

03062

14

2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL
Y DE POSGRADO DEL CCH

"Caracterización farmacológica de los canales de cloro activados por un
aumento en volumen celular en neuronas granulares en cultivo"

Tesis que para obtener el grado de

MAESTRIA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

Presenta la Bióloga:

Marcela Margarita Morales Mulia

Noviembre de 1998.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

267080



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.

La investigación que se presenta en esta tesis se realizó en el laboratorio 202 del Departamento de Biofísica del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Herminia Pasantes-Morales, a quien agradezco profundamente su apoyo e interés en mi formación académica durante los últimos años.

Agradezco a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM, por otorgarme una beca nacional durante el período de estudios de Maestría.

Igualmente, agradezco a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM, por el apoyo económico recibido por el proyecto IN 202094 sin la cual el presente trabajo no hubiera sido posible.

Agradezco a los miembros del H. Jurado

Dra. Herminia Pasantes Ordoñez
Dra. Marietta Tuena Sangri
Dra. Rocío Salceda Sacanelles
Dra. Laura Escobar Pérez
Dr. Alberto Darszon Israel

Por sus sugerencias y críticos comentarios.

INDICE

INTRODUCCION	1
Regulación del volumen celular.....	1
Mecanismos responsables de la regulación del volumen celular en sistemas anisomóticos.....	2
Sensores, transductores y efectores.....	4
Sensores y transductores.....	4
Efectores.....	5
El DRV en neuronas.....	9
Objetivo General	12
Objetivos Específicos	12
Resultados	13
I.- Caracterización farmacológica de los flujos de Cl ⁻ activados por el incremento en volumen celular (incluye la publicación de los "inhibidores de los canales de Cl ⁻ ")	13
II.- Investigación del efecto de los intermediarios metabólicos del ácido araquidónico sobre el DRV y los flujos de osmolitos.....	14
Efecto de los inhibidores de las vías metabólicas del ácido araquidónico sobre los osmolitos y el DRV.....	19
Efecto del ácido araquidónico sobre la liberación de K ⁺ estimulada por el aumento en volumen.....	21
DISCUSION	22
1.- Caracterización farmacológica de los flujos de Cl ⁻ activados por volumen en las neuronas del cerebelo.....	22
2.- Similitud en la sensibilidad farmacológica de los flujos de Cl ⁻ y taurina en las neuronas granulares del cerebelo.....	25
3.- Moléculas que pueden actuar como canales activados por volumen.....	26
(i) CIC-2.....	26
(ii) Glicoproteína-P.....	26
(iii) plCln.....	26
(iv) Banda 3.....	28
(v) Fosfolema.....	28
(vi) VDAC.....	28
4.- Comentarios finales.....	29
Bibliografía	31

ABSTRACT

The effects of the Cl channel blockers 5-nitro-2-(3-phenylpropyl-amino) benzoic acid (NPPB), 1,9-dideoxyforskolin (DDF), dipyridamole, and niflumic acid and of the polyunsaturated fatty acids arachidonic, linolenic, and linoleic acids on regulatory volume decrease (RVD) and associated ^{125}I and $^3\text{[H]}$ taurine fluxes in cultured rat cerebellar granule neurons were examined. Dose-response curves of NPPB, DDF, and dipyridamole showed 20-100% inhibition of RVD and osmolyte fluxes. Niflumic acid was less potent, requiring 150-600 μM to show effects of this magnitude. The polyunsaturated fatty acids (5-20 μM) inhibited 80-90% RVD and osmolyte fluxes, with arachidonic acid exhibiting the most potent effect. The volume-associated taurine efflux was somewhat higher in essentially the same in immature and mature cells. The effects of all tested drugs on ^{125}I and $^3\text{[H]}$ taurine fluxes were remarkably similar, indicating a close pharmacological sensitivity of the transport mechanism for the two osmolytes. This is in line with the suggestion of a common pathway for the volume-associated release of Cl and amino acids functioning as osmolytes.

RESUMEN

En este trabajo se examinó el efectos de los bloqueadores de los canales de Cl 5-nitro-2-(3-fenilpropil-amino) benzoico ácido (NPPB), 1,9-dideoxiforskolina (DDF), dipiridamol, y el ácido niflúmico y de los ácidos grasos poliinsaturados se examinaron el ácido araquidónico, el linoléico y el linolénico sobre el proceso de regulación del volumen (DRV, decremento regulador del volumen) y los flujos de ^{125}I y $^3\text{[H]}$ taurina asociados en neuronas granulares de rata en cultivo. Se hicieron curvas dosis -respuesta para el NPPB, DDF y dipiridamol en el DRV y los flujos de osmolitos, se obtuvieron inhibiciones del 20-100%. El ácido niflúmico fue el menos potente, requiriendo de 150-600 μM para inhibir a la misma magnitud. Los ácidos grasos poliinsaturados (5-20 μM) inhibieron el DRV y los flujos de los osmolitos en un 80-90%, el más potente fue el ácido araquidónico. Los flujos de taurina asociados a cambios en volumen en neuronas maduras fue un poco mayor que en neuronas jóvenes, pero la sensibilidad farmacológica fue esencialmente la misma. El efecto de todas las drogas examinadas sobre los flujos de ^{125}I y $^3\text{[H]}$ taurina fue semejante, indicando un sensibilidad farmacológica muy estrecha en el mecanismo de transporte para los dos osmolitos. Estos resultados sugieren que la vía de transporte para la liberación de Cl y de los aminoácidos sensibles a cambios en volumen es la misma.

ABSTRACT

The effects of the Cl channel blockers 5-nitro-2-(3-phenylpropyl-amino) benzoic acid (NPPB), 1,9-dideoxyforskolin (DDF), dipyridamole, and niflumic acid and of the polyunsaturated fatty acids arachidonic, linolenic, and linoleic acids on regulatory volume decrease (RVD) and associated ^{125}I and $^3\text{[H]}$ taurine fluxes in cultured rat cerebellar granule neurons were examined. Dose-response curves of NPPB, DDF, and dipyridamole showed 20-100% inhibition of RVD and osmolyte fluxes. Niflumic acid was less potent, requiring 150-600 μM to show effects of this magnitude. The polyunsaturated fatty acids (5-20 μM) inhibited 80-90% RVD and osmolyte fluxes, with arachidonic acid exhibiting the most potent effect. The volume-associated taurine efflux was somewhat higher in essentially the same in immature and mature cells. The effects of all tested drugs on ^{125}I and $^3\text{[H]}$ taurine fluxes were remarkably similar, indicating a close pharmacological sensitivity of the transport mechanism for the two osmolytes. This is in line with the suggestion of a common pathway for the volume-associated release of Cl and amino acids functioning as osmolytes.

RESUMEN

En este trabajo se examinó el efectos de los bloqueadores de los canales de Cl 5-nitro-2-(3-fenilpropil-amino) benzoico ácido (NPPB), 1,9-dideoxiforskolina (DDF), dipiridamol, y el ácido niflúmico y de los ácidos grasos poliinsaturados se examinaron el ácido araquidónico, el linoléico y el linolénico sobre el proceso de regulación del volumen (DRV, decremento regulador del volumen) y los flujos de ^{125}I y $^3\text{[H]}$ taurina asociados en neuronas granulares de rata en cultivo. Se hicieron curvas dosis -respuesta para el NPPB, DDF y dipiridamol en el DRV y los flujos de osmolitos, se obtuvieron inhibiciones del 20-100%. El ácido niflúmico fue el menos potente, requiriendo de 150-600 μM para inhibir a la misma magnitud. Los ácidos grasos poliinsaturados (5-20 μM) inhibieron el DRV y los flujos de los osmolitos en un 80-90%, el más potente fue el ácido araquidónico. Los flujos de taurina asociados a cambios en volumen en neuronas maduras fue un poco mayor que en neuronas jóvenes, pero la sensibilidad farmacológica fue esencialmente la misma. El efecto de todas las drogas examinadas sobre los flujos de ^{125}I y $^3\text{[H]}$ taurina fue semejante, indicando un sensibilidad farmacológica muy estrecha en el mecanismo de transporte para los dos osmolitos. Estos resultados sugieren que la vía de transporte para la liberación de Cl y de los aminoácidos sensibles a cambios en volumen es la misma.

INTRODUCCION

Regulación del volumen celular.

El mantenimiento del volumen celular es crucial para la sobrevivencia y funcionamiento en las células animales (Macknight, 1988). Debido a la ausencia de una pared celular rígida, las membranas de éstas células son incapaces de soportar diferencias significantivas en la presión hidrostática transmembranal. La membrana plasmática de la mayoría de las células es altamente permeable al agua y debido a que contienen una gran cantidad de macromoléculas impermeables cargadas negativamente además de iones inorgánicos distribuidos de manera asimétrica en ambos lados de la membrana (Tabla 1), la presión osmótica intracelular es mayor que la del medio extracelular; y si los iones y el agua se distribuyesen tal y como lo predice la teoría de Gibbs-Donnan, las células se hincharían en condiciones isosmóticas (Wilfred y Stein, 1990).

Tabla 1. Concentraciones milimolar de iones en el SNC

• Ion	mM plasma	mM extracelular	mM intracelular
• Na ⁺	150	150	12
• K ⁺	5	2,7	140
• Cl ⁻	130	110	12
• Ca ²⁺	1,2	1,2	0,00001
• Aniones orgánicos	10	1	130

De acuerdo con esta teoría en el estado de equilibrio, la concentración total de solutos intracelulares debería ser mayor que la de los extracelulares, dando como resultado una menor concentración de agua en el interior, con respecto al exterior celular. Este gradiente de concentración (o de potencial químico) del agua causaría un flujo osmótico neto de este solvente hacia el interior celular. Como la membrana de las células animales es distensible, cede ante pequeñas presiones hidrostáticas, por lo que dicho flujo osmótico neto de agua causaría un aumento de volumen y

eventualmente lisis celular. Sin embargo, normalmente este aumento de volumen celular osmótico no ocurre y las células mantienen su volumen constante, por mecanismos que se investigan activamente en este momento.

El mantenimiento de un volumen constante es vital para las células ya que una variación en la concentración de los solutos intracelulares debida a un cambio en el volumen puede llevar a alteraciones equívocas en el sistema de señales que es la base de la función celular y la comunicación intercelular. Además de la importancia de mantener el volumen celular constante, se ha propuesto que el volumen celular participa directamente como un mensajero en el control metabólico, como una señal de crecimiento y proliferación celular, así como el disparador para la iniciación de mecanismos de inserción de proteínas de membrana: canales, receptores y transportadores.

En condiciones fisiológicas pueden ocurrir pequeños cambios y otros ajustes en el volumen celular por la acumulación de osmolitos intracelulares atraídos por macromoléculas cargadas en el citoplasma o durante procesos normales tales como intercambio de nutrientes y sales.

Mecanismos responsables de la regulación del volumen celular en sistemas anisomóticos.

Cuando las células animales se exponen a medios anisomóticos, inicialmente responden como osmómetros perfectos sufriendo cambios en su volumen dictados por el flujo de agua a través de la membrana Figura 1. En un medio hiposmótico inicialmente se observa un aumento rápido en el volumen celular debido a la entrada de agua, seguido de una fase de recuperación más lenta, durante la cuál la célula alcanza un valor muy cercano a su volumen original. Esta disminución del volumen es consecuencia de la pérdida de solutos intracelulares osmóticamente activos acompañados de agua, logrando así reducir la presión osmótica intracelular. Por el contrario, cuando las células se exponen a soluciones hiperosmóticas se observa

Esquema de la regulación del volumen en condiciones anisomóticas.

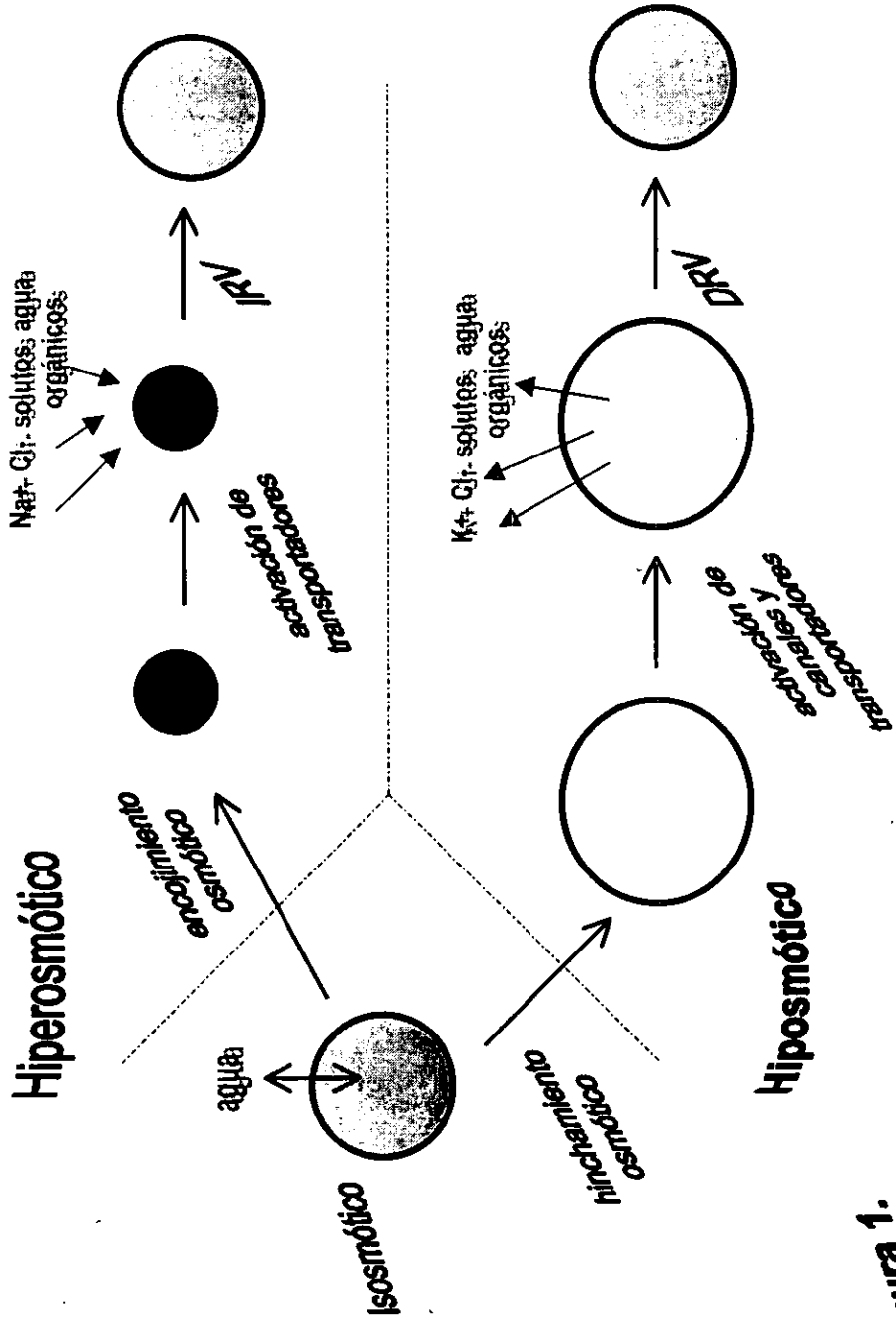


Figura 1.

una disminución en el volumen, debido a la salida de agua producida por el gradiente osmótico impuesto. En algunos tipos celulares a esta disminución inicial del volumen es seguida de una fase de recuperación en la cual incrementan su contenido de agua como consecuencia de la acumulación de solutos osmóticamente activos.

El proceso de regulación del volumen que se observa cuando las células se exponen a soluciones hiperosmóticas es referido como incremento regulador del volumen (IRV) (Figura 1). Esta función se lleva a cabo mediante un aumento en los flujos de solutos osmóticamente activos hacia el interior de la célula. Los osmolitos que principalmente participan en el IRV son los iones Na^+ y Cl^- , así como moléculas orgánicas pequeñas. El proceso de regulación de volumen que ocurre cuando las células se exponen a medios hiposmóticos se conoce como decremento regulador del volumen (DRV) (figura 1). Este ajuste compensatorio tiene lugar mediante la expulsión de iones como el K^+ y Cl^- , así como osmolitos orgánicos intracelulares. Además de estas modificaciones en el volumen que se observan cuando el medio extracelular es anisomótico, también ocurren cambios en el volumen en condiciones isomóticas, como consecuencia de la acumulación de nutrientes, neurotransmisores, a la salida de factores de crecimiento, hormonas, etc.

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; seguidamente 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 el volumen. Finalmente debe percibir en que momento se ha recuperado su volumen inicial y desactivar los mecanismos que se activaron durante el proceso regulador.

Sensores, transductores y efectores.

Los mecanismos mediante los cuales las células perciben su volumen y la señal o señales que indican a la célula que ha sufrido un cambio en este parámetro son cruciales para el entendimiento del proceso regulador del volumen.

