

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**"EDEMA CELULAR EN LA RETINA:
MECANISMOS DE GENERACIÓN Y ADAPTACIÓN"**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
P R E S E N T A
LENIN DAVID OCHOA DE LA PAZ

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. HERMINIA PASANTES ORDÓÑEZ

México, D.F.

2004



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.

Porque

"Hay quien hace de la vida un sueño y de un sueño una realidad"
Pierre Curie

"Reconozco que son pocas las posibilidades de éxito,
pero hay que intentarlo..... es mi obligación"
Albert einstein .

"La vida es breve, la ciencia extensa" Hipócrates

"Desgraciados los hombres que tienen todas sus ideal claras". Louis Pasteur

"Estudia no para saber más si no para saber algo mejor". Séneca

"Cuanto más comprensible parece el universo, más absurdo parece también".
Oliver Andel

A mis padres

*Gracias porque
Se sienten orgullosos y
Esperan lo mejor de mí.....
Porque siempre
Dan a mis preocupaciones
E inquietudes la misma importancia
Que tienen para mí.....
Porque sé que estarán
Observando mis pasos
Por lejos que me vaya, Porque
Contare con su apoyo haga
Lo que haga y este donde este
Porque nunca me han dejado sin
Respuestas, Porque me han
Impulsado en mis proyectos
Porque me han mostrado que
La vida es un reto, un desafío, un regalo.....
Porque su cariño esta siempre
Presente y porque siempre estarán
Conmigo,
David, Carmen.....*

Gracias.....

*Por comprender que mi vida
Tome un rumbo diferente
Por no cambiar su amor inmenso
Porque para ustedes no hay distancias
No hay dificultades,
No existe la palabra imposible
Porque sin importar
En donde me encuentre
Ni lo que haga,
Se que siempre podré
Ver su sonrisa y acudir a ustedes
Para resguardarme de la vida
Por ayudarme a crecer, Papás.....*

Gracias.....

A Jessica, el amor de mi vida.....

*Creo en tu sonrisa,
Ventana abierta de tu ser
Creo en tu mirada
Espejo de tu honestidad
Creo en tus lágrimas
Signo de alegrías o tristezas
Creo en tu mano
Siempre incondicional a dar o recibir
Creo en tu brazo
Acogida sincera de tu corazón
Creo en tu palabra
Expresión de tus sentimientos
Creo en Ti
Así de simple.....
En la elocuencia del silencio*

Gracias, mi amor.....

*En tu abrazo yo abrazo lo que existe,
La arena, el tiempo, el árbol, la lluvia,
Y todo vive para que yo viva;
Sin ir tan lejos puedo verlo todo
Veo en tu vida todo lo viviente*

Pablo Neruda

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme puesto en este camino

A mis padres David y Carmen por su fortaleza, enseñanza, y cariño.

A la Dra. Herminia Pasantes Ordóñez, por darme la oportunidad de trabajar a su lado y sobre todo por su invaluable guía, confianza, paciencia y apoyo en mi formación como profesionista.

A los miembros del comité tutorial: Dra. Ma. Eugenia Torres Marquez y Dr. Julio Moran, por su apoyo, críticas y confianza.

A la Dra. Ana María López Colome por sus consejos, apoyo y críticas.

A mis compañeros del laboratorio BL-301 (antes 302-sur) **Benito, Ruth, Karla, Velia, Xavier, Marcela, Sandra y Claudia**. Por cada momento vivido en las buenas o en las malas, por cada congreso, por cada chela, y por cada palabra sincera que me han dado.

A mis compañeros del departamento de Microscopía Electrónica Jorge y Rodolfo, por su valiosa ayuda técnica y moral en la realización de mi tesis.

A Edith Ramos y Rosita por su paciencia.

Al Dr. Carlos Saldaña por su amistad y confianza.

A mis hermanos Yegor, Irina y Vidal por todo lo que he aprendido de ellos.

A Jessica por su amor, comprensión, apoyo.... por ser como eres.

Al Dr. Raúl y a la Sra. Guadalupe, por toda la confianza que me han dado.

A mis tíos por el inigualable apoyo en todos los aspectos de mi vida personal y académica. Gracias por ser mis segundos padres.

A toda mi familia por su comprensión

Al profesor Luis López por sus consejos, visión, y paciencia pero sobre todo por su amistad.

A mis amigos: Rene, Viridiana, Netzer, Arturo, Manuel, Heder, Héctor, Alma, y a los que se me olviden en el trance, por que son parte de mí.

A mis compañeros de la facultad: Sergio, Alma, Malli, Rodrigo y Beatriz, por cada momento vivido en la facultad, en cada práctica de campo y en cada reunión.

A la Dirección General de estudios de Posgrado (PAEP Num. 202328 y 202355), UNAM (Num. 34886) y DEGAPA (Num. IN204900) por todo subsidio otorgado y a CONACYT (Becario num. 15122548) por el apoyo de la beca. Al Instituto de Fisiología Celular, personal administrativo, cómputo, etc..., por las facilidades, apoyo técnico, instalaciones, etc..

