



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

CALCIO Y OSMOTRANSDUCCIÓN: EFECTO SOBRE LA  
LIBERACIÓN DE TAURINA EN ASTROCITOS

T E S I S

que para obtener el grado de  
Lic. en Investigación Biomédica Básica

Presenta

Velia Maria de la Paz Cardin Martinelli

Directora de Tesis:  
Dra. Herminia Pasantes

Ciudad Universitaria

2002

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

ESTADÍSTICAS DEL SAJE  
DE LA BIBLIOTECA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE:

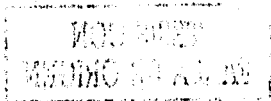
Helia Cardona

FECHA:

24 Oct 2007

FIRMA:

Helia Cardona



### Historia

Un cronopio pequeñito buscaba la llave de la puerta de calle en la mesa de luz, la mesa de luz en el dormitorio, el dormitorio en la casa, la casa en la calle. Aquí se detenía el cronopio, pues para salir a la calle precisaba la llave de la puerta.

Julio Cortázar. *Historias de cronopios y de famas*.

### Destino de las explicaciones.

En algún lugar debe haber un basural donde están amontonadas las explicaciones.

Una sola cosa inquieta en este justo panorama: lo que pueda ocurrir el día en que alguien consiga explicar también el basural.

Julio Cortázar. *Un tal Lucas*.

"Porque hay dos clases de verdades: las de la ciencia, que valen para poliedros, cólicos renales o aviones; y las verdades que provienen del fondo de nuestras almas, que no tienen explicación razonable".

Ernesto Sábato.

*A mamá y papá, por todo el amor.*

*A Titi, por estar siempre a mi lado.*

*A Mariano y Victoria, por ser mis  
compañeros de vida.*

Gracias,

A la Dra. Herminia Pasantes, que desde el primer día me abrió de par en par las puertas de su laboratorio y me enseñó que la ciencia es maravillosa, que está llena de retos, de gratificaciones y es perfectamente compatible con una vida personal plena. Por las múltiples oportunidades académicas, por escuchar todas mis ideas, por confiar siempre en mí y por las largas conversaciones extralaborales sumamente divertidas .

A los miembros del jurado Dra. Clorinda Arias Álvarez, Dra. Lourdes Massieu Trigo, Dr. Julio Morán Andrade, Dra. Herminia Pasantes y Dra. María Eugenia Torres Márquez, por sus comentarios y correcciones.

Al Dr. Octavio Quesada, por toda la ayuda durante la realización de esta tesis y especialmente por su incomparable amistad.

Al Dr. José Bargas y al Dr. Luis Vaca, por todo lo aprendido en las estancias en sus laboratorios.

A la Dra. Ruth Lezama, Biol. Claudia Peña y Biol. Claudia Rodríguez, por la excelente e indispensable ayuda técnica.

A mis compañeros de laboratorio, por las risas vespertinas, los juegos de ajedrez y los días en "Las Estacas".

A mis amigos, por estar siempre en los buenos y malos momentos. De manera especial a la gente del IFC, por ser el soporte cotidiano.

A mi familia y amigos fuera de México, porque la distancia ha sido sólo física.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	1
<b>ABREVIATURAS</b>	2
<b>INTRODUCCIÓN</b>	3
I. CONCEPTOS GENERALES	3
II. IMPORTANCIA DEL VOLUMEN EN PROCESOS FISIOLÓGICOS	5
III. CAMBIOS EN EL VOLUMEN EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	7
IV. MECANISMOS DE REGULACIÓN DEL VOLUMEN CELULAR	9
REGULACIÓN ISOVOLÚMICA	13
REGULACIÓN DEL VOLUMEN EN CONDICIONES HIPEROSMÓTICAS	14
REGULACIÓN DEL VOLUMEN EN CONDICIONES HIPOSMÓTICAS	15
SENSOR	16
VÍAS DE MOVILIZACIÓN DE OSMOLITOS	19
TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES	24
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	30
<b>OBJETIVOS</b>	31
<b>METODOLOGÍA</b>	32
CULTIVOS CELULARES	32
DETERMINACIÓN DE LA $[Ca^{+2}]_i$ INTRACELULAR	32
FLUJO DE $^3H$ -TAURINA	33
LIBERACIÓN DE $^3H$ -ÁCIDO ARAQUIDÓNICO	33
INMUNOPRECIPITACIÓN Y WESTERN BLOT	34
<b>RESULTADOS</b>	36
CAMBIOS EN LA $[Ca^{+2}]_i$ Y EN EL FLUJO DE TAURINA EN CONDICIONES HIPOSMÓTICAS	36
EFECTO DE INHIBIDORES DE CaM Y CaMK	39
PARTICIPACIÓN DE LAS CINASAS DE TIROSINAS	39
LIBERACIÓN DE $^3H$ -ÁCIDO ARAQUIDÓNICO EN MEDIOS HIPOSMÓTICOS	44
DESPOLIMERIZACIÓN DEL CITOESQUELETO DE ACTINA	46
<b>DISCUSIÓN</b>	47
EL $Ca^{+2}$ POTENCIA LA LTO EN ASTROCITOS DE CEREBELO	47
LA ACTIVACIÓN DE LA LTO REQUIERE LA ACCIÓN DE CINASAS DE TIROSINA Y PI3K	48
LA POTENCIACIÓN POR $Ca^{+2}$ ES A TRAVÉS DE CaM/CaMK	50
EFFECTOS DEL AUMENTO EN LA $[Ca^{+2}]_i$ EN CONDICIONES HIPOSMÓTICAS EN ASTROCITOS	54
<b>CONCLUSIONES</b>	55
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	57

## RESUMEN

Alteraciones en el volumen celular en el sistema nervioso central pueden resultar en daño tisular, pérdida funcional y en última instancia, muerte del individuo. Los astrocitos son los encargados de mantener la homeostasis en el sistema nervioso; el hinchamiento de estas células exacerba el daño y el desajuste metabólico del tejido. Los astrocitos de cerebelo de rata responden al hinchamiento ocasionado por un estímulo hiposmótico mediante un proceso activo conocido como Decremento Regulador del Volumen (DRV), el cual se lleva a cabo por la movilización de osmolitos orgánicos e inorgánicos, de manera muy importante taurina. La activación de la vía de liberación de taurina osmosensible (LTO) requiere un sensor que detecte el cambio en el volumen y un sistema de transducción de señales que comunique la señal al efector. La LTO no requiere para su activación un aumento en la concentración de calcio intracelular ( $[Ca^{+2}]_i$ ), fenómeno observado en condiciones hiposmóticas en muchos tipos celulares; sin embargo, un incremento en la  $[Ca^{+2}]_i$ , por encima del obtenido únicamente en condiciones hiposmóticas, es capaz de potenciar el flujo. Dado que una gran variedad de moléculas presentes en el sistema nervioso en condiciones patológicas puede provocar un aumento en la  $[Ca^{+2}]_i$  en astrocitos, y que éste fenómeno podría modificar los mecanismos de regulación, el objetivo de este trabajo es estudiar la modulación por  $Ca^{+2}$  de la liberación de taurina en condiciones hiposmóticas y sus mecanismos de acción. Los resultados demuestran que la activación de la LTO requiere eventos de fosforilación en tirosinas y la participación de PI3K. La potenciación de la LTO inducida por el  $Ca^{+2}$  es mediada tanto por el reclutamiento de nuevas señales, como es el caso de CaM y CaMK, así como por el aumento en la actividad de proteínas necesarias para la activación de la vía, como PI3K. El  $Ca^{+2}$  requiere del estímulo hiposmótico para potenciar la LTO, así como la integridad del citoesqueleto de actina. Estos resultados representan una posibilidad interesante para el tratamiento de condiciones patológicas asociadas a hinchamiento celular en el sistema nervioso.

## ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
ADP	Adenosín difosfato
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ATP	Adenosín trifosfato
CaM	Calmodulina
CaMK	Cinasa dependiente de $Ca^{+2}$ /calmodulina
CIH-407	Línea celular de intestino humano 407
CPAE	Línea celular de endotelio de arteria pulmonar de becerro
DAG	Diacilglicerol
DRV	Decremento regulador del volumen
Erk1/Erk2	Cinasas relacionadas con señales extracelulares
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GFAP	Proteína glial fibrilar
gp-P	Glicoproteína P
GTP	Guanosín trifosfato
HAD	Hormona antidiurética
HEK-293	Células de endotelio de riñón humano 293
I <sub>Cl</sub> SV	Corriente de Cl <sup>-</sup> sensible al volumen
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato
IRV	Incremento regulador del volumen
JNK	Cinasa con amino-terminal Jun
LCE	Líquido cerebroespinal
LTD4	Leucotrieno D-4
MAPKs	Cinasas activadas por mitógenos
MDCK	Células de riñón de perro Madin-Darbin
MEK	Cinasa de MAPK
NSO	Núcleo supraóptico
p110	Subunidad catalítica de PI3K
p125FAK	Cinasa de adhesión focal
p85	Subunidad reguladora de PI3K
PI3K	Cinasa del fosfatidilinositol
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PLA2	Fosfolipasa A2
PLA2c	Isoforma citosólica de 85kDa de PLA2
RSSV	Canal de Cl <sup>-</sup> rectificador saliente sensible a volumen
SNC	Sistema nervioso central



# INTRODUCCIÓN

## I. CONCEPTOS GENERALES

La adaptación a variaciones en la composición del medio extracelular e intracelular es indispensable para todos los organismos vivos. En respuesta a estas diferencias, las células pueden experimentar cambios en el volumen y la capacidad para contrarrestarlos es fundamental, de manera más obvia en organismos expuestos constantemente a perturbaciones en la osmolaridad del medio donde viven y en especies acuáticas que habitan en aguas de diferente salinidad durante su ciclo de vida. En mamíferos, donde la osmolaridad del plasma se mantiene generalmente constante, la habilidad de responder a cambios en el volumen se presenta también, siendo un proceso activo en condiciones fisiológicas.

El interior celular contiene macromoléculas proteicas que se comportan como aniones polivalentes porque su punto isoeléctrico es menor al pH intracelular. La membrana plasmática es impermeable a proteínas y es altamente permeable al agua, lo que provoca que la presión coloidosmótica en el interior celular sea mayor. Si el agua y los iones permeantes se distribuyeran de acuerdo a la teoría de Gibbs-Donnan, la célula se hincharía en condiciones isosmóticas hasta que la concentración de solutos impermeantes fuera insignificante, provocando finalmente lisis celular. Sin embargo, en condiciones fisiológicas este aumento de volumen celular coloidosmótico no ocurre y las células mantienen niveles constantes de agua y solutos. La evidencia experimental indica que el mecanismo encargado de evitar el hinchamiento y la lisis en condiciones isosmóticas es el transporte activo de iones, principalmente la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . El  $\text{Na}^+$  que entra a las células por difusión o por sistemas de transporte secundario, es movilizado nuevamente al exterior por la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , de tal manera las células se comportan en condiciones fisiológicas como si fueran impermeables a este ión. Si este mecanismo se bloquea con ouabaína o por deficiencia de ATP, las células se hinchan por acumulación de  $\text{Na}^+$  (Álvarez-Leefmans y Reuss, 1996).

Debido a la permeabilidad selectiva de las células, una diferencia en la concentración de solutos entre el medio extracelular e intracelular provoca el movimiento osmótico de agua para equilibrar el gradiente y en consecuencia un cambio en el volumen celular (Pasantés-Morales, 1996). Estas diferencias se generan en respuesta a procesos patológicos, generalmente provocando cambios en la concentración de osmolitos en el medio externo, o en respuesta a procesos metabólicos necesarios para la supervivencia, reflejándose en modificaciones en la composición del medio intracelular. Para contrarrestar los cambios en el volumen, las células utilizan múltiples mecanismos de regulación, incluyendo el transporte de osmolitos y las vías metabólicas; de esta forma no sólo se modifica el volumen, sino que también se alteran profundamente las funciones celulares (Lang et al., 1998a).

En mamíferos, la regulación del volumen celular no es suficiente *per se* y es necesario un mecanismo de control de la osmolaridad de todo el organismo. La regulación precisa de la osmolaridad plasmática está controlada por un mecanismo homeostático que ajusta tanto la tasa de ingestión de agua como la de excreción renal. La hormona antidiurética (HAD, vasopresina) es la reguladora principal del sistema a corto plazo. HAD se sintetiza en el núcleo hipotalámico supraóptico (NSO), donde las neuronas tienen patrones de disparo específicos que determinan su liberación. La regulación de la actividad de estas neuronas depende de la osmolaridad; así, la hiperosmolaridad aumenta la cantidad de hormona liberada y la hiposmolaridad la disminuye, y resulta también de la integración de múltiples entradas sensoriales de osmoreceptores periféricos y centrales, así como de la osmosensibilidad intrínseca de la célula (Hussy et al., 2000). En los conductos colectores del riñón la HAD se une a los receptores V2 en la membrana basolateral, aumenta la cantidad de acuaporinas en la membrana apical y la absorción de agua.

## II. IMPORTANCIA DEL VOLUMEN EN PROCESOS FISIOLÓGICOS

El control del volumen es crítico para la supervivencia y funcionamiento celular; no sólo es necesario para mantener constante la concentración de solutos intracelulares, sino que también está directamente conectado al control metabólico, la proliferación, el crecimiento celular y la inserción de proteínas en la membrana (Lang et al., 1998a; Strbák y Greer, 2000).

La proliferación celular y la apoptosis son procesos fundamentales para mantener el número de células funcionalmente adecuado. Antes de iniciar la fase de mitosis, las células tienen que atravesar por las fases G1, S y G2 del ciclo celular. El tránsito por las diferentes fases se acompaña de un aumento en el volumen celular, que de no ser alcanzado impide la proliferación (Lang et al., 2000). Los cambios en la osmolaridad extracelular alteran la proliferación, ya que el medio hiperosmótico la inhibe y el medio hiposmótico la acelera (Lang et al., 1998a). La apoptosis es el proceso de muerte celular que permite la remoción de células sin la liberación del contenido citosólico en el espacio extracelular y el inicio subsecuente de un proceso inflamatorio. Los puntos clave de este proceso son el encogimiento celular, la condensación del núcleo, la fragmentación del DNA, la pérdida de la función mitocondrial, la formación de vesículas apoptóticas y la activación de proteasas. El encogimiento coincide o precede los eventos mencionados y para que se lleve a cabo es necesaria la liberación, acompañada de agua, de osmolitos intracelulares. En linfocitos Jurkat, la inducción de apoptosis a través de la estimulación del receptor CD95 provoca la activación de una corriente de  $Cl^-$  que también es sensible a hiposmolaridad, en ambos casos de manera dependiente de la cinasa de tirosina p56lck (Lang et al., 2000). En estas células (Lang et al., 1998b) y en neuronas granulares de cerebelo (Morán et al., 2000), se libera taurina y otros osmolitos orgánicos durante la apoptosis.

El volumen celular es importante también en la migración de leucocitos. Este proceso se activa por quimiotácticos como los formilpéptidos, que estimulan el cotransportador  $Na^+/H^+$  y provocan hinchamiento. El bloqueo del cotransportador y el medio hiperosmótico inhiben la migración. Este proceso también se impide con la inhibición de canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{+2}$ ,

activados por las oscilaciones intracelulares de  $\text{Ca}^{+2}$ . Se postula entonces que en el extremo líder de la célula migrante es necesaria la polimerización de actina y la activación de transportadores, mecanismos asociados a la regulación del volumen en condiciones hiperosmóticas; en el extremo posterior se necesita la despolimerización de actina, oscilaciones en la  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  y activación de canales de  $\text{K}^+$ , eventos que se observan en condiciones hiposmóticas. Para esto se requiere que la célula distribuya de manera diferencial los canales iónicos en la membrana, como así sucede (Lang et al., 1998a).

El hígado, sujeto a irrigación sistémica y portal, está sometido a diferencias sustanciales en la concentración de aminoácidos, ácidos biliares y glucosa entre el ayuno y la ingestión de alimentos. El hinchamiento celular representa una señal anabólica, estimulando la síntesis de proteínas, la glucogénesis, la exocitosis y el flujo biliar. Por el contrario, una reducción en el volumen celular desencadena procesos catabólicos, como la proteólisis y la glucogenólisis. Las hormonas que regulan la función hepática tienen efectos sobre el volumen celular: insulina y fenilefrina provocan hinchamiento, mientras que el ATP, el AMPc y el glucagon reducen el volumen (Dunkelberg et al., 2001).

En los tejidos epiteliales, el transporte transcelular de iones, nutrientes y productos de desecho, se logra por la incorporación de estos a través de una de las membranas y la expulsión por la contraria. Esta constante entrada y salida de sustancias osmóticamente activas durante el transporte epitelial se traduce en cambios continuos en el volumen. En el intestino, la vejiga y los túbulos proximales del riñón, la incorporación luminal de sustratos, como glucosa o aminoácidos, está acoplada al gradiente de  $\text{Na}^+$ , lo que provoca hinchamiento celular y consecuente activación de canales de  $\text{K}^+$  en la membrana basolateral como mecanismo de regulación. Este mecanismo no sólo ayuda a la regulación del volumen, sino que también mantiene el gradiente electroquímico regenerando el proceso (Lang et al., 1998a).

### III. CAMBIOS EN EL VOLUMEN EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El volumen total cerebral es la suma del volumen sanguíneo, el del líquido cerebroespinal (LCE), el del espacio extracelular y el del parénquima. Debido a la rigidez del cráneo, incrementos pequeños en el volumen de cualquiera de los componentes tienen consecuencias fatales para el individuo. El hinchamiento celular incrementa la presión y provoca la compresión de pequeños vasos sanguíneos, produciendo isquemia y daño celular. Un incremento mayor en la presión provoca el desplazamiento del parénquima cerebral por el *foramen magnum*, comprimiendo los núcleos cardíaco y respiratorio del tallo cerebral, lo que puede provocar la muerte del individuo (McManus y Churchwell, 1994).

Las patologías que desencadenan cambios en el volumen en el cerebro se pueden dividir en dos grupos: anisomóticas y citotóxicas.

Los cambios en el volumen por condiciones anisomóticas resultan de modificaciones en la osmolaridad plasmática, provocadas por patologías como el síndrome de secreción inapropiada de hormona antidiurética, la intoxicación por agua, la insuficiencia cardíaca congestiva, el uso inapropiado de diuréticos, la deshidratación y la diabetes *mellitus* e *insipidus*. Si bien este tipo de patologías no provoca daño celular en primera instancia, las secuelas clínicas de estas alteraciones pueden ser crisis epilépticas, edema cerebral severo y daño neuronal. La osmolaridad del medio tiene un efecto determinante en la excitabilidad y actividad convulsiva del cerebro. Se ha observado que un medio hiposmótico acentúa la intensidad de diversos cuadros convulsivos, mientras que la hiperosmolaridad la mitiga. En diferentes preparaciones, el medio hiposmótico induce actividad epileptiforme, incluso en ausencia de comunicación sináptica química (Jefferys y Hass, 1982; Taylor y Dudek, 1982).

Por otro lado, el manejo clínico de los pacientes que sufren estas patologías no suele ser apropiado y en ciertas circunstancias empeora la situación. Muchas veces el problema comienza desde el diagnóstico inadecuado, sumándose a tratamientos poco eficaces, como el uso inadecuado de manitol en pacientes con edema cerebral, o que incluso pueden causar un daño mayor en el individuo,

como la mielinolisis pontina causada por soluciones hiperosmóticas de NaCl utilizadas en el tratamiento de la hiponatremia (Berl, 1990).