Sensores y transductores

Entre los mecanismos que se han propuesto como sensores y transductores del cambio del volumen celular están:

- 1) La deformación mecánica o estiramiento de la membrana subsecuentes a cambios en el citoesqueleto que ocurren al presentarse una modificación en el volumen celular. El citoesqueleto puede servir como un componente tanto del mecanismo sensor de volumen como del sistema de transducción, ya que además puede llevar a la activación directa de los sistemas de transporte de los osmolitos, o a la activación de canales de estiramiento que consecuentemente sigue la activación de las vías de transporte o bien al movimiento de vesículas citoplásmicas hacia la membrana celular conteniendo proteínas que pueden ser los propios canales o factores de la regulación.
- 2) La activación de canales sensibles al estiramiento debido a la tensión mecánica de la membrana. La activación de la conductancia a través de estos canales, puede ser una señal que inicie los mecanismos de regulación de volumen. Es posible que los canales activados por estiramiento sean sensores de tensión y actúen como primeros mensajeros en una cascada de reacciones previas a la activación de flujos regulatorios a través de otros tipos de canales.
- 3) Un cambio en la concentración o dilución de moléculas señal presentes en el citoplasma por la modificación en el contenido de agua. Estas señales pueden estar actuando como transductores o formar parte del sistema de transducción de señales

de activación de los efectores. El Ca^{2+} y el Mg^{2+} se han propuesto como sensores/transductores primarios asociados con el incremento en el volumen producido por soluciones hiposmóticas. El aumento en la concentración intracelular de calcio se produce como una consecuencia de la entrada de calcio por canales activados por la distensión de la membrana producida por el medio hiposmótico o también por canales de calcio activados por metabolitos del lípido membranal fosfatidilinositol 1,3-bis fosfato a través de un mecanismo que involucra una proteína G sensible a la toxina pertusis. También se ha reportado que el aumento de calcio intracelular puede ocurrir como resultado de su liberación de pozas endógenas principalmente del retículo endoplásmico y que este evento es coincidente con la liberación de los osmolitos involucrados en el DRV (Morán y col., 1997).

4) La concentración de macromoléculas intracelulares, también se ha postulado como un posible sensor del cambio en volumen. Una dilución de las macromoléculas citoplásmicas, podría ser la señal intracelular que iniciaría el proceso regulador de volumen, modificando la actividad funcional de los transportadores efectores (Minton y col., 1993). Esta propuesta se basa en el hecho de que pequeños cambios en la concentración total de macromoléculas intracelulares producen grandes cambios en la reactividad de otras macromoléculas. Este efecto se caracteriza por un poder amplificador, produciendo cambios en la actividad funcional de los transportadores de solutos.

Efectores.

La respuesta efectora para la regulación del volumen es, como se mencionó anteriormente, la movilización de solutos osmoticamente activos en la dirección necesaria para ajustar a la célula al nuevo gradiente osmótico (Strange, 1994). Esta movilización ocurre mediante la activación de vías de transporte transmembranal (Figura 2).

Mecanismos de regulación del volumen

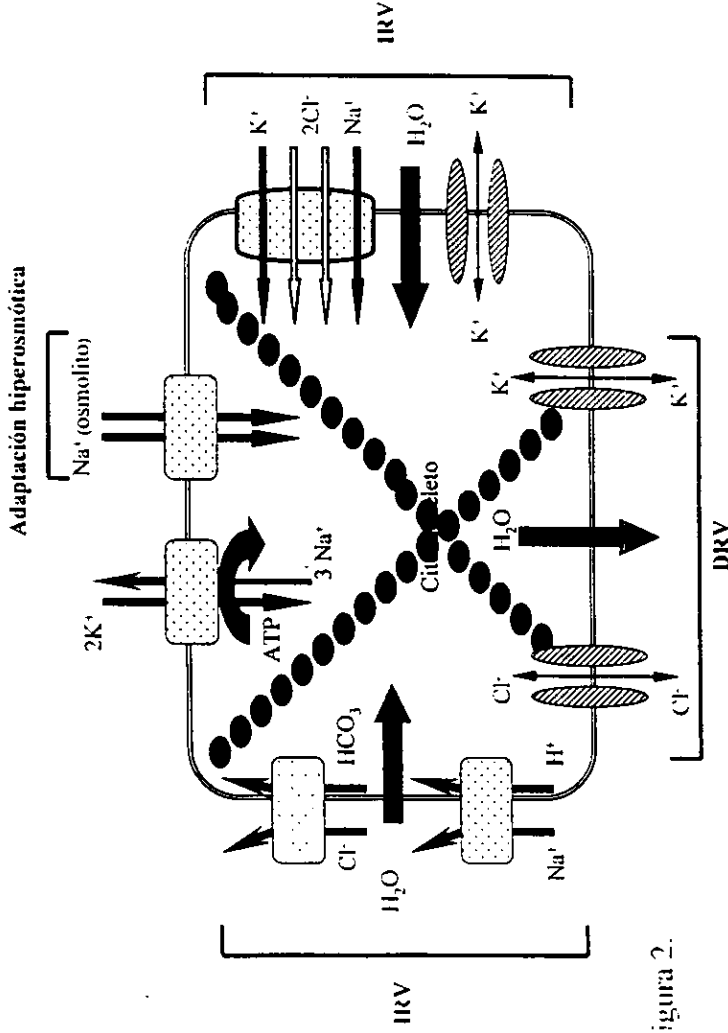


Figura 2.

Los mecanismos de activación osmótica son muy diversos dependiendo del tipo celular. La detección de cambios en el volumen celular puede involucrar proteínas del citoesqueleto, las cuales interactúan con canales y/o transportadores. El proceso de disminución del volumen (DRV) podría iniciarse mediante la activación de canales activados por estiramiento permitiendo la salida de K^+ Cl^- . El proceso que permite a la célula aumentar su volumen en condiciones hipertónicas agudas (IRV) se produce por la entrada de Na^+ Cl^- acoplada o no a la entrada de K^+ . Cuando la exposición es crónica al medio hiperosmótico se inician mecanismos de adaptación que involucran la activación transcripcional de los transportadores de osmolitos.

Los osmolitos involucrados en la regulación del volumen celular son de dos tipos, los iones como el K^+ , el Cl^- y el Na^+ y un grupo de moléculas orgánicas, como aminoácidos, aminos, azúcares y polialcoholes. El K^+ está involucrado en el DRV, ya que es el ión más abundante en el interior de la célula. Los flujos de K^+ están acoplados a flujos de iones y compuestos orgánicos cargados negativamente para mantener la electronegatividad, mientras que el Na^+ y el Cl^- que son los más abundantes en el medio extracelular participan en el IRV.

Los aminoácidos, que participan en la regulación del volumen son el glutamato, el aspartato, la glutamina, el GABA y la taurina (Pasantes-Morales y col., 1993 y Kimbelberg y col., 1990). Entre ellos la taurina es la más importante para una función osmorreguladora debido a que se encuentra presente en concentraciones muy elevadas en la mayoría de las células animales (Jacobsen y Smith, 1968), constituyendo hasta el 70 % de la poza total de aminoácidos libres (Pasante-Morales y col., 1991). Además la taurina presenta características que la señalan como un osmolito ideal: se encuentra en concentraciones lo suficientemente elevadas (hasta 80 mM en retina, 28 mM en linfocitos, 60 mM en músculo esquelético y cardíaco) como para poder contribuir de manera importante a la presión osmótica total y es inerte desde el punto de vista fisiológico, ya que no participa en la estructura primaria de proteínas ni en ninguna reacción del metabolismo primario de la célula (Jacobsen y Smith, 1968). Esto permite que los niveles celulares del aminoácido se puedan modificar con el fin de ajustar la presión osmótica interna sin que las variaciones en la concentración intra o extracelular alteren otras funciones celulares. Evidencias experimentales sugieren que la taurina juega el papel de sustancia activa osmóticamente en el cerebro (Pasantes-Morales, y col., 1993). Los polialcoholes como el *myo*-inositol (Strange, y col., 1994 y Nakanishi y col., 1988) y el sorbitol (Siebens y Spring, 1989), así como las metilaminas y la urea juegan un papel crucial en la regulación del volumen en animales marinos.

Los mecanismos de transporte que se activan durante el IRV son en general cotransportadores, o intercambiadores acoplados en el control de los iones y

sistemas de transporte acoplado para los aminoácidos y los polioles Figura 2. En los eritrocitos participan de manera importante dos sistemas de transporte acoplados: el intercambiador Na^+/H^+ y $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. El sistema Na^+/H^+ , sensible a amilorida, es el mecanismo primario activado por la disminución en el volumen (Kregenow, 1981; Kregenow y col., 1985; Stebens y Kregenow, 1985; Cala, 1980; Cala, 1985a y Cala, 1985b), aunque en condiciones fisiológicas la actividad de este intercambiador se encuentra regulada por el pH interno. Los cotransportadores electroneutros que participan en el IRV en la mayor parte de los animales son el $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ (Orskov, 1954 y Parker, 1977) y el K^+/Cl^- , son insensibles a la ouabaína y sensibles a la furosemida y a la bumetanida.

El transporte de osmolitos orgánicos en el IRV se lleva a cabo principalmente por cotransportadores dependientes de Na^+ (Strange y col., 1994). La regulación del cotransportador de Na^+ -*myo*-inositol está relacionado con un incremento en la expresión de su RNAm el cual permanece por pocas horas después del incremento intracelular de *myo*-inositol y se revierte cuando la célula es regresada a un medio isosmótico (Strange y col., 1994).

La movilización de los iones involucrados en el DRV tiene lugar también a través de transportadores electroneutros aunque de manera más general ocurre a través de canales iónicos (Hoffmann y col., 1989 y Sarkasi y Parker, 1991) Figura 2. Los eritrocitos en general utilizan el sistema de cotransporte K^+/Cl^- para la expulsión de estos iones además, la activación acoplada de los intercambiadores K^+/H^+ y $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (Cala, 1983, Kregenow, 1981). A pesar de la existencia de sistemas de cotransporte electroneutros para la salida de cloro y potasio, el mecanismo más generalizado en la mayoría de las células de mamífero es, como se mencionó, la activación de vías electrogénicas constituídas por canales iónicos. Se ha visto que tanto la salida de K^+ como la del Cl^- se lleva a cabo a través de canales activados por hiposmolaridad, específicos para cada uno de los iones pero interdependientes. Evidencias en este sentido son (i) la insensibilidad de la bumetanida al proceso regulador DRV, un potente y selectivo inhibidor del cotransporte K^+/Cl^- (Grinstein y col., 1982), (ii) el

requerimiento no específico del Cl^- como anión acompañante para el K^+ , como se requeriría en el caso del cotransporte (Kimmelberg, 1990), (iii) el efecto de la gramicidina, un ionóforo catiónico específico, acelerando el DRV (Pasantes-Morales y col., 1994), (iv) el hecho de que bloqueadores conocidos de canales de potasio puedan inhibir la salida de K^+ activada por hiposmolaridad (Grinstein y col., 1982 y Sánchez-Olea y col., 1993), así como también, (v) los inhibidores clásicos de canales de cloro inhiben los flujos de Cl^- activados por hiposmolaridad. En estudios con técnicas electrofisiológicas se han detectado corrientes tanto de K^+ como de Cl^- , que se activan por hiposmolaridad. Aún, no se ha identificado molecularmente a la proteína responsable de la movilización del K^+ sensible a hiposmolaridad, sin embargo, se ha visto que la corriente de K^+ activada por hiposmolaridad es una corriente saliente que se activa por despolarización y que es sensible a quinina (Nilius y col., 1995). En varios tipos celulares se han reportado canales de K^+ dependientes de calcio del tipo BK que son activados por hinchamiento y consecuentemente la liberación de K^+ y el DRV son dependientes del calcio externo (Sarkadi y Parker, 1991). Deutsch y Chen (1993) han propuesto a los canales Kv 1.3 como posibles candidatos en el transporte de los flujos de K^+ . Para apoyar esta propuesta llevaron a cabo un estudio en linfocitos-T que no tienen la habilidad de regular su volumen y que después de la transfección y subsecuente expresión de los canales Kv 1.3 los linfocitos son capaces de regular su volumen. Las características de los canales de Cl^- se tratarán con detalle más adelante. El cloro sale de la célula por su propio canal y esto se ha confirmado por estudios electrofisiológicos de fijación de voltaje (Strange, 1996).

Aún no están totalmente identificados los mecanismos de movilización de los osmolitos orgánicos en el DRV. Se ha demostrado que la exposición de diferentes tipos celulares a medios hiposmóticos produce un incremento en los flujos de taurina y de otros aminoácidos a través de la membrana. En estudios cuantitativos sobre la magnitud de la pérdida de aminoácidos en el DRV se ha demostrado que la liberación de taurina en respuesta al cambio en volumen es independiente de la presencia de Na^+ en el medio extracelular y de la temperatura, lo que descarta la participación del

transportador del aminoácido dependiente de sodio en el DRV. Se ha encontrado, en cambio, que el movimiento de taurina en respuesta al aumento en volumen tiene lugar a través de vías difusionales en los que el movimiento de taurina se encuentra dirigido únicamente por su gradiente de concentración (Sánchez-Olea y col., 1991). Se ha planteado la hipótesis de que la liberación de osmolitos orgánicos es una vía común a aniones y moléculas orgánicas sensible a una gran variedad de inhibidores aniónicos tradicionales. Con base en la sensibilidad farmacológica y en la similitud en las cinéticas de activación y desactivación de los flujos de Cl^- y de los osmolitos orgánicos asociados al DRV, se ha sugerido que el transporte de estos osmolitos tiene lugar a través de un canal, con características tales que permiten el paso de osmolitos zwitteriones como son los aminoácidos (Strange y col., 1996).

El DRV en neuronas.

El DRV en neuronas (Pasantés-Morales y col., 1994c) y en células gliales en cultivo (Kimmelberg y Frangakis, 1986; Olson y col., 1986; Pasantés-Morales y Schousboe, 1988; Bender y col., 1992b) se ha investigado ampliamente. Los resultados de estos estudios *in vivo* e *in vitro* sugieren que el tejido nervioso posee los mecanismos necesarios para recuperar su volumen inicial después que éste se ha incrementado por exposición a soluciones hiposmóticas. Estudios en ratones y en ratas sometidos a cambios en la osmolaridad del plasma muestran cambios adaptativos en el tejido neural del contenido de iones inorgánicos y de taurina (Thurston y col., 1980; Cserr y col., 1987; Wade y col., 1988; Solís y col., 1988; Law y col., 1989; Verbalis y col., 1991). Poco se sabe de los mecanismos moleculares y celulares utilizados por el cerebro para mantener el volumen celular (Ballanyi y col., 1988). En el laboratorio se ha demostrado la liberación de aminoácidos libres, principalmente la taurina, en respuesta a cambios en volumen tanto en astrocitos como en neuronas en cultivo (Pasantés-Morales y col., 1988; Schousboe y col., 1991). Se ha demostrado también que este mecanismo de liberación es un proceso difusional independiente del transportador acoplado a Na^+ (Pasantés-Morales y col., 1990; Schousboe y col., 1991; Sánchez-Olea y col., 1991). El DRV en astrocitos y en

neuronas en cultivo es un proceso rápido que requiere de 15 a 30 min (Pasantes-Morales y col., 1994a) en comparación con células en las que el DRV se lleva a cabo a través de transportadores en donde el proceso de regulación requiere de horas. La eficiencia del DRV en células nerviosas está relacionada con la severidad del cambio osmótico; en soluciones altamente hiposmóticas la recuperación del volumen es parcial y en soluciones de baja hiposmolaridad la recuperación del volumen es total.

Los osmolitos involucrados en el DRV en neuronas son esencialmente los mismos que en la mayoría de las células animales (el K^+ , el Cl^- , los aminoácidos y el *myo*-inositol). Los cursos temporales de los flujos de los aminoácidos en las neuronas son rápidos y muy parecidos al curso temporal del DRV. La liberación de aminoácidos libres, muestra una alta sensibilidad a disminuciones en la osmolaridad del medio externo (Pasantes-Morales y col., 1993). Reducciones en la osmolaridad tan pequeñas como del 5-10% son suficientes para estimular la liberación de taurina sobre el valor basal observado en condiciones isosmóticas (Pasantes-Morales y Schousboe, 1988). La liberación del Cl^- es también muy rápida y sensible a la hiposmolaridad. Reducciones del 30% en la osmolaridad externa producen un significativo incremento en la liberación de I^{125} (usado como marcador de Cl^-), mientras que los flujos de K^+ y *myo*-inositol sensibles a hiposmolaridad muestran un pequeño retardo, pero su liberación también ocurre en pocos minutos (Sánchez-Olea y col., 1993a; Strange y col., 1993; González y col., 1995). La liberación de potasio es poco sensible a incrementos en el volumen celular producido por la exposición a soluciones hiposmóticas. La salida de potasio se incrementa sobre el valor basal únicamente con reducciones extremas en la osmolaridad externa (50% o mayores), mientras que disminuciones de 15 o 30% no estimulan significativamente la liberación espontánea.

El conocimiento acerca de la contribución de los aminoácidos libres, así como del K^+ y su acompañante el Cl^- al proceso de regulación del volumen en células nerviosas es muy importante debido al papel que juegan los iones inorgánicos en el control del potencial de membrana, por lo que su concentración intracelular y

extracelular tiene que estar finamente regulada. La contribución de los aminoácidos libres al proceso de regulación de volumen es del 54% y de los iones el 46% en un medio hiposmótico de 150 mOsm, lo que sugiere que los osmolitos orgánicos son usados preferencialmente sobre los iones inorgánicos, como efectores osmóticos en las células nerviosas (Pasantés-Morales y col., 1993).

