

66  
Reg.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

PARTICIPACION DE LOS OSMOLITOS ORGANICOS  
EN LA REGULACION DE VOLUMEN EN CELULAS  
NERVIOSAS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
B I O L O G A  
P R E S E N T A:  
EDITH GONZALEZ GUEVARA



MEXICO, FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

1995

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**M. en C. Virginia Abrín Batule**  
**Jefe de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

**Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:**

Participación de los osmolitos orgánicos en la regulación de volumen en células nerviosas.

realizado por Edith González Guevara.

con número de cuenta 8822925-4 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

**Atentamente**

Director de Tesis

Propietario Dra. Herminia Pasantes Ordoñez.

Propietario Dr. Julio E.R. Morán Andrade.

Propietario M en IBB Jorge Alberto Pérez León.

Suplente M en C Silvestre de J. Alavez Espidio.

Suplente Biol. Víctor Coffe Ramírez.

FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo Departamental de Biología

COORDINACIÓN GENERAL  
DE BIOLOGÍA

Esta tesis se realizó en el laboratorio 202-sur del Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Herminia Pasantes-Morales. Con la ayuda de una beca otorgada por la DGAPA, UNAM con el proyecto No. IN-202093.

**AGRADECIMIENTOS**

**A la Dra. Herminia Vasantes O.  
Por el apoyo recibido durante la  
elaboración de la presente.**

**A el Dr. Roberto Sánchez Oles  
Por el apoyo que siempre me brindó y su  
interés en el trabajo de investigación.**

**A Claudia Peña por brindarme su ayuda y  
conocimientos al igual que su amistad y  
apoyo en los momentos alegres y difíciles  
de mi estancia en el laboratorio.**

**A Claudia Rodríguez por su apoyo en la  
elaboración de esta investigación.**

**A Miguel Hernández por su amistad y por  
mostrarse siempre dispuesto a colaborar  
con esta investigación y, por el apoyo  
técnico que me brindó.**

## INDICE

<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
Transporte de agua y moléculas insolubles.....	1
Difusión y transporte activo.....	3
<b>REGULACION DEL VOLUMEN CELULAR.....</b>	<b>5</b>
El proceso de regulación de volumen en condiciones hiposmóticas.....	7
<b>MECANISMO DE TRANSPORTE DE OSMOLITOS DURANTE EL DRV.....</b>	<b>8</b>
Iones.....	8
Osmolitos orgánicos.....	10
<b>REGULACION DEL VOLUMEN EN EL SISTEMA NERVIOSO.....</b>	<b>11</b>
<b>EL INOSITOL COMO OSMOEFECTOR.....</b>	<b>15</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
<b>MATERIAL Y METODOS.....</b>	<b>19</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSION.....</b>	<b>23</b>
Regulación de volumen en astrocitos.....	23
Liberación de inositol.....	25
Dependencia iónica de la liberación de inositol.....	26
Efecto del calcio.....	28
Similitudes entre la liberación de inositol y la de otras osmolitos activada durante la regulación del volumen en astrocitos.....	31
Efecto de la NEM.....	34
Carácter difusional de la liberación del inositol.....	35
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>39</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>41</b>

## *Introducción*

La membrana plasmática encierra a el contenido celular, mantiene el medio interno constante y comunica a la célula con el medio circundante. Es también un filtro selectivo a través del cual cruzan sólo ciertas moléculas, controla la entrada de nutrientes y la salida del material de desecho. Las membranas biológicas son bicapas lipídicas que constituyen una barrera al paso de la mayor parte de las moléculas hidrosolubles aunque algunas sustancias pueden movilizarse pasando directamente a través de la membrana lipídica. La continuidad de la bicapa lipídica se interrumpe por la presencia de proteínas que constituyen una importante vía alternativa de paso a través de la membrana celular. La mayor parte de esas proteínas son proteínas de transporte. Algunas tienen espacios acuosos y permiten el movimiento libre de algunos iones y moléculas, son los canales proteicos. Otras, denominadas proteínas transportadoras, se unen a las sustancias a transportar y, mediante cambios conformacionales de las moléculas proteicas, mueven las sustancias a través de sus intersticios hacia el lado opuesto de la membrana. Tanto las proteínas transportadoras como los canales proteicos son muy selectivos para el tipo de moléculas o iones a los que permiten atravesar la membrana.

### *Transporte de agua y moléculas insolubles.*

La membrana plasmática de las células tanto animales como vegetales es muy permeable al agua, por lo que cuando exista un gradiente

osmótico entre el interior y el exterior de la célula, se observarán movimientos netos de agua.

El agua atraviesa a la bicapa lipídica fácilmente pasando en gran parte directamente a través de los lípidos. Aunque el agua y otras moléculas muy pequeñas sin carga pueden difundir fácilmente a través de la bicapa lipídica, los iones tales como el hidrógeno, el sodio, el potasio y el cloro, penetran la membrana mucho más despacio. Mientras que el movimiento a través de la membrana de moléculas no cargadas es impulsado por el gradiente de concentración, el de los iones sigue un gradiente electroquímico. Sin embargo, no pueden cruzar las membranas por un mecanismo de difusión ya que pasarían de un medio dieléctrico alto a uno bajo. La causa de la impermeabilidad de la bicapa lipídica a los iones es la carga eléctrica de éstos, que impide su movimiento de dos formas: 1) Por la unión de múltiples moléculas de agua, formando los denominados iones hidratados, con lo que aumenta su tamaño lo que restringe su paso por la membrana y 2) más importante aún, la carga eléctrica de los iones que interactúa con las cargas de la membrana. Por consiguiente, el transporte de iones por la membrana celular sólo sucede en forma significativa a través de canales proteicos (Fushimi, K. y cols., 1993; Solomon y cols., 1984).

Los canales proteicos son vías acuosas a través de los intersticios de las moléculas de proteína. La reconstrucción tridimensional por computadora de algunas de estas proteínas ha demostrado canales en forma de tubo desde el extremo extracelular al intracelular (Know, M. H., y cols., 1995,) . Por consiguiente las sustancias pueden



7

difundir directamente a través de estos canales desde un lado al otro de la membrana.

Los canales tienen selectividad para cationes tales como el sodio, el potasio, el calcio, y los protones o a aniones como el cloruro y el bicarbonato. La activación de los canales responde a distintos tipos de señales: algunos canales son sensibles a cambios de voltaje, o a cambios en la concentración de un ion, otros son modulados por la fosforilación por proteínas cinasas activadas por adenosín monofosfato cíclico (AMPC) o calcio y otros son modulados por tensión en la superficie celular (Grinstein y cols., 1989).

#### *Difusión y transporte activo.*

El transporte de moléculas a través de la membrana celular, ya sea cruzando directamente la bicapa lipídica o bien a través de proteínas, sucede por medio de dos procesos básicos: difusión (también denominado transporte pasivo) o transporte activo. La difusión a través de la membrana celular puede ser difusión simple o difusión facilitada. La difusión simple significa el movimiento cinético de las moléculas y iones a través de los espacios intramoleculares de la membrana, sin necesidad de unión a proteínas transportadoras. La velocidad de difusión viene determinada por la cantidad de sustancia disponible, por la velocidad del movimiento cinético y por el número de aberturas de la membrana. La difusión simple puede suceder siguiendo dos caminos en la membrana celular: a través de los intersticios de la bicapa lipídica y atravesando los canales acuosos de algunas proteínas de transporte.

La difusión facilitada, requiere la interacción de moléculas o iones con una proteína transportadora que los ayuda a cruzar la membrana, pero a diferencia del transporte activo, este mecanismo no requiere energía.

El movimiento de moléculas grandes a través de la membrana celular se logra por medio de acarreadores o transportadores. Estas proteínas transportan a las moléculas gracias a un cambio conformacional de tipo similar al que experimentan las enzimas al interactuar con el sustrato. Los mecanismos de transporte son de diferentes tipos. Puede haber transportadores en los que el flujo de un sustrato está acoplado al flujo de otro en dirección contraria, por medio de otro acarreador. Cuando el flujo es necesariamente acoplado se trata de un intercambiador. En el mecanismo de cotransporte, dos moléculas son transportadas por un mismo acarreador en una misma dirección y en el contratransporte las moléculas transportadas se mueven en dirección contraria, pero asociadas a través del mismo acarreador.

En muchos contra y cotransportadores el movimiento de moléculas está acoplado al flujo de sodio o hidrógeno en una dirección que tiende a disipar su gradiente de concentración, generando así la energía para el transporte. El gradiente de concentración de sodio e hidrógeno se logra gracias a un sistema de transporte activo. La energía necesaria para lograr este transporte se obtiene de la ruptura del ATP, del flujo de electrones en una reacción de óxido-reducción o de la absorción de energía de un fotón en bombas activadas por luz (Stein, 1986). Muchos de los mecanismos que se

han descrito están involucrados en el proceso de regulación del volumen celular que es el tema de este trabajo.

#### **Regulación del volumen celular.**

La regulación del volumen celular es una propiedad de las células animales, y representa la capacidad que tienen las células de adaptarse a cambios en el volumen, que puede ocurrir en distintas situaciones, entre ellas a modificaciones en la osmolaridad del medio circundante. Cuando esto ocurre algunos de los componentes celulares de fluidos circulatorios (sangre, linfa y hemolinfa) están obligados a ajustar su volumen debido a cambios de salinidad de estos líquidos. En la mayor parte de las especies, también las células que forman tejidos poseen esta capacidad de adaptación (Hoffman, E., 1939; Vancey, P. y cols., 1932; Guillae, R. 1933).