Las patologías citotóxicas provocan muerte celular. Las más importantes son la isquemia, la encefalopatía hepática, las crisis epilépticas, la hipoxia o anoxia y el trauma craneoencefálico. Los estudios de este tipo de patologías han demostrado que el efecto citotóxico es debido, principalmente, al cambio en la composición iónica y la acumulación de glutamato en el medio extracelular. En respuesta a alguna de las patologías mencionadas, las neuronas y astrocitos liberan glutamato, el neurotransmisor excitador de mayor importancia. El daño neuronal producido por el glutamato se denomina excitotóxico, debido a la capacidad para excitar neuronas y el potencial tóxico del transmisor. El glutamato provoca la acumulación intracelular de  $\text{Na}^+$ , la entrada concomitante de agua y  $\text{Cl}^-$  y en consecuencia hinchamiento y despolarización celular. Al mismo tiempo, hay una acumulación de  $\text{Ca}^{+2}$  que se libera de pozas intracelulares y que también entra a través de receptores de glutamato ionotrópicos y de canales de  $\text{Ca}^{+2}$  dependientes de voltaje. El exceso de  $\text{Ca}^{+2}$  provoca la activación descontrolada de cinasas, fosfolipasas, proteasas y de la sintasa del óxido nítrico. La consecuente proteólisis, lipoperoxidación y formación de radicales libres resulta en la muerte de las neuronas (Hansson et al., 2000).

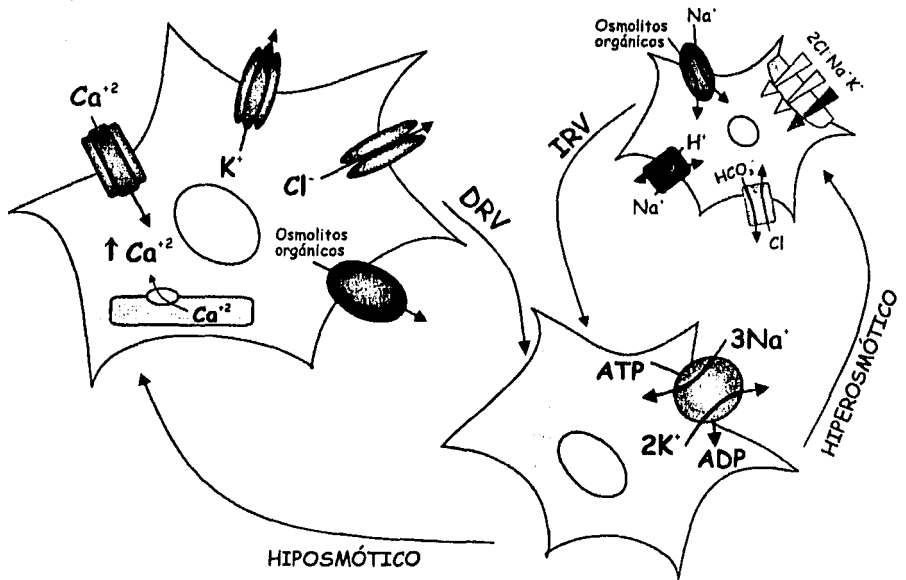
Los astrocitos son los encargados de mantener constante la composición del medio extracelular en el sistema nervioso. Hay tres funciones clave de los astrocitos en la manutención de la homeostasis que se distorsionan en respuesta al daño cerebral y provocan que éste se extienda: el metabolismo del  $\text{CO}_2$ , el de los neurotransmisores y la remoción de  $\text{K}^+$ . El  $\text{CO}_2$  producido por el metabolismo de las neuronas difunde a los astrocitos donde es convertido en  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{H}^+$  por la anhidrasa carbónica. El  $\text{HCO}_3^-$  se intercambia por  $\text{Cl}^-$  en la cercanía de los vasos sanguíneos y el  $\text{H}^+$  por  $\text{Na}^+$  extracelular, que a su vez es transportado al exterior por la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Si el suplemento de energía disminuye y en consecuencia el ATP, el  $\text{Na}^+$  se acumula en el citosol y la célula se hincha. Como no se altera la actividad de la anhidrasa carbónica, se acumula también  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{H}^+$ . En una hemorragia intracerebral la ruptura de eritrocitos libera grandes cantidades de  $\text{K}^+$ .

Los astrocitos se hinchan debido a la incorporación del ión como resultado de su función de amortiguamiento, pero también por entrada a través de canales y transportadores de  $K^+$ , junto con  $Cl^-$  como anión acompañante. El glutamato liberado en respuesta al daño se acumula en los astrocitos a través del transporte dependiente de  $Na^+$ . La despolarización de los astrocitos provoca tanto la liberación de glutamato, como una disminución en la capacidad de removerlo del medio extracelular, resultando en acumulación del aminoácido, transmisión glutamatérgica anormal y neurotoxicidad. El hinchamiento de los astrocitos tiene dos secuelas significativas. En primer lugar, aumenta el volumen del tejido, distorsionando la anatomía y provocando daño mecánico. En segundo término, la liberación de glutamato y lactato provocada por el hinchamiento exacerba el desajuste metabólico en el tejido dañado (Landis, 1994) .

En respuesta a variaciones en la osmolaridad, las células nerviosas se comportan inicialmente como osmómetros perfectos, pero casi inmediatamente se activan mecanismos de control y regulación. Uno de ellos es el movimiento de agua hacia o desde el LCE en respuesta a los cambios en la presión hidrostática. A su vez, el LCE intercambia agua con el plasma. Por otro lado, existen mecanismos de regulación del volumen a nivel celular que se mencionaran a continuación. Estos procesos revierten los cambios en el volumen iniciales y permiten que el volumen cerebral permanezca esencialmente igual en condiciones crónicas (Pasantes-Morales, 1996).

#### **IV. MECANISMOS DE REGULACIÓN DEL VOLUMEN CELULAR**

Para manejar el estrés osmótico las células tienen tres estrategias: ignorarlo, evitarlo o adaptarse a éste. Las plantas, bacterias y levaduras pueden ignorar los cambios en la osmolaridad, en cierto intervalo, debido a la rigidez de la pared celular. Organismos como los moluscos, pueden evitar la influencia de la osmolaridad externa cerrando sus conchas, aunque necesitan regular la osmolaridad intracelular. Por el contrario, las células de la mayoría de los organismos activan procesos para adecuarse al gradiente osmótico impuesto, tratando de conservar el tamaño original.



**Figura 1.** Mecanismos de transporte osmolitos en la regulación del volumen.

La movilización en dirección apropiada de solutos osmóticamente activos es la manera más efectiva y rápida de cambiar la osmolaridad y de esta forma contrarrestar los cambios en el volumen. Los procesos que corrigen el hinchamiento y encogimiento celular se conocen como decremento regulador del volumen (DRV) e incremento regulador del volumen (IRV), respectivamente. Cuando los cambios en la osmolaridad son graduales, ej. 3mOsm/min, las células son capaces de regular constantemente el volumen, evitando así cambios drásticos incluso cuando la disminución en la osmolaridad del medio extracelular es del 50%. Este tipo de regulación se conoce como isovolumica. Cambios en el volumen celular pueden presentarse incluso en condiciones isosmóticas, que en el cerebro producen el llamado edema citotóxico. El hinchamiento celular que resulta de esta condición tiene más riesgos que el causado por hiposmolaridad, ya que no se conocen sistemas efectivos de regulación del volumen.

La regulación del volumen se alcanza cambiando la concentración de osmolitos orgánicos e iones, principalmente  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  (figura 1). Modificaciones



en el gradiente y concentración de iones alteran la función de las macromoléculas, incluyendo los transportadores membranales, que pueden revertir la dirección de transporte. Para evitar esta situación, las células producen "osmolitos compatibles" que, incluso a altas concentraciones, no alteran la función normal de las macromoléculas (Lang et al., 1998a). A este grupo pertenecen osmolitos orgánicos como los aminoácidos, los polialcoholes y las metilaminas. La concentración de cada uno de estos osmolitos varía según la especie y el tipo celular; de esta manera también varía la importancia que tienen en la regulación del volumen. La célula puede acumular osmolitos ya sea aumentando su síntesis, disminuyendo su degradación o estimulando su transporte; así como también puede disminuir su concentración intracelular aumentando su degradación o activando su liberación.

En el cerebro, los aminoácidos más abundantes son taurina, glutamato, glicina, alanina, GABA y glutamina. En el cerebro de rata la concentración de estos aminoácidos es de 30-40 mM, siendo el glutamato, la glutamina y la taurina los más abundantes. En cultivos primarios de astrocitos de rata, la concentración intracelular de aminoácidos libres es significativamente mayor y oscila entre 50 y 60mM (Pasantes-Morales, 1996). El mioinositol es el polialcohol más concentrado en el cerebro de rata, donde alcanza niveles de hasta 10mM, mientras que en astrocitos en cultivo la concentración intracelular es 25mM. La creatina y el N-acetil aspartato son las metilaminas más abundantes en el cerebro de rata y las más importantes en la regulación del volumen (Tabla I).

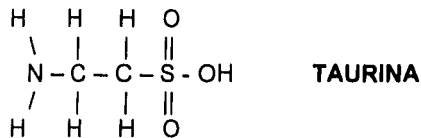
TABLA I. Concentración de los osmolitos orgánicos en el sistema nervioso y su participación en la regulación del volumen.

	Concentración		Contribución en el DRV*
	Cerebro de Rata	Astrocitos en Cultivo	
Aminoácidos	30-40mM	50-60mM	15%
Polialcoholes	5-10mM	28mM	5%
Metilaminas	7-9mM		9%

\*Calculado de experimentos de hiponatremia crónica realizados en el cerebro de rata *In vivo* (Verballis y Gullans, 1991).

### Taurina, osmolito ideal

La taurina es un  $\beta$ -aminoácido sulfónico, producto del catabolismo de la cisteína por la descarboxilasa del sulfinato de cisteína. Tiene un  $pK_{a1}=1.5$  y un  $pK_{a2}=8.82$ , por lo tanto en el intervalo de pH fisiológico se encuentra como zwitterion y es en esta conformación como se libera en respuesta al estímulo hiposmótico. Se puede excretar como tal o unida a sales biliares como el taurocolato. Se acumula en el interior celular y su gradiente de concentración se mantiene por un transportador específico dependiente de  $Na^+$  (Huxtable, 1992).



La taurina cumple todos los requisitos de un osmolito celular perfecto: su transporte y liberación es sensible a cambios en la osmolaridad y en la composición iónica; puede acumularse en grandes cantidades en el citosol; al ser una molécula electroneutra no altera el potencial de membrana ni otros procesos celulares; es metabólicamente inerte y el costo energético de su producción es bajo debido a que es un producto final del catabolismo.

La taurina juega también un papel muy importante en la regulación de la osmolaridad plasmática. En el NSO, donde se sintetiza y libera la HAD, la taurina se encuentra casi en su totalidad en los astrocitos. En condiciones isosmóticas, la glía libera constantemente taurina, que baña a las neuronas del NSO y provoca la activación de receptores de glicina sensibles a estricnina, induciendo una corriente aniónica hiperpolarizante. En presencia de un estímulo hiperosmótico, esta corriente no se activa debido a la disminución en la liberación de taurina, la neurona se despolariza y la liberación de hormonas aumenta. Por el contrario, en condiciones hiposmóticas esta corriente es mayor y consecuentemente la hiperpolarización es también mayor, disminuyendo así la liberación de hormonas.

Este mecanismo actúa en concierto con la apertura y cierre de canales activados por estiramiento de la membrana (Hussy et al., 2000).

Otras funciones propuestas para la taurina son mantener la integridad de la membrana, regular el transporte y unión de  $\text{Ca}^{+2}$ , actuar como factor trófico en el desarrollo del sistema nervioso central (SNC), como neurotransmisor, neuromodulador y neuroprotector contra la neurotoxicidad inducida por glutamato (Foos y Wu, 2002).

## **REGULACIÓN ISOVOLÚMICA**

El estudio de los cambios súbitos en la osmolaridad ha sido de gran ayuda para esclarecer los mecanismos básicos de regulación del volumen, pero en el organismo estos cambios no se dan de manera tan brusca más que localmente, en las inmediaciones de una o dos células en regiones estrechísimas como el surco sináptico. Un paradigma más cercano a la situación in vivo, publicado por primera vez por Lohr y Grantham (1986), es cambiar la osmolaridad de manera gradual y en pequeñas cantidades, dando lugar a una regulación isovolúmica. Este tipo de regulación se ha reportado en rebanadas de hipocampo (Franco et al., 2000) y neuronas gránulares de cerebelo de rata (Tuz et al., 2001). En ambas preparaciones el volumen se mantiene constante a lo largo de todo el experimento, hasta que después de 1 h se alcanza una reducción en la osmolaridad del 50% con variaciones de 3 mOsm/minuto. Dentro de los osmolitos orgánicos reportados, la taurina es la que participa de manera más importante, dado que tiene el umbral de liberación más bajo, la tasa de liberación más alta y presenta la mayor reducción en el contenido intracelular. En neuronas gránulares, se activa un flujo de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{K}^+$  en etapas tardías, cuando la reducción en la osmolaridad es alrededor de 24% y 30%, respectivamente. No se han estudiado los mecanismos de activación, modulación y la identidad molecular responsable de los flujos de osmolitos en este tipo de regulación.

## REGULACIÓN DEL VOLUMEN EN CONDICIONES HIPEROSMÓTICAS

Cuando la osmolaridad del plasma es mayor a la normal, el agua es desplazada de los órganos hacia el plasma siguiendo el gradiente impuesto, provocando de esta manera su encogimiento. El sistema nervioso central no es la excepción y cuando el plasma es hiperosmolar, el agua se desplaza a través de la barrera hematoencefálica y el cerebro se encoge; sin embargo el cambio observado es menor al esperado de un osmómetro perfecto, revelando la existencia de IRV. En modelos experimentales de hipernatremia, condición donde existe un aumento anormal en la concentración sanguínea de  $\text{Na}^+$ , durante los primeros minutos se acumula en el cerebro  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  de manera activa a partir del líquido cerebroespinal y el plasma, manteniendo el volumen intracelular constante pero reduciendo el compartimiento extracelular a la mitad (Pasantes-Morales, 1996). Después de esta "defensa" rápida, sigue una fase de acumulación y síntesis de osmolitos orgánicos. Los osmolitos orgánicos comienzan a acumularse entre 10 y 24 horas después del estímulo hiperosmótico; si éste dura varios días, los electrolitos obtenidos durante la primera fase son remplazados por osmolitos orgánicos, siendo los más importantes mioinositol, glutamato, glutamina y taurina. Estos dos mecanismos representan una respuesta adaptativa clave para el funcionamiento del sistema nervioso, ya que mantienen el contenido de agua y el tamaño celular cercanos a los niveles normales durante las primeras fases de la hipernatremia.

A nivel celular, la respuesta es similar y permite conocer mejor los mecanismos efectores y reguladores (figura 1). Los astrocitos de rata en cultivo, al ser expuestos a una solución hiperosmótica se encogen de manera rápida, en magnitud proporcional al aumento en la osmolaridad. Tienen una fase rápida de acumulación de osmolitos inorgánicos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ) y una respuesta adaptativa más lenta, donde se incorporan principalmente osmolitos orgánicos. La acumulación de iones es mediada por el cotransportador  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ . En otros tipos celulares son importantes también el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , el intercambiador  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  y la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (Lang et al., 1998a). En general, los canales iónicos no participan en esta respuesta.

## REGULACIÓN DEL VOLUMEN EN CONDICIONES HIPOSMÓTICAS

La hiponatremia, donde la concentración de  $\text{Na}^+$  sanguínea es anormalmente baja, o la hipotonicidad del plasma, imponen un gradiente osmótico en el compartimiento intracraneal, lo que eventualmente produce edema cerebral. De manera inmediata se activa el flujo de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , posteriormente se detecta una disminución en la cantidad de osmolitos orgánicos, que es más evidente en los procesos crónicos. A partir de los dos días de hiponatremia los niveles de osmolitos orgánicos no disminuyen más, pero permanecen así durante el tiempo que dure la condición. El porcentaje de disminución de osmolitos orgánicos es mayor que el de electrolitos, 50%-80% comparado con 10%-30%, pero la contribución de estos últimos al DRV es del 60%-70% ya que se encuentran en mayor concentración (Pasantés-Morales et al., 1996). La movilización de aminoácidos, incluso del mismo tipo, no es igual en todas las regiones del cerebro. En respuesta a hiponatremia crónica, en todas las regiones del cerebro se libera taurina, glutamina, glutamato, aspartato y alanina, mientras que los neurotransmisores inhibidores GABA y glicina se liberan preferencialmente en ciertas áreas (Massieu et al., 2002).

A nivel celular, una solución hiposmótica provoca que las células nerviosas, tanto astrocitos como neuronas, se hinchen de manera proporcional a la reducción en la osmolaridad del medio, siendo el máximo hinchamiento un minuto después de presentado el estímulo y a partir de ese momento se encogen hasta alcanzar el volumen basal entre 15-30 minutos después, demostrando así un DRV eficiente (figura 2). El DRV se lleva a cabo por la extrusión de osmolitos intracelulares (figura 1). Los más importantes son  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y osmolitos orgánicos, principalmente aminoácidos. En astrocitos en cultivo, el curso temporal de liberación de cada osmolito es diferente. El flujo de  $\text{Cl}^-$  se activa inmediatamente después del hinchamiento y se inactiva en menos de 80 segundos, mientras que el  $\text{K}^+$  exhibe un curso temporal más lento, siendo la máxima activación a los dos minutos, manteniéndose constante por cinco minutos y posteriormente se inactiva lentamente. La liberación de taurina tiene un curso temporal parecido al cambio en el volumen (figura 2), donde el pico de liberación es entre el minuto uno o dos y a

partir de ese momento comienza a disminuir el flujo (Pasantes-Morales et al., 1998).

La tendencia de las células a mantener un volumen constante, ya sea en condiciones isosmóticas o cuando son expuestas a soluciones anisomóticas, denota que existe un sensor de volumen. Una vez detectada una variación en el volumen, tiene que activarse una cascada de señalización que comunique el sensor con los sistemas de transporte y difusión de electrolitos, permitiendo así la recuperación del volumen original.

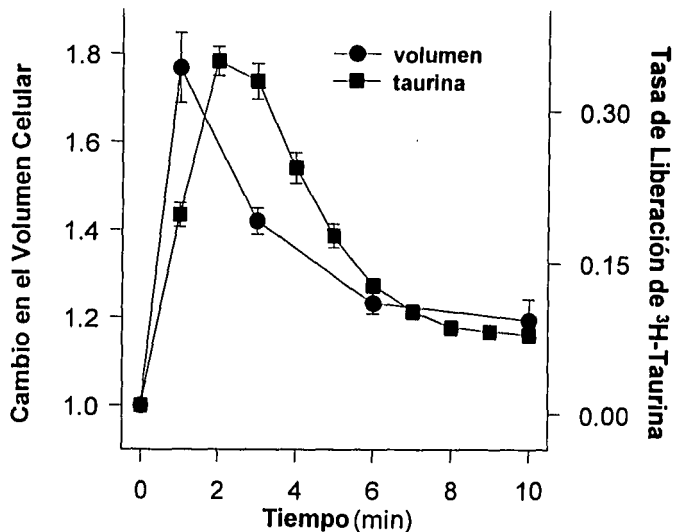


Figura 2. Cambio en el volumen celular y en la tasa de liberación de  $^3\text{H}$ -taurina en condiciones hiposmóticas. Experimentos realizados en astrocitos de corteza de rata expuestos a soluciones hiposmóticas 50% (Cardin et al., 1999).