INDICE	
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
INTRODUCCION	3
1. El volumen Celular	4
2. Importancia Fisiológica	6
3. Cambios de Volumen en el Cerebro	7
4. Mecanismos de Regulación del Volumen Celular	10
I. Decremento Regulador del Volumen (DRV)	13
II. Incremento Regulador del Volumen (IRV)	14
5. Señalización Intracelular y Volumen Celular	14
6. Mecanismos de Liberación de Osmolitos	16
I. Movilización de K^+	16
II. Movilización de Ca^{2+}	17
III. Movilización de Cl^-	18
IV. Movilización de Aminoácidos	18
7. Fisiología de la Retina	20
8. Edema Celular en la Retina	23
I. Edema Anisomótico	23
II. Edema Isomótico	24
OBJETIVO GENERAL	26
OBJETIVOS ESPECIFICOS	26
RESULTADOS Y ARTICULO ANEXOS	27
DISCUSIÓN	30
I. Mecanismos de Liberación de Aminoácidos en respuesta a Condiciones de Edema Hiposmótico o Isomótico. Art. 1	30
II. Identificación de Algunos Elementos de las Vías de Señalización por el Incremento en Volumen y su Vinculo Con la Liberación de Aminoácidos. Art. 2	33
III. Mecanismos Generadores de Hinchamiento en Condiciones Isomóticas: el modelo de K^+ /Ouabaina. Mns. 3	39
REFERENCIAS	43

RESUMEN

El volumen celular es un factor determinante en la homeostasis celular. Los cambios en el volumen celular están involucrados en el proceso de distintos fenómenos como son procesos metabólicos, excitabilidad neuronal, proliferación y diferenciación celular, entre otros. El control de este parámetro es, por lo tanto, trascendental para el funcionamiento adecuado de órganos, tejidos y de todo el organismo. La respuesta celular consistente en movilizar osmolitos orgánicos, incluidos los aminoácidos, ante un incremento en volumen debido a la reducción en la osmolaridad externa se ha estudiado desde hace varios años. En cambio, la presencia de este tipo de respuesta en condiciones isosmóticas, se conoce mucho menos. Los resultados del trabajo muestran que la liberación de taurina y GABA en modelos que reproducen algunas de las condiciones asociadas a la isquemia, presentan características de la movilización de los osmolitos, más que una respuesta tipo neurotransmisor. En el caso del ácido glutámico, a pesar de que una fracción de la liberación se asemeja a la de los osmolitos, otra fracción, posiblemente más importante, tiene otras características y posiblemente sea el resultado de la despolarización. Por otro lado también se observó que las cinasas de tirosina, en particular aquéllas sensibles a tirfostinas, tienen un papel importante como señales de asociación entre el cambio en el volumen celular y la activación de la salida de osmolitos. La identidad molecular de estas cinasas aún no se conoce, pero podrían descartarse las MAP cinasas ERK1/ERK2 y la p38, cuya función puede estar asociada a mecanismos de adaptación al estrés. La PI3K parece ser un elemento importante en la vía de señalización que conecta el cambio en volumen y la liberación de los osmolitos, posiblemente a través de una acción iniciada por cinasas de tirosina. Por último se observó que la retina responde con un mecanismo regulador del volumen al incremento inducido por condiciones hiposmóticas, pero que este proceso es mucho menos eficiente en condiciones isosmóticas, al menos en el modelo empleado en nuestro trabajo. Es lógico suponer que la limitada capacidad de ajuste del volumen sea parecida en otras condiciones isosmóticas, en donde el hinchamiento se produce por una redistribución iónica seguida de la acumulación intracelular de agua. Por esta razón, suponemos que una mejor estrategia para evitar las consecuencias desfavorables del hinchamiento es su prevención. El efecto de inhibidores de los transportadores electroneutros ($\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ y K^+/Cl^-) y de los canales de Cl^- en el incremento en volumen inducido por K^+ , sugieren la participación de los dos mecanismos de transporte en el aumento de volumen en la retina, bajo condiciones isosmóticas.

ABSTRACT

The cell volume plays a major role in the cellular homeostasis. The changes in the cell volume are presented in different processes, like metabolism, neuronal excitability, cellular proliferation and differentiation. The control of the cell volume is fundamental to a suitable function of the organism. The organic osmolytes released from the cell, like amino acids, induced by anisotonic conditions, have been extensively studied. For other hand, this kind of phenomena is poorly studied in isotonic conditions. In this work we have shown that the taurine and GABA release, induced by conditions that reproduce an ischemic process, is more like osmolyte, not like neurotransmitter. The glutamate release shown like osmolyte and neurotransmitter (maybe the most important). The tyrosine kinases have an important role in the signaling between the cell volume changes and the osmolytes release. The molecular identity of this kinases is unknown, and we can not reject the stress activate kinases participation, as p38 and for other hand the MAP kinases ERK1/ERK2, in the cell volume regulation at the retina. The PI3-K plays a central role in the signaling pathway to activate the osmolyte release induced by cell swelling. The retina show a RVD (Regulate volume Decrease) mechanism against hyposmolar conditions, this process was less efficient under isotonic conditions. The chloride channels and cotransporters blockers prevent the cell volume increase induced by our conditions; this suggests two mechanisms to produce the cell swelling in the retina under isotonic conditions.