Con base en estos antecedentes y debido al papel predominante que tiene la movilización del Cl^- en la regulación del volumen aunado a la posibilidad de que una serie de osmolitos orgánicos sean transportados al igual que el Cl^- por un mismo canal, hace de especial interés el conocimiento y caracterización de la vía (canal) de Cl^- involucrada en el DRV. El propósito del proyecto se plantea con los objetivos siguientes:

OBJETIVO GENERAL:

Caracterizar farmacológicamente los canales de cloro activados por el aumento en volumen celular producido por condiciones hiposmóticas en neuronas en cultivo y su posible participación en el proceso de movilización de osmolitos orgánicos.

Objetivos específicos:

- I. Examinar la sensibilidad del proceso de regulación de volumen (DRV) a los inhibidores de los canales de Cl^- en las neuronas de cerebelo en cultivo.

- II. Determinar la importancia relativa de los flujos de I^{125} (utilizado como marcador de Cl^-) activados por hiposmolaridad.

- III. Examinar la similitud y sensibilidad a los inhibidores de canales de Cl^- sobre los flujos de I^{125} y de la $^3\text{[H]}$ -taurina (como representante de los osmolitos orgánicos) en respuesta al incremento del volumen celular producido por la condición hiposmótica.

RESULTADOS

I.- Caracterización farmacológica de los flujos de CF activados por el incremento en volumen celular.

Los métodos y los resultados de esta parte del trabajo se describen con detalle en la publicación que se anexa.

Cl channel blockers inhibit the volume-activated efflux of Cl and taurine in cultured neurons

R. SÁNCHEZ-OLEA, M. MORALES, O. GARCÍA, AND H. PASANTES-MORALES
*Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México,
Mexico 04510 DF, Mexico*

Sánchez-Olea, R., M. Morales, O. García, and H. Pasantes-Morales. Cl channel blockers inhibit the volume-activated efflux of Cl and taurine in cultured neurons. *Am. J. Physiol.* 270 (Cell Physiol. 39): C1703–C1708, 1996.—The effects of the Cl channel blockers 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid (NPPB), 1,9-dideoxyforskolin (DDF), dipyrindamole, and niflumic acid and of the polyunsaturated fatty acids arachidonic, linolenic, and linoleic acids on regulatory volume decrease (RVD) and associated ^{125}I and ^3H taurine fluxes in cultured rat cerebellar granule neurons were examined. Dose-response curves of NPPB, DDF, and dipyrindamole showed 20–100% inhibition of RVD and osmolyte fluxes. Niflumic acid was less potent, requiring 150–600 μM to show effects of this magnitude. The polyunsaturated fatty acids (5–20 μM) inhibited 80–90% RVD and osmolyte fluxes, with arachidonic acid exhibiting the most potent effect. The volume-associated taurine efflux was somewhat higher in younger neurons, but the pharmacological sensitivity was essentially the same in immature and mature cells. The effects of all tested drugs on ^{125}I and ^3H taurine fluxes were remarkably similar, indicating a close pharmacological sensitivity of the transport mechanism for the two osmolytes. This is in line with the suggestion of a common pathway for the volume-associated release of Cl and amino acids functioning as osmolytes.

chloride channels; volume regulation; polyunsaturated fatty acids; cerebellar neurons

CELL VOLUME RECOVERY that occurs subsequent to swelling in hyposmotic solutions is a widespread phenomenon, present in most animal cells. Neurons in culture also possess this ability and when exposed to hyposmotic solutions respond by an initial, rapid swelling phase followed by a volume regulatory process by which cell volume decreases toward original levels (18). This regulatory volume decrease (RVD) is an active mechanism that counteracts cell swelling even when the hyposmotic condition persists. RVD is accomplished by extrusion of intracellular osmotically active solutes through pathways activated by the cell volume change (4). The inorganic ions K and Cl and organic molecules such as amino acids and polyalcohols serve this function of osmolytes in most cells, and recent evidence suggests that this is the case also in neurons (17). The main components of the amino acid pool in cultured cerebellar and cortical neurons, i.e., taurine, glutamate, glycine, γ -aminobutyric acid, and alanine, are all released in response to cell swelling and are likely candidates to participate in RVD. K release is also activated by cell swelling presumably accompanied by Cl. Recent evidence suggests that the volume-induced transport of K and Cl in cerebellar granule cells occurs via channel-like diffusional pathways, which are sepa-

rate but interdependent. The cationic pathway is restricted to most cations, except K and Rb. The anionic pathway, in contrast, is permeable to a large number of anions including large anions such as benzoate, thiocyanate, and sulfate but excludes gluconate (17). RVD in neurons was found to be inhibited by blockers of Cl channels such as niflumic acid, 4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS), and dipyrindamole. The potent effect of these drugs on RVD suggests that their action may not be restricted to Cl fluxes but might also affect the corrective fluxes of other osmolytes, including amino acids, which are also released from neurons via a diffusional pathway (23), and similarly affected by DIDS (23). This possibility was examined in the present work investigating the effect of Cl channel blockers on RVD and on the swelling-stimulated ^3H taurine and ^{125}I efflux (as tracer for Cl).

MATERIALS AND METHODS

Materials. Fetal calf serum and penicillin/streptomycin were obtained from GIBCO (Grand Island, NY). Poly-L-lysine (mol wt >300,000), trypsin, soybean trypsin inhibitor, deoxyribonuclease, and fatty acids were from Sigma Chemical (St. Louis, MO). Cl channel blockers niflumic acid, dipyrindamole, 1,9-dideoxyforskoline (DDF), and DIDS were also from Sigma, and 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid (NPPB) was from Research Biochemicals International. All radiolabeled chemicals were obtained from New England Nuclear. ^{125}I (370 mCi/ml) and ^3H taurine (21.9 Ci/mmol) were used for release experiments. Antibodies against neuron-specific enolase and glial fibrillar acidic protein (GFAP) as well as their corresponding fluorescein isothiocyanate-conjugated secondary antibodies were from Dakopatts, Dako (Carpinteria, CA). All other chemicals were of the purest grade available from regular commercial sources.

Cell cultures. Primary cultures of cerebellar granule neurons were obtained as previously described by Morán and Patel (14). Briefly, the dissociated cell suspensions from cerebella of a 7-day-old rat were plated at a density of 225×10^3 cells/cm² in plastic dishes previously coated with poly-L-lysine (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, mol wt >300,000), and cytosine arabinoside (10 μM) was added to the culture medium at ~20 h after seeding. The culture medium consisted of basal Eagle's medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 2 mM glutamine, 50 U/ml penicillin, and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin. The culture dishes were incubated at 37°C in humidified 5% CO₂-95% air atmosphere. The enrichment of cultures in neurons was determined using polyclonal antibodies against neuron-specific enolase and GFAP, and staining was determined by immunofluorescence. The proportion of neurons in these cultures was 95–97% and that of glial cells was estimated as 2–4%. Neurons were used at 1–7 days in vitro (DIV; days in culture).

Volume measurements. Volume changes were followed as previously described by Pasantes-Morales et al. (18). Cells cultured for 1–2 days were detached by treatment for 3 min

with phosphate-buffered saline (Sigma) without calcium and containing 1 mM EDTA and 0.01% trypsin. The detached cells were mixed with the same volume of serum-containing medium and then centrifuged and resuspended in experimental media as indicated for each experiment. Immediately after this, a sample of the cell suspension was diluted ~100-fold with the experimental media. Exactly 1 min later, cell volume was measured at the indicated times by electronic sizing using a Coulter counter (model ZF) associated to a Coulter channelizer (model 256). Mean cell volume was calculated as the median of the distribution curves. Results were expressed as relative volume, i.e., the change with time over the initial volume recorded in isosmotic medium. In some experiments, results were expressed as percentage of RVD, i.e., the recovery of cell volume between *minute 1* (maximal volume) and *minute 15*.

[³H]taurine and ¹²⁵I efflux. The release of osmolytes activated by hyposmolarity was measured in cells in monolayer using two different experimental protocols. In the first protocol, cells loaded with [³H]taurine (1 μ Ci/ml; 1 h) were washed three times (5 min each) with isosmotic medium containing (in mM) 135 NaCl, 5 KCl, 0.6 MgSO₄, 1 CaCl₂, 10 glucose, and 10 N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (pH 7.4). After washing, taurine efflux was subsequently measured in a 5-min period in isosmotic and hyposmotic medium (50%). At the end of the experiment, cells were solubilized with 0.4 N NaOH, and [³H]taurine was measured in a liquid scintillation counter. The counts present in all fractions and those remaining in cells at the end of the experiment were added to obtain the total counts (100%) used for calculations. Efflux was calculated as percent tracer released in isosmotic or hyposmotic medium, and, in most cases, results were expressed as net stimulated release, i.e., the difference between these two values.

A second protocol was used for ¹²⁵I efflux. Cells loaded with ¹²⁵I (2.0 μ Ci/ml; 15 min) were washed four times with isosmotic medium, and ¹²⁵I efflux was sequentially measured in isosmotic and hyposmotic (50%) media in 20-s fractions. At the end of the experiment, cells were solubilized with 1 N NaOH, and ¹²⁵I was measured in a gamma counter. Efflux rate coefficients were calculated as described by Venglarik et al. (25), using the following equation: $r = [\ln(R_1) - \ln(R_2)] / (t_1 - t_2)$, where R_1 and R_2 are the percentage of counts remaining in the cell layer at *times 1* (t_1) and *2* (t_2), respectively. In this way, the efflux rate coefficients result from straight lines drawn between two experimental points. When the time course is shown, all the efflux rate coefficients are plotted, but, in some figures, only the maximum value for this parameter is indicated. In some experiments, [³H]taurine efflux was measured using this second protocol. No significant differences were found on the amount of taurine released or on the sensitivity to inhibitors. The efflux of [³H]taurine in trypsinized neurons was quantitatively similar to that in neurons in monolayer, and the activation and deactivation phases were somewhat faster in the trypsinized neurons (18).

Statistical analysis. The statistical significance of the effect of results was determined by Student's *t*-test. Half-maximal inhibition concentration (IC₅₀) values, their means, and 95% confidence intervals were calculated and analyzed by the GraphPad Inplot Program.

RESULTS

Effect of Cl channel blockers and polyunsaturated fatty acids on RVD. Swelling and subsequent RVD were measured in trypsinized neurons. When exposed to hyposmotic (50%) solutions, neurons rapidly swell, reaching maximum volume by 1 min after the hypo-

tonic stimulus. This rapid swelling phase is followed by a gradual decline of cell volume toward the original value. The RVD is not complete, and after 15 min, the cell volume is still >40–45% of the original value, i.e., the volume regulation is ~60%. The Cl channel blockers NPPB and DDF exhibited a strong inhibitory effect on RVD. DDF (50 μ M) reduced volume recovery by 50%. No further inhibition was observed with higher concentrations of the drugs, which appear to induce some secondary swelling of the trypsinized cells, thus making volume measurements less accurate. NPPB exhibited a concentration-dependent inhibitory effect reducing RVD to 39 and 50% at 25 and 50 μ M, respectively (data not shown), and of >90% at 100 μ M (Fig. 1). Dipyrindamole (75 μ M) inhibited RVD by 30%. The polyunsaturated fatty acids arachidonic, linoleic, and linolenic acid all exhibited a strong inhibitory effect on RVD. Arachidonic acid showed the most potent effect, because at a 5 μ M concentration, it essentially abolished RVD (Fig. 2). The monounsaturated fatty acids oleic and ricinoleic acids and the saturated fatty acids stearic, palmitic, myristic, and arachidic acids did not modify the volume regulatory process (data not shown).

Effects on ¹²⁵I efflux. Figure 3 shows the osmolarity-dependent efflux of ¹²⁵I in 1–2 DIV cerebellar granule neurons. In isosmotic medium, the efflux rate constant of ¹²⁵I efflux was 0.12 min⁻¹. Decreasing osmolarity by

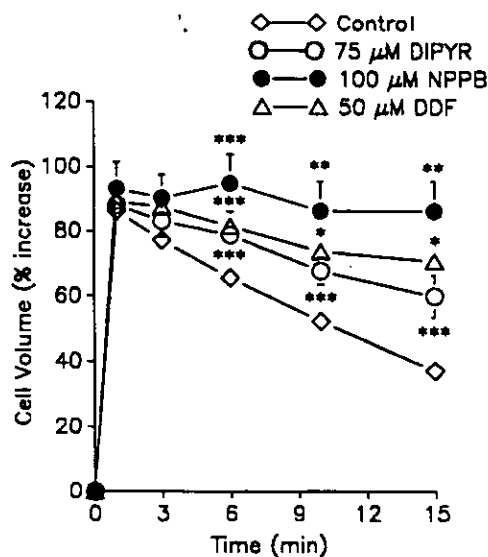


Fig. 1. Effect of the Cl channel blockers 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid (NPPB; 100 μ M), 1,9-dideoxyforskolin (DDF; 50 μ M), and dipyrindamole (DIPYR; 75 μ M) on regulatory volume decrease (RVD) in cerebellar granule neurons. Cultured neurons were detached by treatment with a Ca²⁺-free saline containing 1 mM EDTA and 0.01% trypsin. Cell suspension was centrifuged and resuspended in Krebs-HEPES medium. At *time 0*, a sample of cell suspension was diluted with isosmotic or hyposmotic media with or without indicated drugs. Cell volume was measured at indicated times by electronic sizing. Hyposmotic media were prepared by reducing NaCl. Results are expressed as percentage of increase over isosmotic volume at indicated times after exposing cells to a 50% hyposmotic medium at *time 0*. Mean volume of granule neurons in isosmotic medium was 0.23 ± 0.012 pl ($n = 20$). Results are means \pm SE of 4 experiments. *** $P < 0.05$, ** $P < 0.02$, * $P < 0.001$, significantly different from control.

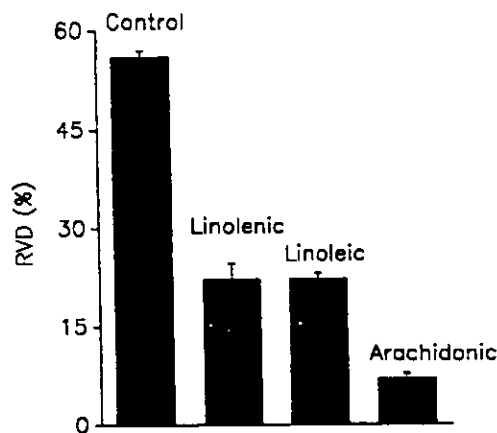


Fig. 2. Effect of polyunsaturated fatty acids on RVD in cerebellar granule cells. Cell volume was measured in cultured neurons as described in MATERIALS AND METHODS and Fig. 1. Arachidonic, linoleic, and linoleic acids were all present at a concentration of 5 μ M. Results are expressed as percentage of RVD, i.e., percentage of recovery of cell volume between *minute 1* (maximal volume) and *minute 15*. Values are means \pm SE of 4 experiments. All results were significantly different from controls by $P < 0.001$.

40 or 50% resulted in rapid efflux of 125 I, and the efflux rate under these conditions increased to a maximum value of 0.85 and 1.14 min^{-1} , respectively. Decreasing osmolarity by 20 or 30% still evoked 125 I efflux with a significant increase in the efflux rate to 0.19 and 0.39 min^{-1} , respectively. Inactivation of the hyposmolarity-evoked release of 125 I occurs even when the hyposmotic conditions persist. The Cl channel blockers NPPB, DDF, dipyrindamole, and niflumic acid all markedly inhibited 125 I fluxes stimulated by hyposmolarity in a concentration-dependent manner, niflumic acid being the less and DDF the most potent blockers (Fig. 4, Table 1).

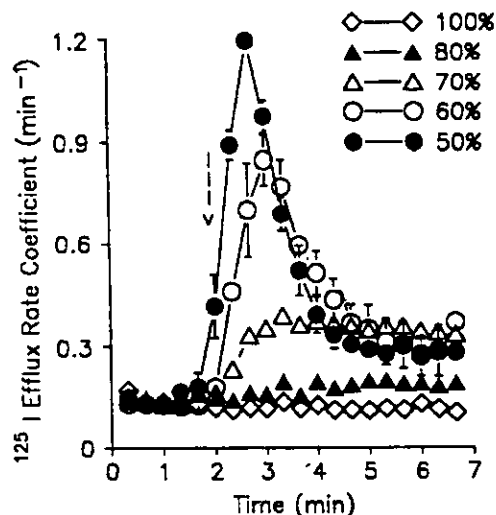


Fig. 3. Time course of swelling-induced 125 I efflux in cerebellar granule neurons. After a 15-min loading period with 125 I (2 μ Ci/ml), cells were washed and basal efflux in isosmotic medium was collected in 20-s fractions. At arrow, isosmotic medium was changed by hyposmotic media with indicated osmolarity. Results are expressed as efflux rate coefficients calculated as described in MATERIALS AND METHODS. Values are means \pm SE of 8 experiments; SE are represented by vertical bars when they exceeded size of symbols.