### Sensor

Estructuras sensibles a cambios en el volumen deben existir en todos los tipos celulares capaces de desencadenar una respuesta reguladora, incluso en varios de los organelos intracelulares. En bacterias y levaduras se han identificado

proteínas transmembranales cinasas de histidina osmosensoras (Wurgler-Murphy y Saito, 1997). En *Escherichia coli* el sistema de dos componentes EnvZ-OmpR regula la expresión de dos porinas de diferente diámetro de poro, OmpF y OmpC. En respuesta a un estímulo hiperosmótico en *Saccharomyces cerevisiae*, la proteína Sin1 activa una cascada de eventos de fosforilación que resultan en la expresión del gen GPD1, que codifica una enzima fundamental en la síntesis de glicerol, osmolito acumulado para contrarrestar el choque osmótico. En eucariontes mayores no se han identificado moléculas osmosensoras, aunque se han propuesto algunos mecanismos que se discuten a continuación.

Agrupamiento de macromoléculas (Macromolecular crowding). La teoría de la exclusión por volumen postula que la actividad termodinámica de las proteínas en un ambiente altamente concentrado es función de la composición del medio (Al-Habori, 2001). Por lo tanto, cambios en la concentración y tamaño de macromoléculas, pueden alterar de manera significativa la actividad de las proteínas efectoras y reguladoras, incluso en condiciones donde su concentración no se modifique. Estos cambios se dan en los procesos de hinchamiento, encogimiento y regulación del volumen. Por esto, se ha propuesto al agrupamiento macromolecular como sensor, tomando en cuenta que el interior celular es un ambiente altamente concentrado y que cambios en la actividad termodinámica de proteínas (cinasas, fosfatasas) afectan la permeabilidad de los canales y transportadores efectoras (Summers et al, 1997). Existe evidencia experimental que apoya esta teoría (Colclasure y Parker, 1992; Summers et al, 1997), pero no es suficiente para respaldarla totalmente.

Fuerza iónica. La importancia de la fuerza iónica intracelular como sensor de cambios en el volumen en condiciones anisosmóticas fue demostrada por primera vez por Motais y col. (1991) en eritrocitos de trucha y ha sido comprobada en otros tipos celulares (Cannon et al, 1998; Cardin et al, 1999; Voets et al, 1999; Wittels et al., 2000).

En astrocitos de corteza cerebral, el flujo de taurina y la regulación de volumen son mayores cuando el hinchamiento se acompaña de una disminución en la fuerza iónica intracelular, inducido por hiposmolaridad o soluciones

isomólicas con alto contenido de urea, que cuando se provoca con soluciones hiposmólicas con alto contenido de  $K^+$ , donde la fuerza iónica intracelular no disminuye (Cardin et al, 1999). Si bien no es claro si el efecto de la fuerza iónica es directamente sobre las vías de movilización de osmolitos (Voets et al, 1999), regulando el umbral de activación (Cannon et al, 1998) o modificando la actividad de cinasas involucradas en las vías de transducción de señales (Wittels et al., 2000), es evidente que se necesita una reducción en la fuerza iónica intracelular para la activación del flujo de taurina y la corriente de  $Cl^-$  sensibles a hinchamiento.

Tensión membranal. El hecho de que la corriente de  $Cl^-$  sensible al volumen ( $I_{ClSV}$ ) se active por presión y por el tratamiento con sustancias que alteran la forma celular, como la clorpromazina y el dipiridamol, sugiere que cambios en la tensión membranal podrían ser el sensor para la activación de los mecanismos de regulación del volumen. Sin embargo, calculando el área de la superficie celular con base en medidas de capacitancia, y comparándolo con los datos obtenidos midiendo el área de la "esfera" celular, se ha demostrado que la tensión membranal comenzaría a aumentar después que la célula alcanzara un volumen de 4.8 veces el original y que el hinchamiento es a expensas de la pérdida de invaginaciones en la membrana y no de un incremento en la tensión (Okada et al., 1997).

Citoesqueleto e Integrinas. Los cambios en el volumen provocan perturbaciones en la morfología celular y en consecuencia en el citoesqueleto. Varios de los segundos mensajeros involucrados en la activación de las vías de transporte tienen interacciones funcionales con el citoesqueleto e incluso los canales y transportadores muchas veces están asociados a éste (Janmey, 1998). Tomando en cuenta lo anterior se ha propuesto que el citoesqueleto, particularmente el de actina, podría estar involucrado en los mecanismos de regulación del volumen. El hinchamiento hiposmótico está asociado a una reducción, y el encogimiento hiperosmótico a un aumento, en la actina total, que permanece incluso después de que la célula recupera su volumen (Pedersen et al., 1999). En astrocitos de cerebelo de rata, el tratamiento con citocalasina B y D



destruye completamente el citoesqueleto de actina, pero no altera el DRV, el flujo de taurina, inositol y  $^{125}\text{I}$  (como marcador del flujo de  $\text{Cl}^-$ ) (Morán et al, 1996).

Se ha puesto menos atención en los filamentos intermedios; sin embargo en astrocitos de ratones deficientes en vimentina y en proteína glial fibrilar (GFAP $^{-/-}$ , vim $^{-/-}$ ), el flujo de taurina en respuesta a un estímulo hiposmótico es 26-45% menor (Ding et al, 1998).

Las integrinas son glicoproteínas transmembranales que interactúan con moléculas de la matriz extracelular, con el citoesqueleto y con proteínas de señalización intracelular. Se encuentran en áreas de adhesión focal y transmiten señales relacionadas con el anclaje, el movimiento y la diferenciación. Algunos estudios sugieren que la activación de integrinas juega un papel importante como sensor, lo que ha llevado a postular que un cambio en el volumen podría provocar acumulación de integrinas y desencadenar las vías de señalización de las adhesiones focales de una manera independiente de ligando. Varias proteínas relacionadas con las vías de activación del DRV, como p125FAK, PKC, PI3K, src y pequeñas proteínas que unen GTP, actúan en los complejos de adhesión focal después de la activación de las integrinas (Pedersen et al, 2001).

### **Vías de movilización de osmolitos**

**Canales de  $\text{Cl}^-$** . El hinchamiento celular se asocia con la activación de diferentes canales de  $\text{Cl}^-$ , dependiendo el tipo celular y las condiciones experimentales. Se ha observado la activación de: 1) rectificadores salientes de conductancias intermedias (10-100pS) y miniconductancias (<3pS), 2) rectificadores entrantes o no rectificadores de conductancia unitaria intermedia, 3) maxicanales ohmicos de gran conductancia unitaria (>100pS) y 4) un canal activado por  $\text{Ca}^{+2}$  de conductancia <10pS. Entre estos canales, el más importante para la regulación del volumen es un canal de  $\text{Cl}^-$  rectificador saliente, ya que se ha visto se activa en respuesta al hinchamiento en varios tipos celulares, es capaz de generar grandes corrientes y su bloqueo suprime el DRV (Okada et al., 1997).

El canal de  $\text{Cl}^-$  rectificador saliente sensible a volumen (RSSV) tiene una conductancia unitaria de 40-50pS a potenciales positivos y 10-20pS a potenciales

negativos, siendo la rectificación una propiedad intrínseca del canal ya que se observa incluso a nivel de canal único. La secuencia de permeabilidad aniónica es  $\text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{HCO}_3^- > \text{F}^- > \text{gluconato} > \text{glicina} > \text{taurina} > \text{lactato} > \text{aspartato} = \text{glutamato}$ . El RSSV se inactiva con el tiempo a voltajes positivos (>50-60mV), siendo la cinética de inactivación más rápida a medida que aumenta la  $[\text{Mg}^{+2}]$  intracelular, disminuye el pH extracelular o en presencia de cationes divalentes extracelulares. La actividad del canal es dependiente de ATP intracelular, ya que cuando éste existe una deficiencia de éste no se detectan corrientes de  $\text{Cl}^-$  sensibles a hinchamiento, lo que es de relevancia patológica en condiciones isquémicas porque probablemente el canal esté inhibido (Okada et al., 1997; Nilius et al., 2000). El RSSV es sensible a bloqueadores clásicos de canales de  $\text{Cl}^-$  como DIDS (ácido 4,4'-diisotiocianoestilben-2,2'-disulfónico), SITS (ácido 4-acetamido-4'-isotiocianoestilben-2,2'-disulfónico), NPA (ácido N-fenilantranílico), 9-AC (ácido 9-aminocamptotécico), NPPB (ácido 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino)benzoico) y ácido niflúmico; inhibidores de la glicoproteína-P como tamoxifen, DDFK (1,9-dideoxiforskolina), verapamil, quinina y quinidina (Okada et al., 1997; Nilius et al., 2000) y se inhibe también por ácido araquidónico y otros ácidos grasos polinsaturados (Sánchez-Olea, 1995a). A continuación se mencionan posibles entidades moleculares responsables de esta corriente.

La glicoproteína-P (gp-P) es producto del gen de resistencia a múltiples drogas 1, miembro de la familia de transportadores ABC (ATP binding cassette) que funciona como transportador de fármacos y posiblemente como un canal aniónico (Idriss et al., 2000). En un principio se pensó que esta proteína era la entidad molecular responsable de  $I_{\text{Cl}^-}\text{SV}$ , actualmente se cree que gp-P puede actuar como un modulador del RSSV. Las evidencias que respaldan esta teoría son: 1) la corriente de  $\text{Cl}^-$  sensible a hinchamiento es inhibida por la proteína cinasa C (PKC) en células HeLa transfectadas con gp-P, mientras que esta cinasa no tiene efecto alguno en las células control o cuando los posibles residuos blanco en gp-P se mutan por alanina; 2) un anticuerpo monoclonal contra gp-P bloquea  $I_{\text{Cl}^-}\text{SV}$  en algunos tipos celulares; 3) el estímulo hiposmótico necesario para la activación de  $I_{\text{Cl}^-}\text{SV}$  es menor en células que expresan gp-P (Nilius et al, 1997).

Los canales de  $\text{Cl}^-$  pertenecientes a la familia CIC son homodímeros de dos poros antiparalelos, ampliamente distribuidos en la naturaleza. CIC-2 es un canal de expresión ubicua, activado por hinchamiento en ovocitos (Roman et al, 2001), pero sus propiedades biofísicas y farmacológicas son diferentes a las de RSSV.

El fosfoleman es una proteína de 15kDa formada por 72 aminoácidos, con una sola región transmembranal y sitios consenso de fosforilación para PKC y proteína cinasa A (PKA) en el C-terminal. Esta proteína induce corrientes aniónicas en ovocitos y forma canales selectivos para taurina en bicapas. En células de endotelio de riñón humano 293 (HEK-293) transfectadas con fosfoleman, el DRV es más eficiente y los flujos de taurina y  $^{125}\text{I}$  son mayores (Morales-Mulia et al., 2000). En astrocitos de cerebelo, el flujo de taurina se inhibe con oligonucleótidos antisentido contra el fosfoleman. Esta respuesta se modula por fosforilación (Morán et al., 2001). Si bien estos resultados proponen al fosfoleman como el responsable del flujo de taurina en astrocitos, no parece tener un papel importante en la corriente de  $\text{Cl}^-$  osmosensible.

$\text{ICl}_n$  es una proteína clonada de la línea celular MDCK, cuyo dominio N-terminal se predice que podría formar un poro transmembranal. Su expresión en ovocitos resulta en una corriente de  $\text{Cl}^-$  con rectificación saliente con características biofísicas similares a  $\text{I}_{\text{Cl}}\text{SV}$ , pero la reconstitución en bicapas revela un canal permeable de manera preferencial a cationes que deja pasar también aniones y taurina. Se encuentra distribuida de manera difusa en el citosol y una pequeña fracción se detecta en la membrana, aunque el estímulo hiposmótico provoca un movimiento hacia la membrana plasmática. Con el uso de oligonucleótidos antisentido se ha podido reducir la  $\text{I}_{\text{Cl}}\text{SV}$  nativa, mientras que su sobreexpresión aumenta las corrientes de  $\text{Cl}^-$  durante el DRV (Füerst et al., 2000).

**Canales de  $\text{K}^+$** . Los canales de  $\text{K}^+$  osmosensibles se pueden agrupar en dos clases: 1) canales de conductancia unitaria entre 100-200pS dependientes de  $\text{Ca}^{+2}$ , reportados principalmente en células epiteliales, cuyas características biofísicas y farmacológicas corresponden a los canales de  $\text{K}^+$  de gran

conductancia (BK); 2) canales de conductancia unitaria  $<100\text{pS}$ , en general independientes de  $\text{Ca}^{+2}$ . (Pasantes-Morales y Morales-Mulia, 2000)

La entidad molecular de los canales de pequeñas conductancias no se ha identificado y parece variar según el tipo celular. Algunos candidatos se mencionan a continuación.

Los canales de fuga KCNK, de dos segmentos formadores de poro y cuatro segmentos transmembranales por subunidad, representan una vía ideal para el flujo de  $\text{K}^+$  sensible a osmolaridad porque están abiertos en condiciones basales, conducen según el potencial de equilibrio del  $\text{K}^+$  ( $E_K$ ) y varios son sensibles a estiramiento de la membrana. La transfección de KCNK5 en células HEK-293 provoca un aumento en la cantidad de corriente en medio hiposmótico y una disminución en condiciones hiperosmóticas (Niemeyer et al., 2001). Este canal se expresa en células de Ehrlich y muestra las mismas propiedades que la corriente de  $\text{K}^+$  nativa.

En varios tipos celulares el hinchamiento hiposmótico está asociado a una despolarización celular, la cual podría activar canales de  $\text{K}^+$  rectificadores salientes dependientes de voltaje. La transfección del canal dependiente de voltaje Kv1.3, pero no el Kv3.1, confiere a una línea celular de linfocitos T de rata la capacidad de regular el volumen (Deutsch y Chen, 1993). También en estas células el bloqueo de la corriente IK, cuya entidad molecular es un canal de  $\text{K}^+$  dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$  (hSK4), impide el DRV (Khanna et al., 1999).

La proteína IsK se asocia con los canales de  $\text{K}^+$  KCNQ1, generando la corriente de  $\text{K}^+$  rectificadora tardía de activación lenta. Las células de tráquea de ratones IsK  $-/-$  pierden la capacidad de regular el volumen que tienen las células silvestres (IsK $+/+$ ), sugiriendo un papel importante para esta proteína en el DRV. (Lock y Valverde, 2000)

No está claro si la corriente de  $\text{K}^+$  osmosensible ocurre a través de canales activados directamente por el hinchamiento, canales abiertos en condiciones basales o activados por cambios subyacentes al hinchamiento, como reorganización del citoesqueleto, incrementos en  $\text{Ca}^{+2}$  citosólico, variaciones en el potencial de membrana y otros.

**Osmolitos Orgánicos.** La vía de movilización de osmolitos orgánicos es de tipo difusional y no un transportador dependiente de  $\text{Na}^+$ , como el que se utiliza para el transporte de estas moléculas en condiciones basales e hiperosmóticas. Las evidencias que apoyan esto demuestran que el flujo de osmolitos: a) es independiente de  $\text{Na}^+$ ; b) es insensible a bloqueadores específicos de estas vías; c) es bidireccional y su dirección está determinada por el gradiente electroquímico; d) no se satura (Pasantes-Morales et al., 1996).

El flujo de osmolitos orgánicos es sensible a los mismos bloqueadores que la  $I_{\text{ClSV}}$  en varios tipos celulares (Perlman y Goldstein, 1999; Junankar y Kirk, 2000). Experimentos realizados con aminoácidos en forma aniónica, demostraron que el RSSV tenía un poro lo suficientemente grande para dejar pasar osmolitos orgánicos (Roy et al, 1995; Boese et al., 1999). Estas evidencias, aunque indirectas, y las características difusionales de la vía, respaldan la teoría de una vía común para el transporte de  $\text{Cl}^-$  y osmolitos orgánicos mediante una molécula semejante a un canal aniónico.

En los últimos años se ha acumulado evidencia en varios tipos celulares que sugiere la existencia de vías independientes. Se ha observado la activación del flujo de taurina osmosensible sin activación de  $I_{\text{ClSV}}$  y viceversa; también hay diferencias en los cursos temporales de activación e inactivación de ambos flujos (Junankar y Kirk, 2000). En células de Ehrlich los flujos osmosensibles de taurina y  $^{36}\text{Cl}^-$  responden de diferente manera al DIDS y al ácido araquidónico (Lambert y Hoffmann, 1994). La disminución del  $\text{Cl}^-$  extracelular aumenta el flujo de taurina en células HeLa, mientras que provoca una disminución de la corriente entrante de  $\text{Cl}^-$ , contrario a lo predicho por la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz. También en estas células el flujo de taurina y  $I_{\text{ClSV}}$  responden con diferente sensibilidad al DIDS (Stutzin et al, 1997). La expresión de canales aniónicos y transportadores en ovocitos de *Xenopus laevis* resulta en la activación de un flujo de taurina en respuesta a soluciones hiposmóticas, pero la corriente de  $\text{Cl}^-$  no se modifica (Stegen et al., 2000).

Hay suficiente evidencia respaldando tanto una vía única como vías independientes. Incluso hay trabajos que postulan la existencia de vías independientes para cada uno de los diferentes tipos de osmolitos orgánicos (Junankar y Kirk, 2000). Estas dos hipótesis no son excluyentes, ya que ambos tipos de canales podrían coexistir en la misma célula o un mismo canal podría cambiar sus propiedades según las condiciones experimentales o fisiológicas. Hay que tomar en cuenta que células de diferentes organismos e incluso de tejidos distintos, tienen diversas maneras de controlar el volumen y por lo tanto de movilizar osmolitos orgánicos.

### **Transducción de Señales**

Cinasa del Fosfatidilinositol (PI3K). Es una enzima que fosforila al fosfatidilinositol en la posición D-3. Está compuesta de una subunidad catalítica (p110) y una reguladora (p85). Debido a la presencia de dos dominios SH2 en el carboxilo terminal de p85, PI3K puede activarse al unir con alta afinidad residuos de tirosina fosforilados (Duronio et al, 1998). PI3K se activa en respuesta a hiposmolaridad en hepatocitos de rata (Krause et al, 1996) y en la línea celular de intestino humano 407 (CIH-407) (Tilly et al, 1996). Inhibidores de esta cinasa disminuyen la liberación de taurina osmosensible (LTO) en neuronas granulares de cerebelo (Morales-Mulia et al, 2001), la  $I_{Cl}SV$  y el DRV en el hepatoma HTC (Feranchak et al., 1998) y el flujo de  $^{125}I$  en células CIH-407 (Tilly et al, 1996).