INTRODUCCION

1. EL VOLUMEN CELULAR. CONCEPTOS GENERALES

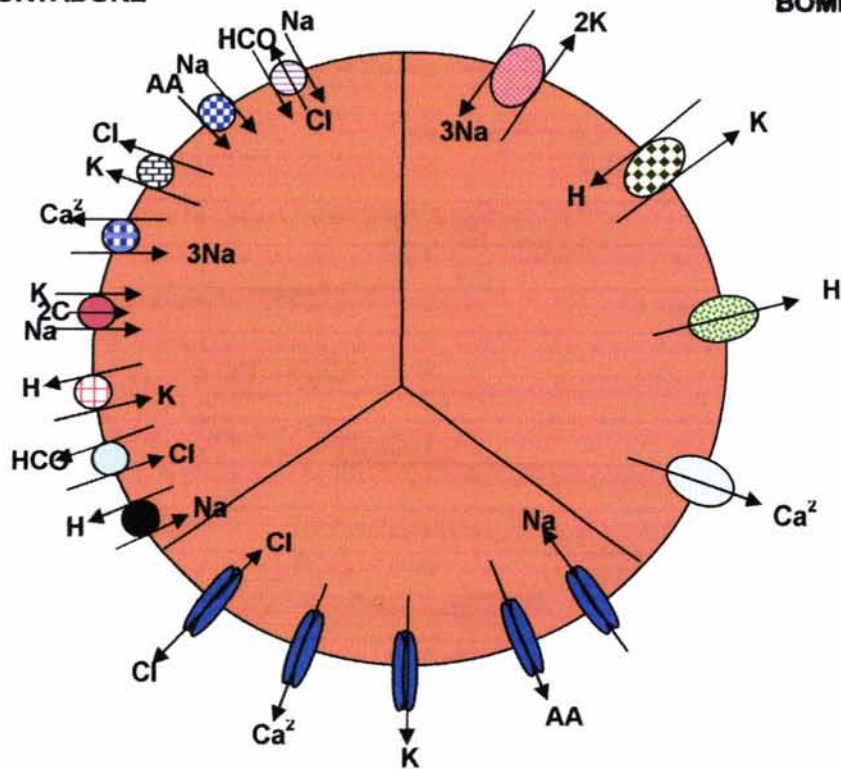
El agua es el componente que se encuentra en mayor proporción en tejidos y células de vertebrados, invertebrados, organismos unicelulares y plantas. El movimiento de agua a través de las membranas biológicas está íntimamente relacionado con el fenómeno de la ósmosis. La palabra ósmosis (del griego empuje) se utiliza para describir el flujo de agua de una solución a otra más concentrada cuando éstas se hallan separadas por una membrana impermeable a solutos pero permeable al agua. La presión necesaria para abolir el flujo de agua es la presión osmótica (1).

En mayor o menor grado, la membrana plasmática de las células es permeable al agua. La vía de transporte de agua a través de la membrana plasmática constituye uno de los temas relativamente más estudiados y discutidos de la fisiología celular. Los flujos de agua a través de las membranas ocurren tanto vía la capa lipídica como a través de proteínas membranales que se comportan como poros, llamados acuaporinas (2). Los flujos netos de agua a través de ambas vías ocurren en respuesta a gradientes transmembranales de presión hidrostática, de presión osmótica o de ambas. Para que haya un flujo neto de agua, debe existir un gradiente de potencial químico de este fluido a través de la membrana.

El mantener un volumen constante es imprescindible para las células animales. Debido a la ausencia de pared celular rígida, las membranas de estas células son incapaces de soportar diferencias en la presión hidrostática transmembranal. En condiciones isosmóticas, el volumen de las células animales tiende a aumentar continuamente por fuerzas coloidosmóticas que resultan de la presencia de aniones no difusibles en el compartimiento intracelular, lo que de acuerdo con los principios del equilibrio Gibbs-Donnan, crea una distribución desigual de partículas osmóticamente activas entre los compartimientos intra y extracelular. El exceso de soluto en el interior de la célula disminuye el potencial químico del agua intracelular y causa su entrada osmótica. Sin embargo en condiciones fisiológicas, las células mantienen su volumen constante, debido a la activación de mecanismos de control del volumen celular, cuya eventual falla produciría una lisis celular (Figura 1). La

TRANSPORTADORE

BOMBA



CANALE

Figura 1. Control de volumen celular en condiciones fisiológicas. El control del volumen está determinado por el funcionamiento organizado de diferentes sistemas de transporte de iones y moléculas orgánicas a través de la membrana, como son los transportadores, canales y bombas.

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 Na/K. Si este mecanismo se bloquea con ouabaina o si se depleta el ATP, las células se hinchan por acumulación de Na^+ (1).

Debido a la permeabilidad selectiva de las células, una diferencia en la concentración de solutos entre el medio extracelular e intracelular genera un movimiento de agua osmóticamente obligada, para tratar de igualar el gradiente y por consiguiente mantener el volumen celular (3). Estas diferencias se generan en respuesta a procesos fisiológicos y/o patológicos, generalmente provocando cambios en la concentración de solutos

osmoticamente activos en el medio externo o en el interno. Para compensar los cambios de volumen, las células utilizan múltiples mecanismos de regulación, que incluyen el transporte de osmolitos y la operación de vías metabólicas; de esta forma no solo se modifica el volumen, si no también las funciones celulares (4).

En mamíferos, las células se encuentran expuestas generalmente a fluidos extracelulares de osmolaridad controlada. La regulación de la osmolaridad del plasma esta dada por un mecanismo homeostático encargado de ajustar tanto la tasa de ingestión de agua como la de excreción renal.