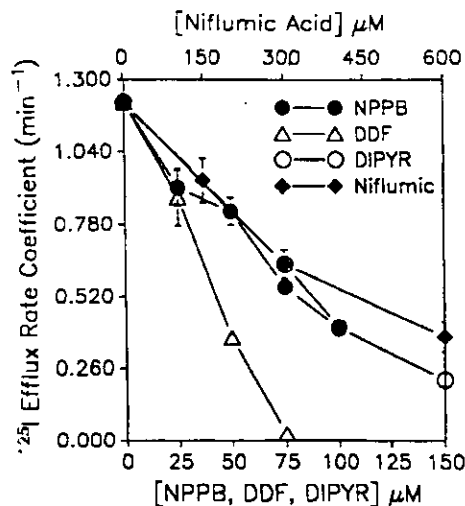


Fig. 4. Effect of Cl channel blockers on hyposmolarity-induced 125 I fluxes in cultured granule neurons of 1–2 days in culture. Drugs at indicated concentrations were present in washing medium and throughout experiment. Definitions are as in Fig. 1. Note that scale for niflumic acid is different from that for other inhibitors. Results are expressed as difference between maximum efflux rate coefficient in hyposmotic medium and that observed in isosmotic medium. Points are means \pm SE of 6–8 experiments; SE are represented by vertical bars when they exceeded size of symbols. All results were significantly different from controls by $P < 0.001$.

The polyunsaturated fatty acids arachidonic acid, linoleic acid, and linolenic acid also exerted a marked inhibitory effect on volume-activated 125 I fluxes, with about the same potency. A clear inhibition was observed at 5 μ M, and at 20 μ M, 125 I efflux was almost completely inhibited (Fig. 5). Monounsaturated and saturated fatty acids failed to decrease 125 I fluxes (Fig. 5). The potency of the inhibitors tested expressed as IC_{50} is shown in Table 1. The maximum value of 125 I release (peak release) was used in all figures except Fig. 3 and in Table 1. This peak value appears very regularly at

Table 1. Effect of fatty acids and chloride channel blockers on the release of $[^3\text{H}]$ taurine and 125 I stimulated by hyposmolarity

Drug	IC_{50} , μ M		
	$[^3\text{H}]$ taurine release		125 I release
	1–2 DIV	7–8 DIV	1–2 DIV
NPPB	28.1 (16–47)	28.0 (20–39)	38.6 (15–98)
DDF	38.2 (25–58)	35.8 (23–56)	34.5 (8–145)
Dipyridamole	34.0 (14–84)	63.8 (45–90)	69.9 (40–121)
DIDS	32.8 (22–49)	46.1 (30–70)	
Niflumic acid	306.5 (182–517)	321.1 (180–525)	204.3 (59–709)
Arachidonic acid	7.8 (7–8)	5.2 (3–8)	5.9 (4–9)
Linolenic acid	7.6 (6–9)	8.8 (7–10)	5.8 (3–10)
Linoleic acid	7.1 (6–8)	8.9 (7–11)	7.4 (1–24)

Results are half-maximal inhibitory (IC_{50}) concentration values (means, with 95% confidence interval given in parentheses) of at least 4 replicate experiments, analyzed by the GraphPad Inplot Program. IC_{50} values were calculated from inhibition curves of $[^3\text{H}]$ taurine and 125 I release induced by 50% hyposmotic medium in presence of different concentrations of indicated drugs. NPPB, 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid; DDF, 1,9-dideoxyforskolin; DIV, days in vitro.

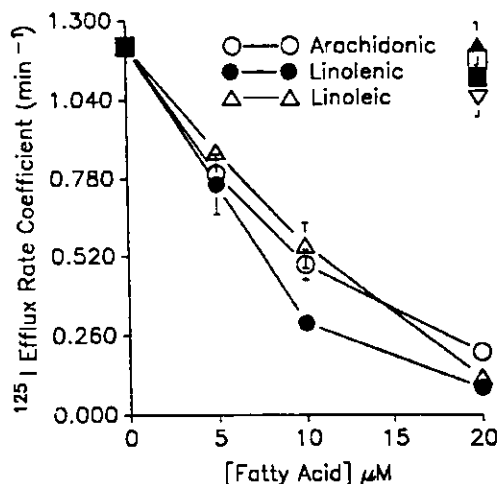


Fig. 5. Inhibitory effect of polyunsaturated fatty acids arachidonic, linolenic, and linoleic acids on swelling-stimulated ^{125}I efflux from cultured granule neurons of 1–2 days in culture. At 20 μM , monounsaturated fatty acids oleic (\blacktriangle) and ricinoleic (\triangle) acids as well as saturated fatty acids arachidic (\square) and palmitic (\blacksquare) acids were ineffective. Fatty acids were present in washing period and throughout experiment. Results are expressed as difference between maximum efflux rate coefficient in hyposmotic medium and that observed in isosmotic medium. Data are means \pm SE of 6–8 experiments; SE are represented by vertical bars when they exceeded size of symbols. Except for results of arachidic, myristic, oleic, and ricinoleic acids, which were not significantly different from controls, all other results were significantly different by $P < 0.001$.

1–2 min of superfusion with the hyposmotic medium (Fig. 3). None of the inhibitors delayed the peak release time.

Effects on ^3H taurine release. The efflux of taurine in response to hyposmolarity was followed during maturation of cerebellar granule cells at 1, 3, 5, and 7 DIV. The release of taurine in isosmotic medium was ~ 1 –1.5% of the total radioactive taurine pool, and this figure was essentially the same in neurons of different days in culture (Fig. 6). Taurine release increased markedly, and the peak release was reached 1–2 min after the

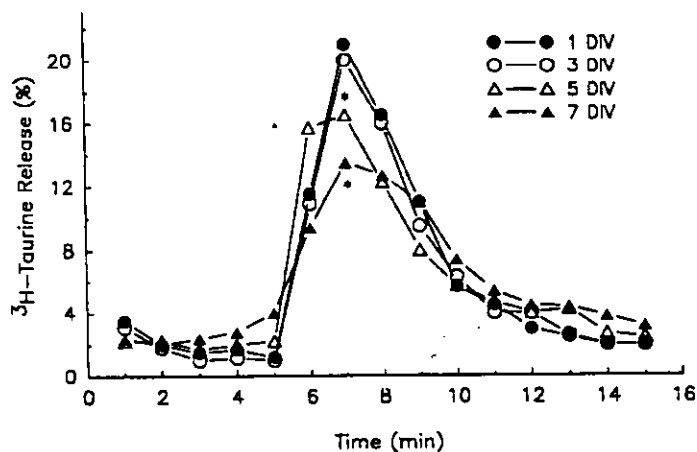


Fig. 6. Effect of hyposmotic swelling on ^3H taurine release in granule neurons of 1, 3, 5, and 7 days in vitro (DIV). ^3H taurine efflux was sequentially measured in isosmotic and 50% hyposmotic media at 1-min intervals for 15 min. Results shown are expressed as percentage of tracer released at each sample collection. Results are means \pm SE of 4–8 experiments. Results at 5 and 7 DIV were significantly lower than those at 1 and 3 DIV ($*P < 0.001$).

hyposmotic stimulus. The efflux then decreased to the baseline. The time course of ^3H taurine release upon exposure to hyposmotic (50%) solutions was similar in neurons of various days in culture. The amount of ^3H taurine released was somewhat higher in younger (65% in 5 min) than in older neurons (54% in 5 min) (Fig. 6). Taurine efflux stimulated by hyposmolarity was markedly inhibited by Cl channel blockers. Figure 7A shows the concentration-dependent inhibition of taurine efflux by NPPB, DDF, dipyrindamole, and niflumic acid in neurons of 1–2 DIV. The potency order of the Cl channel blockers in these neurons was similar to that observed on ^{125}I fluxes. DDF was the most potent and niflumic acid the least potent of the drugs examined (Table 1). The effect of these inhibitors in neurons of 7–8 DIV is shown in Fig. 7B. As for neurons of 1–2 DIV, all drugs markedly inhibited the hyposmolarity-induced taurine release. No significant difference was observed in the potency of the Cl channel blockers in immature and mature neurons with exception of dipyrindamole, which was slightly more potent in immature neurons (Fig. 7, A and B, Table 1). A strong inhibitory effect of polyunsaturated fatty acids on taurine release, similar to that exhibited on ^{125}I fluxes, was observed on taurine efflux in neurons of 1–2 DIV (Fig. 8A). As for the other Cl channel blockers, the polyunsaturated fatty acids were also effective inhibitors of taurine efflux on neurons of 7–8 DIV (Fig. 8B). The potency of the inhibitors tested expressed as IC_{50} is shown in Table 1.

DISCUSSION

Activation of an anion permeability is the main event in the response of cerebellar neurons to cell volume increase. Whereas in isosmotic conditions Cl permeability is restricted, it dramatically increases upon swelling and dominates the membrane conductance, making K efflux rate limiting for Cl and water efflux and consequently for RVD (17). This is demonstrated by the acceleration of RVD in the presence of gramicidin (17). These results emphasize the importance of the Cl efflux pathway in the mechanism of cell volume regulation in cerebellar neurons. If, moreover, as discussed later, this Cl pathway appears also to carry other osmolytes, the characterization of this pathway is of particular interest to understand the mechanism of RVD.

Cl channels activated by hyposmolarity have been identified in a large variety of cell types, and some of them have been recently cloned (3, 7, 19, 24). These channels are voltage dependent, outwardly rectifying, and exhibit a greater selectivity for I over Cl. The volume-activated Cl channels in all cell types examined are inhibited by NPPB and DDF (6). Other potent blockers of Cl channels are the polyunsaturated fatty acids arachidonic, linoleic, and linolenic acids (5, 11, 15).

The present results showed remarkable similarities in the sensitivity of ^3H taurine and ^{125}I efflux activated by hyposmolarity to a number of compounds with known actions as Cl channel blockers. This susceptibility of taurine fluxes to Cl channel blockers was first suggested by the inhibitory effect of DIDS reported in a

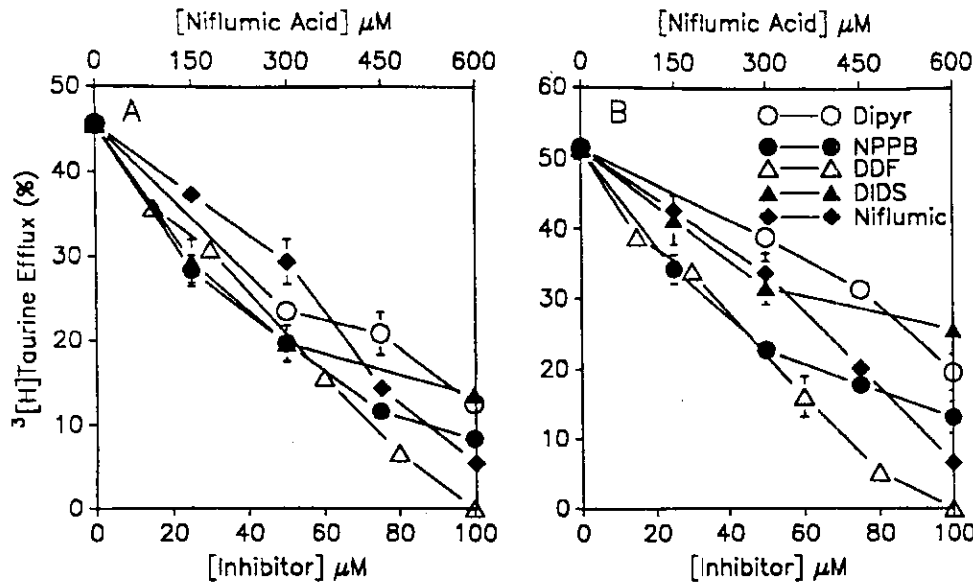


Fig. 7. Effect of Cl channel blockers dipyridamole, NPPB, DDF, DIDS, and niflumic acid on volume-associated [³H]taurine release in granule neurons of 1-2 days in culture (A) and in neurons of 7-8 days in culture (B). [³H]taurine efflux was sequentially measured in isosmotic and 50% hyposmotic media during a 5-min period. Results shown are expressed as difference (in %) between isosmotic and hyposmotic media and are means \pm SE of 6-8 experiments; SE are represented by vertical bars when they exceeded size of symbols. All results were significantly different from controls by $P < 0.001$.

variety of cells (8, 13). The inhibitory effect of niflumic acid on taurine efflux was first described in skate red blood cells (2). More recently, inhibition of taurine release by these and other Cl channel blockers has been reported in astrocytes (6, 22), in Chinese hamster ovary cells (21), and in flounder erythrocytes (9). In these two latter cell types, parallel studies have been made on the effect of Cl channel blockers on taurine and Cl fluxes (traced as ¹²⁵I).

In the present work, niflumic acid, dipyridamole, NPPB, and DDF all inhibited RVD and concomitantly exhibited inhibitory actions on [³H]taurine and ¹²⁵I efflux from cerebellar granule neurons. In a previous study, we found RVD in granule neurons to be less sensitive to dipyridamole. In the present work, dipyridamole was found consistently more sensitive than niflumic acid and less sensitive than NPPB and DDF in both RVD and osmolyte fluxes (Fig. 1, Table 1). We have no explanation for the higher sensitivity to dipyridamole shown by granule neurons in the present study.

An interesting finding is that polyunsaturated fatty acids are strong inhibitors of RVD and of the volume-

stimulated taurine and ¹²⁵I efflux from neurons. In fact, polyunsaturated fatty acids are the most potent blockers of RVD and osmolyte fluxes so far described. Fatty acids are known to directly modulate conductance through a number of ion channels (5, 15). In general, cationic channels are activated and anionic channels are inhibited by fatty acids (5, 15). This effect does not appear to be mediated by metabolic intermediates of the arachidonic acid metabolic cascade (12) but rather seems a direct effect on the volume-activated conductance. The similar sensitivity of taurine and ¹²⁵I fluxes to polyunsaturated fatty acids supports the suggestion of a common pathway for these two osmolytes in neurons.

The permeability pathway suggested for osmolyte fluxes is a nonselective anion channel; negatively charged as well as neutral amino acids may be transported through this channel. Evidence in support of this notion came first from a study by Banderalli and Roy (1) in Madin-Darby canine kidney cells in which they could detect currents carried by amino acids through an outwardly rectifying anion channel activated by hypos-

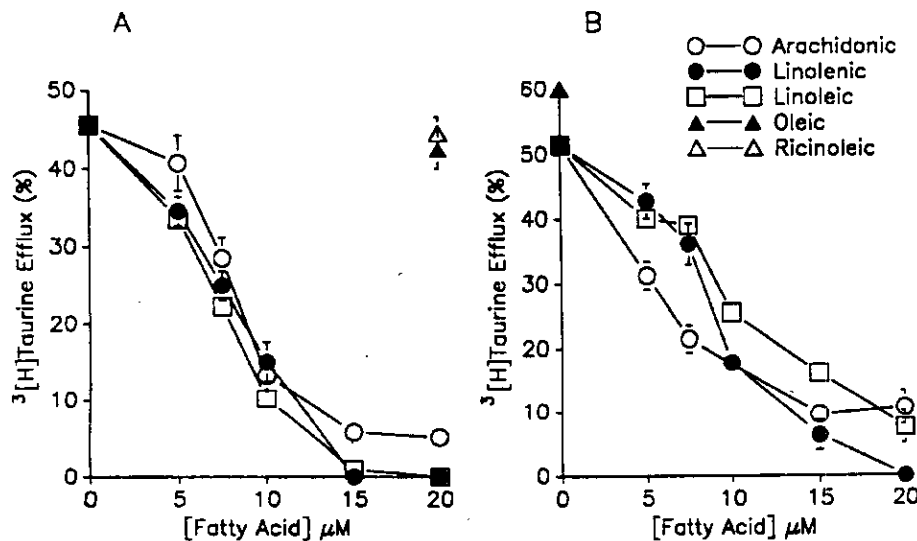


Fig. 8. Inhibitory effect of polyunsaturated fatty acids arachidonic, linolenic, and linoleic acids on swelling-induced [³H]taurine efflux in neurons of 1-2 days in culture (A) and in neurons of 7-8 days (B). [³H]taurine efflux was sequentially measured in isosmotic and 50% hyposmotic media during a 5-min period. Results shown are expressed as difference (in %) between isosmotic and hyposmotic media and are means \pm SE of 6-8 experiments; SE represented by vertical bars when they exceeded size of symbols. Except for results of oleic (\blacktriangle) and ricinoleic acids (\triangle), and first point in curve of effect of arachidonic acid in A, which were not significantly different from controls, all other results were significantly different by $P < 0.001$.

molarity. Taurine was the most permeable, showing a permeability ratio for taurine to Cl ($P_{\text{taurine}}/P_{\text{Cl}}$) of 0.43. This was also confirmed in astrocytes by Jackson and Strange (6). They found an anion channel activated by hyposmolarity, blocked by NPPB and DDF, and outwardly rectifying, which is permeable to taurine with $P_{\text{taurine}}/P_{\text{Cl}}$ of 0.2. The present results showing a close coincidence of the inhibitory effect of a number of Cl channel blockers on taurine and ^{125}I fluxes activated by swelling in neurons enlarge the body of evidence, suggesting a close relationship between taurine and Cl fluxes associated with cell volume regulation. Several possible explanations for this relationship can be envisaged: 1) taurine and Cl fluxes permeate through the same channel; 2) taurine efflux occurs via an anionic channel-like pathway, different from that carrying Cl fluxes; 3) taurine and Cl fluxes are transported by different pathways but are so closely interconnected that inhibition of Cl fluxes conveys a subsequent inhibition of the taurine pathway as well; and 4) the inhibitors affecting Cl and taurine pathways are acting on a sensor, signal, or transduction mechanism responsible for activating the different pathways for the various osmolyte fluxes.