Fosfolipasas A2. Las fosfolipasas A2 (PLA2) son una familia de enzimas que hidrolizan fosfolípidos de membrana en la posición *sn*-2, produciendo ácido araquidónico que es metabolizado en productos oxigenados, como las prostaglandinas y los leucotrienos. Existen isoformas citosólicas y extracelulares, con varios subtipos cada una. Esta proteína ha sido relacionada con el DRV principalmente en células de Ehrlich, donde el hinchamiento hiposmótico activa la isoforma citosólica de 85 kDa de PLA2 (PLA2c), aumenta la liberación de ácido araquidónico y aumenta la producción de leucotrieno D-4 (LTD4) (Thorod et al., 1997). Si bien este no parece ser un mecanismo de acción general, debido a que el LTD4 no tiene efecto en otros tipos celulares, la inhibición de PLA2 tiene efectos

en el DRV, el flujo de taurina y la corriente de Cl<sup>-</sup>, involucrando así a esta enzima con los mecanismos de señalización activados por hiposmolaridad (Pasantes-Morales et al., 2000).

Cinasas de Tirosina. Son proteínas que transfieren un fosfato- $\gamma$ , generalmente del ATP, a un residuo de tirosina en las proteínas sustrato. Inhibidores de estas proteínas, como tirfostina A23, genisteína, lavendustina A y herbimicina A, disminuyen la I<sub>Cl</sub>SV y la LTO en varios tipos celulares (Pasantes-Morales et al., 2000), lo que sugiere un evento de fosforilación de este tipo en la vía de activación del flujo de osmolitos.

p56lck es una proteína de la familia de tirosinas cinasas src, involucrada en el DRV y en la activación de la I<sub>Cl</sub>SV en linfocitos; incluso la expresión de esta proteína activa en condiciones isosmóticas una corriente de Cl<sup>-</sup> similar a I<sub>Cl</sub>SV (Lepple-Wienhues, 2000). p56lyn y p72syk, también proteínas de esta familia, regulan la actividad del intercambiador aniónico, proteína responsable del flujo de taurina en eritrocitos de raya (Musch et al., 1999).

La cinasa de adhesión focal (p125FAK) es una proteína activada por integrinas que se asocia con proteínas como PI3K, Shc, Grb2, paxilina, miembros de la familia src y p130cas. p125FAK se fosforila en respuesta a un estímulo hiposmótico en células CIH-407, aparentemente esta fosforilación es mediada por la proteína Rho y p125FAK podría ser la proteína que activa PI3K en condiciones hiposmóticas en estas células (Tilly et al, 1996).

En otros tipos celulares no se ha identificado la cinasa de tirosina involucrada en el DRV ni el orden de los eventos de fosforilación, pero muchas de las proteínas identificadas como responsables de la activación del flujo de osmolitos son reguladas por este tipo de cinasas.

Cinasas de Serina/Treonina. El estímulo hiposmótico activa en varios tipos celulares a las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), que en general se asocian a receptores con actividad de cinasas de tirosina o acoplados a proteínas G. En mamíferos se expresan cuatro grupos de estas enzimas: las cinasas relacionadas con señales extracelulares 1 y 2 (Erk1/Erk2), las cinasas con amino-terminal Jun (JNK1/2/3), las proteínas p38 (p38 $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ / $\delta$ ) y Erk5, que son

activadas por tipos específicos de cinasas de MAPKs (MEKs): MEK1/2, MKK3/6, Mkk4/7 y MEK5 respectivamente (Chang y Karin, 2001). Las MAPKs reconocen sitios fosfoaceptores compuestos de serina o treonina seguidas de prolina y los aminoácidos que rodean estos sitios incrementan la especificidad de reconocimiento. Erk1/Erk2 se activan en respuesta al estímulo hiposmótico en muchos tipos celulares (Pasantes-Morales et al, 2000a) y en astrocitos de corteza estas proteínas están involucradas en la activación de la  $I_{Cl}SV$  (Crépel et al, 1998). JNK y p38 se activan también en respuesta al hinchamiento hiposmótico, pero no se ha encontrado una relación entre la actividad de estas proteínas y la activación de los flujos de osmolitos (Pasantes-Morales et al, 2000a).

La familia de proteínas cinasas C (PKC) se activan por  $Ca^{+2}$  y 1,2-diacilglicerol (DAG). Al estudiarse el efecto de PKC sobre la  $I_{Cl}SV$  se encontraron respuestas diferentes dependiendo del tipo celular estudiado: a) la activación de PKC disminuye la cantidad de corriente y su inhibición la aumenta; b) la activación aumenta la corriente y la inhibición la disminuye; c) la activación o inhibición de PKC no tiene efecto (Pasantes-Morales et al, 2000a). La LTO es independiente de PKC en el NSO de la rata (Deleuze et al., 2000) y en neuronas granulares de cerebelo (Morales-Mulia et al., 2001). El bloqueador de PKC, queleritrina, inhibe el flujo de aminoácidos en células cardíacas, pero no en células de corteza de rata. Varios de los canales propuestos como responsables de la corriente de  $K^+$  sensible a volumen son sustrato de fosforilación de PKC y otras cinasas, pero el efecto específico sobre esta corriente en condiciones hiposmóticas no se ha reportado. Los resultados obtenidos apuntan a que el papel de esta proteína en los flujos de osmolitos y el DRV es específico para cada tipo celular.

GTPasas Rho. Constituyen una subfamilia de la superfamilia de pequeñas GTPasas Ras. Las mejor caracterizadas son RhoA (Ras homologous member A), Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) y Cdc42 (cell division cycle 42) (Luo, 2001). Estas proteínas se han visto relacionadas con la activación de la  $I_{Cl}SV$ , ya que en la línea celular CIH-407 (Tilly et al, 1998) y en células CPAE (Nilius et al, 1999) el tratamiento con exoenzima C3 recombinante, un inhibidor de Rho, impide la activación de esta vía. Los blancos de acción de estas proteínas



en la regulación del volumen podrían ser p125FAK, PI3K y Rho cinasa (Tilly et al, 1998; Nilius et al, 1999). La conexión final con la activación de las vías de transporte no es clara aún, pero es importante resaltar que estas proteínas son reguladoras clave de la organización del citoesqueleto de actina y de las vías de señalamiento activadas por integrinas.

CaM y CaMK. Una de las proteínas más importantes en la transducción de señales en respuesta a aumentos en la  $[Ca^{+2}]_i$  es la calmodulina (CaM), de 148 aminoácidos con cuatro dominios conocidos como "manos EF", cada uno capaz de unir un ión de  $Ca^{+2}$  y desencadenar un cambio conformacional en la proteína. Una de las acciones principales de CaM es activar a miembros de la familia de proteínas cinasas S/T, entre ellos las proteínas cinasas dependientes de  $Ca^{+2}/CaM$  (CaMK) (Hook y Means, 2001).

Inhibidores de CaM como W7 (N-(6-aminohexil)-5-cloro-1-naftalen sulfonamida), pimozida y trifluoperazina disminuyen el DRV y los flujos de osmolitos en una gran variedad de células (Pasantés-Morales y Morales-Mulia, 2000). La dependencia de CaM y CaMK de la LTO en diferentes tipos celulares se puede apreciar en la Tabla II.

Calcio. En la mayoría de los tipos celulares, el hinchamiento hiposmótico provoca un aumento en la concentración de calcio intracelular ( $Ca^{+2}$ ), proveniente tanto del medio extracelular como de pozas intracelulares. La entrada de  $Ca^{+2}$  en respuesta al hinchamiento puede ser a través de canales de  $Ca^{+2}$  dependientes de voltaje, canales catiónicos activados por estiramiento o entrada  $Ca^{+2}$  capacitativa, dependiendo el tipo celular. En astrocitos de cerebelo de rata la entidad molecular responsable de la entrada de  $Ca^{+2}$  no se ha identificado, pero se sabe que no son canales dependientes de voltaje ni canales sensibles a estiramiento (Morales-Mulia et al., 1998). En astrocitos de corteza y cerebelo de rata, la poza sensible a inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) es la que colabora en el aumento en la  $[Ca^{+2}]_i$  (Fischer et al., 1997; Morales-Mulia et al., 1998).

Esta respuesta tan conservada postulaba al  $Ca^{+2}$  como molécula fundamental en la activación del DRV y el flujo de osmolitos. Los primeros trabajos realizados en células renales apoyaban este hecho, pero el estudio de este

**TABLA II.** Dependencia de  $Ca^{+2}$ , CaM y CaMK de la Liberación de Taurina Osmosensible.

Tipo Celular	Dependiente de				Ref.
	$Ca^{+2}e$	$Ca^{+2}i$	CaM	CaMK	
Línea celular de tráquea de humano 9HTEo-	si	si			Gaietta et al., 1997
Neuroblastoma CHP-100	si				Basavappa et al., 1996
Eritrocitos de <i>Noctia Ponderosa</i>	si				Pierce y Rowland-Faux, 1992
Rebanadas de corteza de rata	no	si	si		Law, 1994
Células de eritroleucemia	no		si	si	Huang et al., 2001
Células MDCK	no	no			Sánchez-Olea et al., 1991
Linfocitos de humano	no	no	no	no	García et al., 1991
Células de papila renal	no	no			Kinne et al., 1996
Astroцитos de cerebelo	no				Sánchez-Olea et al., 1995b
Astroцитos de corteza	no		no		Pasantes-Morales et al., 1990 O'Connor y Kimmelberg, 1993
Neuronas granulares de cerebelo	no	no	no	no	Morán et al., 1997 Morales-Mulia et al., 2001
Núcleo supraóptico de rata	no				Deleuze et al., 1998
Células HeLa			si		Kirk y Kirk, 1994

$Ca^{+2}e$ , calcio extracelular;  $Ca^{+2}i$  calcio intracelular; CaM, calmodulina; CaMK, cinasa dependiente de calmodulina; MDCK, células de riñón de perro Madin-Darbin.

fenómeno en diversos tipos celulares ha permitido demostrar que el DRV es dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$  en células epiteliales pero independiente en casi todos los demás tipos celulares, con algunas excepciones (Pasantes-Morales y Morales-Mulia, 2000). Esta diferencia entre células epiteliales y no epiteliales se ha propuesto es debido, principalmente, al canal de  $\text{K}^+$  involucrado en el DRV. Mientras que en las células epiteliales se activan los canales BK, que son dependientes de concentraciones micromolares de  $\text{Ca}^{+2}$  y tienen conductancias entre 100-200pS; en los demás tipos celulares se activa una canal de conductancia menor, de 20-30 pS, e independiente de  $\text{Ca}^{+2}$ . En consecuencia, el hinchamiento en células donde los BK participan en el DRV se activa la corriente de  $\text{K}^+$  dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$ , se hiperpolariza la célula y posteriormente se activan los canales de  $\text{Cl}^-$ . En los demás tipos celulares, incluyendo los astrocitos, la activación de la corriente de  $\text{Cl}^-$  precede a la de  $\text{K}^+$  y en general ambas son independientes de  $\text{Ca}^{+2}$ ; en este caso la célula se despolariza al hincharse.

La  $I_{\text{ClSV}}$  es independiente de  $\text{Ca}^{+2}$  en la mayoría de las células (Pasantes-Morales y Morales-Mulia, 2000), pero necesita de una concentración mínima de  $\text{Ca}^{+2}$ , para su activación, conocida como calcio permisivo (Szucs et al., 1996b).

La LTO es independiente de  $\text{Ca}^{+2}$  en la mayoría de los tipos celulares (Tabla II). Aun así, en algunos tipos celulares se ha observado que un aumento en los niveles de este ión por encima de los alcanzados con un estímulo hiposmótico potencia el flujo, pero en estas células la liberación de taurina es dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$ .

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las células gliales, entre ellas los astrocitos, son las responsables de mantener constante la composición del medio extracelular en el sistema nervioso central. Así mismo, pueden regular la actividad neuronal debido a la cercanía anatómica con las sinapsis. Los astrocitos son preferentemente susceptibles al incremento en volumen, lo que exacerba el desajuste metabólico y provoca un daño mecánico mayor. Una gran variedad de neurotransmisores, neuromoduladores, hormonas y mediadores de la respuesta inmune presentes en el cerebro, ya sea en condiciones fisiológicas o patológicas, puede provocar un aumento en la  $[Ca^{+2}]_i$  en astrocitos (Verkhratsky y Kettenmann, 1996). Si bien la LTO es independiente de  $Ca^{+2}$  en astrocitos de cerebelo de rata, un aumento en la  $[Ca^{+2}]_i$ , por encima del observado en condiciones hiposmóticas, podría potenciar el flujo de taurina. En consecuencia, el efecto del  $Ca^{+2}$  sobre la liberación de taurina podría resultar en un aumento en la eficiencia de los mecanismos de regulación del volumen y una disminución en el daño causado por patologías asociadas a condiciones hiposmóticas. La caracterización de estos mecanismos es importante ya que podría ser una estrategia eficaz en el tratamiento de estas patologías en el sistema nervioso.

## **OBJETIVOS**

Con base en lo anterior, el objetivo general de este trabajo es investigar la modulación por  $\text{Ca}^{+2}$  de la liberación de taurina en condiciones hiposmóticas y sus mecanismos de acción.

Los objetivos particulares son:

- Aumentar los niveles de calcio intracelular durante el estímulo hiposmótico mediante el uso de ionomicina y estudiar el efecto de este ión sobre la liberación de taurina osmosensible.
- Caracterizar la cascada de señales que activa la liberación de taurina en condiciones hiposmóticas en astrocitos de cerebelo de rata, con el propósito de ubicar los posibles blancos del  $\text{Ca}^{+2}$ .
- Determinar si las vías activadas por el aumento en el calcio intracelular son las mismas que las activadas por hiposmolaridad o se reclutan señales diferentes.

## **METODOLOGÍA**

### **CULTIVOS CELULARES.**

Se utilizaron cultivos primarios de astrocitos de cerebelo de rata que se obtuvieron de acuerdo a Morán y Patel (1989). Ratas de la cepa Wistar, de ocho días de nacidas, fueron decapitadas para aislar el cerebelo. El tejido se homogeneizó mecánicamente, las células se disociaron con tripsina y se sembraron en cajas de plástico a una densidad de  $2.1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. Se utilizó medio basal Eagle suplementado con 10% de suero fetal inactivado, 2mM glutamina, 50 U/ml penicilina y 50 µg/ml estreptomina. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> (5%) y aire saturado con vapor de agua (95%). Los cultivos se utilizaron después de 2-3 semanas en cultivo.

### **DETERMINACIÓN DE LA [Ca<sup>+2</sup>] INTRACELULAR.**

Los astrocitos se incubaron 1h con 5µM Fura-2/AM en medio basal Eagle a 37°C y transcurrido este tiempo se levantaron las células de las cajas de cultivo con solución salina de fosfatos (10mM buffer de fosfatos, KCl 2.7mM, 137mM NaCl, pH 7.4) sin Ca<sup>+2</sup>, con 1mM EDTA (ácido etilenediamine-tetracético) y 0.01% de tripsina, se centrifugaron y resuspendieron en medio isosmótico durante 30 min para desechar el fluoróforo no incorporado. En las células suspendidas en solución isosmótica se determinó la concentración de Ca<sup>+2</sup> en la condición basal y posteriormente en la condición experimental. La fluorescencia fue medida en un espectrofluorómetro de luminiscencia Aminco-Bowman alternando la longitud de onda de excitación entre 340 y 380 nm, mientras que la emisión fue monitoreada a 510 nm. Al final de cada experimento se lisaron las células con 0.1% de Tritón X-100 para obtener la fluorescencia máxima y posteriormente se amortiguó todo el Ca<sup>+2</sup> con 20 mM EGTA (ácido etilenglicol-bis(beta-aminoetil)-N,N,N',N'-tetraacético) para determinar la señal mínima. Los valores obtenidos se utilizaron para calcular la concentración de calcio de acuerdo a ecuaciones publicadas con anterioridad (Grynkiweicz et al., 1985).

## **FLUJO DE <sup>3</sup>H-TAURINA.**

Los astrocitos en cultivo se incubaron durante 1 hora con 1  $\mu$ Ci/ml <sup>3</sup>H- taurina en medio isosmótico (300mOsm) que contiene (en mM): 135 NaCl, 5 KCl, 1 MgSO<sub>4</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 10 glucosa y 10 ácido N-2-Hidroxietilpiperazin-N'-2- ethanesulfónico (HEPES), pH 7.4. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron durante 15 minutos con solución isosmótica en ausencia del marcador radioactivo. Posteriormente se reemplazó completamente el medio cada minuto, colectándose tres muestras para determinar la liberación de <sup>3</sup>H- taurina en condiciones control (isosmóticas) y 5 muestras para las condiciones experimentales. Al terminar el experimento se solubilizaron las células con NaOH 0.4 N y la radioactividad se determinó en un contador de centelleo líquido. Los resultados se expresan como porciento de liberación o como tasa de liberación, que es el cociente entre la radioactividad presente en el medio colectado en cada fracción de tiempo y la radioactividad en las células en ese periodo.

Las soluciones hiposmóticas se prepararon reduciendo la concentración de NaCl. La osmolaridad de las soluciones se determinó en un osmómetro de punto de congelación.

El ionóforo de Ca<sup>+2</sup> ionomicina estuvo presente únicamente durante la condición experimental. Los demás fármacos se preincubaron los tiempos indicados y estuvieron presentes en el medio de perfusión durante todo el experimento.

## **LIBERACIÓN DE <sup>3</sup>H-ÁCIDO ARAQUIDÓNICO.**

Las células en cultivo se incubaron 24h con 0.5  $\mu$ Ci/ml <sup>3</sup>H-ácido araquidónico en medio basal Eagle sin suero, suplementado con 2mM glutamina, 50 U/ml penicilina y 50  $\mu$ g/ml estreptomycin. Transcurrido este tiempo se lavaron las células tres veces con medio isosmótico con albúmina al 1% para remover el marcador no incorporado y tres veces más con medio isosmótico normal. Después de 5 minutos en condiciones isosmóticas, se colectó completamente el medio para determinar la liberación basal y se agregó la solución experimental, que se colectó 5 minutos después. Las células se solubilizaron con NaOH 0.4 N y la

radioactividad se determinó en un contador de centelleo líquido. Los resultados se expresan como aumento porcentual con respecto a la liberación basal de  $^3\text{H}$ -ácido araquidónico.

### **INMUNOPRECIPITACIÓN Y WESTERN BLOT.**

Después de ser expuestos a las condiciones experimentales, los astrocitos se trataron con buffer de lisis (20mM Tris pH7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5mM pirofosfato de sodio, 1mM  $\beta$ -glicerolfosfato, 1mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptina, 0.2 mM fenilmetil-sulfonil fluoride) a 4°C. Las células se desprendieron de las cajas con un asa de goma y el lisado fue sonificado tres veces con ciclos de 30 segundos. Se obtuvo el sobrenadante de esta muestra centrifugando durante 15 min a 10,000 rpm y se determinó la concentración de proteína por el método publicado por Lowry (1951).