2. IMPORTANCIA FISIOLÓGICA DEL VOLUMEN CELULAR

Durante algún tiempo se pensó que la propiedad de regulación del volumen estaba restringida a especies que efectivamente requerían de este control para su supervivencia, como es el caso de los animales eurihalinos que constantemente están expuestos a fluctuaciones en la osmolaridad del medio externo. En condiciones fisiológicas, la mayoría de las células de un organismo multicelular no se encuentran expuestas a situaciones anisomóticas (cambios en la osmolaridad del medio) excepto las células renales y algunas células epiteliales. A pesar de ello la capacidad de regular el volumen es una propiedad que se ha conservado a través de la evolución en prácticamente todos los tipos celulares. La osmolaridad de los fluidos corporales de mamíferos es de aproximadamente 285 mOsm/L y este valor se mantiene prácticamente constante, mostrando sólo pequeñas fluctuaciones que no exceden de un 3% (5). Sin embargo, a nivel celular existen numerosas situaciones fisiológicas en las que pueden crearse microgradientes osmóticos que llevan a cambios en el volumen de los compartimentos intracelulares y que deben ser ajustados.

Procesos como el transporte iónico, la secreción y acumulación de nutrientes producen continuos cambios de volumen. En el riñón y en el intestino las células se encuentran expuestas a variaciones importantes de osmolaridad, por lo que la incorporación de sales, glucosa o aminoácidos, está acoplada al gradiente de Na^+ , lo que lleva a un aumento en el volumen celular. Esto conlleva a la activación de canales de K^+ en la membrana basolateral como mecanismo de corrección del volumen, ayudando también a mantener el gradiente

electroquímico regenerando el proceso (4). En el caso de las neuronas, están continuamente sometidas a alteraciones en el contenido de solutos intracelulares, debido a la generación de impulsos nerviosos, y los cambios en la concentración de neurotransmisores los cuales producen cambios en los flujos netos de agua y solutos a través de la membrana plasmática.

Además de la necesidad imperativa de mantener constante la concentración intracelular de solutos, muchos de los cuales participan en complejos eventos de señalización, recientemente se ha propuesto que el volumen celular participa directamente como mensajero en el control metabólico, como una señal de crecimiento y proliferación celular, así como señal para la inserción de proteínas membranales, tales como canales, receptores y transportadores (3).

3. CAMBIOS DE VOLUMEN EN EL CEREBRO

En el cerebro este tema también tiene implicaciones desde el punto de vista clínico, en aquellas patologías asociadas a cambios en la osmolaridad del plasma. Una situación particularmente grave se puede presentar cuando hay un edema celular en el cerebro. El edema cerebral esta dado por un incremento en la concentración de agua intracerebral, en respuesta a cuadros de daño como compresión vascular, anoxia y muerte neuronal. Un incremento excesivo del volumen celular provoca el desplazamiento caudal del parénquima cerebral por el *foramen mágnum*, comprimiendo los núcleos cardiaco y respiratorio provocando la muerte del individuo (6). Por esto mismo, el estudio de los procesos que intervienen en la regulación del volumen en el cerebro es de la mayor importancia.

Existen diversas causas que originan el edema cerebral, las cuales dependen de la perturbación original. El edema cerebral se clasifica de tres formas, dependiendo del espacio del parénquima en donde se origine: 1) edema celular, 2) edema extracelular o intersticial y 3) edema cerebral combinado. Independientemente del origen (extra o intracelular) el edema se expande y termina por ser combinado (7, 8). La distinción entre estos tres tipos de edema depende de los factores patológicos que lo originan.

Las patologías que desencadenan cambios en el volumen del cerebro se pueden dividir en dos grupos: *Anisomóticas* y *Citotóxicas*.

El edema celular *Anisomótico* o hiposmótico es originado por alteraciones en la osmolaridad del plasma (hiposmolaridad), y no genera daño celular en primera instancia. Las patologías asociadas a este tipo de daño son la intoxicación por agua, síndrome de secreción inapropiada de la hormona antidiurética, uso inapropiado de diuréticos, deshidratación. Las secuelas clínicas de estas alteraciones pueden ser crisis epilépticas, daño neuronal y edema cerebral severo. La osmolaridad tiene un efecto determinante en la excitabilidad y actividad convulsiva del cerebro. Se ha observado que la hiposmolaridad acentúa la intensidad de diversos cuadros convulsivos, mientras que la hiperosmolaridad la mitiga. En diferentes preparaciones, el medio hiposmótico induce una actividad epileptiforme, incluso en ausencia de comunicación sináptica (9, 10).

El procedimiento usado comunmente para corregir el edema hiposmótico es la administración de una solución salina hipertónica, aunque la restricción en la ingesta de líquidos es la opción aconsejable en los casos de hiponatremia asociada a falla en la secreción de la hormona antidiurética. El proceso de corrección debe, sin embargo, hacerse en forma lenta y controlada, ya que, debido a los cambios adaptativos que se presentan durante esta condición, la osmolaridad celular está ahora en equilibrio con un medio externo hiposmótico. Al hacer la corrección restableciendo la osmolaridad fisiológica, la célula percibe al plasma normal como una condición hiperosmótica y activa los mecanismos de regulación tendientes a restablecer el nuevo equilibrio, con la consiguiente deshidratación. Es posible que esta respuesta sea la responsable de la consecuencia más grave de una corrección inadecuada de la hiponatremia; la mielinosis que ocurre en distintas regiones del cerebro, en particular en el tallo cerebral. Esta patología, cuyas características son cuadriplegia flácida, parálisis respiratoria, letargo y coma, podrían derivarse de una ruptura de las uniones comunicantes en las células de la barrera hematoencefálica a consecuencia de la deshidratación, permitiendo el acceso de factores que pueden causar daño a los oligodendrocitos y llevando finalmente a la destrucción de la mielina (11)