The ability of cells to respond to changes in cell volume induced by swelling by an active volume regulatory process seems to be a well-preserved function of animal cells. Even highly specialized cells such as neurons exhibit this phenomenon. The present results showed that RVD and its associated osmolyte fluxes are present in cerebellar neurons since an early stage of maturation. If one uses the efflux of taurine as marker for the volume-stimulated osmolyte fluxes, it could be assumed that the regulatory osmolyte fluxes persist after neuronal differentiation with essentially the same basic properties and pharmacological sensitivity. This suggests that the adaptive response to cell volume changes is an intrinsic property of neurons as it is in other less specialized animal cells.

We acknowledge the technical assistance of Claudia Peña and Claudia Rodríguez.

This work was partially supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México Grant IN 202094.

Address for reprint requests: H. Pasantes-Morales, Instituto de Fisiología Celular, Ciudad Universitaria, CP 04510, Apartado Postal 70-253, México DF, Mexico.

Received 12 July 1995; accepted in final form 22 December 1995.

REFERENCES

- Banderalli, U., and G. Roy. Anion channels for amino acids in MDCK cells. *Am. J. Physiol.* 263 (*Cell Physiol.* 32): C1200–C1207, 1992.
- Goldstein, L., and S. R. Brill. Volume-activated taurine efflux from skate erythrocytes: possible band 3 involvement. *Am. J. Physiol.* 260 (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 29): R1014–R1020, 1991.
- Grunder, S., A. Thiemann, M. Pusch, and T. J. Jentsch. Regions involved in the opening of ClC-2 chloride channel by voltage and cell volume. *Nature Lond.* 360: 759–762, 1992.
- Hoffmann, E. K., and L. O. Simonsen. Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells. *Physiol. Rev.* 69: 315–382, 1989.
- Hwang, T., S. E. Guggino, and W. B. Guggino. Direct modulation of secretory chloride channels by arachidonic and other cis-unsaturated fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5706–5709, 1990.
- Jackson, P. S., and K. Strange. Volume-sensitive anion channels mediate swelling-activated inositol and taurine efflux. *Am. J. Physiol.* 265 (*Cell Physiol.* 34): C1489–C1500, 1993.
- Jentsch, T. Molecular physiology of anion channels. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6: 600–606, 1994.
- Kimelberg, H. K., S. K. Goderie, S. Higman, S. Pang, and S. Waniewski. Swelling induced release of glutamate, aspartate and taurine from astrocyte cultures. *J. Neurosci.* 10: 1483–1491, 1990.
- Kirk, K., J. C. Ellory, and J. D. Young. Transport of organic substrates via a volume-activated channel. *J. Biol. Chem.* 267: 23475–23478, 1992.
- Kirk, J., and K. Kirk. Inhibition of volume-activated I^- and taurine efflux from HeLa cells by P-glycoprotein blockers correlates with calmodulin inhibition. *J. Biol. Chem.* 269: 29389–29394, 1994.
- Lambert, I. H. Effect of arachidonic acid, fatty acids, prostaglandins, and leukotrienes on volume regulation in Ehrlich ascites tumor cells. *J. Membr. Biol.* 98: 207–221, 1987.
- McManus, M., C. Serhan, P. Jackson, and K. Strange. Ketoconazole blocks organic osmolyte efflux independently of its effect on arachidonic acid conversion. *Am. J. Physiol.* 267 (*Cell Physiol.* 36): C266–C271, 1994.
- Morán, J., S. Hurtado, and H. Pasantes-Morales. Similar properties of taurine release induced by potassium and hyposmolarity in the rat retina. *Exp. Eye Res.* 53: 347–352, 1991.
- Morán, J., and A. J. Patel. 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.
- Ordway, R. W., J. J. Singer, and J. V. Walsh. Direct regulation of ion channels by fatty acids. *Trends Neurosci.* 14: 96–100, 1991.
- Pasantes-Morales, H., S. Alavez, R. Sánchez-Olea, and J. Morán. Contribution of organic and inorganic osmolytes to volume regulation in rat brain cells in culture. *Neurochem. Res.* 18: 445–452, 1993.
- Pasantes-Morales, H., E. Chacón, R. A. Murray, and J. Morán. Properties of osmolyte fluxes activated during regulatory volume decrease in cultured cerebellar granule neurons. *J. Neurosci. Res.* 37: 720–727, 1994.
- Pasantes-Morales, H., T. E. Maar, and J. Morán. Cell volume regulation in cultured cerebellar granule neurons. *J. Neurosci. Res.* 34: 219–224, 1993.
- Paulmich, M., M. Gschwentner, E. Woll, A. Schmarda, M. Ritter, G. Kanin, H. Ellemunter, W. Waitz, and P. Deetjen. Insight into the structure-function relation of chloride channels. *Cell Physiol. Biochem.* 3: 374–387, 1993.
- Roy, G., and R. Sauvé. Effect of anisotonic media on volume, ion and amino acid content and membrane potential of kidney cells (MDCK) in culture. *J. Membr. Biol.* 100: 83–96, 1987.
- Sánchez-Olea, R., C. Fuller, D. Benos, and H. Pasantes-Morales. Volume-associated osmolyte fluxes in cell lines with or without the anion exchanger. *Am. J. Physiol.* 269 (*Cell Physiol.* 35): C1280–C1286, 1995.
- Sánchez-Olea, R., C. Peña, J. Morán, and H. Pasantes-Morales. Inhibition of volume regulation and efflux of osmoregulatory amino acids by blockers of Cl^- transport in cultured astrocytes. *Neurosci. Lett.* 156: 141–144, 1993.
- Schousboe, A., R. Sánchez-Olea, J. Morán, and H. Pasantes-Morales. Hyposmolarity-induced taurine release in cerebellar granule cells is associated with diffusion and not with high affinity transport. *J. Neurosci. Res.* 30: 662–665, 1991.
- Valverde, M. A., M. Díaz, F. V. Sepulveda, D. R. Gill, S. C. Hyde, and C. F. Higgins. Volume-regulated chloride channels associated with the human multidrug resistance P-glycoprotein. *Nature Lond.* 355: 830–833, 1992.
- Venglarik, C. J., R. G. Bridges, and R. A. Fritzell. A simple assay for agonist-regulated Cl and K conductances in salt-secreting epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 259 (*Cell Physiol.* 28): C358–C364, 1990.

II. Investigación del efecto de los intermediarios metabólicos del ácido araquidónico sobre el DRV y los flujos de osmolitos.

El ácido araquidónico (AA) es un intermediario clave en el metabolismo celular. Se libera de la membrana plasmática en respuesta a un estímulo químico (hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento, antígenos y otros estímulos). Los mecanismos responsables de esta liberación incluyen : (a) la activación de la fosfolipasa A₂ (PLA₂), (b) la acción secuencial de la fosfolipasa C (PLC) y la lipasa de diacilglicerol, (c) la activación de la fosfolipasa D (PLD).

Como se discutirá más adelante, el AA y otros ácidos grasos pueden modular ya sea directamente o a través de los intermediarios de la cascada metabólica del AA, la actividad de diferentes tipos de canales presentes en la membrana plasmática de las células (Meves, 1994) (Ver Tabla 2).

Tabla 2. Regulación de la actividad de canales iónicos por el ácido araquidónico.

Tipo de canal y preparación	Efecto	Concentración (μM)	Método	Mecanismo	Otros ácidos grasos.				Referencia
					OL	MI	PA	ES	
Canales de Na^+									
Axón gigante de calamar	inhibición	30-500	Perfusión	Det.	*				Takenaka (1987)
Músculo esquelético de vertebrados	activación	1-20	Pipeta Baño		*		*		Wieland (1992)
	inhibición	5-10					0		
Neuronas del Estriado	inhibición	10		Directo					Fraser (1993)
Canales de Ca^{2+}									
Células piramidales de hipocampo	inhibición	10-100		PKC	*		0		Keyser (1990)
Células GH3	activación	1					0		Vacher (1989) Kornand (1991)
	inhibición	10-50							
Células NG108-15	inhibición	25-50		Directo			*		Scmitt (1994)
Células PC12	inhibición	5					0		Rittenhouse (1993)
Músculo liso de Intestino	inhibición	10-30		Directo	*		0		Shimada (1992)
Músculo ventricular	activación	3-30		Det.	*		*	*	Huang (1992)
Canales de K^+ Rectificadores Salientes									
Células piramidales del hipocampo	activación	10-100	sello con el interior expuesto	Directo					Premkumar (1990)
	inhibición	10-100							
Neuronas neocorticales	activación	50		Met (icic)					Zona (1993)
Células GH3	inhibición	1					0		Vacher (1989)
Músculo liso del intestino	inhibición	10					0		Shimada (1992)
Músculo liso gástrico	activación	10-100	Célula completa sello interior expuesto y exterior expuesto	Directo	*	*	0		Ordway (1989)
I_A Trasientes salientes De K^+									
Neuronas simpáticas de rana	inhibición	2-100		Directo					Villarroel (1993)
Células de insulinoma	activación	5-20		PKC	*	0	0		Muller (1992)

El efecto se refiere al causado por el ácido araquidónico (AA). Otros ácidos grasos se refiere a; OL, oléico; MI, mirístico; PA, palmítico; ES, esteárico. El * indica que el ácido graso mimetiza el efecto del AA. El 0 indica que el ácido graso no mimetiza el efecto del AA. Mecanismo: Det. Detergente, mediado por PKC o por metabolitos de las vías de la lipo-oxigenasa o de la ciclo-oxigenasa.

Tabla 2. Regulación de la actividad de canales iónicos por el ácido araquidónico.

Tipo de canal y preparación	Efecto	Concentración (μ M)	Método	Mecanismo	Otros ácidos grasos.				Referencia
					OL	MI	PA	ES	
Canales de K⁺ Muscarínico									
Células atriales	activación	50	Célula adherida	Met (lip)					Kurachi (1998)
	activación	50-100	Célula adherida	Met (lip)					Kim (1989)
	activación	20		Met (lip)					Scherer (1990)
	inhibición	20		Met (cic)					Scherer (1990)
Neuronas de <i>Aplysia</i>	activación	4-50	Microelectrodos	Met (lip)					Piomelli (1987)
Canales de Cl⁻									
Epitelio	inhibición	1-25	sello interior	Directo	*	0	0		Hwang (1990)
	inhibición	5-100	expuesto	Directo	*	0	0		Anderson (1990)
Células parietales gástricas	activación	10		Met (cic)					Sakai (1992)
Receptores de glutamato Ligados a canales									
Receptor-NMDA	activación	0.5-1.0		Directo					Miller (1992)
Receptor-AMPA	inhibición	5							Miller (1993)
Receptores de GABA Ligados a canales									
Sinaptosomas Corticales	inhibición	2-200	captura de Cl ³⁶		*	0	0		Schwartz (1992)
Uniones estrechas									
Glándulas lagrimales	inhibición	25-100	Doble parche	Directo		*			Glaume (1989)
Corazón	inhibición	1-100	Doble parche	Directo					Schmilinsky (1990)

El efecto se refiere al causado por el ácido araquidónico (AA). Otros ácidos grasos se refiere a; OL, oléico; MI, mirístico; PA, palmítico; ES, esteárico. El * indica que el ácido graso mimetiza el efecto del AA. El 0 indica que no mimetiza el efecto del AA. Mecanismo: Det, efecto de detergente, mediado por PKC o por metabolitos de las vías de lipo-oxigenasa o de la ciclo-oxigenasa.

El AA tiene un metabolismo complejo que puede derivarse a través de varias vías que dan origen a diferentes productos, estas vías están representadas en la figura 3.

El metabolismo del AA inicia con su movilización a partir de los fosfolípidos de la membrana como se mencionó anteriormente y continúa con una serie de

Metabolismo del ácido araquidónico

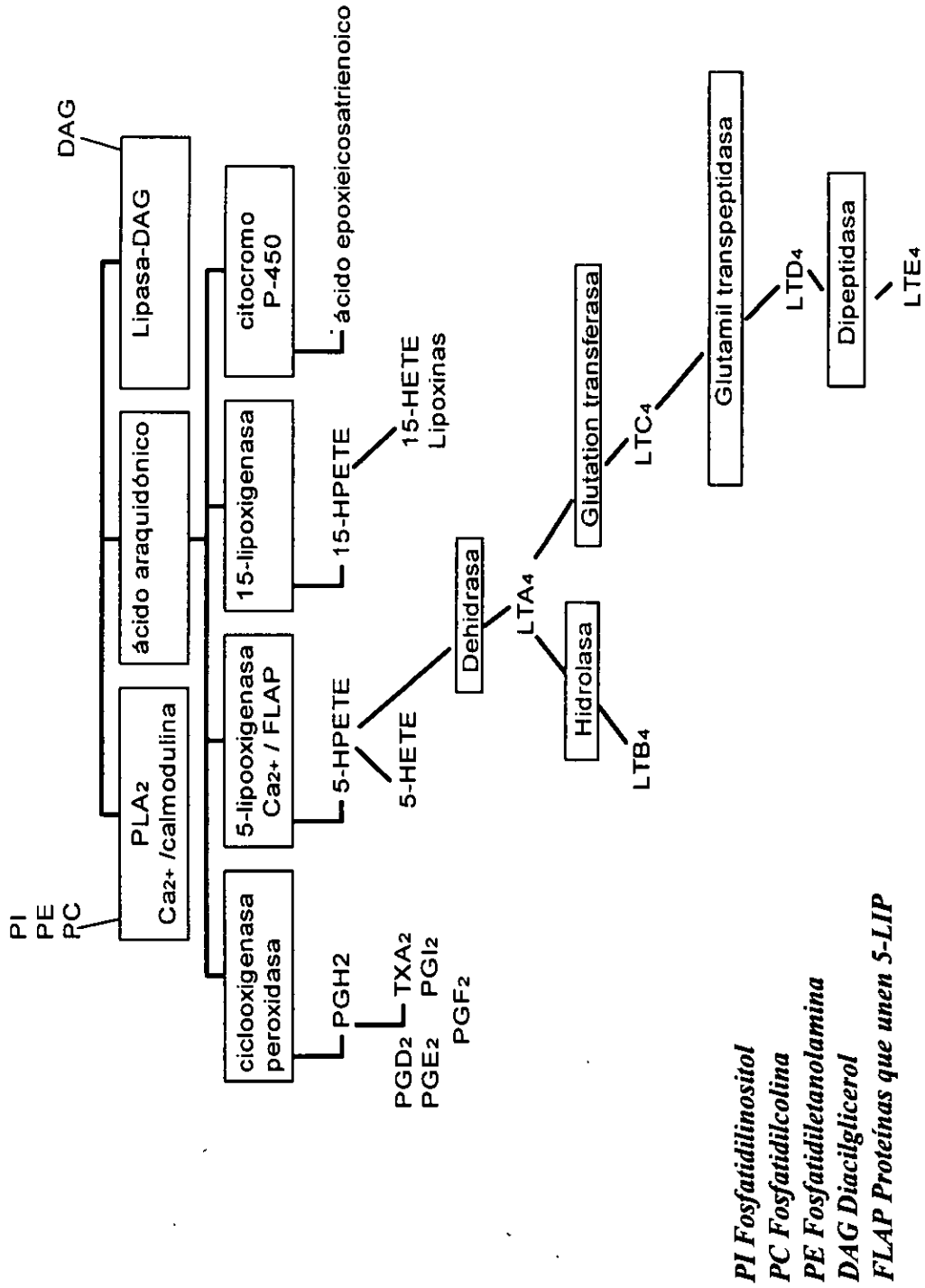


Figura 3. Vías principales para la producción de eicosanoides.

reacciones oxidativas secuenciales. Son tres las enzimas que están implicadas en el metabolismo del AA: la prostaglandina sintetasa-H (PGH), también llamada ciclo-oxigenasa, la citocromo P-450 y diferentes lipoxigenasas.

Vía de la ciclo-oxigenasa.

La prostaglandina sintetasa-H (PGH) metaboliza al AA produciendo prostaglandinas. La sintetasa-PGH tiene actividad de ciclo-oxigenasa y peroxidasa. Por medio de su actividad de ciclo-oxigenasa inserta 2 oxígenos dentro del AA dando como resultado la formación de prostaglandina-G₂ (PGG₂), mientras que en su actividad de peroxidasa reduce a la PGG₂ a prostaglandina-H₂ (PGH₂). La aspirina y la indometacina inhiben la actividad de ciclo-oxigenasa y no la de peroxidasa.