En condiciones isosmóticas, las células diferenciadas presentan un cierto volumen determinado por el linaje celular al que pertenecen; es decir, su volumen está en estado estacionario. Cuando el medio extracelular se vuelve hiperosmótico, el volumen celular disminuye como consecuencia de la salida de agua intracelular, obedeciendo a los principios fisicoquímicos ya mencionados. Por el contrario, en un medio extracelular hiposmótico, la célula se hincha por la entrada de agua obligada osmóticamente. En cualquiera de las condiciones anteriores, el aumento o disminución de volumen celular es una consecuencia directa de los flujos de agua que solo obedecen las leyes de la ósmosis, es decir, inicialmente las células se comportan como osmómetros perfectos. Sin embargo, se observa una

tendencia a recuperar el volumen original aún bajo la persistencia de la condición anisométrica. Esta segunda fase de recuperación activa del volumen es lo que se conoce como regulación del volumen celular (Olson y cols., 1986).

La regulación del volumen celular es un proceso complejo que implica varios eventos básicos. En primer lugar, la célula debe ser capaz de detectar los cambios en el volumen; seguido a este evento debe reaccionar al cambio detectado iniciando el proceso regulador que modifique el contenido intracelular de solutos en la dirección necesaria para corregir el cambio en volumen; al final debe recuperar su volumen inicial y desactivar los mecanismos que se activaron durante el proceso regulador.

Los sensores encargados de detectar el cambio inicial en el volumen celular no se han identificado con precisión en ningún tipo celular, aunque los diversos sistemas de segundos mensajeros podrían tener este papel. Una variación en la concentración intracelular del calcio o de algún otro de los elementos de los sistemas de segundos mensajeros podría estar dada en forma pasiva, simplemente por una modificación en su concentración como consecuencia de la entrada de agua. Un sistema de esta naturaleza quedaría automáticamente inactivado al restaurarse la concentración original por la salida de agua durante el proceso de regulación del volumen. Se ha considerado también la participación de los canales sensibles al estiramiento previamente mencionados, aunque la evidencia experimental que sustentaría esta posibilidad, no es muy amplia en este momento (Christensen, O. 1987; Islas, L. y

cols.,1993; Uhl, J. y cols.,1988).

La estructura del citoesqueleto, que en todas las células en la que se ha examinado se modifica con los cambios de volumen celular, parecería ser un sensor natural de estos cambios en el volumen. Esto es particularmente cierto debido a que algunos de los elementos del citoesqueleto de membrana se encuentran asociados directamente con canales iónicos y transportadores, algunos de los cuales podrían participar en los mecanismos de regulación de volumen (Mills, 1987). Sin embargo, hasta la fecha solo hay evidencia de que el cambio en citoesqueleto y el cambio en el volumen celular constituyen epifenómenos, sin que haya podido establecerse una relación directa de causa-efecto.

*El proceso de regulación de volumen en condiciones hiposmóticas.*

Como ya se mencionó, la membrana celular es poco permeable al agua sin embargo, cuando exista un gradiente entre el interior y el exterior de la célula se observarán movimientos netos de agua y en consecuencia un cambio en el volumen celular (Christensen, O. 1987; Islas I. y cols.,1993; Uhl, J. y cols.,1988). En condiciones hiposmóticas, el volumen celular aumenta debido a una rápida entrada de agua, pero casi inmediatamente se desencadenan una serie de mecanismos activos que permiten la recuperación del volumen inicial a pesar de que persistan las condiciones hiposmóticas. Este proceso adaptativo de regulación del volumen, al que nos referiremos en adelante como decremento regulador del volumen (DRV) tiene lugar debido a un cambio en el contenido de solutos

intracelulares osmóticamente activos, de tal manera que la presión osmótica interna tiende a alcanzar el mismo valor que la externa disipando así el gradiente osmótico. Los solutos que intervienen en los mecanismos de regulación pueden ser iones inorgánicos o moléculas orgánicas (Pierce y cols., 1972; Armende y cols., 1980; Perisamy y cols., 1992). Los iones inorgánicos más abundantes en la célula son el potasio y el cloro, su concentración es de 136 milimolar (mM) y 61 mM respectivamente. Son estos iones los que tienen un papel activo en el DRV. Los osmolitos orgánicos son polialcoholes (sorbitol, inositol), aminoácidos (taurina, prolina, glicina, alanina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, GABA), metilaminas, urea, glicerofosforilcolina, betaina y azúcares. Su concentración varía en los distintos tipos celulares. Para aminoácidos, la concentración es alrededor de 50-80 mM y para los polialcoholes de 5.2 mM (Sterns R. y cols., 1993).

#### *Mecanismo de transporte de los osmolitos durante el DRV*

##### *a) Iones*

Los mecanismos de transporte de los iones  $K^+$  y  $Cl^-$ , que varían como ya se mencionó, pueden ser de dos tipos: 1) Cotransportadores electroneutros del tipo de los que se describieron en la sección anterior o 2) vías conductivas electrogénicas (canales). Los transportadores iónicos relacionados con el DRV son el cotransportador de  $K/Cl$  y el de  $Na/K/Cl$  (Hoffman, 1987; Grinstein, 1984). Estos transportadores se han estudiado con detalle y se

7

conoce que son sensibles a una serie de fármacos tales como la furosemida y la bumetanida, los cuales, sobre todo está última, son suficientemente específicos como para constituir una herramienta farmacológica útil para conocer si es éste el mecanismo de movilización de los iones que está funcionando en una determinada condición o tipo celular (Kimelberg, H. K. y cols., 1986). A diferencia de los transportadores electroneutros, el mecanismo de transporte de los iones en respuesta al aumento del volumen celular mediado por canales ofrece algunas dificultades derivadas del hecho de que los inhibidores de los canales catiónicos o aniónicos no son suficientemente específicos. Esto es particularmente cierto para los canales de cloro. (Pasantes-Morales, 1993; Hoffman, E. 1989a; Cala, C. 1990). Los diferentes tipos celulares pueden utilizar uno u otro de los mecanismos descritos, cotransportadores o canales, para regular su volumen. Algunas células epiteliales y eritrocitos utilizan básicamente el cotransporte de  $K^+/Cl^-$  mientras que en otros muchos tipos celulares emplean un mecanismo de transporte a través de canales iónicos. La utilización de transportadores o de canales se refleja en el tiempo que requiere el proceso regulador del volumen. Cuando el cotransportador es el responsable del movimiento iónico la regulación del volumen es muy lenta con una duración en el intervalo de horas, mientras que si se efectúa a través de canales iónicos la respuesta es muy rápida y la regulación tiene lugar entre 10 y 30 minutos, en general. Tanto los transportadores electroneutros como las vías conductoras rápidas permanecen latentes en condiciones isosmóticas y son activadas cuando hay un

cambio a condiciones hiposmóticas. El estado energético de la célula juega un papel importante en la activación de estos mecanismos de transporte iónico, ya que los cotransportadores son directamente dependientes de energía mientras que los canales, en particular los de cloro, son activados directamente por ATP, aunque no es necesaria su hidrólisis para permitir el funcionamiento del canal debido a que es utilizado como ligando (Lauf, 1985; Hoffman, 1987).

La regulación de volumen mediante osmolitos inorgánicos se relaciona con el mantenimiento del pH intracelular. Durante el proceso de la regulación de volumen el intercambiador Cl/NaHCO<sub>3</sub> transporta a este último al interior celular, el cual toma protones formando agua y CO<sub>2</sub>, el cual se pierde a través de la membrana este sistema y el intercambio Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> permiten amortiguar a el pH intracelular (Kimmelberg-Frangakis 1986a).

*b) Osmolitos orgánicos.*

Los mecanismos de movilización de los osmolitos orgánicos, aminoácidos, polialcoholes y aminas, no están totalmente identificados. En el caso de los aminoácidos se ha demostrado que los sistemas de transporte dependientes del gradiente de sodio no participan de manera prominente en el mecanismo de regulación. En cambio, se ha demostrado que la movilización tiene lugar a través de un proceso de difusión en el que la dirección del movimiento de estos osmolitos, activado por el cambio en volumen, está dada solamente por el gradiente de concentración (Pasantes-M. 1993).



Brevemente se ha demostrado que el movimiento de los aminoácidos en respuesta al cambio en el volumen celular se inhibe por fármacos inhibidores de los canales de cloro. Estas dos circunstancias, su carácter pasivo y su sensibilidad farmacológica, han hecho que se considere la hipótesis de que los aminoácidos tanto aquellos que tienen carga neta como los que no la tienen, se movilizan a través de canales, similares o idénticos a los canales aniónicos (Sánchez-Olea y cols., 1993).