El edema celular *Citotóxico* o isosmótico se origina por alteraciones en el transporte activo de iones y moléculas hidrosolubles. Asociadas a este tipo de edema se encuentran patologías como isquemia, epilepsia, encefalopatía hepática y traumatismo craneoencefálico. En el caso de la isquemia, el daño es debido principalmente a la reducción del flujo sanguíneo cerebral, con la subsecuente privación del oxígeno y nutrientes, junto a una liberación de ácido glutámico, que lleva a un daño neuronal irreversible en el foco isquémico. Sin embargo, en la zona de penumbra el daño se desarrolla lentamente afectando incluso otras zonas del cerebro. Los principales procesos fisiopatológicos que ocurren durante la isquemia son: 1) disminución de ATP, 2) incremento en la concentración intracelular de Na^+ , 3) aumento en la concentración extracelular de K^+ , 4) acidosis intracelular, 5) aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular, 5) excitotoxicidad. Posterior a estos procesos se genera una lipoperoxidación. (12).

La encefalopatía hepática es el resultado de una falla hepática aguda o crónica, que conlleva numerosas alteraciones en canales iónicos y en los sistemas de transporte y receptores de aminoácidos (13). El edema cerebral es una característica neuropatológica asociada a la falla hepática aguda, siendo el mismo edema la principal causa de muerte. Este tipo de edema celular se genera principalmente en astrocitos. El factor inicial y causal del hinchamiento celular en la encefalopatía hepática es un incremento en los niveles de amonio en el plasma, alcanzando niveles 45 veces más altos que los fisiológicos. El incremento de amonio en el cerebro, presente en todas las condiciones de disfunción hepática, provoca en parte un incremento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. La desintoxicación del amonio en el cerebro, en condiciones normales o de hiperamonemia, la realizan los astrocitos. Debido a que el cerebro carece de enzimas para remover el amonio en forma de urea, su metabolismo ocurre básicamente por la vía de síntesis de glutamina, a través de la aminación del ácido glutámico por la glutamina sintetasa, enzima localizada exclusivamente en astrocitos (14). Consecuentemente, la producción de glutamina en astrocitos se incrementa considerablemente durante la hiperamonemia causando falla hepática aguda (15). El hinchamiento de los astrocitos y la generación de edema cerebral en la falla hepática aguda, aparentemente es el resultado de la interacción de varios mecanismos generados por la acumulación intracelular de glutamina.

El bloqueo de las enzimas responsables del metabolismo oxidativo y la producción de acetato, así como la generación de radicales libres y la apertura del poro de transición mitocondrial, ocurren asociados al incremento de amonio y glutamina en astrositos. La forma en como todos estos diferentes elementos están interconectados en esta patología es aún controversial.

En el caso de la epilepsia, se sabe que en un episodio epiléptico se generan descargas simultáneas de un grupo de neuronas, durante este cuadro epiléptico hay un incremento en la concentración de K^+ extracelular. Este aumento, conlleva una entrada de K^+ al interior de la célula acompañado de Cl^- y agua, generando un aumento en el volumen celular. A su vez la entrada de K^+ produce una despolarización que libera aminoácidos excitadores, principalmente ácido glutámico generando condiciones de excitotoxicidad, lo cual exacerba el cuadro epiléptico (16)

Una característica importante del incremento de volumen celular originado por un edema citotóxico, es que no hay una regulación, debido posiblemente a que la salida de K^+ y Cl^- intracelular es mínima o casi nula, por el incremento en la concentración extracelular de estos mismos iones, de tal forma que la cantidad de osmolitos disponibles para el proceso de regulación es limitada.

4. MECANISMOS DE REGULACION DEL VOLUMEN CELULAR

El manejo del estrés osmótico por parte de las células se basa en tres estrategias: ignorarlo, evitarlo o adaptarse a él. Las plantas, bacterias y levaduras pueden ignorar los cambios de 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 mantener el volumen inicial.

Generalmente, el volumen celular se incrementa alcanzando un máximo en un tiempo variable, que depende de: 1) la velocidad en el cambio en la osmolaridad extracelular en el plano inmediatamente adyacente a la membrana plasmática, 2) la permeabilidad de la membrana plasmática al agua, 3) la relación entre área de la membrana y el volumen de la célula (17, 5, 18). Después de este máximo, el volumen celular disminuye, aún cuando la osmolaridad extracelular se mantenga por debajo del valor del control inicial. Este proceso compensatorio del volumen, que generalmente ocurre en un periodo de varios minutos, se conoce como Decremento Regulador del Volumen (DRV). En la mayoría de los casos, las células no retornan totalmente a su volumen inicial, sino que alcanzan un nivel estable ligeramente superior. De manera análoga, cuando las células se mantienen en una solución hiperosmótica, su volumen disminuye y en la mayoría de los casos, tienden a recuperarse mediante el proceso conocido como Incremento Regulador del Volumen (IRV) (Figura 2).