El AA es el sustrato preferencial para la ciclo-oxigenasa, pero también el ácido dihomo- γ -linolénico y el ácido eicosapentaenoico (EPA) pueden ser convertidos a prostaglandinas. Los endoperóxidos son inestables a pH fisiológico y a la temperatura, por lo que se consideran el paso limitante en la formación de otros productos. Los endoperóxidos pueden ser convertidos enzimáticamente a prostaglandina-I₂ (PGI₂) y tromboxano-A₂ (TXA₂), tromboxano-B₂ (TXB₂), o a prostaglandina-E₂ (PGE₂) y prostaglandina-D (PGD).

Vía de las lipoxigenasas.

En células de mamífero existen tres diferentes isoformas de lipoxigenasas; la 5-lipoxigenasa (5-LIP), la 12-LIP y la 15-LIP, que catalizan la incorporación de oxígeno dentro del AA en las posiciones 5, 12 y 15 respectivamente.

Los productos iniciales de cada una de las reacciones llevadas a cabo por cada una de las lipoxigenasas son los ácidos 5, 12 y 15 hidroperoxi eicosatetranoicos (5-HPETE, 12-HPETE y 15-HPETE). Los ácidos 5-HPETE,

12-HPETE y 15-HPETE posteriormente se reducen a ácidos hidroxieicosatetranoicos 5, 12 y 15 respectivamente (5-HETE, 12-HETE y 15-HETE). De manera alternativa, el ácido 5-HPETE puede convertirse a un intermediario inestable, el LTA₄, el cual se convierte a leucotrieno-B₄ (LTB₄) por acción de la hidrolasa LTA₄ citosólica o, si el LTA₄ es conjugado con la glutatión (γ-glutamil-cistoinil-glicina) por una glutatión-S transferasa, puede formar leucotrieno-C₄ (LTC₄). La pérdida secuencial de un residuo de ácido glutámico y de una glicina del LTC₄ da lugar a la formación de leucotrieno-D₄ (LTD₄) y del leucotrieno-E₄ (LTE₄) respectivamente.

Las enzimas glutatión-S transferasa, la glutamyl-transferasa y la cistanil-glicidasa, son enzimas que están localizadas en la membrana plasmática, lo cual sugiere que el LTD₄ se libera directamente al espacio extracelular.

Vía del citocromo P-450, "epoxigenasa".

En esta vía el AA es metabolizado a productos oxigenados tales como los HETEs, los epóxidos (EETs). Estos productos oxigenados posiblemente regulan el transporte renal y ocular actuando sobre la ATPasa-Na⁺-K⁺ y además regulan la actividad de las plaquetas de la sangre y otras células.

Los mecanismos de acción del AA sobre los canales iónicos considerados hasta ahora son: 1) la interacción directa del AA con el canal (Giaume et al., 1989; Orway et al., 1989), 2) modulación de los canales por los productos de su metabolismo del AA como el LTD₄ (Mong et al., 1988; Mong et al., 1987), 3) la modulación por parte del AA o de sus metabolitos de proteínas G incrementando el calcio citosólico, el cual a su vez puede tener efecto sobre canales iónicos de manera directa (Vacher et al., 1989) o indirecta mediante la activación de proteínas cinasas (Muller et al., 1992) y subsecuentes reacciones de fosforilación.

Efecto de los inhibidores de las vías metabólicas del AA sobre los osmolitos y el DRV.

La posibilidad de que el efecto inhibitor del AA sobre el DRV y la liberación de $^3\text{[H]}$ taurina y ^{125}I estimulada por hiposmolaridad (50%) que se describe en la publicación anexa estuviera mediado a través de la acción de sus productos metabólicos se investigó el efecto de algunos bloqueadores de las tres vías metabólicas del AA sobre el DRV, y en la liberación de los osmolitos sensibles a cambios en volumen. Los fármacos utilizados fueron los siguientes: la esculetina y el ácido nordihidroguaiarético (NDGA), que son inhibidores de la vía de las lipoxigenasa; la indometacina que inhibe la vía de la ciclo-oxigenasa; la metirapona y la naftoflavona que son inhibidores de la vía del citocromo P-450. El efecto de estos compuestos sobre el DRV se examinó tanto en ausencia como en presencia del AA. Estos experimentos se hicieron con el fin de investigar, si la inhibición observada del DRV se debió al AA por sí mismo ó bien, si la inhibición se debió a la presencia de alguno de los metabolitos del AA. Si la inhibición del DRV es a través de la formación de algún metabolito del AA entonces, el bloqueo de la vía debería de prevenir su acción. En la tabla 3 se muestra que con excepción del NDGA, ninguno de los bloqueadores utilizados afectó el DRV. Asimismo, agregados simultáneamente con el AA, ninguno de ellos fue capaz de prevenir la acción inhibitor del ácido graso. La naftoflavona, un bloqueador de la vía del citocromo P-450, usada en combinación con el AA, produjo un daño celular evidenciado por un incremento notable en el volumen de las células (no se muestran). El inhibidor de la vía de las lipoxigenasas, el NDGA, tuvo un efecto inhibitorio *per se* sobre el DRV y por ello no se procedió a examinar su acción en presencia del ácido araquidónico (Fig. 4).

Tabla 3. Efecto de los inhibidores de las vías metabólicas del ácido araquidónico sobre la liberación de los osmolitos y el DRV, inducida por hiposmolaridad en neuronas granulares de cerebelo en cultivo.

Condición	DRV, (%)	Liberación de $^3\text{[H]}$ -taurina, (%)	Constante de liberación I^{125} , (min^{-1})
Control	56.3 ± 1.64	37.8 ± 1.32	1.282 ± 0.05
Indometacina (50 μM)	49.5 ± 4.40	35.92 ± 1.54	1.148 ± 0.28
Esculetina (100 μM)	55.1 ± 1.89	35.99 ± 2.35	0.802 ± 0.04
NDGA (10 μM)	42.0 ± 0.00	40.40 ± 1.88	1.210 ± 0.05
Naftoflavona (25 μM)	56.4 ± 1.56	32.22 ± 0.69	1.263 ± 0.02
Metirapona (100 μM)	27.8 ± 2.00	28.74 ± 6.73	1.429 ± 0.09
Araquidónico (5 μM)	15.0 ± 1.99	4.24 ± 0.84	0.916 ± 0.05
+ Esculetina	10.4 ± 2.10		
+ Metirapona	0		
+Indometacina	27.2 ± 1.18		

Los datos del DRV representan el % de volumen recuperado en 15 min. Las neuronas en cultivo fueron tratadas en un medio salino sin calcio y con tripsina. En el tiempo cero una muestra de la suspensión celular fue diluida alrededor de 100 veces con medio isosmótico o hiposmótico al 50% conteniendo el AA y los inhibidores a las concentraciones indicadas. Para la liberación de los osmolitos las neuronas en cultivo fueron incubadas con ^3H taurina y ^{125}I y preincubadas 10 min con los diferentes inhibidores. La liberación de ^3H taurina fue calculada como porcentaje de la radioactividad liberada en medio isosmótico e hiposmótico y los resultados fueron expresados como la liberación máxima estimulada, i.e., la diferencia entre estos valores. Los datos de la liberación de ^{125}I son expresados como la liberación en medio isosmótico y el máximo valor en medio hiposmótico. Los datos son el promedio \pm ES de 8-10 determinaciones.

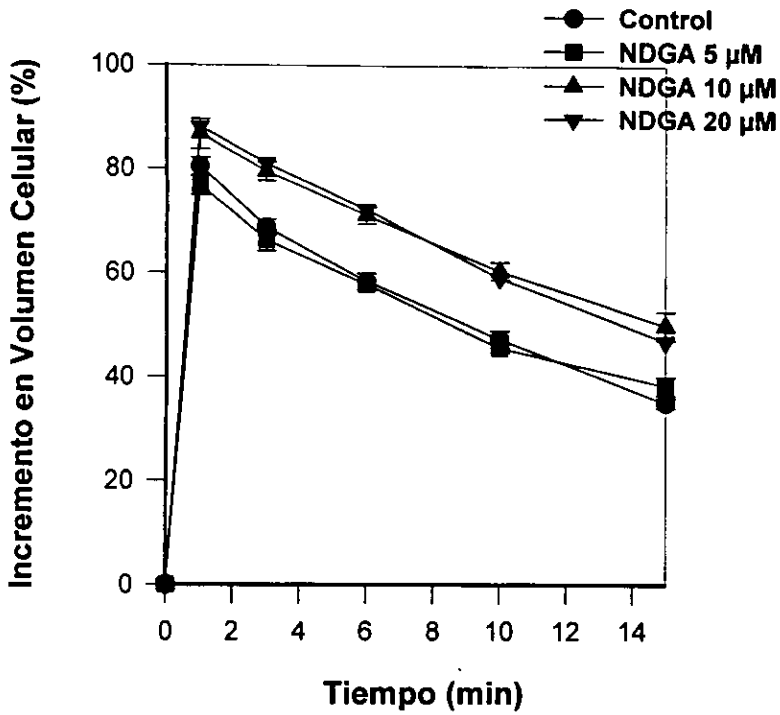
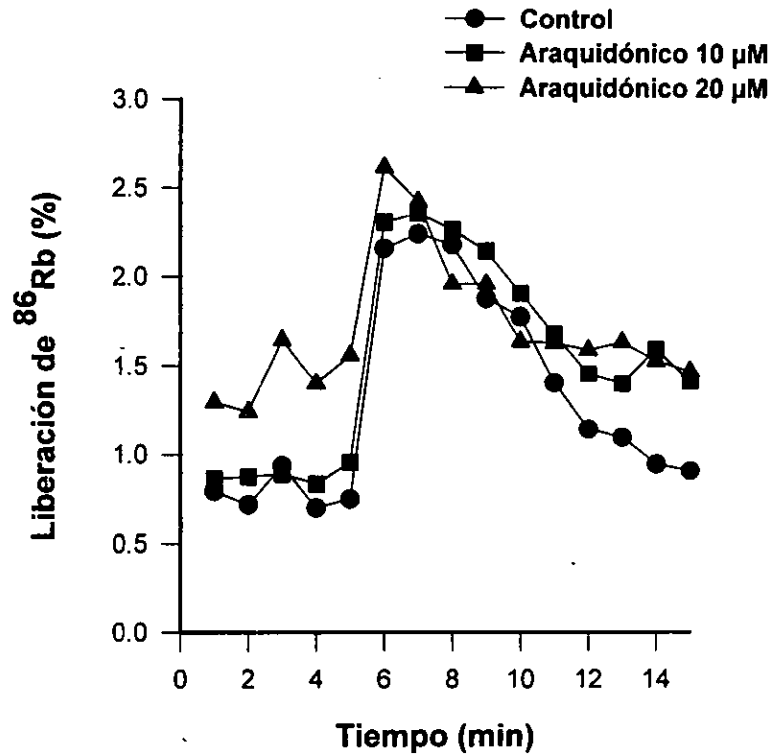


Figura 4.

El efecto del NDGA sobre el DRV en neuronas de cerebelo. Los resultados están expresados como porcentaje del incremento en el volumen celular relativo a el valor del isosmótico. Los datos señalan de 6-9 experimentos \pm ES.

Figura 5.

Efecto del AA sobre la liberación de ^{86}Rb en respuesta a un estímulo hiposmótico en neuronas en cultivo. Los resultados se expresan como el % de liberación de ^{86}Rb en el tiempo indicado.



Efecto del ácido araquidónico sobre la liberación de K^+ estimulada por el aumento en volumen.

En la publicación que se anexa, se muestran los resultados de una importante acción inhibitoria del AA sobre los flujos de Cl^- y de $^3[H]$ -taurina. En esta parte del trabajo se investigó el efecto del AA sobre los flujos de K^+ estimulados por el incremento en volumen. Esta investigación puede indicar, por una parte, si el efecto del AA se está ejerciendo únicamente en la vía aniónica – que como se describió, parece ser también la que transporta a los osmolitos orgánicos – o bien que el AA pudiera estar afectando a algún otro factor dentro de la secuencia sensor – activador – efector.

Los flujos de ^{86}Rb usado como marcador de K^+ , los cuales también contribuyen de manera importante al DRV podrían ser afectados por el AA y otros ácidos grasos poli-insaturados. Los canales de K^+ activados por calcio por lo general son activados por el AA y otros ácidos grasos al igual que los canales de K^+ de alta conductancia presentes en células cardiacas atriales. Sin embargo aún no se ha descrito el efecto del AA en corrientes o flujos de K^+ relacionados con el cambio en volumen celular. Contrastando con el potente efecto inhibitorio que muestran los ácidos grasos poli-insaturados sobre la liberación de $^3[H]$ -taurina y ^{125}I , el AA en ninguna de las concentraciones utilizadas (10 y 20 μM), afectó la liberación de ^{86}Rb inducido por hiposmolaridad, aunque si se observó un incremento significativo en su liberación en condiciones isosmóticas (Fig. 5).

DISCUSION

1.- Caracterización farmacológica de los flujos de Cl⁻ activados por volumen en las neuronas del cerebelo.

Se ha demostrado que la movilización de Cl⁻ y K⁺ tiene lugar a través de vías electrogénicas y que en este proceso no participan los cotransportadores electroneutros. Esta interpretación quedó confirmada en el trabajo presente, en el que se demostró por una parte, que los bloqueadores de canales de Cl⁻ tienen una profunda acción inhibitoria sobre los flujos de Cl⁻ activados por hiposmolaridad y por otra, y consecuentemente, que fármacos inhibidores muy específicos de los cotransportadores electroneutros, no ejercieron ninguna influencia sobre la salida de Cl⁻ estimulada por un incremento en el volumen en las neuronas.

Los resultados de este trabajo muestran que la sensibilidad farmacológica de los flujos de Cl⁻ y taurina asociados al DRV en las neuronas es similar a la que se encontró previamente en los astrocitos. Los compuestos con actividad como bloqueadores de canales de Cl⁻; NPPB, DDF, tamoxifen, ácido niflúmico y dipiridamol inhibieron los flujos correctores de Cl⁻ y taurina en las neuronas estimuladas con un medio hiposmótico, esencialmente con la misma potencia que en los astrocitos. La razón, en parte, puede ser la relativa inespecificidad de los inhibidores disponibles hasta ahora. Por otra, es posible que este mecanismo de movilización de los osmolitos sea una característica muy conservada, con propiedades similares en los distintos tipos celulares.

Un hallazgo importante en el presente trabajo fue la identificación de lo que parece ser un efecto directo de los ácidos grasos insaturados sobre la vía de movilización del Cl⁻. Estos compuestos mostraron un efecto inhibitorio muy potente sobre el DRV y en este estudio se demostró que esta acción se debe a la inhibición de los flujos de Cl⁻ y de aminoácidos, mientras que la vía de movilización del K⁺ no se afecta. Esta observación es interesante por varias razones, entre ellas porque puede

dar información sobre los mecanismos de activación de estos canales, que es un aspecto en el que poco se ha avanzado. Los posibles mecanismos de acción de los ácidos grasos insaturados incluyen los siguientes :

1. Una acción inespecífica como detergente, alterando la organización membranal. Un efecto de esta naturaleza es común a los ácidos grasos tanto saturados como insaturados, y puesto que la acción inhibitoria sobre los flujos de Cl^- se presenta sólo en el caso de los poli-insaturados, esta interpretación queda excluida.
2. Una acción del ácido araquidónico sobre una fosforilación del canal, mediada por el sistema calcio/calmodulina. Este efecto parece ser el responsable de algunas de las acciones de estos ácidos grasos sobre canales de Ca^{2+} y de K^+ . Sin embargo, la activación del canal de Cl^- en la mayor parte de las células en las que se ha examinado, no requiere de una previa fosforilación. Por otra parte, tanto el DRV como la salida de Cl^- en las neuronas granulares son procesos independientes de calcio.
3. Una acción a través de la cascada metabólica del ácido araquidónico. Se ha sugerido que algunos metabolitos de esta vía, en particular el LTD_4 , podrían actuar como mensajeros para la activación de los canales de Cl^- en las células ascíticas de Ehrlich.

En las neuronas granulares este no es el caso, como se demostró en las investigaciones del presente trabajo. La interrupción por medio de fármacos, de todas las vías metabólicas del ácido araquidónico no tuvo ninguna influencia sobre el DRV o sobre los flujos de Cl^- . Por otra parte, esta manipulación del metabolismo del ácido araquidónico tampoco modificó la inhibición ejercida por el propio ácido araquidónico o por otros ácidos grasos insaturados. Si el efecto de éstos fuera debido a algún cambio en los niveles de un elemento de las distintas vías metabólicas del ácido araquidónico, al quedar éstas interrumpidas, el efecto inhibitorio de los ácidos grasos debería desaparecer. Esto no ocurrió, sin embargo, lo que favorece la interpretación de que el efecto de estos compuestos se ejerce directamente.

4. Un efecto directo sobre la molécula transportadora o sobre los microambientes que la rodean. Un efecto directo de los ácidos grasos insaturados sobre el propio canal no puede descartarse y de hecho, algunos ácidos grasos insaturados tiene un efecto directo modulando las propiedades de distintos tipos de canales de K^+ . Los registros hechos en parches aislados, excluyen la posibilidad de que los efectos observados puedan estar mediados por componentes citosólicos. Este tipo de abordaje experimental no excluye, sin embargo, la posibilidad de que el efecto de los ácidos grasos insaturados se esté ejerciendo a través de una modificación en la fluidez de la membrana.