La actividad de Erk1/Erk2 se determinó mediante la fosforilación de la proteína básica de mielina (PBM) según la técnica publicada por Alessi y col. (1995). Se inmunoprecipitó durante 2h a 4°C con un anticuerpo policlonal contra Erk1/Erk2 y sefarsosa acoplada a proteína A. Los inmunoprecipitados se lavaron con buffer de cinasa (20mM HEPES pH 7.4, 10mM  $\text{MgCl}_2$ , 1mM ditiotreitól) y se incubaron con 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$  de PBM y 1 $\mu\text{M}$  ácido okadaico a 30°C durante 5 min. La reacción se inició al agregar 20mM ATP y 10 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]-ATP. Transcurridos 30 min se detuvo la reacción con buffer de muestra (Tris 52.5mM, glicerol 10%, 2.3% SDS,  $\beta$ -mercaptoetanol 5mM) y el material se separó en geles desnaturizantes de duodecil sulfato de sodio-poliacrilamida al 15% (SDS-PAGE). Las proteínas se transfirieron y expusieron a placas Molecular Dynamics phosphorimager. Para determinar la cantidad de Erk1/Erk2 las membranas se bloquearon durante 2 h con 5% leche descremada en 10mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl (TBS) y se incubaron con un anticuerpo anti-Erk1/Erk2 a 22°C durante 1 h. Las membranas se lavaron cuatro veces con TBS (durante 5 min c/u) y se incubaron 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo acoplado a peroxidasa. Las bandas se detectaron con el reactivo ECL (Amersham Pharmacia).

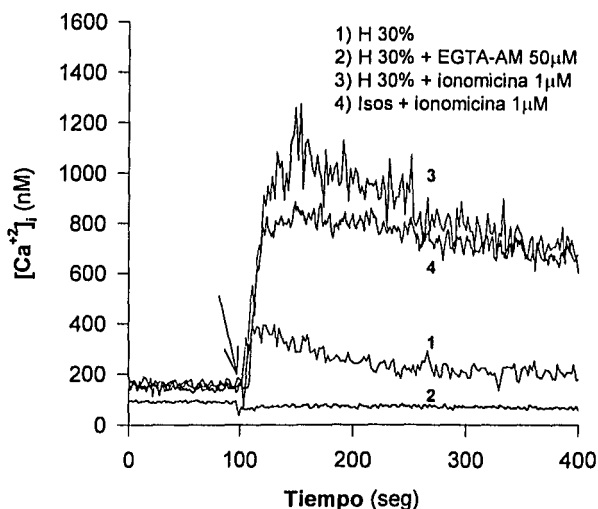


La actividad de PI3K se determinó indirectamente mediante la fosforilación de la proteína cinasa Akt. Se inmunoprecipitó incubando los lisados toda la noche a 4°C con un anticuerpo que reconoce la proteína Akt (dilución 1:500) y agarosa acoplada proteína A (1.2mg). Las perlas se lavaron tres veces con buffer de lisis y se desnaturalizaron a 100°C en presencia de buffer de muestra. El resultado de la inmunoprecipitación se separó por SDS-PAGE al 12%. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y las membranas se bloquearon durante 2 h con 5% leche descremada en Tris-HCl pH 7.5 y 150mM NaCl (TBS). Las membranas se incubaron toda la noche a 4° C con un anticuerpo fosfo-específico que reconoce la proteína Akt fosforilada en el residuo de serina 473. Las membranas se lavaron cuatro veces con TBS (durante 5 min c/u) y se incubaron 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (dilución de 1:2000). La membrana se lavó con TBS y se reveló con reactivo ECL. Los niveles totales de Akt se determinaron incubando las membranas con un anticuerpo específico contra Akt.

## RESULTADOS

### CAMBIOS EN LA $[Ca^{2+}]_i$ Y EN EL FLUJO DE TAURINA EN CONDICIONES HIPOSMÓTICAS.

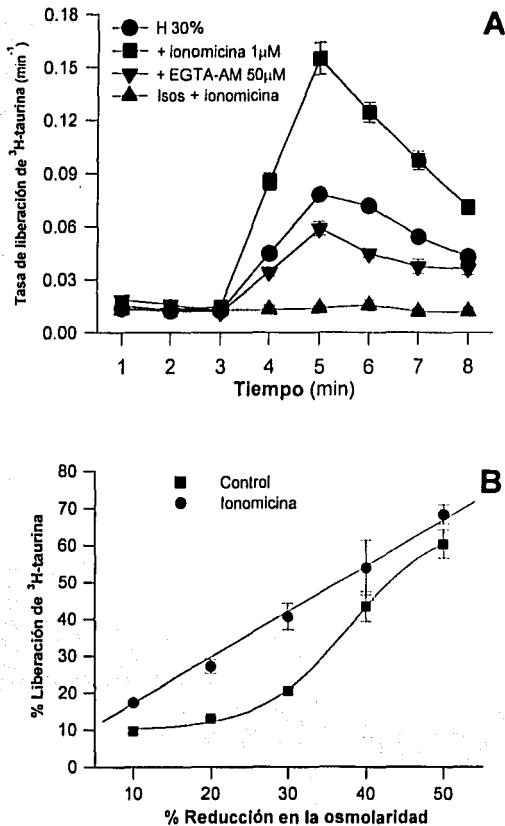
En astrocitos de cerebelo en cultivo la  $[Ca^{2+}]_i$  en condiciones basales varía entre 130-200nM. Una disminución en la osmolaridad del medio extracelular de 300 a 210 mOsm (30%), provoca un aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  que alcanza rápidamente un pico y posteriormente cae hasta alcanzar una meseta que se mantiene durante todo el experimento (5 minutos en total) (figura 3, trazo 1). El incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  puede llegar hasta 400nM en el punto máximo (figura 3).



**Figura 3.** Cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  inducidos por soluciones hiposmóticas y ionomicina. Los astrocitos se cargaron con FURA-AM como se describe en Metodología. El trazo basal corresponde a la  $[Ca^{2+}]_i$  en solución isosmótica. La flecha indica el momento en que se aplicaron los siguientes estímulos: 1. medio hiposmótico 30%, 2. medio hiposmótico 30% en células tratadas con 50 µM EGTA-AM, 3. medio hiposmótico 30% más 1µM ionomicina, 4. medio isosmótico más 1µM ionomicina. El EGTA-AM se preincubó 30 minutos y estuvo presente durante todo el experimento. La ionomicina estuvo presente únicamente durante la condición experimental. Los trazos son representativos de 3-6 experimentos.

El tratamiento de los cultivos durante 30 min con 50 $\mu$ M de etilenglicol-bis(beta-aminoetil)-N,N,N',N'-tetraacetoximetil ester (EGTA-AM), un quelante de Ca<sup>+2</sup><sub>i</sub>, disminuye la concentración basal del ión a valores alrededor de 90nM y elimina completamente el aumento en la [Ca<sup>+2</sup>]<sub>i</sub> en condiciones hiposmóticas (figura 3, trazo 2). La [Ca<sup>+2</sup>]<sub>i</sub> aumenta de manera muy importante al estimular a las células con un medio 30% hiposmótico más 1 $\mu$ M de ionomicina, un ionóforo de Ca<sup>+2</sup>; en estas condiciones el aumento en la [Ca<sup>+2</sup>]<sub>i</sub> es superior a 1 $\mu$ M en el punto máximo (figura 3, trazo 3). La ionomicina en condiciones isosmóticas también produce un aumento en la [Ca<sup>+2</sup>]<sub>i</sub> (figura 3, trazo 4), que aunque siempre por debajo de los niveles observados en soluciones hiposmóticas con ionomicina, puede alcanzar concentraciones de 800nM a 1 $\mu$ M.

El estímulo hiposmótico induce la activación de un flujo de taurina como mecanismo de regulación del volumen celular (figura 4). La tasa de liberación de taurina en condiciones isosmóticas es de  $1.28 \times 10^{-2} \pm 1.1 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  y aumenta a  $7.6 \times 10^{-2} \pm 2.2 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  después de dos minutos en un medio 30% hiposmótico, momento en el que se obtiene la liberación máxima (figura 4A). Cuando se incubaba a las células con 50 $\mu$ M EGTA-AM, una condición en la que no se observa elevación alguna en la [Ca<sup>+2</sup>]<sub>i</sub>, la liberación de taurina osmosensible (LTO) se inhibe 18.8% (figura 3). La ionomicina en un medio hiposmótico 30% aumenta la tasa de liberación de taurina a  $1.55 \times 10^{-1} \pm 8.9 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  a los dos minutos, siendo la liberación total 65% superior a la observada en condiciones hiposmóticas (figura 4). La figura 4A muestra que se requiere un estímulo hiposmótico para que la ionomicina induzca una potenciación de la liberación de taurina, ya que en condiciones isosmóticas no produce un cambio significativo en la tasa de liberación ( $1.56 \times 10^{-2} \pm 2.87 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  en el punto máximo), a pesar del aumento observado en la [Ca<sup>+2</sup>]<sub>i</sub>. En la figura 4B se muestra el efecto de la ionomicina en un intervalo de hiposmolaridad que va desde 10% hasta 50%, siendo suficiente una disminución pequeña en la osmolaridad (10%) para observar potenciación y siendo ésta mayor cuando la osmolaridad se reduce entre 10%-30%.



**Figura 4.** Efecto de la  $[Ca^{2+}]_i$  en la liberación de  $^3H$ -taurina osmosensible (LTO). Los astrocitos incubados con  $^3H$ -taurina se perfundieron con medio isosmótico por 3 minutos y durante 5 minutos más con las soluciones experimentales que se indican. **A.** (●) Control, solución hiposmótica 30%; (■) solución hiposmótica más  $1\mu M$  ionomicina; (▼) solución hiposmótica en células tratadas con  $50\mu M$  EGTA-AM; (▲) medio isosmótico con  $1\mu M$  ionomicina. El EGTA-AM se preincubó 30 minutos y estuvo presente durante todo el experimento. **B.** Potenciación de la liberación de  $^3H$ -taurina en soluciones hiposmóticas en presencia de  $1\mu M$  ionomicina. Los puntos representan el porcentaje de taurina liberada durante 5 min en soluciones de osmolaridad reducida como se indica. (●) Medio hiposmótico 30%; (■) medio hiposmótico 30% más ionomicina. Los resultados expresan el promedio  $\pm$  ES de al menos 6 experimentos.

Para determinar los mecanismos de potenciación del  $\text{Ca}^{+2}$  se examinó el efecto de inhibidores de proteínas propuestas como responsables de la activación de la liberación de taurina osmosensible o activadas por aumento en la  $[\text{Ca}^{+2}]_i$ .

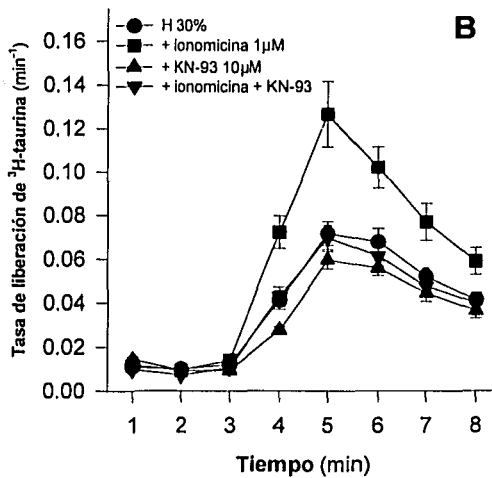
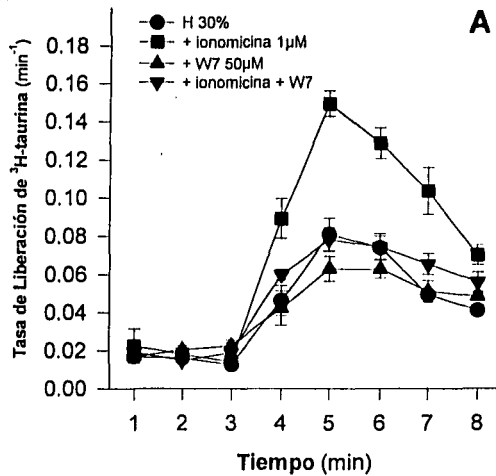
### **EFFECTO DE INHIBIDORES DE CaM Y CaMK.**

Una de las proteínas más importantes en la transducción de señales en respuesta a un aumento en la  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  es la calmodulina (CaM); por este motivo estudiamos el efecto de W7, un inhibidor de esta proteína, sobre la LTO y la potenciación por  $\text{Ca}^{+2}$ . La figura 5A muestra que la incubación de los cultivos con  $50\mu\text{M}$  W7 durante 10 minutos no tiene efecto sobre la liberación de taurina en condiciones hiposmóticas, pero abate la potenciación inducida por el  $\text{Ca}^{+2}$ .

Uno de los principales blancos de CaM es la cinasa dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$ /CaM (CaMK). Al incubar los astrocitos durante 10 minutos con  $10\mu\text{M}$  KN-93, un inhibidor de CaMK que compite con el sitio de unión del ATP, se observa el mismo efecto que en los experimentos con W7, es decir, la liberación de taurina en condiciones hiposmóticas no se ve afectada, pero desaparece la potenciación en presencia de ionomicina (figura 5B).

### **PARTICIPACIÓN DE LAS CINASAS DE TIROSINAS.**

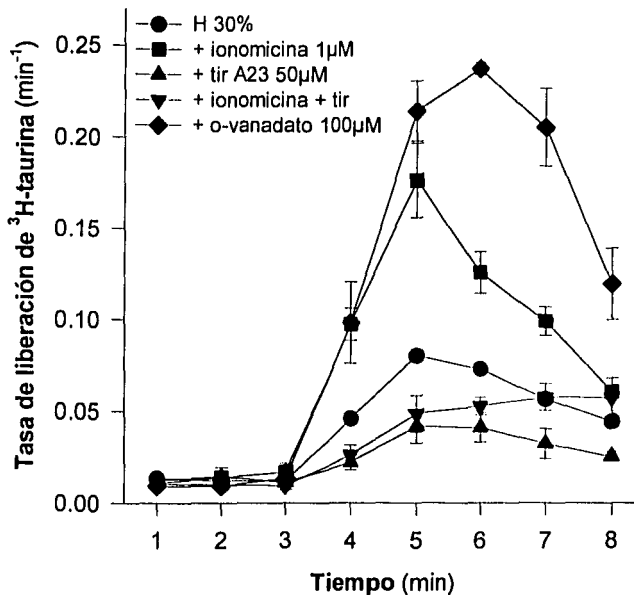
Si bien las señales involucradas en la activación de la LTO no se han identificado, hay evidencia que involucra eventos de fosforilación en tirosinas (Pasantes-Morales et al., 2000a). Para determinar si este mecanismo es responsable de la activación de la LTO y la potenciación por  $\text{Ca}^{+2}$  en astrocitos de cerebelo, las células fueron tratadas por 30 minutos con  $50\mu\text{M}$  tirfostina A23 ( $\alpha$ -ciano-(3,4-dihidroxi)cinamonitrilo), un inhibidor general de cinasas de tirosina. La figura 6 muestra el efecto de este fármaco, que inhibe 47.8% la LTO y 45.73% la potenciación con ionomicina. Cuando por el contrario, se trata a las células con un inhibidor de fosfatasa de tirosina, en este caso  $100\mu\text{M}$  de *orto*-vanadato durante 5 minutos, la LTO aumenta 92.02%. Estos resultados indican que se necesita al menos un evento de fosforilación en tirosinas para la activación de la vía.



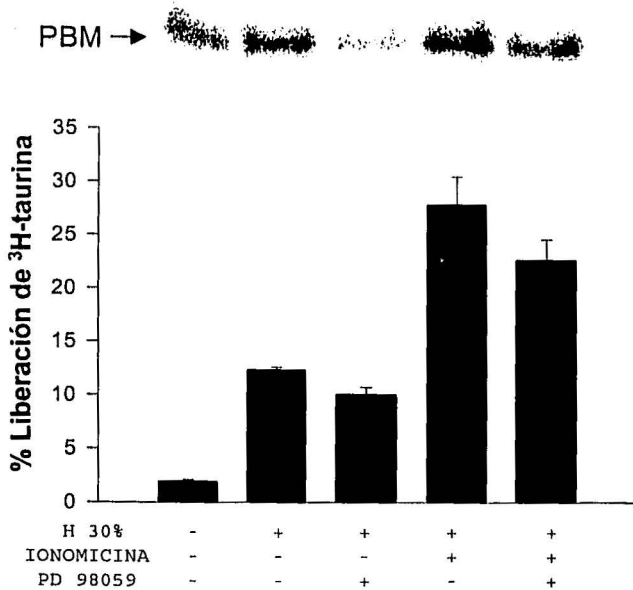
**Figura 5.** Efecto de inhibidores de CaM y CaMK sobre la LTO en presencia o ausencia de ionomicina. Los astrocitos cargados con  $^3\text{H}$ -taurina se preincubaron durante 10 min con  $50\mu\text{M}$  W7 (A) o  $10\mu\text{M}$  KN-93 (B) y posteriormente se perfundieron con soluciones hiposmóticas 30% de la siguiente manera: **A.** (●) Control, solución hiposmótica 30%; (▲) solución hiposmótica 30% más  $50\mu\text{M}$  W7; (■) solución hiposmótica 30% más  $1\mu\text{M}$  ionomicina; (▼) solución hiposmótica más  $1\mu\text{M}$  ionomicina y  $50\mu\text{M}$  W7. **B.** Igual que A pero en presencia de KN-93 en vez de W7. Los resultados expresan el promedio  $\pm$  ES de 4 experimentos.

A continuación se describen los experimentos que se realizaron para identificar las posibles cinasas de tirosinas involucradas en la activación de la LTO.

Erk1/Erk2 son MAPKs cuya cascada de activación involucra eventos de fosforilación en tirosinas, son responsables de la activación de la  $I_{CaSV}$  en astrocitos de corteza y pueden ser activadas también por  $Ca^{+2}$ , CaM y CaMKII (Agell et al, 2002). Se estudió la activación de estas proteínas en condiciones hiposmóticas inmunoprecipitándolas con un anticuerpo específico y determinando



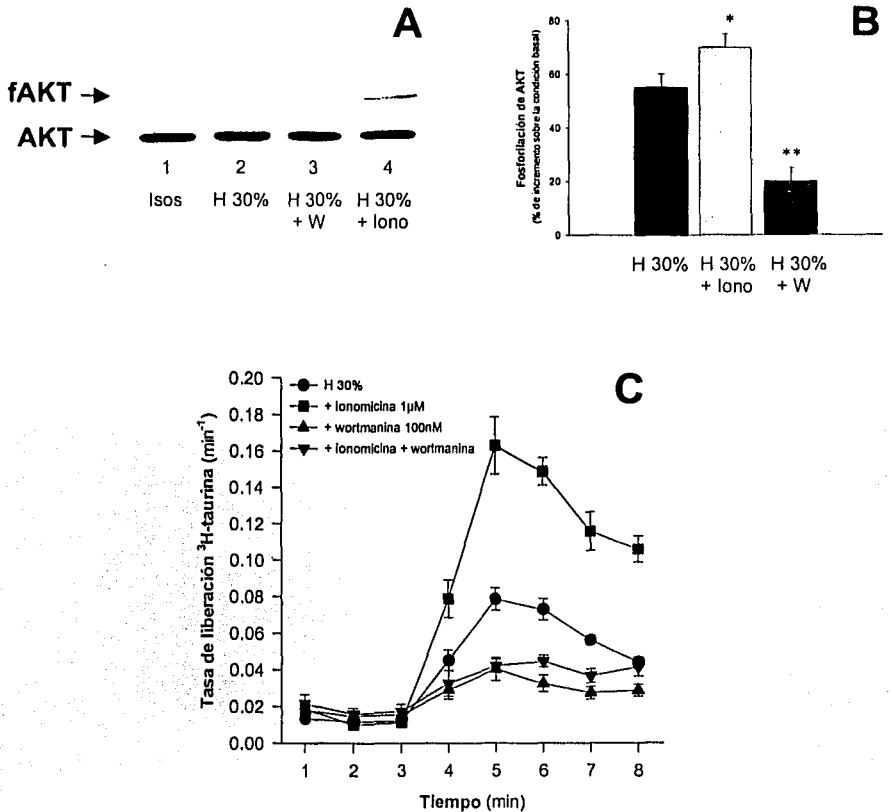
**Figura 6.** Efecto de la inhibición de cinasas y fosfatasa de tirosina en la LTO y la potenciación inducida por  $Ca^{+2}$ . El experimento se realizó de igual manera que en la figura 4A. (●) Control, solución hiposmótica 30%; (▲) solución hiposmótica 30% más 50µM tirfostina A23; (■) solución hiposmótica 30% más 1µM ionomicina; (▼) solución hiposmótica con 1µM ionomicina y 50µM tirfostina A23; (◆) solución hiposmótica 30% con 100 µM orto-vanadato. Las células se preincubaron durante 30 min y 5 min con tirfostina A23 y orto-vanadato, respectivamente. Los resultados expresan el promedio  $\pm$  ES de 5 experimentos.