#### *Regulación del volumen en el sistema nervioso.*

Las primeras observaciones en relación con procesos de regulación del volumen en el sistema nervioso fueron hechas por Chan y Fishman en 1990, quienes observaron que la hipernatremia o la hiponatremia (condiciones en las que existe una disminución o un aumento respectivo en las concentraciones de sodio), producen cambios en las concentraciones de osmólitos en el cerebro. En estas investigaciones en particular, se detectaron cambios importantes en los niveles de aminoácidos y especialmente en los de la taurina, que en los ratones, que fue la especie utilizada en estos experimentos, se encuentra en concentraciones particularmente elevadas en el cerebro. Los cambios observados en los niveles de aminoácidos así como los de iones orgánicos tienen lugar en la dirección necesaria para restaurar el volumen celular, es decir que disminuyeron en la hiponatremia debido a su salida y se incrementaron en la hipernatremia debido a la entrada de los mismos (Thurson, J. y cols., 1980; Verbalie, J. y cols., 1991; Carr, H. y

cols., 1987). Estudios posteriores llevados a cabo por distintos grupos sugieren, que cuando los cambios en volumen son muy notables, el movimiento de los iones precede ligeramente en el tiempo al de los osmolitos orgánicos (Solis, J. y cols., 1988; Lav, R. y cols., 1990; Wade, J. y cols., 1988).

La movilización de los aminoácidos en respuesta a condiciones hiposmóticas ha sido estudiada en el sistema nervioso en preparaciones de distinto nivel de organización, desde terminales sinápticas aisladas hasta el cerebro completo. En todos los casos los resultados son semejantes y muestran una disminución en los niveles celulares de varios aminoácidos, preferentemente taurina, glicina, alanina y el ácido glutámico. En estudios en el cerebro en vivo, mediante técnicas de microdialisis, se puede advertir que los aminoácidos que disminuyen en el compartimiento intracelular son liberados hacia el extracelular. Esta observación es interesante ya que, en el caso del ácido glutámico y otros aminoácidos excitadores, el incremento en su concentración en el medio extracelular puede conducir a un cuadro de daño neuronal por excitotoxicidad. Estos dos fenómenos, aumento en volumen y excitotoxicidad, se observan consistentemente en los cuadros de isquemia, por lo que no se puede excluir la posibilidad de que el daño excitotóxico en esta condición pueda deberse a la liberación de aminoácidos excitadores en respuesta al cambio en volumen.

Los estudios que se lleven a cabo en preparaciones complejas, como en rebanadas de tejido o en el cerebro completo, no permiten determinar las características en los cambios en volumen y los

respuestas celulares en los distintos tipos de células que coinciden en estas preparaciones. Los sistemas de células nerviosas en cultivo, en cambio, han resultado particularmente útiles para este tipo de estudios ya que presentan la característica de homogeneidad del tipo celular, que permite, a diferencia de lo que ocurre en las poblaciones mixtas del cerebro completo, examinar las posibles semejanzas o diferencias en la respuesta al cambio de volumen entre los distintos tipos celulares.

Las características de la regulación del volumen y de los osmolitos que participan en este proceso en el sistema nervioso pueden ser distintos de los que se observan en otros tejidos, sobre todo considerando el papel clave que juegan los iones inorgánicos en el mantenimiento de la excitabilidad neuronal y en la respuesta nerviosa a los estímulos fisiológicos. Es posible entonces que en las células nerviosas los osmolitos orgánicos tengan un papel especialmente importante en los mecanismos de regulación de volumen (Schousboe, A. y cole., 1989; Sachin, K. 1989).

El conocimiento con detalle de los mecanismos de regulación del volumen en el cerebro es de particular importancia, ya que existen numerosas neuropatologías que llevan asociado un componente de edema celular. Una de ellas es la ya mencionada muerte celular por isquemia y otras más son la epilepsia, la encefalopatía hepática y los traumatismos craneoencefálicos. Puesto que el cerebro, al estar contenido dentro del cráneo, está sujeto a una restricción en la expansión de sus elementos celulares, el edema cerebral que se presenta en estas patologías es una complicación clínica grave, en

ocasiones más importante que la propia patología que lo originó. En todos estos casos se ha observado que son los astrocitos, más que las neuronas, las células que cambian su volumen en respuesta a cambios de la osmolaridad del plasma o del espacio extracelular cerebral (Kimelberg y cols., 1986b; Kimelberg y cols., 1990). Todavía no se conoce si esta diferencia entre astrocitos y neuronas se debe a que las neuronas tienen la capacidad de regular su volumen más rápidamente que los astrocitos, o bien que tienen mecanismos que impiden el cambio en el volumen celular en las condiciones patológicas señaladas (Pasantes-M. y cols., 1988; Pasantes-M. y cols., 1993; Lehman, A. y cols., 1987; Schousboe, A. y cols., 1989; Sachin, H. 1989).

Las condiciones experimentales utilizadas para inducir el DRV como la exposición a medios hiposmóticos no se presentan en general en condiciones fisiológicas. Sin embargo, es cierto que existen numerosas situaciones durante la función de las células nerviosas tales como depolarizaciones o hiperpolarizaciones, en las que se generan gradientes osmóticos microscópicos, locales y transitorios, los que producen cambios de volumen que requieren corrección para evitar la alteración de la complicada citoarquitectura neuronal. Esto es de la mayor importancia si se considera que para la interacción eficiente de las redes neuronales, es necesario que se mantenga la topografía específica de los distintos elementos que las constituyen.

Todas estas consideraciones hacen que el conocimiento con detalle de los mecanismos implicados en la regulación del volumen celular

sea un aspecto importante en la fisiología y la patología del cerebro.

#### *El inositol como osmoefector*

El inositol (hexahidroxiciclohexano) es un isómero de la glucosa. Hay siete formas posibles de inositol ópticamente activas, estereoisoméricas, de las que únicamente una, el *myo*-inositol ópticamente inactivo, es nutricionalmente activo.

El papel fisiológico del inositol como componente de los segundos mensajeros está bien estudiado. Sin embargo, no está claro el requerimiento de concentraciones elevadas de inositol, en el orden de  $\mu\text{M}$ , que están presentes en muchos tipos celulares. La concentración plasmática de inositol en el humano es de 0.5  $\mu\text{g}/\text{dl}$ . Dentro de los tejidos la concentración de inositol es muy alta: en el músculo cardíaco 9.24; el cerebro 3.2 y el músculo esquelético 2.3  $\mu\text{M}$  con respecto a la concentración plasmática.

Considerando estas características existe la posibilidad de que el inositol funcione como un osmoefector debido a las características que comparte con los aminoácidos que funcionan como osmolitos.

La participación del inositol en los mecanismos de la regulación de volumen se estudió inicialmente en epitelios renales. Su concentración en estas células es alrededor de 93  $\text{mmol}/\text{kg}$  de proteína y los primeros estudios se dirigieron a conocer la función del inositol como osmolito en respuesta a un aumento en la osmolaridad del medio, es decir en el proceso de incremento regulador del volumen (IRV). Estas investigaciones demostraron que

efectivamente, el inositol participa en la corrección del volumen en la células expuestas a medios hiperosmóticos aumentando sus niveles intracelulares (Strange, K. y cols., 1991).

Este aumento se debe a la activación de dos mecanismos distintos, uno que funciona a corto plazo que es la estimulación del transporte activo del polialcohol y otro que actúa a largo plazo que consiste en el aumento de la concentración de las enzimas de la vía metabólica de síntesis del inositol. En la línea celular epitelial Madin-Darby canine kidney (MDCK), se ha observado un aumento en la cantidad de ácido ribonucleotido mensajero (RNAm) para el transportador de inositol en condiciones de hiperosmolaridad (Banderalli 1992).

Sólo recientemente se ha comenzado a examinar el papel del inositol en el DRV. En las células renales, el inositol se libera en respuesta a un aumento en volumen en células expuestas a condiciones hiposmóticas, al igual que sucede con otras moléculas orgánicas, como los aminoácidos. En el sistema nervioso, el posible papel del inositol como osmolito asociado a los cambios correctores del volumen se documentó a partir de las investigaciones que mostraron modificaciones en su concentración en el cerebro durante hipernatremia o hiponatremia, observándose que, los niveles de inositol en el cerebro aumentan en el primer caso y disminuyen en el segundo como era de esperarse (Tratchman, M. y cols., 1991). La concentración de inositol en el cerebro, que es de 3.2 mM, permite suponer que forma parte del conjunto de osmolitos orgánicos que funcionan en la regulación del volumen en el cerebro.

Los astrocitos tienen concentraciones de inositol que varían de 40-60 mM y al igual que en las células renales el inositol participa en el incremento regulador del volumen en los astrocitos expuestos a condiciones hiperosmóticas, posiblemente mediante los mismos mecanismos. Se ha encontrado que la respuesta de los astrocitos al medio hiperosmótico, en lo que se refiere al inositol, es una activación del mecanismo de transporte activo, que se traduce en un aumento progresivo de sus niveles intracelulares que puede llegar a ser hasta de dos o tres veces la concentración que se encuentra en condiciones isosmóticas. La participación del inositol en la regulación de volumen subsecuente al incremento producido al exponer a los astrocitos en condiciones hiposmóticas está menos estudiado. Existe un reporte en la línea celular tumoral glial C6, en el que se estudió la movilización de inositol en un modelo de aumento del volumen celular producido al transferir las células de un medio hiperosmótico a un medio hiposmótico (Strange, K. 1993). El conocimiento de su participación como osmólito en astrocitos en cultivo y las características de su movilización en respuesta al cambio en volumen en condiciones hiposmóticas, es el objetivo de esta investigación.