Los efectos inhibidores de los fármacos (NPPB, DDF, dipiridamol, ácido niflúmico, DIDS, ácido araquidónico, ácido linolénico y ácido linoléico) sobre la regulación del volumen celular (DRV) y sobre la liberación de los osmolitos involucrados en dicho proceso (flujos de 3H taurina, Cl^- y K^+) utilizados en este trabajo son muy potentes, lo que pone de manifiesto la importancia de esta vía para el mecanismo corrector del volumen. Los resultados de este trabajo y de otros que le sirvieron de antecedente, sugieren, de hecho, que la respuesta inicial de las neuronas al cambio en volumen, es precisamente la movilización inmediata del Cl^- , lo que produce posiblemente una despolarización, aunque esto no se ha medido experimentalmente. A consecuencia de este cambio eléctrico, podrían activarse canales de K^+ sensibles a voltaje, produciendo una salida de K^+ que permite mantener la electroneutralidad y con ella, la persistencia de los flujos iónicos junto con el agua osmóticamente obligada. De hecho, en un estudio paralelo a éste, llevado a cabo en el laboratorio sobre la caracterización de los flujos de K^+ activados por volumen en estas mismas neuronas, se observa que el curso temporal de esta vía está considerablemente retrasado con respecto a la del Cl^- , lo que sustenta esta interpretación.

2. Similitud en la sensibilidad farmacológica de los flujos de Cl⁻ y taurina en las neuronas granulares del cerebelo.

Una de las observaciones interesantes en este trabajo fue la semejanza observada en las acciones de todos los inhibidores estudiados sobre los flujos de Cl⁻ y de taurina, tomada ésta como un representante de los aminoácidos que funcionan como osmolitos. El efecto similar del ácido niflúmico y dipiridamol sobre los flujos de Cl⁻ y taurina activados por volumen, fue descrito por primera vez en nuestro laboratorio, en un estudio hecho en astrocitos de cerebelo (Sánchez-Olea y col., 1993). A partir de esta observación, se han llevado a cabo estudios electrofisiológicos que muestran que la taurina no sólo en forma aniónica, sino también como molécula neutra, puede permear a través del canal aniónico que se activa por volumen. Se piensa, entonces, que este canal puede ser muy poco selectivo, permitiendo el paso no sólo de una gran variedad de aniones, sino también de numerosas moléculas orgánicas no relacionadas estructuralmente, tales como aminoácidos y polialcoholes. En este trabajo la similitud de las acciones de los fármacos empleados sobre los flujos de Cl⁻ y de taurina sólo permite concluir que su movilización está muy ligada, aunque por el tipo de enfoque experimental, no puede definirse si se trata de la misma molécula transportadora, de una señal de activación común a las dos vías que se afecta con los fármacos empleados o bien que existe una interrelación de manera muy estrecha, que la supresión de uno de los flujos lleva al bloqueo del otro. Estas interrogantes no son fáciles de aclarar ya que, por una parte, los inhibidores existentes hasta la fecha no permiten discriminar entre los distintos tipos de canales de Cl⁻ y por otra, los canales de Cl⁻ no se han identificado plenamente a nivel molecular. Las distintas especies moleculares que pueden ser candidatos a actuar como canales aniónicos -y de osmolitos orgánicos- activados por volumen, se describen en la siguiente sección :

3. Moléculas que pueden actuar como canales activados por volumen.

(i) **El CIC-2** . Es una proteína compuesta de 907 aminoácidos con una masa molecular de 99 kDa y forma parte de una familia de proteínas de membrana, que funcionan como canales de Cl⁻ (CIC-0, CIC-1, CIC-3, CIC-4, CIC-5, CIC6, CIC-7, CIC-K1 y el CIC-K2) (Brandt y Jentsch, 1995). Los análisis de Northern revelan que el CIC-2 está ampliamente distribuido tanto en células de mamíferos como en líneas celulares y hay evidencia de que el CIC-2 forma por sí solo un canal aniónico sensible a volumen (Gründer y col., 1992). Sin embargo, sus características de selectividad iónica, farmacológicas y electrofisiológicas son completamente diferentes de los canales aniónicos rectificadores salientes sensibles a volumen reportados. Se ha postulado que el papel de este canal de Cl⁻ es principalmente mantener el potencial de membrana.

(ii) **La glicoproteína-P**. Esta proteína es el producto del gen *mdr1* y pertenece a la familia de transportadores ABC (ATP-binding-cassette, es decir presentan una secuencia consenso para unir ATP) . La expresión de la glicoproteína-P está sobre regulada en células cancerosas haciéndolas resistentes a drogas citotóxicas al actuar como bomba de expulsión de las drogas. Además de esta función se ha sugerido que puede servir como un canal aniónico activado por hinchamiento y/o como proteína reguladora del canal. Esta interpretación ha sido cuestionada por trabajos que muestran que no existe correlación entre los niveles de expresión de la glicoproteína-P y la actividad del canal activado por hinchamiento (McEwan y col., 1992; Rasola y col., 1994; Wang y col., 1994; Dong y col., 1994; Kunzelmann y col., 1994; De Greef y col., 1995a,b; Morin y col., 1995; Tominaga y col., 1995; Viana y col., 1995).

(iii) **pl_{Cl⁻}**. Esta proteína tiene 235 aminoácidos y fue clonada originalmente de las células MDCK (Paulmichl y col., 1992). La pl_{Cl⁻} está ampliamente distribuida y su secuencia de aminoácidos está altamente conservada a través de las especies. Cuando esta proteína es expresada en ovocitos de *Xenopus* genera una

conductancia al Cl⁻ constitutivamente activa con características similares a las del canal aniónico y al de los osmolitos activado por hinchamiento (Strange y col., 1996). Paulmichl (1992) y Gschwentner (1995) han realizado trabajos que apoyan que esta proteína podría ser la responsable en el proceso de regulación del volumen. Sin embargo, subsecuentes hallazgos por Krapivinsky y col., (1994) demuestran que la proteína está principalmente localizada en el citoplasma celular lo cual lleva a la suposición de que esta proteína pueda servir como un regulador citosólico de un canal endógeno activado por hinchamiento (Ackerman y col., 1994). Esta hipótesis es difícil de reconciliar con los datos originales de Paulmichl y col. (1992) en donde mutaciones puntuales en la proteína alteran la sensibilidad del canal a la inhibición por nucleótidos extracelulares como también las cinéticas y dependencia de Ca²⁺ del canal. Paulmichl y sus colegas han descrito resultados preliminares que indican que aunque la proteína está normalmente presente en el citosol ésta migra a la membrana en respuesta al hinchamiento osmótico Paulmichl y col., (1996) y Strange y col., (1996) han propuesto un modelo de "anclaje-inserción" que puede acoplarse a muchos de los datos obtenidos. Sin embargo, Nilius, Eggermont y sus colegas pone en duda la asociación de pI_{Cl_{in}} en la actividad del canal. Ellos han demostrado que la expresión del pI_{Cl_{in}} de humano difiere de la corriente endógena del ovocitio de *Xenopus* activada por hinchamiento (Voets y col., 1996). Estos datos argumentan en contra de la hipótesis de que el pI_{Cl_{in}} de humano activa (regula) el canal nativo activado por hinchamiento en los ovocitos. Por otra parte, una corriente con las mismas características como las inducidas en los ovocitos de *Xenopus* por el pI_{Cl_{in}} de humano ha sido detectada en ovocitos que expresan otra proteína no relacionada, la CIC-6 (Buyse y col., 1997). Así, entonces, la actividad del canal se ve incrementada en respuesta a la expresión de proteínas forasteras. Finalmente, se encontró que el pI_{Cl_{in}} de células endoteliales está presente predominantemente en el citosol, sin distinguir ninguna alteración en su distribución intracelular en respuesta a el hinchamiento osmótico. Estos datos argumentan en contra de la existencia de pI_{Cl_{in}} como un canal activado por hinchamiento o como un regulador.

(iv) **La Banda 3.** Esta proteína es el principal constituyente de la membrana plasmática de los eritrocitos de muchas especies de vertebrados y tiene su parte homóloga en otros tejidos. Este es un sistema de intercambiador aniónico electroneutro ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$). Sin embargo, la observación de que muchos inhibidores del intercambiador aniónico mediado por la banda-3 inhiben los canales de osmolitos y el aniónico activado por hinchamiento podría sugerir que la banda 3 podría estar involucrada en la actividad del canal activado por hinchamiento (Goldstein y col., 1990; Goldstein y Bill, 1991; García Romeu y col., 1991; Motais y col., 1991, 1992). Sin embargo, se ha reportado que la expresión de la banda 3 de los eritrocitos de ratón no tiene actividad de canal de osmolitos activada por hinchamiento ni tampoco un incremento, en la conductancia ni en la permeabilidad de la taurina, a diferencia de los eritrocitos de trucha expresados en ovocitos de *Xenopus* (Fiévet y col., 1995).

(v) **Fosfolema.** Esta es una pequeña proteína de 72 aminoácidos que cuando es reconstituída en bicapas lipídicas forma canales aniónicos con una aparente permeabilidad a la forma aniónica de la taurina 70 veces mayor sobre la del Cl^- , lo que sugiere que esta proteína podría estar relacionada con el transporte de taurina regulado por volumen (Moorman y col., 1995). Faltan todavía un estudio detallado de las características funcionales y su grado de similitud con los canales de osmolitos activados por hinchamiento.

(vi) **VDAC.** El canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) es un canal parecido a una porina y se ha encontrado formando parte de la membrana externa de las mitocondrias en eucariontes y podría también estar presente en otras fracciones de membrana plasmática (Reymann y col., 1995; Junankar y col., 1995). En una reciente revisión por Reymann y col., (1995) hace referencia a una evidencia inmunotopológica para la expresión del VDAC en la membrana plasmática de los ovocitos de *Xenopus* y, además reporta que el anticuerpo contra el VDAC de linfocitos de humano inhibe los flujos iónicos activados por hiposmolaridad en estas células. Estos datos son consistentes con un papel para VDAC en la actividad del canal aniónico/osmolitos activada por hinchamiento.

4. Comentarios finales.

Los resultados de este trabajo con un enfoque farmacológico, contribuyen de manera complementaria a la identificación de las moléculas que pueden estar actuando como canales de Cl^- durante el DRV. Junto con los datos obtenidos con técnicas electrofisiológicas y de biología molecular, se pueden descartar tanto a la glicoproteína-P como a la P_{Cl^-} , al menos como moléculas que funcionen directamente como transportadores, aunque es posible que su función esté relacionada con la regulación del canal propiamente. El CIC-2, como ya se mencionó, tiene características muy distintas de las que son típicas de los canales de Cl^- activados por volumen. Los intercambiadores aniónicos del tipo de la banda 3 de los eritrocitos se han descrito en el cerebro, particularmente localizada en los astrocitos. No se ha investigado la presencia de una proteína de este tipo en las neuronas, ni *in situ* ni en células en cultivo. El fosfolema, que como se describió con anterioridad, tiene la peculiaridad de ser notablemente más permeable a la taurina que al Cl^- , podría ser un candidato para el transporte preferentemente de los aminoácidos en respuesta al cambio en volumen en las neuronas. Esto no excluye, por supuesto, que existan además uno o varios otros canales de Cl^- que tengan a su cargo la movilización de éste y otros aniones que pueden estar involucrados en la regulación del volumen.

Además de la caracterización molecular de las vías de movilización del Cl^- asociadas a la regulación del volumen, es muy importante conocer los mecanismos encargados de su regulación. A diferencia de las células no excitables, los movimientos de Cl^- a través de las membranas de las neuronas están implicados en funciones cruciales para el funcionamiento y la supervivencia de estas células, en particular en aquellas relacionadas con la modulación de la excitabilidad cerebral. Esta circunstancia hace de especial interés el conocimiento de todos los aspectos relacionados con el manejo del Cl^- como osmolito en las células nerviosas. Los

resultados de este trabajo mostraron, sin embargo, que las características del proceso de recuperación del volumen, incluyendo los osmolitos involucrados y las vías de movilización no difieren de los que se encuentran en otras células con características muy distintas de las neuronas. Esto confirma que el proceso de adaptación a los cambios en el volumen celular es una función muy conservada biológicamente, aún en aquellas células con una especialización muy pronunciada, como son las neuronas.

BIBLIOGRAFIA

- Ackerman, M.J., Wickman, K.D., Clapham, D.E. (1994). Hypotonicity activates a native chloride current in *Xenopus* oocytes. *J. Gen. Physiol.* 103: 153-179.
- Anderson, M.P., and Welsh, M.J. (1990). Fatty acids inhibit apical membrane chloride channels in airway epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 7334-7338.
- Ballanyi, K., Grafe, P. (1988). Cell volume regulation in the nervous system. *Renal Physiol. Biochem.* 5: 142-157.
- Bender, A.S., Neary, J.T., and Norenberg, L-O.B., and Norenberg, M.D. (1992b). Role of Calmodulin and protein kinase C in astrocytic cell volume regulation. *J. Neurochem.* 58: 1874-1882.
- Brandt, S., Jentsch, T.J. (1995). CIC-6 and CIC-7 are two novel broadly expressed members of the CIC chloride channel family. *FEBS Lett.* 377: 15-20.
- Buyse, G., Voets, T., Tytgat, J., De Greef, C., Droogmans, G., Nilius, B., Eggermont, J. (1997). Expression of human pl_{Cl} and CIC-6 in *Xenopus* oocytes induces an identical endogenous chloride conductance. *J. Biol. Chem.* 272: 3615-3621.
- Cala, P.M. (1980). Volume regulation by *Amphiuma* red blood cells. The membrane potential and its implications regarding the nature of the ion-flux pathway. *J. Gen. Physiol.* 76: 683-708.
- Cala, P.M. (1983). Volume regulation by red blood cells. Mechanisms of ion transport. *Mol. Physiol.* 4: 3.
- Cala, P.M. (1985a). Volume regulation by *Amphiuma* red blood cells: characteristics of volume-sensitive K^+/H^+ and Na^+/H^+ exchange. *Mol. Physiol.* 8: 199-214.

Cala, P.M. (1985b). Volume regulation by *Amphiuma* red blood cells. strategies for identifying alkali metal/H⁺ transport. **Federation Proc.** 44: 2500-2507.

Cserr, H.F., De Pasquale, M., and Patlak, C.S. (1987a). Regulation of brain water and electrolytes during acute hyperosmolality in rats. **Am. J. Physiol.** 253: F522-F529.

De Greef, C., Van der Heyden, S., Viana, F., Eggermont, J., De Bruijn, E.A., Raeymaekers, L., Droogmans, G., Nilius, B. (1995a). Volume-activated chloride currents are not correlated with P-glycoprotein expression. **Biochem. J.** 307: 713-718.

De Greef, C., Van der Heyden, S., Viana, F., Eggermont, J., De Bruijn, E.A., Raeymaekers, L., Droogmans, G., Nilius, B. (1995b). Lack of correlation between *mdr-1* expression and volume-activated of chloride currents in rat colon cancer cells. **Pfluegers Arch.** 430: 296-298.

Deutsch, C., Chen, L. Q. (1993). Heterologous expression of specific K⁺ channels in T lymphocytes: Functional consequences for volume regulation. **Proc. Natl Acad. Sci. USA.** 90:10036-10040.

Dong, Y., Chen, G., Duran, G. E., Kouyama, K., Chao, A.C., Sikic, B.I., Gollapudi, S.V., Gupta, S., Gardner, P. (1994). Volume-activated chloride current is not related to P-glycoprotein overexpression. **Cancer Res.** 54: 5029-5032.

Fiévet, B., Gabillat, N., Borgese, F., Motais, R. (1995). Expression of band 3 anion exchange induces chloride current and taurine transport: structure-funtion analysis. **EMBO J.** 14: 5158-5169.

Fraser, D.D., Hoehn, K., Weiss, S. And MacVicar, B.A. (1993). Arachidonic acid inhibits sodium currents and synaptic transmission in cultured striatal neurons. **Neuron.** 11, 633-644.

García-Romeu, F., Cossins, A.R., Motais, R. (1991). Cell volume regulation by trout erythrocytes: characteristics of the transport systems activated by hypotonic swelling. *J. Physiol.* 440: 547-567.

Giaume, C., Randriamampita, C. and Trautmann, A. (1989). Arachidonic acid closes gap junction channels in rat lacrimal glands. *Pfluegers Arch.* 413: 273-279.

Goldstein, L., Brill, S.R., Freund, E.V. (1990). Activation of taurine efflux in hypotonically stressed elasmobranch cells: inhibition by stilbene disulfonates. *J. Exp. Zool.* 254: 114-118.

Goldstein, L., Brill, S.R. (1991). Volume-activated taurine efflux from skate erythrocytes: possible band 3 involvement. *Am. J. Physiol.* 260: R1014-R1020.

González, E., Sánchez-Olea, R. and Pasantes-Morales, H. (1995). Inhibition by Cl channel blockers of the volume activated, diffusional mechanism of inositol transport in primary astrocytes in culture. *Neurochem. Res.* 20: 895-900.