**Figura 7.** Efecto de PD98059 en la actividad de Erk1/Erk2 y en la LTO en condiciones hiposmóticas en presencia o ausencia de ionomicina. La actividad de Erk1/Erk2 se determinó mediante la fosforilación de la proteína básica de mielina (PBM) con inmunoprecipitados obtenidos utilizando un anticuerpo anti-Erk1/Erk2. El experimento mostrado en la parte superior es representativo de tres independientes. Las barras representan la liberación de <sup>3</sup>H-taurina después de tres minutos en la condición experimental indicada y son el promedio  $\pm$  ES de 5 experimentos. El PD98059 se preincubó 2h.

la fosforilación de una proteína sustrato, en este caso PBM. La figura 7 muestra un incremento en la fosforilación de la PBM por Erk1/Erk2 en un medio hiposmótico 30%; esta respuesta es mayor en presencia de ionomicina. El efecto en ambos casos disminuye cuando las células son tratadas con 50 $\mu$ M de PD09859 (2'-amino-3'-metoxiflavona), un inhibidor de MEKK1, la cinasa que activa Erk1/Erk2. Sin embargo, estas proteínas no están involucradas en la activación del flujo de taurina, ya que el tratamiento con PD09859 y la consecuente inhibición de la fosforilación inducida por hiposmolaridad (figura 7), no tiene un efecto significativo sobre la LTO o su potenciación por Ca<sup>+2</sup> (figura 7).



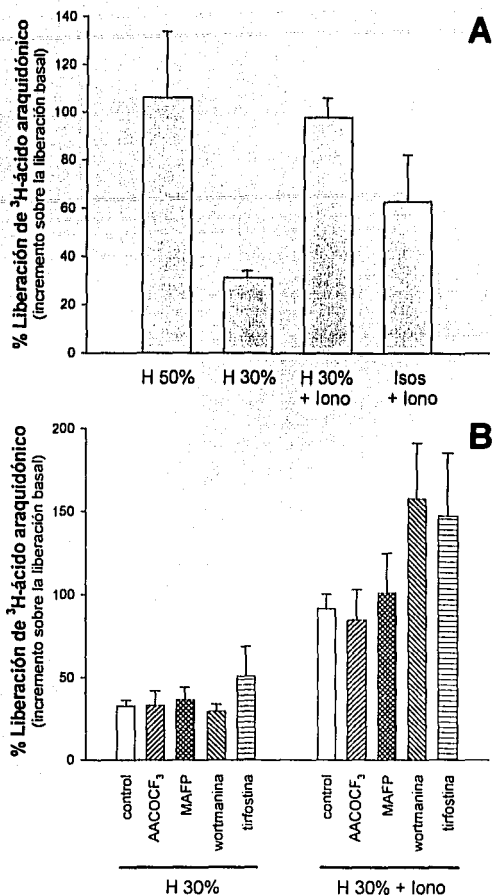


**Figura 8.** Actividad de PI3K en condiciones hiposmóticas en presencia y ausencia de ionomicina. La actividad de PI3K se determinó mediante la fosforilación de AKT como se describe en Metodología. **A.** Experimento representativo de fosforilación de AKT (panel superior) y AKT total (panel inferior) después de 3 min en las siguientes condiciones: 1: medio isosmótico; 2: solución 30% hiposmótica; 3: solución hiposmótica más 100nM wortmanina; 4: solución hiposmótica más 1 $\mu\text{M}$  ionomicina. **B.** Cuantificación de los resultados en A. Las barras muestran el incremento porcentual en la fosforilación de AKT en las condiciones indicadas comparadas contra la condición isosmótica y representan el promedio  $\pm$  ES de 5 experimentos individuales. \*Significativamente distinto de la condición 30% hiposmótica  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ . **C.** El experimento se realizó igual que en la figura 5. (●) Control, solución hiposmótica 30%; (▲) solución hiposmótica 30% más 100nM wortmanina; (■) solución hiposmótica 30% más 1 $\mu\text{M}$  ionomicina; (▼) solución hiposmótica más 1 $\mu\text{M}$  ionomicina y 100nM wortmanina. La wortmanina se preincubó una hora. Los resultados expresan el promedio  $\pm$  ES de 6 experimentos.

PI3K podría ser el blanco de las tirosinas cinasas involucradas en la activación de la LTO, ya que se ha observado que esta enzima se activa cuando se asocian dos dominios SH2 de la subunidad p85 con proteínas fosforiladas en residuos de tirosina (Duronio et al, 1998) y la wortmanina, un inhibidor de esta enzima que modifica de manera irreversible el dominio catalítico, disminuye la LTO en neuronas granulares de cerebelo (Morales-Mulia et al., 2001). La actividad de esta proteína en condiciones hiposmóticas se determinó de manera indirecta mediante la inmunoprecipitación de un sustrato fosforilado, en este caso fosfo-Akt. En las figuras 8A y 8B se observa que el estímulo hiposmótico produce la activación de PI3K y la wortmanina la impide. El tratamiento con ionomicina resulta en una activación mayor de PI3K (figura 8A, B). La figura 8C muestra que wortmanina inhibe también la LTO (45.7%) y la potenciación inducida por el aumento en la  $[Ca^{+2}]_i$  (63.8%), lo que sugiere que PI3K está involucrada en la activación de este flujo en ambas condiciones.

### **LIBERACIÓN DE $^3H$ -ÁCIDO ARAQUIDÓNICO EN MEDIOS HIPOSMÓTICOS.**

La activación de isoformas de PLA2 y el aumento en la liberación de  $^3H$ -ácido araquidónico (AA) en condiciones donde aumenta la  $[Ca^{+2}]_i$  (Thoroed et al., 1997), así como la asociación de esta fosfolipasa con la activación del flujo de taurina en algunos tipos celulares, nos alentó a estudiar los efectos suscitados en esta vía en respuesta al estímulo hiposmótico y a la potenciación por  $Ca^{+2}$ . Reducciones en la osmolaridad del 50% y 30% aumentan la liberación de AA  $106.2\% \pm 27.54\%$  y  $31.28\% \pm 2.72\%$  respectivamente (figura 9A). En presencia de ionomicina, la liberación de AA aumenta  $62.66\% \pm 19.42\%$  en condiciones isosmóticas y  $97.9\% \pm 8.18\%$  en una solución hiposmótica 30% (figura 9A). La incubación de los astrocitos durante 15 min con  $150\mu M$  araquidonitri fluorometil cetona (AACOCF3) o durante 30 min con  $20\mu M$  metil araquidonil fluorofosfonato (MAFP), inhibidores específicos de cPLA2, no disminuyeron la liberación de AA en soluciones 30% hiposmóticas con y sin ionomicina (figura 9B). El efecto de un inhibidor general de fosfolipasas, 8-bromofenacil bromide (BPB), no pudo ser determinado debido a que produjo grandes aumentos en la liberación basal de

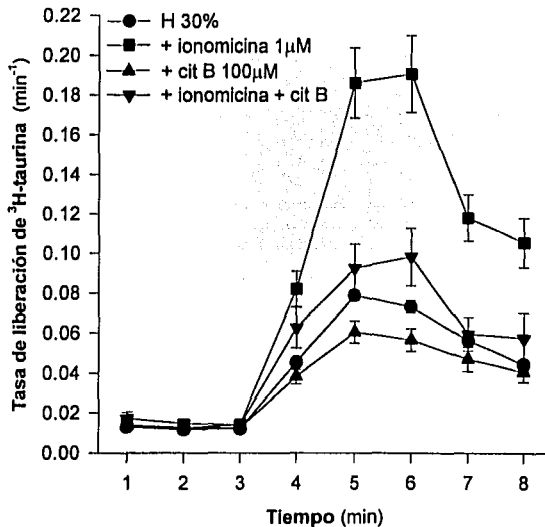


**Figura 9.** Liberación de <sup>3</sup>H-ácido araquidónico en condiciones hiposmóticas y con ionomícina. Los astrocitos se preincubaron 24 h con <sup>3</sup>H-ácido araquidónico como se describe en Metodología. Se colectó completamente el medio después 5 minutos en medio isosmótico para determinar la liberación basal y una vez más después de 5 min en las siguientes condiciones: **A.** medio hiposmótico 50% (H 50%); medio hiposmótico 30% (H 30%); medio hiposmótico 30% en presencia de 1 $\mu$ M ionomícina (H 30% + lono); medio isosmótico más 1 $\mu$ M ionomícina (Isos + lono). **B.** Liberación de <sup>3</sup>H-ácido araquidónico en condiciones hiposmóticas 30% en ausencia (H 30%) o condiciones hiposmóticas 30% más 1 $\mu$ M ionomícina (H 30% + lono) en condiciones control, en presencia de 150  $\mu$ M AACOCF<sub>3</sub>, 20 $\mu$  MAFP, 100nM wortmanina o 50  $\mu$ M tirfostina A23. AACOCF<sub>3</sub> se preincubó 15 min, wortmanina 1h, MAFP y tirfostina A23 30 min. Los resultados representan el promedio  $\pm$  ES de al menos 4 experimentos.

taurina probablemente por efectos tóxicos en los astrocitos. Los fármacos wortmanina y tirfostina A23, utilizados de igual manera que en los experimentos previos, no disminuyeron la liberación de AA en las condiciones probadas (figura 9B).

### DESPOLIMERIZACIÓN DEL CITOESQUELETO DE ACTINA.

Con el propósito de estudiar una posible participación del citoesqueleto en la LTO y su potenciación por  $\text{Ca}^{+2}$  se utilizó citocalasina B ( $100\mu\text{M}$ , 30 min preincubación), que despolimeriza completamente el citoesqueleto de actina en astrocitos de cerebelo (Morán et al., 1996). El tratamiento con citocalasina B no disminuye de manera considerable la LTO pero impide la potenciación por el  $\text{Ca}^{+2}$  (figura 10), de igual manera que el W7 y el KN93.



**Figura 11.** Efecto de la citocalasina B sobre la LTO y la potenciación por  $\text{Ca}^{+2}$ . El experimento se realizó de igual manera que en la figura 5. (●) Control, solución hiposmótica 30%; (▲) solución hiposmótica 30% más  $100\mu\text{M}$  citocalasina B; (■) solución hiposmótica 30% más  $1\mu\text{M}$  ionomicina; (▼) solución hiposmótica más  $1\mu\text{M}$  ionomicina y  $100\mu\text{M}$  citocalasina B. La citocalasina B se preincubó 30 min. Los resultados expresan el promedio  $\pm$  ES de 5 experimentos.

## DISCUSIÓN

### EL $\text{Ca}^{+2}$ POTENCIA LA LTO EN ASTROCITOS DE CEREBELO.

En astrocitos de cerebelo de rata, el estímulo hiposmótico induce la activación de un flujo de osmolitos y se acompaña de un aumento en la  $[\text{Ca}^{+2}]_i$ . Entre las pozas de osmolitos orgánicos que participan en el DRV, la de taurina es la que disminuye en mayor cantidad (Pasantes-Morales et al, 2000b) y su utilización representa una ventaja debido a la inercia metabólica del compuesto.

En astrocitos de cerebelo de rata la LTO es básicamente independiente de  $\text{Ca}^{+2}$ , ya que al impedir el aumento en la concentración del ión inducido por la hiposmolaridad, el flujo de taurina disminuye mínimamente. Este resultado coincide con lo reportado en la mayoría de los tipos celulares (Tabla II), con excepción de los eritrocitos de molusco (Pierce y Rowland-Faux, 1992), el neuroblastoma CHP-100 (Basavappa et al., 1996) y la línea celular 9HTEo- (Galietta et al., 1997), donde la LTO es dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular. En rebanadas de corteza de rata, el TMB-8 (ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico 8-(dietilamin)octil ester), un compuesto que impide la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  de las pozas intracelulares, inhibe 30% la liberación de taurina (Law, 1994). Sin embargo, en estos trabajos las concentraciones de fármacos utilizadas para remover el  $\text{Ca}^{+2}$  son en general superiores a las necesarias. En estas condiciones, probablemente el  $\text{Ca}^{+2}$  disminuye más allá de la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  permisivo necesario para la activación del flujo de taurina.

Independientemente del efecto marginal del  $\text{Ca}^{+2}$  en la activación de la LTO, el incremento en las concentraciones intracelulares de este ión durante un estímulo hiposmótico, potencia la LTO en el intervalo de osmolaridad estudiado. El efecto modulador del  $\text{Ca}^{+2}$  en el DRV fue reportado por primera vez por Pierce y Rowland-Faux (1992), quienes demostraron en eritrocitos de *Noetia ponderosa* que la ionomicina aceleraba la regulación del volumen y aumentaba la LTO. En rebanadas de corteza de rata un ionóforo de  $\text{Ca}^{+2}$  incrementa la LTO 22% (Law, 1994); en células 9HTEo- la ionomicina y el ATP también potencian el flujo de taurina (Galietta et al., 1997). Sin embargo, debido a que en estos tipos celulares

la LTO depende de  $Ca^{+2}$ , el efecto observado se interpretó como evidencia que reforzaba esta relación. Incluso, en células 9HTEo- el aumento de la  $[Ca^{+2}]_i$  aumenta el flujo de taurina en condiciones isosmóticas. En nuestras células, no se observó incremento alguno en los experimentos realizados con ionomicina en condiciones isosmóticas, a pesar de que el aumento en la  $[Ca^{+2}]_i$  es mucho mayor que en condiciones 30% hiposmóticas. Esto demuestra que el  $Ca^{+2}$  actúa incrementando la eficiencia de la vía una vez activada ésta y no de manera directa activando el flujo de taurina. Esto es respaldado por el mayor efecto estimulador de la ionomicina observado en condiciones hiposmóticas leves, a diferencia del efecto en medios 50% hiposmóticos donde la potenciación es casi inapreciable.

Los efectos moduladores del  $Ca^{+2}$  no se limitan al flujo de taurina; en criptas de colon de ratón aisladas, el ionóforo de  $Ca^{+2}$  A23187, la bradicinina y la taspigargina, disminuyen el hinchamiento celular y aceleran el DRV (Mignen et al., 1999). En la línea CIH- 407, el flujo de  $^{125}I$  aumenta en condiciones hiposmóticas cuando se estimula también con hormonas que movilizan  $Ca^{+2}$ , A23187 o taspigargina (Tilly et al., 1994). En astrocitos de corteza (Bender y Norenberg, 1994) y de cerebelo de rata (Quesada et al., 1999), la ionomicina aumenta el flujo de  $^{86}Rb$  (como marcador de  $K^+$ ) en condiciones hiposmóticas. En estas células, el efecto del  $Ca^{+2}$  tampoco se observa en condiciones isosmóticas.

## **LA ACTIVACIÓN DE LA LTO REQUIERE LA ACCIÓN DE CINASAS DE TIROSINA Y PI3K.**

Las señales involucradas en la activación de la LTO no se conocen y la evidencia obtenida hasta el momento apunta hacia mecanismos diferentes según el tipo celular. No existe información previa acerca de las señales responsables de este mecanismo en astrocitos de cerebelo. El presente trabajo aporta evidencia que involucra al menos un evento de fosforilación en tirosina y la participación de PI3K, como se demuestra con la inhibición de la LTO con tirfostina A23 y wortmanina, la potenciación de este flujo con orto-vanadato y el aumento en la actividad de PI3K en respuesta al estímulo hiposmótico.

La importancia de los eventos de fosforilación en tirosinas en la LTO, utilizando inhibidores de cinasas o fosfatasa de tirosinas, se ha demostrado también en corazón de rata (Song et al., 1998), eritrocitos de trucha (Kiessling et al., 1998), astrocitos de corteza (Mongin et al., 1999), eritrocitos de raya (Hubert et al., 2000), núcleo supraóptico de rata (Deleuze et al., 2000), neuronas granulares de cerebelo (Morales-Mulia et al., 2001), rebanadas de hipocampo (Franco et al., 2001), células de cáncer cervical humano (Shen et al., 2001) y fibroblastos de ratón NIH3T3 (Pedersen et al., 2002). El efecto de estos fármacos en diferentes preparaciones señala a las cinasas de tirosinas como proteínas clave en la cascada de señales que conecta el cambio en volumen con la activación de la vía de transporte de taurina. Sin embargo, no se han identificado las cinasas específicas y los sitios de acción de éstas, y las diferencias entre el efecto de los mismos fármacos en los tipos celulares estudiados apunta hacia la participación de proteínas distintas. El trabajo realizado por Hubert y col. (2000) en eritrocitos de raya es la excepción, ya que aquí las proteínas p72syk y p56lyn parecen ser las responsables de la activación del flujo de taurina al fosforilar el intercambiador aniónico, efector del flujo en estas células. En otro trabajo realizado por el mismo grupo de investigación (Wittels et al., 2000), se utilizaron varios paradigmas para provocar hinchamiento con valores diferentes en la fuerza iónica intracelular, dado que este parámetro parece regular el flujo de taurina (Motais et al., 1991; Cannon et al., 1998; Cardin et al., 1999); los experimentos realizados demostraron que existe una correlación entre la activación de estas proteínas, el flujo de taurina y la disminución en la fuerza iónica. El canal de Cl<sup>-</sup> sensible a hinchamiento también se activa cuando disminuye la fuerza iónica intracelular y el efecto depende de la actividad de las cinasas de tirosina (Nilius et al., 1998). Por lo tanto, existe la posibilidad de que las cinasas de tirosina que participan en el DRV, lo hagan debido a que su actividad es sensible a variaciones en la fuerza iónica.

La inhibición del flujo de taurina con wortmanina se ha observado previamente en neuronas granulares de cerebelo (Morales-Mulia et al., 2001) y rebanadas de hipocampo de rata (Franco et al., 2001); en esta última preparación se observó también la activación de PI3K en respuesta al estímulo hiposmótico y

su inhibición con wortmanina. Esta enzima se ha involucrado con la activación de la corriente de  $Cl^-$  en la línea celular CIH-407 (Tilly et al., 1996) y en el hepatoma HTC (Feranchak et al., 1992). La conexión de esta proteína con las otras señales involucradas en el DRV no es clara. La activación de cinasas de tirosinas en respuesta al estímulo hiposmótico podría resultar en la activación de PI3K, blanco de estas cinasas (Duronio et al., 1998). Los eventos posteriores a la activación de PI3K podrían involucrar a la familia de GTPasas-Rho, proteínas con las que interactúa en varias vías de señalamiento. La GTPasa-Rho participa en la activación de la  $I_{Cl}^{-}$ SV en células CPAE (Nilius et al., 1999) y CIH-407 (Tilly et al., 1998), además, su expresión acelera el DRV y aumenta el flujo de osmolitos en células NIH3T3 (Pedersen et al., 2002).