#### **OBJETIVO GENERAL**

Este trabajo se inserta dentro del objetivo general, que es el de contribuir a caracterizar a el mecanismo de movilización de los osmolitos orgánicos durante el proceso de regulación del volumen en astrocitos en cultivo.

#### **OBJETIVO ESPECIFICO**

El objetivo específico de este trabajo es examinar las propiedades del flujo de inositol asociado con el decremento del volumen celular en astrocitos de cerebelo de rata en cultivo, expuestos a condiciones hiposmóticas.



## **Materiales y métodos.**

### **Soluciones y reactivos**

La solución isosmótica contiene en mM: 135 NaCl, 5 KCl, 0.6 MgSO<sub>4</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 10 glucosa y 10 ácido N-2-hidroxipiperasina-N'-2-2-hidroxipiperasina-N'-2-etanosulfónico (HEPES), a pH 7.4. Las soluciones hiposmóticas se prepararon disminuyendo la concentración de NaCl de 300 miliosmoles (mOsm) en un medio isosmótico a 150 mOsm en un medio hiposmótico 50 %.

Los medios libres de Ca<sup>++</sup> fueron preparados omitiendo el Ca<sup>++</sup> de la solución y agregando ácido etilen glicol-bis (B-aminostil eter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA) (0.5 mM) o ácido 1,2-bis-(o-aminofenoxi)-etano-N;N;N',N'-tetraacético (BAPTA) (0.5 mM) El derivado del BAPTA el ácido [1,2-bis-(o-aminofenoxi)-etano-N,N,N',N'-tetraacético tetra-(acetoximetil)-ster] BAPTA AM fue usado como un quelante de calcio intracelular. El medio libre de cloro se preparó reemplazando todas las sales de Cl<sup>-</sup> por sales de gluconato. El medio libre de sodio se preparó reemplazando el Na<sup>+</sup> por colina. Se utilizaron los siguientes bloqueadores de canales de Cl<sup>-</sup>: ácido 5-Nitro-2-(3-fenilpropilamino) benzoico (NPPB), 1,9-dideoxiforskolina (DDF), ácido diisotiocianatostilben-2,2'-disulfónico (DIDS) y ácido niflúmico. Cuando se necesitó un vehículo para disolver las drogas, se empleó dimetilsulfóxido (DMSO) y en estos casos, se colocó la misma cantidad del vehículo a las soluciones control.

### **Cultivos celulares:**

Todos los experimentos se realizaron con cultivos primarios de astrocitos obtenidos del cerebelo de ratas Wistar de 8 días, y crecidos a confluencia en condiciones de esterilidad (Morán y Patel., 1989). Para realizar los cultivos, se disociaron las células cerebrales de las ratas y se sembraron a una densidad de 700 000 a 1 000 000 células/ml de medio, en cajas de Petri de 35 mm de diámetro para los experimentos de liberación de inositol estimulada por hiposmolaridad, y en cajas de petri de 60 mm de diámetro para experimentos de cuantificación de inositol endógeno. En este trabajo se utilizaron astrocitos de 2 a 4 semanas in vitro (D.I.V.) es decir, siempre después de haber alcanzado la confluencia. A las 4 semanas las células todavía son viables y no presentan alteraciones de ninguna índole. Las células fueron sembradas en un medio basal Eagle, complementado con 10 % de suero fetal bovino inactivado por calor, glutamina 10 mM, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomicina. Las células se incubaron a 37 °C en atmósfera húmeda y una mezcla de 5 % CO<sub>2</sub> y 95 % de O<sub>2</sub>. La pureza del cultivo se determinó por inmunofluorescencia mediante anticuerpos policlonales contra marcadores específicos de fibroblastos como la Thy-1 para observar que no se encuentran presentes. De acuerdo a estas determinaciones se obtuvieron cultivos astrogiales compuestos en un 95-97 % de astrocitos.

### *Liberación de inositol.*

#### *Sistema de perfusión.*

Para estudiar la liberación de  $^3\text{H}$ -inositol las células se perfundieron de acuerdo a la técnica descrita por Drejer y Cols., 1987. Los astrocitos crecidos en cajas de petri de 35 mm se incubaron con 2  $\mu\text{Ci/ml}$  de  $^3\text{H}$  inositol en el medio de cultivo durante 60 minutos, al terminar la incubación, el medio de cultivo se sustituyó por el medio isosmótico (300 mOsm) antes descrito. Después de sustituir a el medio de cultivo, se colocó un filtro delgado de seda para lograr una perfusión homogénea del medio sobre la monocapa. Las células se colocaron en un sistema de perfusión en el que a una velocidad de 2 ml/min dos bombas peristálticas de manera sincrónica; una de ellas deposita 2 ml de medio, mientras que la segunda retira la misma cantidad de medio de las células a la misma velocidad. Las células se perfundieron con medio isosmótico durante 5 minutos; una vez obtenida la liberación basal, el medio se cambió por un medio hiposmótico reduciendo la osmolaridad en la forma indicada para cada uno de los experimentos, durante 15 minutos. Al final de cada experimento, se midió la radioactividad de las muestras colectadas y la de el tejido en un contador de centelleo para muestras líquidas. Los resultados se expresaron como porcentaje del total liberado en cada fracción respecto a la radioactividad acumulada por las células durante el tiempo de incubación con el inositol radiactivo, es decir, la radioactividad liberada más la remanente en las células al final

del experimento.

#### *Contenido celular de inositol.*

El inositol fue extraído de los astrocitos por un tratamiento con ácido perclórico al 6 %. Las proteínas precipitadas por el tratamiento se separan por centrifugación de los extractos que contienen el inositol. Estos extractos fueron neutralizados con KOH 3 M, el inositol contenido en los extractos se midió por la técnica de Weissbach. Esta técnica se basa en la reacción de la enzima inositol deshidrogenasa (IDH) con el inositol. En presencia de NAD y de la enzima se forma la 2,4,6/3,5 pentahidroxiciclohexanona + NADH + H. En estas condiciones, la reacción no se lleva a cabo completamente, pero la formación máxima de NADH es proporcional a la concentración de inositol. El NADH formado se mide por espectrofotometría, observando los cambios en absorbancia a 339 nm. Después de haber realizado las lecturas en el espectrofotómetro, se procede a calcular la concentración de inositol por medio de la curva de concentración patrón y los resultados se expresan de acuerdo a la cantidad de proteína obtenida de la muestra determinada por el método de Bradford (Weissbach, A. 1974).

## **Resultados y Discusión**

### **Regulación de volumen en astrocitos.**

Al ser expuestos a un medio hiposmótico (50 %) los astrocitos en cultivo se comportan inicialmente como osmómetros perfectos es decir aumentan rápidamente su volumen celular a medida que se ajustan la presión osmótica del compartimiento intracelular al nuevo gradiente osmótico impuesto. Así el volumen de los astrocitos que en un medio isosmótico es aproximadamente de 1.2 picolitros se incrementa hasta alcanzar un 65 a 70 % por encima de este volumen inicial (Fig.1). El máximo aumento en volumen se alcanza entre 30 y 60 segundos después de la exposición al medio hiposmótico. A continuación se inicia una fase más lenta de regulación durante la cual las células tienden a recuperar su volumen inicial en un periodo de aproximadamente 15 min. En este proceso de regulación pueden advertirse claramente dos pendientes, un mayor en la que el decremento del volumen es más rápido, que tiene lugar entre 1 y 6 minutos y una menor en la que el volumen se recupera más lentamente que tiene lugar entre el minuto 6 y el 20. La recuperación sin embargo no es completa, ya que el valor original en condiciones isosmóticas no se alcanza aún después de tiempos más prolongados, hasta de 60 min (Fig 1). Las células pueden volver a este volumen original sin embargo, si se restauran las condiciones isosmóticas. Tanto el incremento en el volumen inicial, como la eficiencia del proceso regulador, están en función del decremento de osmolaridad. Cuando la osmolaridad se reduce en un 50 % el aumento en volumen es

de cerca de 70 % y la regulación es de aproximadamente el 80 % es decir, las células recobran su volumen en un 80 %. Cuando las células son expuestas a soluciones de osmolaridad disminuida en un 30 % el volumen celular aumenta solo 37 % y la recuperación es de 92 %. Una reducción de 15 % de osmolaridad produce un aumento de 23 % en el volumen y al cabo de 15 minutos la recuperación es completa (Fig 1). Estos resultados nos permiten observar que a pesar de que las condiciones de hiposmolaridad están presentes, las células regulan su volumen, debido probablemente a la salida de osmolitos.

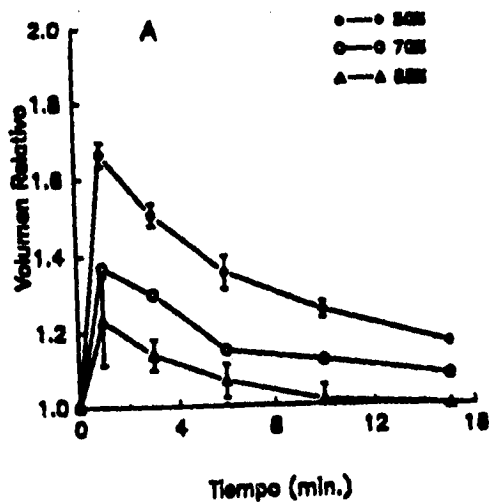


Fig. 1. Regulación de volumen. Esta figura muestra los cambios en el volumen de los astrocitos en cultivo al ser expuestos a diferentes condiciones hiposmóticas, respecto al tiempo. Se observa el hinchamiento de las células al ser expuestas a condiciones de hiposmolaridad y el regreso a su volumen aún en condiciones de hiposmolaridad.