Gschwentner, M., Nagl, U.O., Woll, E., Schmarda, A., Riter, M., Paulmichl, M. (1995). Antisense oligonucleotides suppress cell-volume-induced activation of chloride channels. *Pfluegers Arch.* 430: 464-470.

Grinstein, S., Rothstein, A., Sarkadi, B., Gelfand, E.W. (1982). Responses of lymphocytes to anisotonic media: Volume-regulating behavior. *Am. J. Physiol.* 246: C204-C215.

Gründer, S., Thiemann, A., Pusch, M., and Jentsch, T.J. (1992) Regions involved in the opening of ClC-2 chloride channel by voltage on cell volume. *Nature.* 360: 759-762.

Hoffmann, E. K., and Simonsen, L.O. (1989). Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells. *Physiol. Rev.* 69: 315-382.

Huang, J. M.-C., Xian, H. And Bacaner, M. (1992). Long-chain fatty acids activate calcium channels in ventricular myocytes. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 6452-6456.

Hwang, T.C., Guggino, S.E., and Guggino, W.B. (1990). Direct modulation of secretory chloride channels by arachidonic and other cis unsaturated fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 5706-5709.

Jacobsen, J.G., Smith, L.H. 1968. Biochemistry and physiology of taurine derivatives. *Physiol. Rev.* 48: 424-511.

Junankar, P.R., Dulhunty, A.F., Curtis, S.M., Thinnis, F.P. (1995). Porin-type 1 proteins in sarcoplasmic reticulum and plasmalemma of striated muscle fibres. *J. Muscle Research and Cell Motility.* 16: 595-610.

Keyser, D. O. and Alger, B. E, (1990). Arachidonic acid modulates hippocampal calcium current via protein kinase C and oxygen radicals. *Neuron.* 5, 545-553.

Kimelberg, H.K., and Frangakis, M. (1986). Volume regulation in primary astrocyte cultures. *Adv. Biosci.* 67: 177-186.

Kimelberg, H.K. (1990). Chloride transport across glial membranes. In Alvarez-Leefmans, F.J., Muscle J.M. (eds): "Chloride Channels and Carriers in Nerve, Muscle and Glial Cells". *New York: Plenum Press*, pp 159-191.

Kimelberg, S.K., Goderie, S., Higmann, S., Pang, and A. Waniewski. (1990). Swelling-Induced Release of Glutamate, Aspartate, and Taurine from astrocytes

Cultures. *J. Neurosc.* 10(5): 1583-1591.

Kim, D., Lewis, D.L., Graziadei, L., Neer, E.J., Bar-Sagi, D. and Clapham, D.E. (1989). G-protein β -subunits activate the cardiac muscarinic K^+ via phospholipase A2. *Nature* 337, 557-560.

Krapivinsky, G.B., Ackerman, M.J., Gordon, E.A., Krapivinsky, L.D., Clapham, D.E. (1994). Molecular characterization of a swelling-induced chloride conductance regulatory protein, pl_{Cl} . *Cell* 76: 439-448.

Kregenow, F.M. (1981). *Annu. Rev. Physiol.* 43: 493-505.

Kregenow, F. M., Caryk, T., Siebens, A.W. (1985). Further studies of the volume-regulatory response of *Amphiuma* red cells in hypertonic media. Evidence for amiloride-sensitive Na^+/H^+ exchange. *J. Gen. Physiol.* 86: 565-584.

Kunzelmann, K., Slotki, I.N., Klein, P., Aausiello, D.A., Greger, R., Cabantchik, Z.I. (1994). Effects of P-glycoprotein expression on cyclic AMP and volume-activated ion flux and conductances in HT-29 colon adenocarcinoma cells. *J. Cell Physiol.* 161: 393-406.

Kurachi, Y., Ito, H., Sugimoto, T., Shimizu, T., Miki, I. and Ui, M. (1989). Arachidonic acid metabolites as intracellular modulators of the G protein-gated cardiac K^+ channel. *Nature*. 337, 555-557.

Law, R. O. (1989). The effects of pregnancy on the contents of water, taurine, and total amino nitrogen in rat cerebral cortex. *J. Neurochem.* 53: 300-302.

Macknight, A.D.C. (1988). Principles of cell volume regulation. *Renal Physiol. Biochem.* 3: 114-141.

McEwan, G.T.A., Hunter, J., Hirst, B.H., Simmons, N.L. (1992). Volume-activated Cl⁻ secretion and transepithelial vinblastine secretion mediated by P-glycoprotein are not correlated in cultured human T84 intestinal epithelial layers. *FEBS Lett.* 304: 233-236.

Meves, H. 1994. Modulation of ion channels by Arachidonic Acid. *Progress in Neurobiology.* 43: 175-186. Printed in Great Britain.

Miller, B., Sarantis, M., Traynelis, S.F., and Attwell, D. (1992). Potentiation of NMDA receptor currents by arachidonic acid. *Nature.* 355, 722-725.

Miller, B., Sarantis, M. and Kovalchuk, Y. (1993). Effects of arachidonic acid on AMPA receptor currents in isolated cells and tissue slices from the rat hippocampus and cerebellum. *J. Physiol. Lond.* 473, 25P..

Minton, A.P.(1993). Macromolecular crowding and molecular recognition. *J. Mol. Recognit.* 6: 211-214.

Mong, S., Miller, J., Wu, H.-L., and Crooke, S.T. (1988). Leukotriene D₄ receptor mediated hydrolysis of phosphoinositide and mobilization of calcium in sheep tracheal smooth muscle cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 244: 508.

Mong, S., Hoffmann, K., Wu, H.-L., and Crooke, S.T. (1987). Leukotriene-induced hydrolysis of inositol lipids in guinea pig lung: mechanism of signal transduction for leukotriene-D₄ receptor, *Mol. Pharmacol.* 31: 35.

Moorman, R., Ackerman, S.J., Kowdley, G.C., Griffin, M.P., Mounsey, J.P., Chen, Z., et al (1995). Unitary anion currents through phospholemman channel molecule. *Nature.* 377: 737-740.

Morán, J., S. Morales-Mulia., A. Hernández-Cruz., and H. Pasantes-Morales. (1997). Regulatory Volume Decrease and Associated Osmolyte Fluxes in Cerebellar Granule

Neurons Are Calcium Independent. *J. Neurosci. Res.* 47: 144-154.

Morin, X.K., Bond, T.D., Loo, T.W., Clarke, D.M., Bear, C.E. (1995). Failure of P-glycoprotein (MDR1) expressed in *Xenopus* oocytes to produce swelling-activated chloride channel activity. *J. Physiol.* 486: 707-714.

Motais, R., H. Guizouarn, and F. Garcia-Romeu. (1991). Red cell volume regulation: the pivotal role of ionic strength in controlling swelling- dependent transport systems. *Biochim. Biophys. Acta* 1075: 169-180.

Motais, R., Fiévet, B., Borgese, F., Garcia-Romeu, F. (1992). Some functional properties of band 3 protein in nucleated red cells. *Proc. Cell. Res.* 2: 253-262.

Muller, M., Szewczyk, A., De Weille, J.R. and Lazdunski, M. (1992). ATP-sensitive K⁺ channels in insulinoma cells are activated by nonesterified fatty acids. *Biochemistry* 31: 4656-4661.

Nakanishi, T., Balaban, R.S., Burg, M.B. (1988). Survey of osmolytes in renal cell lines. *Am. J. Physiol.* 255: C181-C191.

Nilius, B., J. Sehrer., P. De Smet., W. V. Driessche and G. Droogmans. (1995). Volume regulation in a toad epithelial cell line: role of coactivation of K⁺ and Cl⁻ channels. *J. Physiol.* 487.2: 367-378.

Olson, J.E., Sankar, R., Holtzman, D., James, A. Fleischhacker, D. (1986). Energy-dependent volume regulation in primary cultured cerebral astrocytes. *J. Cell Physiol.* 128: 209-215.

Ordway, R.W., Walsh, J.V. and Singer, J.J. (1989). Arachidonic acid and other fatty acids directly activate potassium channels in smooth muscle cells. *Science.* 244: 1176-1179.

Orskov, S.L. 1954. The potassium absorption bby pigeon blood cells is observed when a hypertonic sodium chloride solution is added. *Acta Physiol. Scand.* 31: 221-229.

Parker, J.C. (1977). Solute and water transport in dog and cat red blood cells. En: Ellory, J.C., Lew, V.L., (eds) . Membrane transport in red cells. *London: Academic*, pp 427-465.

Pasantes-Morales, H. and Schousboe, A. (1988). Volume regulation in astrocytes: a role for taurine as osmoeffector. *J. Neurosci. Res.* 34: 219-224.

Pasantes-Morales, H., J. Morán, and A. Schousboe. (1990). Volume-sensitive release of taurine from cultured astrocytes: properties and mechanism. *Glia* 3: 427-432.

Pasantes-Morales, H., García, J., Sánchez-Olea, R. (1991). Hyposmolarity-sensitive release of taurine and free amino acids from human lymphocytes. *Biochem. Pharmacol.* 41: 303-307.

Pasantes-Morales, H., S. Alavez., Sánchez-Olea, R., and J. Morán. (1993). contribution of Organic and Inorganic Osmolytes to Volume regulation in Rat Brain Cells in Culture. *Neurochem. Research.* 18(4): 445-452.

Pasantes-Morales, H., E. Chacón, R.A. Murray, and Morán, J. (1994). Properties of Osmolytes Fluxes Activated During Regulatory Volume Decrease in Cultured Cerebellar Granule. Neurons. *J. Neurosci. Research.* 37: 720-727.

Pasantes-Morales, H., E. , Murray R.A. Lilja, L., and Morán, J. (1994a). Regulatory volume decrease in cultured astrocytes I. Potassium-and Chlorid-activated permeability. *Am. J. Physiol.* C165-C171.

Pasantes-Morales, H., Chacón, E. Murray R.A. and Morán, J. (1994c). Properties of osmolyte flux activated during regulatory volume decrease in cultured cerebellar granule neurons. *J. Neurosci. Res.* 37: 720-727.

Paulmichl, M., Li, Y., Wickman, k., Ackerman, M., Peralta, E., Clapham, D. (1992). New mammalian chloride channel identified by expression cloning. *Nature* 356: 238-241.

Paulmichl Laich, A., Fürst, H., Ggschwentner, M., Nagl, U.O., Hittmair, A., Ritter, M. (1996). Transportation of the chloride channel Icln from the cytosol into the cell membrane after volume stress. *Biophys. J.* 70:A9

Piomelli, D.,Volterra, A., Dale, N., Siegelbaum, S.A., Kandel, E. R., Schwartz, J. H. and Belardetti, F. (1987). Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid as second messengers for presynaptic inhibition of Aplysia sensory cells. *Nature.* 328, 38-43.

Premkumar, L.S., Gross, R. and Turk., J. (1990). Coupled potassium channels induced by arachidonic acid in cultured neurons. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 242, 17-22.

Rasola, A., Galletta, L.J., Gruenert, D.C., Romeo, G. (1994). Volume-sensitive chloride currents in four epithelial cell lines are not directly correlated to the expression of the *MDR-1* gene. *J. Biol.Chem.* 269: 1432-1436.

Reymann, S., Flörke, h., Heiden, M., Jakob, C., Stadtmüller, U., Steinacker, P., Lalk, V.E., Pardowitz, I., Thinner, F.P. (1995). Further evidence for multitopological localization of mammalian porin (VDAC) in the plasmalemma forming part of a chloride channel complex affected in cystic fibrosis and encephalomyopathy. *Biochemical and Molecular Medicine.* 54: 75-87.

Rittenhouse, A.R., Hallag, H.L., Leaf, A. And Hess, P. (1993). The fatty acid docosahexaenoic acid inhibits L-type calcium current. *Biophys. J.* 64, A202.

Sakai, H., Okada, Y., Morii, M. and Takeguchi, N. (1992). Arachidonic acid and prostaglandin E2 activate small conductance Cl⁻ channels in the basolateral membrane of rabbit parietal cells. *J. Physiol. Lond.* 448, 293-306.

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

Sánchez-Olea, R., Peña, C., Morán, J., Pasantes-Morales, H. (1993). Inhibition of volume regulation and efflux of osmoregulatory amino acids by blockers of Cl⁻ transport in cultured astrocytes. *Neurosci. Lett.* 156: 141-144.

Sánchez-Olea, R., Morán, J., Martínez, A., and Pasantes-Morales, H. (1993a). Volume-activated Rb⁺ transport in astrocytes in culture. *Am. J. Physiol.* 264: C836-C842.

Sarkasi, B., and Parker, J.C. (1991). Activation of ion transport pathways by changes in cell volume. *Biochem. Biophys. Acta.* 1071: 407-427.

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

Scherer, R.W., and Breitwieser, G.E. (1990). Arachidonic acid metabolites alter G protein-mediated signal transduction in heart. Effects on muscarinic K⁺ channels. *J. Gen. Physiol.* 96, 735-755.

Shimada, T. and Somlyo, A.P. (1992). Modulation of voltage-dependent Ca channel current by arachidonic acid and other long-chain fatty acids in rabbit intestinal smooth

muscle. *J. Gen. Physiol.* 100, 27-44.

Shimilinsky Fluri, G., Rudisuli, A., Willi, M., Rohr, S. And Weingart, R. (1990). Effects of arachidonic acid on the gap junctions of neonatal rat heart cells. *Plugers Arch.* 417, 149-156.

Schmitt, H., and Meves, H. (1994). Modulation of neuronal calcium channels by arachidonic acid. *Plugers Arch.*

Shwartz, R. D. and Yu, X. (1992). Inhibition of GABA-gated chloride channel function by arachidonic acid. *Brain Res.* 585, 405-410.

Siebens, A.W., Spring, K.R. (1989). A novel sorbitol transport mechanism in cultured renal papillary epithelial cells. *Am. J. Phhysiol.* 257: F937-F946.

Solís, J.M., Herranz, A.S., Herreras, O., Lerma, J., and Del Río, R.M. (1988). Does taurine act as an hyponatremia. *Am. J. Physiol.* 264: F833-F836.

Stebens, A.W., Kregenow, F.M. (1985). Volume-regulatory responses of *Amphiuma* red cells in anisotonic media. The effect of amiloride. *J. Gen. Physiol.* 86: 527-564.

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

Strange, K., Emma, F., Paredes, A., and Morrison, R. (1994). Osmoregulatory changes in myo-inositol content and Na⁺/myo-inositol cotransport in rat cortical astrocytes. *Glia* 12: 35-43.

Strange, K. (Editor). (1994). Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation. *Boca Raton, FL: CRC.*

- Strange, K., Emma, F., Jackson, P.S. (1996). cellular and molecular physiology of volume-sensitive anion channels. *Am. J. Physiol.* 270: C711-C730.
- Takenaka, T., Horie, H. And Hori, H. (1987). Effects of fatty acids on membrane currents in the squid giant axon. *J. Membr. Biol.* 106, 141-147.
- Thurston, J. H., R.E. Hauart, and J. A. Dirgo. (1980). Taurine: a role in osmotic regulation of mammalian brain and possible clinical significance. *Life Sci.* 26: 1561-1568.
- Tominaga, M., Tominaga, T., Miwa, A., Okada, Y. (1995). Volume-sensitive chloride channel activity does not depend on P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 270: C711-C730.
- Vacher, P., McKenzie, J. And Dufy, B. (1989). Arachidonic acid affects membrane ionic conductances of GH3 pituitary cells. *Am. J. Physiol.* 257: E203-E211.
- 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.
- Viana, F., Van Acker, K., de Greef, C., Eggermont, J., Raeymaekers, L., Droogmans, G., Nilius, B. (1995). Drug-transport and volume-activated chloride channel functions in human erythroleukemia cells: relation to expression level of P-glycoprotein. *J. Membrane Biol.* 145: 87-98.
- Villarroel, A. (1993). Suppression of neural potassium A-current by arachidonic acid. *FEBS Lett.* 335, 184-188.
- Voets, T., Buyse, G., Tytgat, J., Droogmans, G., Eggermont, J., Nilius, B. (1996). The chloride current induced by expression of the protein pl_{Cl} in *Xenopus* oocytes differs from the endogenous volume-sensitive chloride current. *J. Physiol.* 495.2: 441-447.

Wade, J., J. Olson, F. Samson, S. Nelson, and T. A. Pazdernik. (1988). Possible role of taurine in osmoregulation within the brain. *J. Neurochem.* 45: 335-344.

Wang, X., Wall, D.M., Parkin, J.D., Zalcborg, J. R., Kemm, R.E. (1994). P-glycoprotein expression in classical multi-drug resistant cells does not correlate with enhanced chloride channel activity. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 21: 101-108.

Wieland, S.L., Fletcher, J. E., and Gong, Q.-H. (1992). Differential modulation of a sodium conductance in skeletal muscle by intracellular and extracellular fatty acids. *Am. J. Physiol.* 263, C308-C312.

Wilfred, D. Stein. (1990). Channels, Carriers, and Pumps. *An Introduction to Membrane Transport. Academic Press, INC.* pp57-69: 127-169.

Zona, C., Palma, E., Pellerin, L. and Avoli, M. (1993). Arachidonic acid augments potassium currents in rat neocortical neurones. *Neuro Report.* 4, 359-362.