Los mecanismos adaptativos de regulación del volumen celular se establecen a través de cambios en la concentración intracelular de solutos osmóticamente activos, en la dirección necesaria para recuperar el equilibrio osmótico de la célula. Estos componentes llamados osmolitos, se agrupan en dos categorías: iones inorgánicos Na^+ , K^+ , Cl^- y moléculas orgánicas, como aminoácidos, aminas y polialcoholes. Los solutos osmóticamente activos, son aquellos que se encuentran en forma libre en solución en el citoplasma. En general, durante la regulación del volumen las células de los invertebrados y de los vertebrados de especies acuáticas utilizan preferentemente los osmolitos orgánicos, mientras que en las células de vertebrados terrestres los iones parecen tener un papel más importante. Una excepción a esto puede ser el sistema nervioso central, en el cual los iones participan de manera sustantiva en el control de la excitabilidad y en la comunicación interneural, y por tanto su homeostasis debe ser regulada de manera muy estricta. Los iones, principalmente K^+ , Na^+ , Cl^- y HCO_3^- , contribuyen en el mantenimiento de la osmolaridad interna y externa de la célula, siendo el K^+ y el Cl^- los de mayor concentración intracelular y el Na^+ el más concentrado en el espacio extracelular. Estos iones participan de manera importante en la regulación del volumen después de alguna alteración en la osmolaridad del medio externo, por lo que su transporte a través de la membrana es muy importante en los procesos de regulación del volumen.

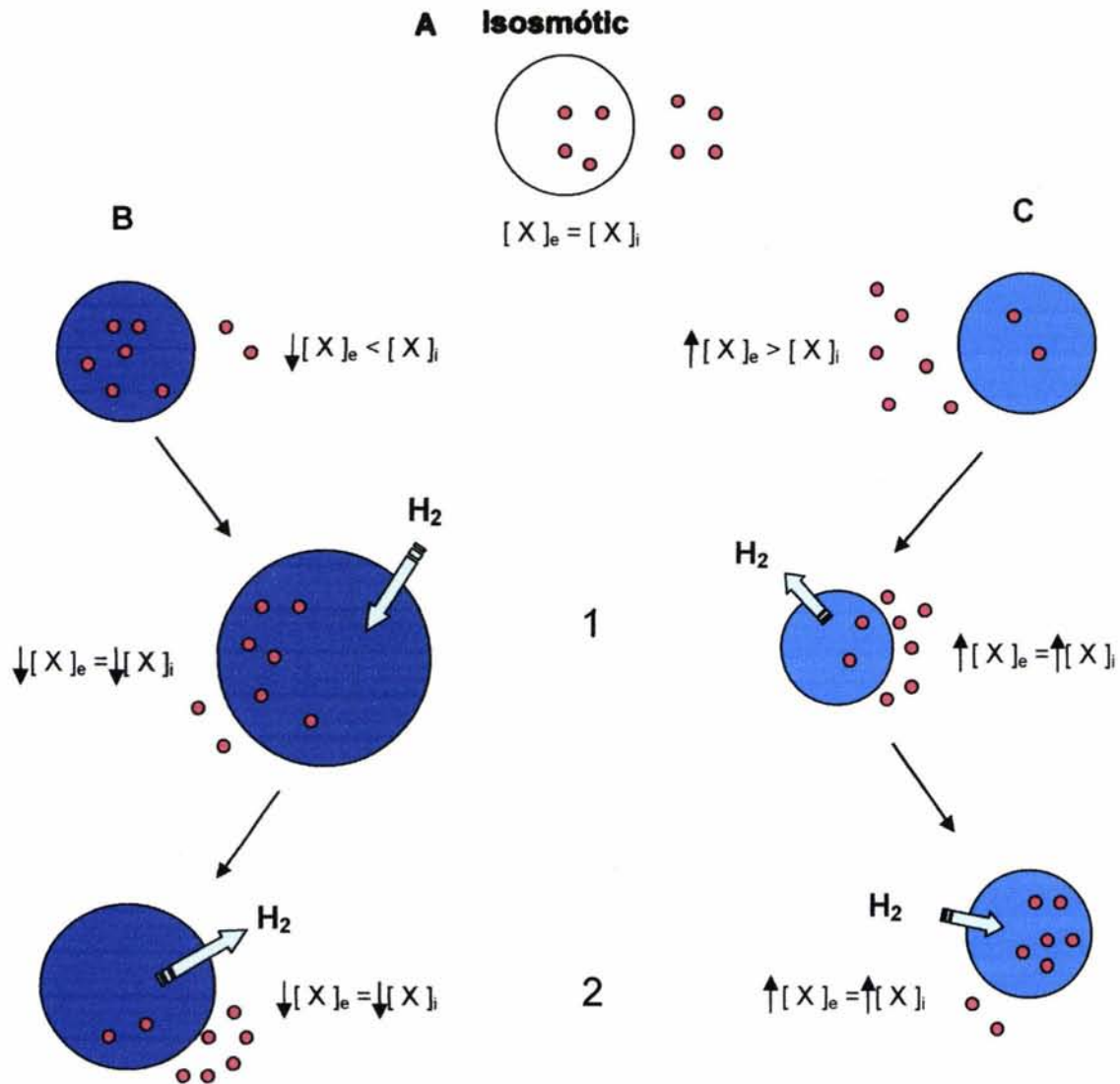


Figura 2. Control del volumen celular en condiciones anisomóticas. En condiciones **Isomóticas (A)** la concentración de solutos en el compartimiento extracelular $[X]_e$ e intracelular $[X]_i$ es la misma, por lo que la presión osmótica en ambos lados está equilibrada. En condiciones **Hiposmóticas (B)** o **Hiperosmóticas (C)** cuando $[X]_e$ disminuye o se incrementa respecto a $[X]_i$, se genera un flujo neto de agua debido al gradiente osmótico impuesto, hasta que $[X]_i$ se equilibra respecto a $[X]_e$ (1) lo que modifica inicialmente el volumen celular. Posteriormente, aún cuando el estímulo osmótico se mantenga (2), la célula recupera parcialmente su volumen inicial mediante la activación de distintas vías de movilización de osmolitos que