### *Liberación de inositol*

La figura 2 muestra la liberación de inositol  $^3\text{H}$  que se ha incorporado a la poza intracelular en condiciones isosmóticas y después de la estimulación con una solución 50 % hiposmótica. En condiciones isosmóticas la liberación de inositol es de aproximadamente 4 % por minuto (Fig.2). Al ser estimuladas con el medio hiposmótico la liberación de inositol se aumenta rápida y notablemente, alcanzando un valor de 2.7 % por minuto en el pico de liberación. La máxima liberación se alcanza alrededor de 4 min después del estímulo e inmediatamente después comienza a disminuir gradualmente mostrando dos fases de inactivación: una rápida, que va del minuto 8 al 12, durante la cual la liberación de inositol es de aproximadamente 1 a 2 % por minuto, y otra fase lenta, que ocurre entre el minuto 12 y el 20, en la cual la liberación del inositol es mucho menor (fig 2). Es interesante hacer notar que el curso temporal de la salida del inositol ocurre en forma paralela a los procesos de cambio del volumen, es decir, un aumento inicial y la disminución progresiva en dos fases como se observó en la fig 1. La liberación del inositol está en función del decremento en la osmolaridad. En condiciones de reducción de un 50 % en la osmolaridad los astrocitos liberan durante el proceso de regulación aproximadamente el 10 % del total contenido en la célula. Cuando la osmolaridad se reduce en un 70 % esta cantidad sube a cerca del 13 %, con decrementos menores en la osmolaridad la proporción de inositol liberado disminuye, y no se advierte ningún incremento en su salida cuando la osmolaridad disminuye 15 % (Fig 2).

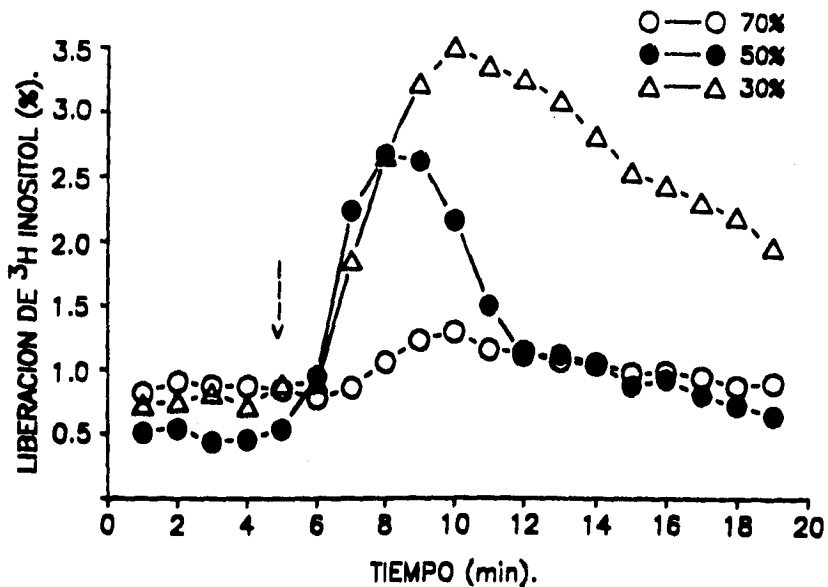


Fig. 2. Liberación de inositol. Relación entre el grado de hiposmolaridad y la liberación de [ $^3\text{H}$ ] inositol en astrocitos en cultivo. La flecha indica el momento de la estimulación con el medio hiposmótico reduciendo el 30, 50, y 70 % en la osmolaridad. Se observa el curso temporal de la salida de inositol.

*Dependencia iónica de la liberación de inositol.*

La movilización de inositol estimulada por un medio hiposmótico (50%) aumentó ligeramente, cerca del 25 %, cuando el sodio del medio se reemplazó con colina (Fig 3). Este aumento se debe posiblemente a que, en presencia de colina, las células incrementan ligeramente su volumen, en comparación con el que presenta en un



medio conteniendo sodio. Cuando se reemplaza a el cloro del medio extracelular por el anión impermeable gluconato, el resultado es una disminución en la liberación del inositol de aproximadamente 24 %. Este cambio puede también relacionarse con un cambio en el volumen celular, que se sabe que disminuye en presencia de aniones impermeables como el gluconato. Estas características son similares a las que presentan algunos aminoácidos que sirven a la célula como osmólitos, y con los cuales puede llevar a cabo la regulación de volumen.

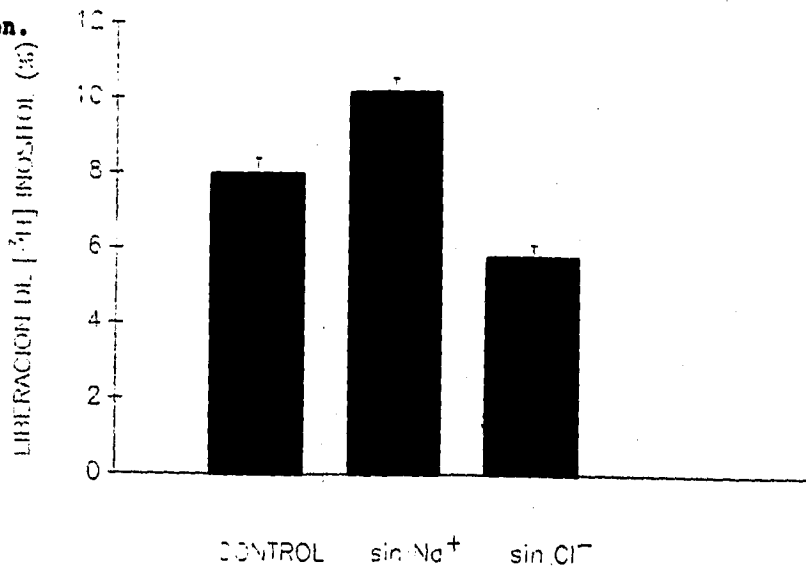
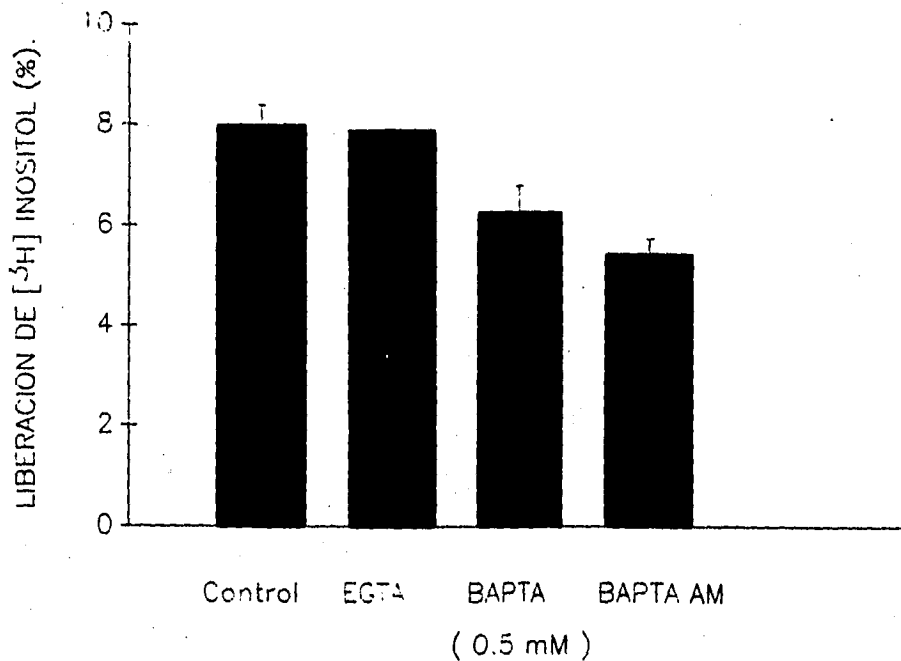


Fig. 3. Dependencia iónica de la liberación de  $[^3\text{H}]$  inositol en astrocitos en cultivo. La dependencia de cloro en la liberación de inositol estimulada por condiciones hiposmóticas es mayor que la dependencia de sodio para la liberación de  $[^3\text{H}]$  inositol, esto es una semejanza con las características de liberación de otros aminoácidos que tienen el papel de osmólitos.