#### **LA POTENCIACIÓN POR $Ca^{+2}$ ES A TRAVÉS DE CaM/CaMK .**

La potenciación de la LTO observada al aumentar la  $[Ca^{+2}]_i$  se abatió al utilizar los inhibidores de CaM y CaMK, W7 y KN93, lo que señala la participación de estas proteínas en el mecanismo descrito. Estos bloqueadores no tuvieron efecto en la LTO, lo cual es de esperarse si se toma en cuenta que en astrocitos de cerebelo este proceso es básicamente independiente de  $Ca^{+2}$ . Los inhibidores de CaM y CaMK tampoco tienen efecto sobre la LTO (Tabla II) en linfocitos (García et al., 1991), astrocitos (Pasantes-Morales et al., 1990) y neuronas granulares de cerebelo de rata (Morales-Mulia et al., 2001), con excepción de W7 que de manera sorpresiva potencia este flujo en neuronas de cerebelo. En rebanadas de corteza de rata la liberación de taurina se inhibe 20% con trifluoperazina (TFP), un bloqueador de CaM (Law, 1994). En células de eritroleucemia humana inhibidores de CaM y CaMK reducen notablemente la LTO (Huang et al., 2001). En células HeLa (Kirk y Kirk, 1994), la inhibición de CaM por ciertas drogas y la disminución en el flujo de taurina sigue una relación lineal. Sin embargo, estos resultados deben interpretarse con cuidado ya que algunos de los fármacos utilizados tienen efecto en células donde el flujo de osmolitos y el DRV no dependen de  $Ca^{+2}$  e incluso en células donde el estímulo hiposmótico no provoca un aumento en la  $[Ca^{+2}]_i$ , como es el caso de las células de Ehrlich



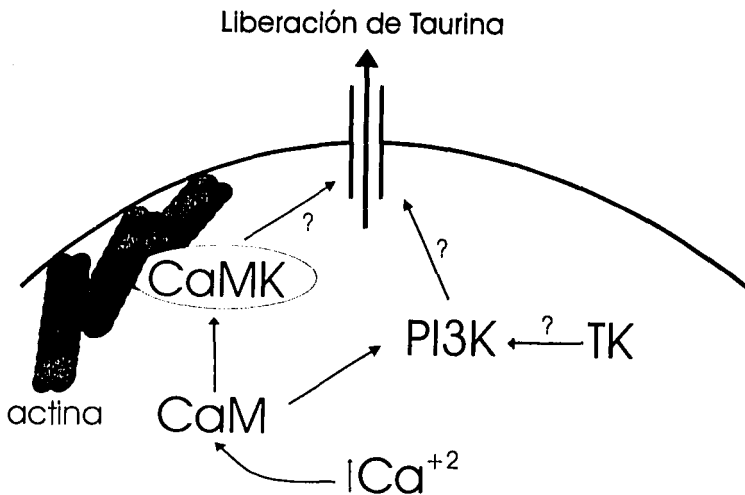
(Thomas-Young, 1993). Un buen ejemplo es la línea celular de eritroleucemia humana K562, donde el aumento en la  $[Ca^{+2}]_i$  es abolido al remover el  $Ca^{+2}$  extracelular y en esta condición la LTO disminuye únicamente en un 36%, sin embargo, la LTO es dependiente de  $Ca^{+2}/CaM$  y CaMKII (Huang et al., 2001). Si bien estos efectos pueden ser debido a que de igual manera se alcanza la concentración de  $Ca^{+2}$  necesaria para activar a  $Ca^{+2}/CaM$ , en células CPAE, la trifluoperazina bloquea la  $I_{CaSV}$  a una  $[Ca^{+2}]_i$  de 50nmol/l, que está por debajo del umbral de activación de  $Ca^{+2}/CaM$ , lo que indica que no es un efecto suscitado por la inhibición de esta proteína (Szucs et al., 1996a).

La potenciación de la LTO inducida por el aumento en la  $[Ca^{+2}]_i$  se inhibe con wortmanina y tirfostina A23, siendo el flujo resultante mucho menor al obtenido en las condiciones hiposmóticas control. Estos resultados indican que el efecto del  $Ca^{+2}$  puede ser aumentando la actividad de las señales responsables de la activación del flujo de taurina en condiciones hiposmóticas. Esta posibilidad es apoyada por la mayor activación de PI3K observada en presencia de ionomicina y por evidencia que demuestra que el  $Ca^{+2}$  produce la asociación de CaM con la subunidad p85 de PI3K incrementando la actividad de esta proteína (Joyal et al., 1997). No obstante, los resultados obtenidos con los inhibidores de CaM y CaMK demuestran que el  $Ca^{+2}$  recluta señales diferentes a las activadas por el estímulo hiposmótico, ya que ni el W7 ni el KN93 tienen efecto sobre la liberación de taurina en condiciones hiposmóticas pero impiden la potenciación observada con ionomicina (figura 12).

En este trabajo examinamos como posibles blancos de CaM y CaMK a Erk1/Erk2, PLA2 y el citoesqueleto, elementos que también se asocian con el DRV en algunos tipos celulares.

Erk1 y Erk2 se activan en respuesta al estímulo hiposmótico y aun más al aumentar la  $[Ca^{+2}]_i$ , sin embargo, no participan en la activación del flujo de taurina ya que el PD09859, inhibidor de la enzima MEK1 que fosforila Erk1/Erk2, impide la activación de estas proteínas pero no afecta el flujo de taurina en ninguna de las dos condiciones. En neuronas granulares de cerebelo (Morales-Mulia et al., 2001) y en rebanadas de hipocampo de rata (Franco et al., 2001) se observó también la

activación de estas proteínas en condiciones hiposmóticas sin que participen en la activación del flujo de taurina, al igual que sucede con la corriente de  $\text{Cl}^-$  en fibroblastos de ratón NIH3T3 (Van der Wijk et al, 1999). En el único tipo celular donde la LTO depende de estas proteínas es en células de cáncer cervical humano (Shen et al., 2001). El aumento en la  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  y en la actividad de PI3K pueden ser responsables de la activación de estas enzimas, ya que en astrocitos de corteza de rata la ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular y la wortmanina bloquean la activación de Erk1 y Erk2 en respuesta al estímulo hiposmótico (Schliess et al., 1996). Es obvio que hace falta investigación en este aspecto, pero es probable que estas proteínas estén involucradas con la activación de factores de transcripción responsables de la respuesta adaptativa posterior al cambio en el volumen o sean activadas únicamente en respuesta al estrés causado por las condiciones anisomóticas, ya que se ha visto su activación incluso en condiciones hiperosmóticas (Pedersen et al., 2001).



**Figura 12.** Posible mecanismo de acción del  $\text{Ca}^{+2}$  en la potenciación de la LTO.

La PLA2c se ha propuesto como responsable de la activación de la LTO en células de Ehrlich (Thoroed et al., 1997) y en el neuroblastoma CHP-100 (Basavappa et al., 1998) donde existe una relación entre el hinchamiento, la activación de estas proteínas, la liberación de AA y la activación del flujo de taurina. En el presente estudio se demuestra que en astrocitos de cerebelo la hiposmolaridad activa la liberación de AA de manera proporcional a la osmolaridad del medio. La ionomicina aumenta también la movilización de AA, ya sea en condiciones isosmóticas o aun más al combinarse con el estímulo hiposmótico. Sin embargo, los bloqueadores específicos de cPLA2, AACOCF3 y MAFF, no disminuyeron la liberación de AA en condiciones hiposmóticas o en presencia de ionomicina, lo que excluye la participación de este tipo específico de fosfolipasa en la regulación del volumen en astrocitos de cerebelo. No se descarta que otras fosfolipasas estén involucradas en este mecanismo ya que no se pudo determinar el efecto de inhibidores generales de estas proteínas, debido a su toxicidad, en la liberación de AA ni en la LTO. Puesto que ni la wortmanina ni la tirfostina A23 tuvieron efecto sobre la liberación de AA, si alguna fosfolipasa estuviera participando en la activación de la LTO, lo haría antes que PI3K y las cinasas de tirosina en la cascada de señales o por un mecanismo independiente de éstas.

En astrocitos de cerebelo, el tratamiento con citocalasina B despolimeriza completamente el citoesqueleto de actina; sin embargo no tiene efecto sobre la liberación de taurina observada con un estímulo hiposmótico 50% (Morán et al., 1996). Como se demostró en este trabajo, cuando el choque hiposmótico es menor, tampoco es necesario que el citoesqueleto esté intacto; sin embargo, es indispensable para que se pueda observar la potenciación inducida por el  $Ca^{+2}$ . Este efecto podría resultar de la interacción entre CaMK y el citoesqueleto. Se sabe que CaMKII no se encuentra libre en el citosol, sino que está asociada casi por completo al citoesqueleto y a organelos (Means, 2000). CaMKII- $\beta$  se une directamente a la actina en las espinas dendríticas de las neuronas (Shen et al., 1998), por lo tanto, la despolimerización del citoesqueleto de actina con el tratamiento con citocalasina B, podría afectar la actividad de CaMKII alejando a la proteína de su sitio de acción en la membrana (figura 12). Otra posibilidad es que

la acción de CaMKII sea a través de la fosforilación de proteínas del citoesqueleto, como sucede con la vimentina y la GFAP en astrocitos, lo que resulta en el desensamble de los filamentos (Inagaki et al., 1997). Si bien la interacción entre la actina y los filamentos intermedios no es clara, debe señalarse que en astrocitos de ratones deficientes en estas proteínas (GFAP<sup>-/-</sup>, vim<sup>-/-</sup>) la LTO disminuye con respecto a la observada en células control (Ding et al, 1998). Considerando que una de las funciones más estudiadas del citoesqueleto es la regulación de canales y transportadores membranales (Janmey, 1998), es probable que en ciertas condiciones, como al aumentar la  $[Ca^{+2}]_i$ , el citoesqueleto pueda modular la LTO.

### **EFFECTOS DEL AUMENTO EN LA $[Ca^{+2}]_i$ EN CONDICIONES HIPOSMÓTICAS EN ASTROCITOS.**

Los compuestos que provocan aumentos en la  $[Ca^{+2}]_i$  en astrocitos, entre ellos norepinefrina, ATP, GABA, acetilcolina, glutamato, mediadores de la respuesta inmune y factores de crecimiento (Verkhatsky y Kettenmann, 1996), se encuentran en el sistema nervioso en condiciones fisiológicas y patológicas. Al aumentar los niveles de calcio en un astrocito, este aumento se esparce entre las células vecinas provocando "ondas de calcio" que propagan a una velocidad de  $20\mu\text{m s}^{-1}$  y producen liberación de glutamato (Haydon, 2001); en consecuencia el aumento en la  $[Ca^{+2}]_i$  puede provenir también de astrocitos adyacentes o resultar de la estimulación autócrina de receptores.

En patologías que provocan hinchamiento e incremento en la  $[Ca^{+2}]_i$  en los astrocitos, en particular las que se asocian a excitotoxicidad e hiperexcitabilidad, la acción de estas señales resultaría en una mayor liberación de taurina. Un aumento en la eficiencia del mecanismo de liberación de taurina osmosensible podría resultar de gran beneficio en el sistema nervioso contrarrestando el hinchamiento celular de manera más rápida, disminuyendo la utilización de otros osmolitos que pueden tener efectos tóxicos en el SNC y de manera notoria protegiendo las membranas del daño causado por la generación de radicales libres, la lipoperoxidación y la sobrecarga iónica; todos estos, efectos neuroprotectores de la taurina que están ampliamente estudiados (Huxtable, 1992).

## CONCLUSIONES

- Al ser expuestos a una solución hiposmótica, los astrocitos de cerebelo activan un mecanismo de regulación del volumen que incluye la liberación de taurina. Este mecanismo es básicamente independiente de  $\text{Ca}^{+2}$ , pero un incremento en la  $[\text{Ca}^{+2}]_i$ , por encima de los niveles alcanzados únicamente con el choque hiposmótico, potencia el flujo.
- El  $\text{Ca}^{+2}$  actúa aumentando la eficiencia de la vía de liberación de taurina pero no como molécula iniciadora, ya que en condiciones isosmóticas un incremento en la concentración del ión no potencia el flujo de taurina.
- En este trabajo se exploran por primera vez las posibles señales involucradas en la activación de la LTO en astrocitos de cerebelo de rata. Los resultados obtenidos demuestran que se necesitan eventos de fosforilación en tirosinas y la participación de PI3K para la activación de la vía.
- La potenciación de la LTO inducida por el  $\text{Ca}^{+2}_i$  es mediada tanto por el reclutamiento de nuevas señales, como es el caso de CaM y CaMK, así como por el aumento en la actividad de proteínas necesarias para la activación de la vía, como PI3K.
- A diferencia de la activación de la LTO, para poder observar la potenciación inducida por el  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  se necesita la integridad del citoesqueleto de actina.
- Las proteínas Erk1/Erk2 se activan en respuesta a un choque hiposmótico y en mayor grado al aumentar la  $[\text{Ca}^{+2}]_i$ , pero no participan en la activación de la vía de movilización de taurina. Esta observación puede ser un epifenómeno asociado a la condición hiposmótica o puede tener que ver con la expresión de genes necesarios para una respuesta adaptativa posterior.

- El estímulo hiposmótico y el incremento en la  $[Ca^{+2}]$ , aumentan la liberación de ácido araquidónico en astrocitos. La participación de las fosfolipasas en la activación del flujo de taurina, en ambas condiciones, no pudo ser comprobada; sin embargo se excluyó la participación de la isoforma citosólica de 85-kDa de la PLA2.
- El estudio de los mecanismos que aumentan la eficiencia de la vía de transporte de taurina osmosensible es una aproximación diferente para entender los mecanismos de regulación del volumen en condiciones hiposmóticas; y plantea como herramienta para el tratamiento de condiciones patológicas asociadas a edema y excitotoxicidad la regulación de la LTO.

## BIBLIOGRAFÍA

- Agell N, Bachs O, Rocamora N, Villalonga P. Modulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by  $Ca^{2+}$  and calmodulin. *Cell Signal*. 2002; 14:649-654.
- Alessi DR, Cohen P, Ashworth A, Cowley S, Leever SJ, Marshall CJ. Assay and expression of mitogen-activated protein kinase, MAP kinase kinase, and Raf. *Methods Enzymol*. 1995; 255: 279-285.
- Al-Habori M. Macromolecular crowding and its role as intracellular signalling of cell volume regulation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2001; 33: 844-864.
- Álvarez-Leefmans FJ, Reuss L. Operación orquestada de los sistemas de transporte a través de la membrana plasmática: regulación y mantenimiento del volumen celular. En: *Biofísica y fisiología celular*. Editores: Latorre R, López-Barneo J, Bezanilla F, Llinás R. Universidad de Sevilla. Secretariado de Publicaciones. España, 1996: 177-212.
- Basavappa S, Huang CC, Mangel AW, Lebedev DV, Knauf PA, Ellory JC. Swelling-activated amino acid efflux in the human neuroblastoma cell line CHP-100. *J Neurophysiol*. 1996; 76:764-769.
- Basavappa S, Pedersen SF, Jorgensen NK, Ellory JC, Hoffmann EK. Swelling-induced arachidonic acid release via the 85-kDa cPLA2 in human neuroblastoma cells. *J Neurophysiol*. 1998; 79:1441-1449.
- Bender AS, Norenberg MD. Calcium dependence of hypoosmotically induced potassium release in cultured astrocytes. *J Neurosci*. 1994; 14:4237-4243.
- Berl T. Treating hyponatremia: damned if we do and damned if we don't. *Kidney Int*. 1990; 37:1006-1018.
- Boese SH, Wehner F, Kinne RK. Taurine permeation through swelling-activated anion conductance in rat IMCD cells in primary culture. *Am J Physiol*. 1999; 271:F498-F507.
- Cannon CL, Basavappa S, Strange K. Intracellular ionic strength regulates the volume sensitivity of a swelling-activated anion channel. *Am J Physiol*. 1998; 275:C416-C422.
- Cardin V, Peña-Segura C, Pasantes-Morales H. Activation and inactivation of taurine efflux in hyposmotic and isosmotic swelling in cortical astrocytes: role of ionic strength and cell volume decrease. *J Neurosci Res*. 1999; 56:659-667.
- Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. 2001; 410: 37-40.
- Colclasure GC, Parker JC. Cytosolic protein concentration is the primary volume signal for swelling-induced  $[K-Cl]$  cotransport in dog red cells. *J Gen Physiol* 1992; 100:1-10.
- Crépel V, Panenka W, Kelly M, MacVicar B. Mitogen-activated protein and tyrosine kinases in the activation of astrocyte volume-activated chloride current. *J Neurosci*. 1998; 18:1196-1206.
- Deleuze C, Duvoid A, Hussy N. Properties and glial origin of osmotic-dependent release of taurine from the rat supraoptic nucleus. *J Physiol*. 1998; 507:463-471.
- Deleuze C, Duvoid A, Moos FC, Hussy N. Tyrosine phosphorylation modulates the osmosensitivity of volume-dependent taurine efflux from glial cells in the rat supraoptic nucleus. *J Physiol*. 2000; 523: 291-299.

Deutsch C, Chen LQ. Heterologous expression of specific K<sup>+</sup> channels in T lymphocytes: functional consequences for volume regulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90:10036-10040.

Ding M, Eliasson C, Betsholtz C, Hamberger A, Pekny M. Altered taurine release following hypotonic stress in astrocytes from mice deficient for GFAP and vimentin. *Brain Res Mol Brain Res* 1998;62:77-81

Dunkelberg JC, Feranchak AP, Fitz JG. Liver cell volume regulation: size matters. *Hepatology*. 2001; 33:1349-1352.

Duronio V, Scheid MP, Ettinger S. Downstream signaling events regulated by phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Cell Signal*. 1998; 10: 223-239.

Feranchak AP, Roman RM, Schwieber EM, Fitz JG. Phosphatidylinositol 3-kinase contributes to cell volume regulation through effects on ATP release. *J Biol Chem*. 1998; 273:14906-14911.

Fischer R, Schliess F, Häussinger D. Characterization of the hypo-osmolarity-induced Ca<sup>2+</sup> response in cultured rat astrocytes. *Glia*. 1997; 20:51-58.

Foos TM, JY Wu. The role of taurine in the central nervous system and the modulation of intracellular calcium homeostasis. *Neurochem Res*. 2002; 27:21-26.

Franco R, Quesada O, Pasantes-Morales H. Efflux of osmolyte amino acids during isovolumic regulation in hippocampal slices. *J Neurosci Res*. 2000; 61:701-711.

Franco R, Torres-Márquez ME, Pasantes-Morales H. Evidence of two mechanisms of amino acid osmolyte release from hippocampal slices. *Pflugers Arch*. 2001; 442:791-800.