Una característica interesante de las moléculas orgánicas relacionadas con la función de la regulación osmótica es que, a diferencia de los iones inorgánicos, poseen lo que se conoce como propiedades osmoprotectoras, es decir, que además de funcionar como osmolitos pueden acumularse en concentraciones muy altas en el compartimiento intracelular sin alterar significativamente la estructura y la función de las macromoléculas citosólicas,

alterar significativamente la estructura y la función de las macromoléculas citosólicas, como enzimas y proteínas. Un caso particular es la taurina, de la cual se hablará más adelante. Existen otros osmolitos orgánicos usados como moléculas osmoefectoras en las células de mamíferos; estos son los polialcoholes, como el sorbitol y el *mio*-inositol. Otros osmolitos orgánicos con menor participación son las metilaminas como la glicerofosforilcolina (4). La concentración de cada uno de estos osmolitos varía según la especie y tipo celular; de esta manera varía también la importancia que tiene en la regulación del volumen. La célula puede acumular osmolitos ya sea aumentando la síntesis, disminuyendo la degradación o estimulando el transporte; para disminuir la concentración intracelular de éstos puede degradarlos o activar su liberación.

En el cerebro, los aminoácidos más abundantes son taurina, glutamato, glicina, 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 astrocitos en cultivo, la concentración intracelular de aminoácidos libres es significativamente mayor, oscilando entre 50-60 mM.

3. Decremento regulador del volumen (DRV)

Cuando las células se exponen a un medio anisomótico cambian su volumen de acuerdo al cambio en la osmolaridad externa, encontrando el máximo de hinchamiento un minuto después del estímulo, a partir de este momento la célula recupera su volumen en un lapso de entre 15-30 min posterior al estímulo, aún cuando persistan las condiciones hiponatémicas. El DRV se lleva a cabo por la movilización de osmolitos intracelulares hacia el espacio extracelular. Los principales osmolitos involucrados en el DRV son el K^+ y el Cl^- , aminoácidos y el *mio*-inositol (19, 3). El porcentaje en la disminución de osmolitos orgánicos es mayor (50-80%) que el de iones (10-30%), aunque la contribución de éstos últimos al DRV es de entre 60 – 70% debido a que se encuentran en mayor concentración (3). En células de glioma C6 el DRV tiene una dependencia de Cl^- , (20,21). Este proceso de regulación ha sido ampliamente estudiado en células en cultivo como líneas celulares y células gliales (22, 23, 24, 25). En respuesta a la hiponatremia crónica, en todas las regiones

del cerebro se libera taurina, ácido glutámico, ácido aspártico, alanina y glutamina, a diferencia de GABA y glicina los cuales se liberan en áreas más localizadas (25) (Figura 2).

II. Incremento regulador del volumen (IRV)

De manera contraria, cuando las células son expuestas a soluciones hiperosmóticas hay una disminución del volumen de la célula; este encogimiento es proporcional al aumento de osmolaridad. Presentan una fase rápida de acumulación de osmolitos inorgánicos (Na^+ , K^+ y Cl^-) y una respuesta adaptativa más lenta, donde se incorporan principalmente osmolitos orgánicos. De igual forma se ha identificado al sistema de cotransporte $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ como el responsable de la movilización de los iones involucrados. En otros tipos celulares son importantes también el intercambiador Na^+/H^+ , $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ y la ATPasa Na^+/K^+ (4). En general los canales iónicos no participan en esta respuesta.

Estas dos fases representan un mecanismo de adaptación clave en el sistema nervioso, ya que mantienen el contenido de agua y el tamaño celular cercanos a los niveles basales durante las primeras fases de la hipernatremia. El IRV ha sido estudiado principalmente en líneas celulares de glioma C6, neuroblastoma, cultivos primarios de astrocitos de rata y ratón, sinaptosomas y en algunos sistemas in vivo (26, 27) (Figura 2).

5. SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR Y VOLUMEN CELULAR

El proceso de regulación de volumen implica varias etapas, en las que la inicial es aquella en la que la célula debe detectar el cambio en volumen, para posteriormente desencadenar un sistema de señales que llevan a la activación de los efectores; en este caso, los osmolitos que ajustan el contenido de agua. Finalmente, la célula debe “recordar” su volumen inicial y desactivar los mecanismos reguladores, ya sea por el silenciamiento de las señales transductoras o por la desactivación de los canales a través de los cuales permean los osmolitos. Hasta este momento, no se han identificado los sistemas o moléculas que pudieran funcionar como sensores para el volumen en ningún tipo celular. En cuanto a las señales de transducción, los resultados son todavía poco claros. El incremento en volumen está asociado, en la mayor parte de las células, con un aumento en los niveles de Ca^{2+}

intracelular (28), por lo que se consideró a este catión como un elemento clave para el proceso de transducción. Sin embargo, numerosas investigaciones han demostrado claramente que el Ca^{2+} sólo participa como señal en aquellas células, generalmente de tipo epitelial, en las que el canal de K^+ que participa en la regulación del volumen es un canal dependiente de Ca^{2+} . En células no epiteliales, incluyendo células nerviosas, el incremento en la concentración de Ca^{2+} parece ser solo un epifenómeno, no relacionado directamente con los mecanismos de regulación del volumen.