### **Efecto del calcio**

La liberación de inositol no se modificó en medios libres de calcio. Estos medios se prepararon omitiendo a el cloruro de calcio que normalmente forma parte de las soluciones de trabajo y, agregando los quelantes EGTA y BAPTA a una concentración de 0.5 mM. En algunos casos, en presencia de BAPTA, se observó un decremento en la liberación de inositol dependiendo del tiempo de preincubación con el quelante, de modo que se observó una reducción del 22 % en la liberación del inositol cuando las células se preincubaron durante 10 minutos en presencia del quelante. Este efecto del BAPTA, dependiente del tiempo, sugiere que en estas condiciones haya una movilización del calcio intracelular hacia afuera de la célula, lo que daría como resultado una disminución neta en la concentración de calcio intracelular, la cual sería a su vez la responsable de la disminución en liberación del inositol. Para investigar esta posibilidad se examinó el efecto del BAPTA AM, un compuesto hidrofílico que, debido a su esterificación a diferencia del BAPTA es capaz de penetrar la membrana y llegar al espacio intracelular. Una vez en este compartimiento, las esterasas de la célula transforman el BAPTA AM en BAPTA con la capacidad de actuar como quelante de calcio, la figura 4 muestra que efectivamente el BAPTA AM disminuye la liberación de inositol asociada al cambio en volumen en un 30 %. En conjunto, estos resultados sugieren que la liberación de inositol es parcialmente dependiente de la presencia del calcio intracelular. En este

entido es conveniente señalar que la participación del calcio en los mecanismos de regulación de volumen en los astrocitos es especialmente controvertida. En nuestras manos, el proceso de regulación del volumen es totalmente independiente de la presencia de calcio extracelular y solo parcialmente (30%) dependiente del calcio intracelular, medido por la acción de quelantes como el BAPTA AM o de inhibidores de los movimientos de calcio de posas intracelulares como el dantroleno, estos datos han sido observados en este laboratorio. Otro autores han reportado resultados contradictorios indicando ya sea una independencia total del calcio extracelular del proceso regulatorio del volumen o una dependencia solamente en presencia de concentraciones muy elevada de EGTA superiores a 2 mM, las que se conoce que pueden causar daño membranal y una consiguiente fuga de solutos a través de la membrana dañada.



**Fig. 4. Efecto del calcio. Efecto de los quelantes de calcio EGTA, BAPTA y BAPTA AM (0.5 mM), sobre la liberación de [<sup>3</sup>H] inositol en astrocitos en cultivo. Se observa que la liberación de inositol no se afecta cuando el quelante de calcio EGTA se encuentra en el medio, en cambio cuando el quelante de calcio es el BAPTA, la liberación de inositol se ve disminuida y, cuando se utiliza BAPTA AM como quelante, se observa una disminución mayor en la liberación de [<sup>3</sup>H] inositol.**

***Semejanzas entre la liberación de inositol y la de otros osmolitos activada durante la regulación del volumen en astrocitos.***

El proceso de la regulación del volumen se inhibe en forma muy importante por la acción de bloqueadores de canales de cloro tales como el ácido niflúmico, el DIDS, la DDF, y el NPPB. En presencia de algunos de estos bloqueadores la inhibición de la regulación del volumen es prácticamente total por lo que es difícil considerar que su efecto esté restringido a bloquear los movimientos del cloro. Si se considera que los osmolitos orgánicos como los aminoácidos y los polialcoholes contribuyen cuando menos con un 30 % al proceso regulador (Pasantes-Morales, H., y cols., 1995a), la inhibición total observada en presencia de los bloqueadores de canales de cloro sugiere que estos compuestos podrían tener también un efecto inhibitorio sobre la movilización de los osmolitos orgánicos. En trabajos anteriores se ha demostrado que éste es precisamente el caso para los aminoácidos libres, cuya liberación se inhibe de manera importante por los bloqueadores de canales de cloro (Pasantes-Morales, H., y cols., 1995b). En la fig 5 se muestra que, al igual que los aminoácidos, la liberación de inositol en respuesta al aumento de volumen celular de los astrocitos es muy sensible a los inhibidores de los canales de cloro. El inhibidor más potente fue el NPPB el cual, a una concentración de 100  $\mu$ M, inhibió 83 % la salida del inositol. Los otros inhibidores en orden de potencia fueron la DDF (100  $\mu$ M) que inhibe 70 %, el DIDS 69 % y el ácido niflúmico, que fue el menos potente e inhibió el 60 % a

una concentración de 600  $\mu$ M. Las concentraciones utilizadas son mucho menores que las utilizadas por otros investigadores que son en algunos casos del orden de 1 mM (Kinzelberg, H.K., y cols., 1986a). Ninguno de estos inhibidores modificó en ningún caso la liberación de inositol en condiciones isosmóticas. Estos resultados sugieren una estrecha vinculación entre los mecanismos de liberación de los distintos osmolitos que participan en la regulación del volumen de los astrocitos. Con base en la semejanza y en la susceptibilidad farmacológica de los flujos de cloro, de los aminoácidos y ahora del inositol en el presente trabajo, se pueden considerar dos posibilidades:

- 1) Que los distintos tipos de osmolitos, a pesar de su diferencia estructural, se movilicen a través de una misma vía sensible a los bloqueadores de canales de cloro, y
- 2) Que estos inhibidores no estén actuando directamente sobre la vía de permeabilidad activada por el aumento del volumen, sino que su acción tenga lugar sobre una señal o mecanismo de activación común a las vías de transporte de los diversos osmolitos. En este momento, puesto que ninguno de los sistemas de transporte ha sido caracterizado hasta el punto de que pueden hacerse ensayos funcionales en sistemas artificiales de bicapas lipídicas, no es posible discriminar entre estas distintas posibilidades.

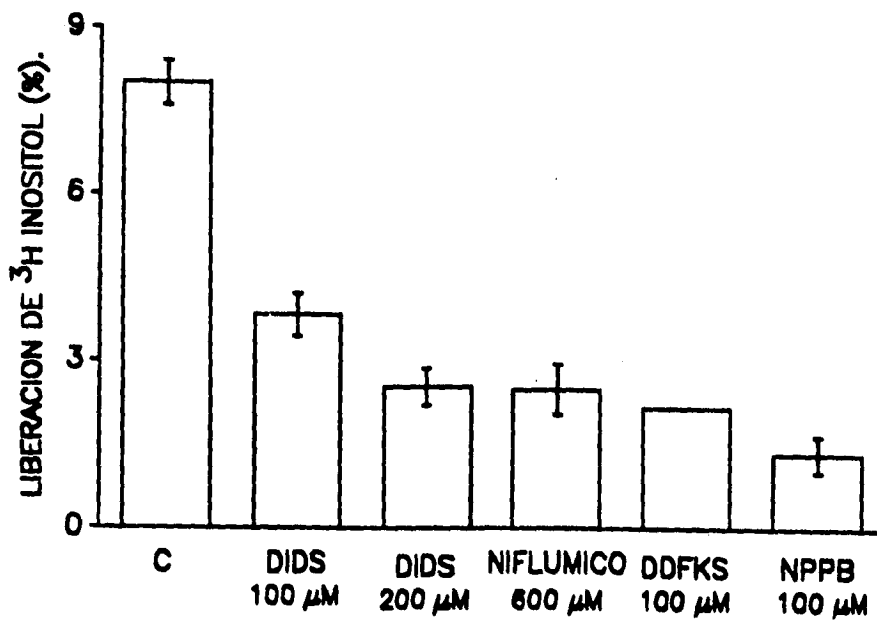


Fig. 5. Efecto de inhibidores de canales de cloro sobre la liberación de [<sup>3</sup>H] inositol en astrocitos en cultivo. El efecto de estos inhibidores de canales de cloro en la liberación de inositol es semejante al observado en la liberación de otros osmolitos lo que hace suponer que el inositol puede ser un osmolito que se moviliza por la misma vía de salida de otros osmolitos.

### *Efecto de la NEM*

El reactivo bloqueador de grupos sulfidrilo N-etilmaleimida (NEM) tiene un efecto inhibitor muy potente sobre la liberación de aminoácidos y de cloro en respuesta al estímulo hiposmótico. Considerando que la movilización del inositol en respuesta a estas mismas condiciones tiene lugar a través de una vía similar o idéntica a la de los otros osmolitos, debería esperarse que este reactivo mostrara también un efecto inhibitor notable en la salida de inositol estimulada por hiposmolaridad. La figura 6 muestra que efectivamente éste es el caso, ya que la NEM a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  bloquea casi por completo la liberación de inositol. La  $\text{IC}_{50}$  calculada a partir de esta curva es de 22  $\mu\text{M}$ . Este efecto de la NEM es específico sobre la liberación de inositol estimulada por el cambio en volumen celular ya que a ninguna concentración se observó un efecto inhibitor de la salida basal en medios isosmóticos (Fig 6).