Fürst J, Jakab M, Köning M, Ritter M, Gschwentner M, Rudzki J, Danzl J, Mayer M, Burtscher CM, Schirmer J, Maier B, Nairz M, Chwatal S, Paulmichl M. Structure and function of the ion channel Icln. *Cell Physiol Biochem*. 2000; 10:329-334.

Galletta LJV, Falzoni S, Di Virgilio F, Romeo G, Zegarra-Moran O. Characterization of volume-sensitive taurine- and Cl<sup>-</sup>-permeable channels. *Am J Physiol*. 1997; 273:C57-C66.

García JJ, Sánchez-Olea R, Pasantes-Morales H. Hyposmolarity-sensitive release of taurine and free amino acids from human lymphocytes. *J Cell Biochem*. 1991; 45:207-212.

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. 1985; 260(6):3440-3450.

Hansson E, Muyderman H, Leonova J, Allansson L, Sinclair J, Blomstrand F, Thorlin T, Nilsson M, Rönnbäck L. Astroglia and glutamate in physiology and pathology: aspects on glutamate transport, glutamate-induced cell swelling and gap-junction communication. *Neurochem Int*. 2000; 17: 317-329.

Haydon P. Glia: listening and talking to the synapse. *Nature Rev Neurosci*. 2001 ; 2 :185-193.

Hook SS, Means AR. Ca<sup>2+</sup>/CaM-dependent kinases: from activation to function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001; 41:471-505.

Huang CC, Chang CB, Liu JY, Basavappa S, Lim PH. Effects of calcium, calmodulin, protein kinase C and protein tyrosine kinases on volume-activated taurine efflux in human erythroleukemia cells. *J Cell Physiol*. 2001; 189: 316-322.



Hubert EM, Musch MW, Goldstein L. Inhibition of volume-stimulated taurine efflux and tyrosine kinase activity in the skate red blood cell. *Pflügers Arch.* 2000; 440:132-139.

Hussy N, Deleuze C, Desarménien MG, Moos FC. Osmotic regulation of neuronal activity: a new role of taurine and glial cells in a hypothalamic neuroendocrine structure. *Prog Neurobiol.* 2000; 62:113-134.

Huxtable RJ. Physiological actions of taurine. *Physiol Rev.* 1992; 72:101-163.

Idriss HT, Hannun YA, Boulpaep E and Basavappa S. Regulation of volume-activated chloride channels by P-glycoprotein: phosphorylation has the final say! *J Physiol.* 2000; 524:629-636.

Inagaki N, Goto H, Ogawara M, Nishi Y, Ando S, Inagaki M. Spatial patterns of  $Ca^{2+}$  signals define intracellular distribution of a signaling by  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem.* 1997; 272:25195-25199.

Janmey P. The cytoskeleton and cell signalling: component localization and mechanical coupling. *Physiol Rev.* 1998; 78:763-781.

Jefferys JGR, Hass HL. Synchronized bursting of CA1 hippocampal pyramidal cells in the absence of synaptic transmission. *Nature.* 1982; 200:448-450.

Joyal JL, Burks DJ, Pons S, Matter WF, Vlahos CJ, Whites MF, Sacks DB. Calmodulin activates phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem.* 1997; 272:28183-28186.

Junankar PR, Kirk K. Organic osmolyte channels: a comparative view. *Cell Physiol Biochem.* 2000; 10:355-360.

Khanna R, Chang MC, Joiner WJ, Kaczmarek LK, Schlichter LC. hSK4/hIK1, a calmodulin-binding  $K_{Ca}$  channel in human T lymphocytes. Roles in proliferation and volume regulation. *J Biol Chem.* 1999; 274:14838-14849.

Kiessling K, Ellory JC, Cossins AR. The relationship between hypotonically-induced amino acid release in the rat. *J Pharm Pharmacol.* 1998; 50:1280-1286.

Kinne RK, Boese SH, KinneSaffran E, Ruhfus B, Tinel H, Wehner F. Osmoregulation in the renal papilla: membranes, messengers and molecules. *Kidney Int.* 1996; 49:1686-1689.

Kirk J, Kirk K. Inhibition of volume-activated I- and taurine efflux from HeLa cells by P-glycoprotein blockers correlates with calmodulin inhibition. *J Biol Chem.* 1994; 269:29389-29394.

Krause U, Rider MH, Hue L. Protein kinase signaling pathway triggered by cell swelling and involved in the activation of glycogen synthase and acetyl-CoA carboxylase in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem.* 1996; 271:16668-16673.

Lambert IH, Hoffmann EK. Cell swelling activates separate taurine and chloride channels in Ehrlich mouse ascite tumor cells. *J Membr Biol.* 1994; 142:289-298.

Landis DM. The early reactions of non-neuronal cells to brain injury. *Annu Rev Neurosci.* 1994; 17:133-151.

Lang F, Gillian LB, Ritter M, Völkl H, Waldegger S, Gulbins E, Häussinger D. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev.* 1998a; 78:247-306.

Lang F, Madlung J, Uhlemann AC, Risler T, Gulbins E. Cellular taurine release triggered by stimulation of the Fas (CD95) receptor in Jurkat lymphocytes. *Pflügers Arch.* 1998b; 436:377-383.

Lang F, Ritter M, Gamper N, Huber S, Filon S, Tanneur V, Lepple-Wienhues A, Szabo I, Gulbins E. Cell volume in the regulation of cell proliferation and apoptotic cell death. *Cell Physiol Biochem*. 2000; 10:1-417-728.

Law RO. Taurine efflux and the regulation of cell volume in incubated slices of rat cerebral cortex. *Biochim Biophys Acta*. 1994; 1221: 21-28.

Lepple-Wienhues A, Szabo I, Wieland U, Heil L, Gulbins E, Lang F. Tyrosine kinases open lymphocyte chloride channels. *Cell Physiol Biochem*. 2000; 10:307-312.

Lock H, Valverde MA. Contribution of the Isk (Mink) potassium channel subunit to regulatory volume decrease in murine tracheal epithelial cells. *J Biol Chem*. 2000; 275:34849-34852.

Lohr J, Grantham J. Isovolumetric regulation of isolated S2 proximal tubules in anisotonic media. *J Clin Invest*. 1986; 78:1165-1172.

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193:265-275.

Luo L. Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nature Rev Neurosci*. 2001; 1:173-180.

Massieu L, Montiel T, Robles G, Quesada O. Differential mobilization of amino acids from rat brain regions during hyponatremia *in vivo*. *J Neurosci Res*. 2002; En Prensa.

McManus ML, Churchwell KB. Clinical significance of cellular osmoregulation. En: Cellular and molecular physiology of cell volume regulation. Editor: Strange K. CRC Press. USA. 1994: 63-77.

Means AR. Regulatory cascades involving calmodulin-dependent protein kinases. *Mol Endo*. 2000; 14:4-13.

Mignen O, Le Gall C, Harvey BJ, Thomas S. Volume regulation following hypotonic shock in isolated crypts of mouse distal colon. *J Physiol*. 1999; 515:501-510.

Mongin AA, Reddi JM, Charniga C, Kimelberg HK. <sup>3</sup>H-Taurine and D-<sup>3</sup>H-aspartate release from astrocyte cultures are differently regulated by tyrosine kinases. *Am J Physiol*. 1999; 276:C1226-C1230.

Morales-Mulia M, Pasantes-Morales H, Morán J. Volume sensitive efflux of taurine in HEK293 cells overexpressing phospholemmann. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1496:252-260.

Morales-Mulia S, Vaca L, Hernández-Cruz A, Pasantes-Morales H. Osmotic swelling-induced changes in cytosolic calcium do not affect regulatory volume decrease in rat cultured suspended cerebellar astrocytes. *J Neurochem*. 1998; 71:2330-2338.

Morales-Mulia S, Cardin V, Crevenna A, Torres-Márquez ME, Pasantes-Morales H. Influence of protein kinases on the osmosensitive release of taurine from cerebellar granule neurons. *Neurochem Int*. 2001; 38:153-161.

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

Morán J, Sabanero M, Meza I, Pasantes-Morales H. Changes of actin cytoskeleton during swelling and regulatory volume decrease in cultured astrocytes. *Am J Physiol*. 1996; 271:C1901-C1907.

- Morán J, Morales-Mulia S, Hernández-Cruz A, Pasantes-Morales H. Regulatory volume decrease and associated osmolyte fluxes in cerebellar granule neurons are calcium independent. *J Neurosci Res.* 1997; 47:144-154.
- Morán J, Hernandez-Pech X, Merchant-Larios H, Pasantes-Morales H. Release of taurine in apoptotic cerebellar granule neurons in culture. *Pflugers Arch.* 2000; 439:271-277
- Morán J, Morales-Mulia M, Pasantes-Morales H. Reduction of phospholemman expression decreases osmosensitive taurine efflux in astrocytes. *Biochim Biophys Acta.* 2001; 1538:313-320.
- Motais R, Guizouarn H, Garcia-Romeu F. Red cell volume regulation: the pivotal role of ionic strength in controlling swelling-dependent transport systems. *Biochim Biophys Acta.* 1991; 1075:169-180.
- Musch MW, Hubert EM, Goldstein L. Volume expansion stimulates p72<sup>svk</sup> and p56<sup>lyn</sup> in skate erythrocytes. *J Biol Chem.* 1999; 274:7923-7928.
- Niemeyer MI, Cid LP, Barros LF, Sepúlveda F. Modulation of the two-pore domain acid-sensitive K<sup>+</sup> channel TASK-2 (KCNK5) by changes in cell volume. *J Biol Chem.* 2001; 276:43166-43174.
- Nilius B, Eggermont J, Voets T, Buyse G, Manolopoulos V, Droogmans G. Properties of volume-regulated anion channels in mammalian cells. *Prog Biophys Mol Biol.* 1997; 68:69-119.
- Nilius B, Prenen J, Voets T, Eggermont J, Droogmans G. Activation of volume-regulated chloride currents by reduction of intracellular ionic strength in bovine endothelial cells. *J Physiol.* 1998; 506:353-361.
- Nilius B, Voets T, Prenen J, Barth H, Aktories K, Baibuchi K, Droogmans G, Eggermont J. Role of Rho and Rho kinase in the activation of volume-regulated anions channels in bovine endothelial cells. *J Physiol.* 1999; 516:67-74.
- Nilius B, Eggermont J, Droogmans G. The endothelial volume-regulated anion channel, VRAC. *Cell Physiol Biochem.* 2000; 10:313-320.
- O'Connor ER, Kimelberg HK. Role of calcium in astrocyte volume regulation and in the release of ions and amino acids. *J Neurosci.* 1993; 13:2638-2650.
- Okada Y. Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl<sup>-</sup> channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor. *Am J Physiol.* 1997; 273:C755-C789.
- Pasantes-Morales H, Morán J, Schousboe A. Volume-sensitive release of taurine from cultured astrocytes: properties and mechanisms. *Glia.* 1990; 3:427-432.
- Pasantes-Morales H. Volume regulation in brain cells: cellular and molecular mechanisms. *Metab Brain Dis.* 1996; 11:187-204.
- Pasantes-Morales H, Cardin V, Morales-Mulia S, Quesada O. Regulatory volume decrease in cultured brain cells: rate limiting factors. En: *Cell volume regulation: the molecular mechanisms and volume sensing machinery.* Editor: Okada Y. Elsevier Science B.V. 1998:43-48.
- Pasantes-Morales H, Morales-Mulia S. Influence of calcium on regulatory volume decrease: role of potassium channels. *Nephron.* 2000; 86: 414-427.
- Pasantes-Morales H, Cardin V, Tuz K. Signaling events during swelling and regulatory volume decrease. *Neurochem Res.* 2000a; 25: 1301-1314.

Pasantes-Morales H, Franco R, Torres-Márquez ME, Hernández-Fonseca K, Ortega A. Amino acid osmolytes in regulatory volume decrease and isovolumetric regulation in brain cells: contribution and mechanisms. *Cell Physiol Biochem*. 2000b; 10:361-370.

Pedersen SF, Mills JW, Hoffman EK. Role of the F-actin cytoskeleton in the RVD and RVI processes in Ehrlich ascites tumor cells. *Exp Cell Res*. 1999; 252:63-74.

Pedersen SF, Hoffman EK, Mills JW. The cytoskeleton and cell volume regulation. *Comp Biochem Physiol*. 2001; 130:385-399.

Pedersen SF, Beisner KH, Hougaard C, Willumsen BM, Lambert IH, Hoffmann EK. Rho family GTP binding proteins are involved in the regulatory volume decrease process in NIH3T3 mouse fibroblasts. *J Physiol*. 2002; 541:779-796.

Perlman DF, Goldstein L. Organic osmolyte channels in cell volume regulation in vertebrates. *J Exp Zool*. 1999; 283:725-733.

Pierce SK, Rowland-Faux LM. Ionomycin produces an improved volume recovery by an increased efflux of taurine from hypoosmotically stressed molluscan red blood cells. *Cell Calcium*. 1992; 13:321-327.

Quesada O, Ordaz B, Morales-Mulia S, Pasantes-Morales H. Influence of  $Ca^{2+}$  on  $K^{+}$  efflux during regulatory volume decrease in cultured astrocytes. *J Neurosci Res*. 1999; 57:350-358.

Roman RM, Smith RL, Feranchak AP, Clayton GH, Doctor RB, Fitz JG. CIC-2 chloride channels contribute to HTC cell volume homeostasis. *Am J Physiol*. 2001; 280: G344-G353.

Roy G. Amino acid current through anion channel in cultured human glial cells. *J Membr Biol*. 1995; 147:35-44.

Sánchez-Olea R, Pasantes-Morales H, Lazaro Z, Cerejido M. Osmolarity-sensitive release of free amino acids from cultured kidney cells (MDCK). *J Membr Biol*. 1991;121:1-9.

Sánchez-Olea R, Morales-Mulia M, Morán J, Pasantes-Morales H. Inhibition by polyunsaturated fatty acids of regulatory volume decrease and osmolyte fluxes in astrocytes in culture. *Am J Physiol*. 1995a; 269:C96-C102.

Sánchez-Olea R, Morales-Mulia M, Morán J, Pasantes-Morales H. Inhibition by dihydropyridines of regulatory volume decrease and osmolyte fluxes in cultured astrocytes in unrelated to extracellular calcium. *Neurosci Lett*. 1995b; 193:165-168.

Schliess F, Sinning R, Fischer R, Schmalenbach C, Häussinger D. Calcium-dependent activation of Erk-1 and Erk-2 after hypo-osmotic astrocyte swelling. *Biochem J*. 1996; 320:167-171.

Shen K, Teruel MN, Subramanian K, Meyer T. CaMKII- $\beta$  functions as an F-actin targeting module that localizes CaMKII- $\alpha/\beta$  heterooligomers to dendritic spines. *Neuron*. 1998; 21:593-606.

Shen MR, Chou CY, Browning JA, Wilkins RJ, Ellory JC. Human cervical cancer cells use  $Ca^{2+}$  signaling, protein tyrosine phosphorylation and MAP kinase in regulatory volume decrease. *J Physiol*. 2001; 537:347-362.

Song D, O'Regan MH, Phillis JW. Protein kinase inhibitors attenuate cardiac swelling-induced amino acid release in the rat. *J Pharm Pharmacol*. 1998; 52:1280-1286.

Stegen C, Matskevich I, Wagner CA, Paulmichl M, Lang F, Broer S. Swelling-induced taurine release without chloride channel activity in *Xenopus laevis* oocytes expressing anion channels and transporters. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1467: 91-100.

Strbák V, Greer MA. Regulation of hormone secretion by acute cell volume changes:  $\text{Ca}^{2+}$ -independent hormone secretion. *Cell Physiol Biochem*. 2000; 10:393-402.

Stutzin A, Eguiguren AL, Cid LP y Sepúlveda FV. Modulation by extracellular Cl of volume-activated organic osmolyte and halide permeabilities in HeLa cells. *Am J Physiol*. 1997; 273:C999-C1007.

Summers JC, Trais L, Lajvardi R, Hergan D, Buechler R, Chang H, Peña-Rasgado C, Rasgado-Flores H. Role of concentration and size of intracellular macromolecules in cell volume regulation. *Am J Physiol*. 1997; 273: C360-C370.

Szucs G, Heinke S, De Greef C, Raeymaekers L, Eggermont J, Droogmans G, Nilius B. The volume-activated chloride current in endothelial cells from bovine pulmonary artery is not modulated by phosphorylation. *Pflugers Arch*. 1996a; 431:540-548.

Szucs G, Heinke S, Droogmans G, Nilius B. Activation of the volume-sensitive chloride current in vascular endothelial cells requires a permissive intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. *Pflugers Arch*. 1996b; 431:467-469.

Taylor CP, Dudek FE. Synchronous neural afterdischarge in rat hippocampal pyramidal cells without active chemical synapses. *Science*. 1982; 218: 810-812.

Thomas-Young RJ, Smith TC, Levinson C. Regulatory volume decrease in Ehrlich ascites tumor cells is not mediated by a rise in intracellular calcium. *Biochim Biophys Acta*. 1993; 1146: 81-86.

Thoroed SM, Lauritzen L, Lambert IH, Hansen HS, Hoffmann EK. Cell swelling activates phospholipase A2 in Ehrlich ascites tumor cells. *J Membr Biol*. 1997; 160:47-58.

Tilly BC, Edixhoven MJ, Van Den Berghe N, Bot AGM, De Jonge HR.  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilizing hormones potentiate hypotonicity-induced activation of ionic conductances in intestine 407 cells. *Am J Physiol*. 1994; 267:C1271-C1278.

Tilly BC, Edixhoven MJ, Tertoolen LGJ, Morii N, Saitoh Y, Narumiya S, de Jonge HR. Activation of the osmo-sensitive chloride conductance involves  $\text{P21}^{\text{tho}}$  and is accompanied by a transient reorganization of the F-actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell*. 1996; 7:1419-1427.

Tilly BC, van der Wijk T, Jonge H R. Activation of cellular signaling pathways by hypotonicity. *En: Cell Volume Regulation: the molecular mechanism and volume sensing machinery*. 1998; 59-66.

Tuz K, Ordaz B, Vaca L, Quesada O, Pasantes-Morales H. Isovolumetric regulation mechanisms in cultured cerebellar granule neurons. *J Neurochem*. 2001;79:143-151.

Van der Wijk T, De Jonge HR, Tilly BC. Osmotic cell swelling-induced ATP release mediates the activation of the extracellular signal-regulated protein kinase (Erk)-1/2 but not the activation of osmo-sensitive anion channels. *Biochem J*. 1999; 343:579-586.

Verbalis JG, Gullans SR. Hyponatremia causes large sustained reductions in brain content of multiple organic osmolytes in rats. *Brain Res*. 1991; 567:274-282.

Verkhatsky A, Kettenmann H. Calcium signalling in glial cells. *Trends Neurosci*. 1996; 19:346-352.

Voets T, Droogmans G, Raskin G, Eggermont J, Nilius B. Reduced intracellular ionic strength as the initial trigger for activation of endothelial volume-regulated anion channels. *Proc Natl Acad Sci.* 1999; 96:5298-5303.

Wittels KA, Hubert EM, Musch MW, Goldstein L. Osmolyte channel regulation by ionic strength in skate RBC. *Am J Physiol.* 2000; 279:R69-R76.

Wurgler-Murphy SM, Saito H. Two-component signal transducers and MAPK cascades. *Trends Biochem Sci.* 1997; 22:172-176.