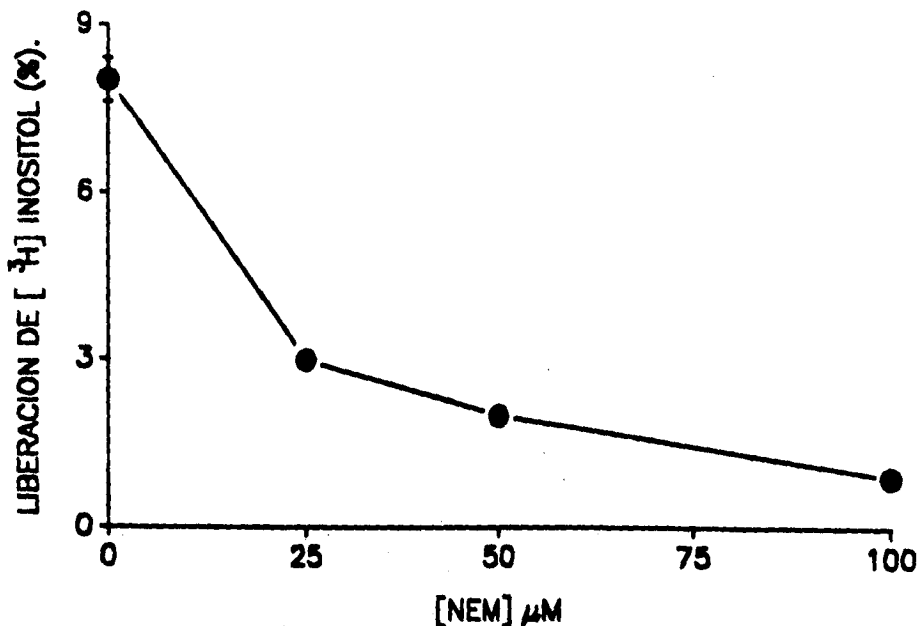


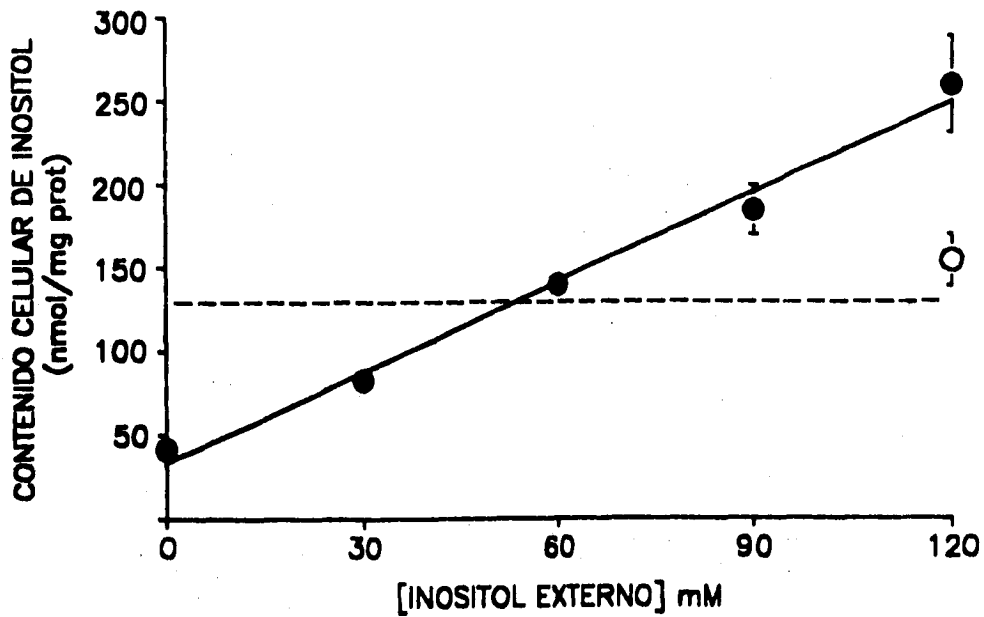
Fig. 6. Efecto del reactivo bloqueador de grupos sulfidrilo (NEM) sobre la liberación de [ $^3\text{H}$ ] inositol en astrocitos en cultivo. Los astrocitos fueron incubados con la NEM durante 5 minutos antes de la perfusión y después perfundidos como se describe en los métodos. La gráfica representa el promedio de 4 experimentos, en los puntos en los que el error estándar no se observa es porque es menor al tamaño del símbolo.

*Caracter difusional de la liberación del inositol.*

La mayor parte de las células, incluidos los astrocitos, muestran un mecanismo de transporte activo de inositol que es dependiente de la energía obtenida por el gradiente transmembranal de sodio. Sin

embargo, la observación hecha en el presente trabajo, de que la liberación de inositol dependiente del volumen no se modifica en ausencia de sodio, una condición en la cual la función del transportador está detenida, sugiere que la participación de éste en la salida asociada a la regulación del volumen no es importante. Es posible entonces que la vía de permeabilidad asociada a la regulación del volumen sea una vía difusional. Para investigar esta posibilidad, en el presente trabajo examinamos el movimiento de inositol cuando los astrocitos se expusieron a una solución hiposmótica, pero en presencia de concentraciones crecientes de inositol en el medio extracelular. La hipótesis subyacente en estos experimentos es que, si la movilización del inositol durante la regulación del volumen ocurre a través de una vía difusional, la dirección del movimiento del inositol estará dada únicamente por el gradiente de concentración, es decir el osmolito se moverá hacia adentro o hacia afuera de la célula, dependiendo de las concentraciones relativas en cada compartimiento. La fig 7 muestra, que en efecto, cuando el medio extracelular no contiene inositol, al abrirse la vía de permeabilidad en condiciones hiposmóticas el movimiento del inositol va del compartimiento en donde se encuentra más concentrado (intracelular) hacia donde está menos concentrado (extracelular) y el resultado neto es una liberación de inositol. Cuando la concentración del osmolito en el medio extracelular es similar a la del interior de la célula, lo que ocurre alrededor de 60 mM, el choque hiposmótico no da como resultado un movimiento neto de inositol, de manera que la concentración intracelular no

cambia y no se ve liberación al medio extracelular. Finalmente, cuando la situación es inversa al primer caso, es decir, cuando la concentración de inositol en el medio extracelular es claramente superior a sus niveles intracelulares, al abrirse la vía sensible a volumen se observa una entrada neta de inositol, hacia el interior de la célula tendiente a equilibrar su concentración en los dos compartimientos. Sin embargo, en los experimentos ilustrados en la fig 7 observamos que este equilibrio no se alcanza en el tiempo del experimento que es de 15 minutos, ya que la concentración intracelular alcanzada es claramente menor que la que se encuentra en el exterior. Estos resultados indican que la vía de permeabilidad para el inositol en condiciones hiposmóticas es una vía difusional, la cual sin embargo permite la movilización del inositol sólo en forma lenta. Estos resultados coinciden con los reportados por Isaaks y cols., 1994, quienes observaron que el vaciamiento de la poza del inositol en condiciones hiposmóticas requiere periodos largos hasta de tres horas.



**Fig. 7. Niveles de inositol intracelular en astrocitos expuestos a un medio hiposmótico al 50 % y en presencia de condiciones elevadas de *myo*-inositol en astrocitos en cultivo. La línea punteada indica el contenido de inositol en condiciones isosmóticas y, la línea continua representa la condición hiposmótica en presencia de concentraciones elevadas de inositol extracelular. Esta gráfica nos muestra que a mayor concentración extracelular de inositol en condiciones hiposmóticas, aumenta la concentración de inositol intracelular.**

### *Conclusiones*

Estos resultados y los del presente trabajo, indican que la participación del inositol en los mecanismos de regulación del volumen en los astrocitos es un proceso a largo plazo, distinto en cierto modo del que tienen a su cargo otros osmolitos, como los aminoácidos y posiblemente los iones orgánicos. En el caso de los aminoácidos, un experimento similar al descrito en el presente trabajo, hecho para la taurina, muestra que, al contrario de lo que ocurre con el inositol, las concentraciones de taurina en los compartimientos intracelular y extracelular se equilibran muy rápidamente, en el intervalo de unos cuantos minutos (Sánchez-Olea, R., 1991). En el mismo sentido, si se comparan la cantidad neta de taurina que se sale de las células durante los primeros 15 minutos, que es del 80 %, con la del inositol que en este mismo intervalo es sólo del 12 %, se advierte que la permeabilidad de la vía que se abre por hiposmolaridad es muy distinta para los dos osmolitos. Estos resultados sugieren que la participación del inositol en los mecanismos de regulación del volumen es más importante en la fase de incremento regulador del volumen, es decir en el proceso de regulación que opera cuando las células se encogen en un medio hiperosmótico, debido a que se acumula dentro de las células para poder restaurar su volumen. Su participación en el proceso opuesto, es decir cuando las células incrementan su volumen en respuesta a un medio hiposmótico es, como ya se mencionó, en mecanismos de ajuste a largo plazo y no en respuestas muy rápidas. Esto es

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

importante, ya que este tipo de respuestas lentas probablemente corresponden más a la naturaleza de las modificaciones en el volumen que se observan en condiciones fisiológicas.

Otra conclusión de este trabajo es que el inositol comparte con los otros osmolitos orgánicos y con el cloro la sensibilidad farmacológica a los inhibidores de canales aniónicos. Esto puede significar que la movilización del inositol y de los otros osmolitos sensibles a los fármacos mencionados tiene lugar a través de la misma vía de permeabilidad.

**BIBLIOGRAFIA.**

Armende, L.H., Pierce. S.K. 1980 Cellular volume regulation in salinity stressed molluscs: the response of Neotia ponderosa (Arcidae) red blood cells to osmotic variation J. Comp. Physiol, 138:283-289.

Banderali, U. and Roy, G. 1992. Anion channels for amino acids in MDCK cells. Am. J. Physiol. 32:C1200-1207.

Cala, C. P. 1990. Principles of cell volume regulation ion flux pathways and the roles of anions. In chlorides channels and carriers in Nerve, Muscle and Glial cells. (Ed) Alvarez, F. J; Leefmans and John, N. Russel. Plenum Press. 67-83.

Cerr, H; De Pasquale, M; Patlak, C; Pullan, R. 1987. Regulation of brain water and electrolytes during acute hyperosmolarity in rats. Am. J. Physiol. 253:f522-f529.

Chan, P. H. and Fishman R. A. 1990. Elevation of rat brain amino acids, ammonia and indigogenic osmoles induced by hiperosmolarity. Brain Res. 161: 293-301.

Christensen, O. 1987. Mediation of cell volume regulation by  $Ca^{++}$  influx through stretch-activated channels. Nature Lond. 330:66-68.

Drejer, J; Honore, T y Shouboe, A. 1987. Excitatory amino acid induced release of GABA from cultured mouse cerebral cortex interneurons. *J. Neurosci.* 7:2910-2923.

Fushimi, K. Uchida, S., Hara, Y., Hirata, Y., Marumo, F., Sasa, K. S., 1993 Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule *Nature.* 362 (6412):549-552.

Gilles, R. 1988. Comparative aspects of cell osmoregulation and volume control. *Renal Physiol. Biochem.* 3-5:277-288.

Grinstein, S., Rothstein, A., Sarkadi, B., and Gelfand, E. W. 1984 Responses of lymphocytes to anisotonic media: volume regulating behavior. *Am. J. Physiol., 246, Cell. Physiol.,* 15:C204-C215.

Grinstein, S., Dixon, S.J., 1989. Ion transport, Membrane potential and cytoplasmic pH in Lymphocytes: Changes During Activation. *Physiol. Rev.* 69(2):417-481.

Hoffmann, E. K., 1987 volume regulation in culture cells. *Curr. Topics Membr. Transp.,* 30:125-188.

Hoffmann, E. K. 1989a. Mechanism in volume and pH regulation in vertebrate cells. *Amer. J. Physiol.* 69:315-383.

Hoffmann, E. K. and Simonsen, L. O. 1989b. Membrane mechanisms in



volume and pH regulation in vertebrate cells. *Physiol. Rev.* 69:315-392.

Issaks, R. E., Bender, S. A., Kim, C. Y., Prieto, M.M., and Norenberg, M. D. 1994 Osmotic regulation of myo-inositol uptake in primary astrocytes cultures. *Neurochem. Res.* 19:331-338.

Islas, L; Pasantes-Morales, H. 1993. Characterisation of stretch-activated ion channels in cultured astrocyts. *Glia.* 8:97-96.

Kinzelberg, H. K; Frangakis. 1986a. Furosemide and bumetanide sensitive ion transport and volume control in primari astrocytes culture from rat brain. *Brain Res.* 361:125-134.

Kinzelberg H. K., Frangakis M.V. 1986b Volume regulation in primary astrocytes cultures. *Adv. Biosc.* 61:177-186.

Kinzelberg, H. K; Goderie, S. K; Higman, S; Pang, S; Cole, R; Parsons, D.F. 1990. Volume changes of astrocytes *in vitro* as a model for pathological astrocytic swelling. In: Levi, G. (ed) Differentiation and functions of glial cells. *Neurology and Neurobiology.* 55:335-348.

Know, M.H., and Handler, J.S. 1995. Cell volume regulated transporters of compatible osmolytes. *Current Opinion in Cell Biology* 7:465-471.

Lauf, P. K. 1988. On the relationship between volume and thiol stimulated  $K^+$   $Cl^-$  fluxes in red cell membranes. Mol Physiol. 8:215-234.

Law, R.O. and Burg, M. S. The role of organic osmolytes in the regulation of mammalian cell volume. In Advances in Comparative and Environmental Physiology. (ed) Gilles, R. et al. Springer Verlag. 9:189-225.

Lehman, A; Hansson, E. 1987. Aminoacid content in astroglial primary cultures from different brain regions rumin cultivation. Neurochem Res. 12:797-800.

Mills, J.W. 1987 The cell cytoskeleton: Possible role in volume control. Current topics in membranes and transport. 30:75-101.

Morán, J y Patel, A, J. Stimulation of the N-methyl-D-aspartate receptor promotes the biochemical differentiation of cerebellar granule neurons and not astrocytes. Brain. Res. 486:15-25, 1989.

Olson, J. E., Sankar, R., Holtzman, D., James, A., and Fleischacker, D. 1986. Energy-Dependent volume regulation in primary cultured cerebral astrocytes. J. Cell Physiol. 128:209-215.

Pasantes-Morales, H. and Schousboe, A. 1988. Volume regulation astrocytes: A role for taurine as an osmoeffector. *J. Neurosci. Res.* 20:305-309.

Pasantes-Morales, H; Alaves, S; Sanchez-Olea, R; Moran, J. 1993. Contribution of organic and Inorganic Osmolytes to Volume Regulation in Rat Brain Cells in Culture. *Neurochemical Research.* 18:445-452.

Pasantes-Morales, H., Murray, R.A., Lilja, L. and Morán, J. 1995. Regulatory volume decrease in culture astrocytes I. Potassium and chloride permeability. *Am. J. Physiol.* 266 (Cell physiol. 35): C165-C171.

Pasantes-Morales, H., Murray, R.A., Sánchez-Olea, R. and Morán J. 1995. Regulatory volume decrease in cultured astrocytes II. Permeability pathway to amino acids and polyols. *Am. J. Physiol.* 266 (Cell Physiol. 35): C172-C178.

Perisany, N., Kau, H. P., Fushimi, K. and Verkman, A. S. 1992. Organic osmolytes increases cytoplasmic viscosity in kidney cells. *Am. J. Physiol.* 263 (Cell Physiol 33):C136-C143.

Pierce, S. K., Greenberg, M. J., 1972. The nature of cellular volume regulation in marine bivalves. *J.Exp.Biol.* 57:601-692.

Sachin, H. 1989. A stretch-activated  $K^+$  channel sensitive to cell

volume. Proc Natl. Acad. Sci. 86:1731-1735.

Sánchez-Olea, R; Morán, A. J. and Pasantes-Morales, H. 1991. Hypomolarity activated fluxes of taurine in astrocytes are mediated by diffusion. Neurosci.Lett. 130: 233-236.

Schousboe, A and Pasantes-Morales. 1989. Potassium-stimulated Release of <sup>3</sup>H-taurine from cultured GABAergic and Glutamatergic Neurons. J. Neurosci. 9:1309-1315.

Schousboe, A; Sánchez-Olea, R; Morán, A. J. and Pasantes-Morales, H. 1991. Hypomolarity induced taurine release in cerebellar granule cells is associated with diffusion and not with high affinity transport. J. Neurosci. Res. 30:661-665.

Solis, J; Herrans, A; Herreras, O; Lerma, O. and Martín del Río 1988. Does taurine act as an osmoregulatory substance in rat brain? Neurosci. Lett. 91:53-58.

Solomon, A. K., Chazan, B., Dix, J. A., Lukacovic, M. F., Toon, M. R., Verkman, A. S. 1984 The aqueous pore in the red cell membrane: Band 3 as a channel for anions, cations, nonelectrolytes and water. Ann. N. Y. Acad. Sci. 414:79-124.

Stein, W.D. 1986 Transport and diffusion across cell membranes. Acad. Press. Orlando, Florida. Pp. 114-209.

7

Sterns, R.E., Saer, J., Ebersol, S., Darbbie T., Lohr, J. W. and Kamm D. H. 1993 Organic osmolytes in acute hyponatremia Am. J. Physiol. 264 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 33): F833-F836.

Strange, K., Morrison, R., Heilig, C. W., DiPietro, S., and Gullans, S.R. 1991 Upregulation of inositol transport mediates inositol accumulation in hyperosmolar brain cells. Amer. J. Physiol. 260:C784-C790.

Strange, K., Morrison, R., Shrode, L., and Putnam, R. 1993. Mechanism and regulation of swelling-activated inositol efflux in brain glial cells. Amer. J. Physiol. 265:C244-C256.

Thurson, J. H; Mahuart, R.H; Dirgo, J.A. 1988. Taurine: a role in osmotic regulation of mammalian brain and and possible clinical significance. Life Sci. 26: 1561-1568.

Tratchman, H., Futterweit, S., Hammer, E., Siegel, T. W. and Oates, P. 1991 The role of polyols on cerebral cell volume regulation in hypernatremic and hyponatremic states. Life Sci. 49:677-688.

Uhl, J; Murer, H; and Kolb, H. 1988. Ion channels activated by osmotic and mechanical stress in membranes of Opossum Kidney cells. J. Membrane Biol. 104: 223-232.

Vancey, P. H; Clark, H. H; Hand, S.C; Bowler, R. D; Somero. 1982.

Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*.  
217: 1214-1222.

Verbalis, J. G. and Gullans, S. R. 1991. Hyponatremia causes large  
sustained reductions in brain content of multiple organic osmolytes  
in rats. *Brain Res.* 567:274-282.

Wade, J; Olson, J; Sanson, F; Nelson, S; Paedernik, A. 1988.  
Possible role of taurine in osmoregulation within the brain. *J.*  
*Neurochem.* 45:335-344.

Weisbach, A. 1974 Myo-inositol Pages 133-136, in Bergmeyer, H. U.  
(ed.), *Methods in Enzymatic Analysis*, Academic Press, New York.