Recientemente se ha hecho énfasis en la participación de cinasas de tirosina como elementos clave en la recuperación del volumen celular. En condiciones de hinchamiento anisomótico se produce una rápida activación de algunas de estas cinasas, entre las que se encuentran principalmente p125^{FAK} , p38 , p56^{lck} , p72^{lyk} , ERK1/ERK2 (29-34). Algunas investigaciones muestran que los inhibidores de estas cinasas, como tirfostina A23, genisteína y levandustina, bloquean la liberación de osmolitos con una potencia que depende del tipo celular (35, 36). Otra cinasa involucrada en las cascadas de señalización durante la osmotransducción es la fosfatidil-inositol 3 cinasa (PI3K), que es blanco de tirosinas cinasas. Esta enzima incrementa su actividad bajo condiciones hiposmóticas en algunos tipos celulares (37,38). Los bloqueadores de esta enzima, wortmannina y LY 294002, inhiben la liberación de taurina y ^{125}I de neuronas granulares de cerebelo y de la línea 407 de células intestinales (39, 40). Otro tipo de cinasas que posiblemente participan en la osmotransducción son la PKC, PKA, y calcio calmodulina cinasa (CAMK), así como también la fosfolipasa A2 y GTPasa Rho. No está claro, sin embargo, si existe una conexión directa entre la actividad de las cinasas y el mecanismos de activación de osmolitos, ni tampoco si estas enzimas forman parte de la cadena de señalización que lleva a la movilización de los osmolitos o si se trata de epifenómenos.

Los cambios en el volumen activan numerosos mecanismos no necesariamente asociados a la regulación tales como cambios en el citoesqueleto, moléculas de adhesión, señales hacia el núcleo y la activación de proteínas de estrés.

Mientras que las cascadas de señalización que conducen a la activación de las vías de movilización de osmolitos para el ajuste del volumen celular en condiciones hiposmóticas

han sido muy estudiadas en los últimos tiempos, se tiene muy poca información acerca de la existencia de estas vías en condiciones de edema isosmótico. Sólo existen algunos estudios comparativos en hepatocitos, donde hay una activación de PI3K y de la cinasa p70S6, mientras que ERK1/ERK2 no modifican su actividad (37). En enterocitos hay un efecto de PKC sobre la liberación osmosensible de Cl^- durante el edema isosmótico. Se sabe que en condiciones isquémicas in vivo hay una liberación de aminoácidos en la cual hay aparentemente una participación de cinasas de tirosina y de PKA (41, 42). La isquemia produce una fosforilación de ERK1/ERK2, p38, JNK, y PI3K en el cerebro (43, 44, 45). En la retina hay una fosforilación de PI3K y ERK1/ERK2 en las mismas condiciones (46). La identificación de la cascada de señalización involucrada en la osmotransducción durante el edema isosmótico, se complica por el hecho de que esencialmente todas las condiciones que conducen al incremento de volumen en estas condiciones son situaciones de estrés que conllevan la activación de numerosos elementos de señalización principalmente asociados a este fenómeno.

6. MECANISMOS DE LIBERACION DE OSMOLITOS

I. Movilización del K^+

La vía por la que se mueve el K^+ asociado al DRV no está bien caracterizada, aunque se sabe que es específica para el K^+ y bastante impermeable a otros cationes. Esta aún por definirse si los canales de K^+ son activados por el hinchamiento o por factores asociados al cambio en el volumen celular. El hinchamiento desencadena una variedad de cambios celulares incluyendo un incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} , cambios en la organización del citoesqueleto, fosforilación de varias proteínas, expresión de algunos genes y afecta el potencial de membrana de acuerdo con la naturaleza y cinética de la corriente activada (47, 48). Alguno o algunos de estos cambios asociados al hinchamiento podrían activar los canales de K^+ relacionados con el DRV. Muchos tipos celulares se despolarizan en respuesta al hinchamiento, y esto activa subsecuentemente canales de K^+ durante el DRV. Esto se ha observado en células de neuroblastoma (49), en donde la despolarización activa en primer lugar canales catiónicos inespecíficos sensibles a la tensión membranal. En muchas células, hay una salida de Cl^- producida por hinchamiento

(50), que conduce a una despolarización, la cual posiblemente pueda activar a los canales Kv (canales de K^+ activados por voltaje), que son los candidatos a ser las vías por las que se sale el K^+ en estas células. Existe evidencia que respalda esta idea, proveniente de linfocitos T que carecen de la habilidad de regular el volumen, y que posteriormente adquieren esta habilidad al ser transfectados con el gen de los canales Kv 1.3 (51). En reportes recientes se muestra una modulación directa por condiciones hiposmóticas de los canales Kv en neuronas de hipocampo tipo RD, pero no en células piramidales (52).

II. Movilización de Ca^{2+}

En la mayoría de los tipos celulares, el hinchamiento hiposmótico provoca un aumento en la concentración de calcio intracelular, que proviene 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 de Ca^{2+} capacitativa, dependiendo del tipo celular. En astrocitos de cerebelo de rata la entidad molecular responsable de la entrada de Ca^{2+} no se ha identificado, lo único que se sabe es que no son canales dependiente de voltaje ni canales sensibles a estiramiento (53).

Esta respuesta tan conservada señala al Ca^{2+} como factor fundamental del DRV y del flujo de osmolitos. Los primeros trabajos realizados en células renales apoyaban este hecho, pero el estudio de este fenómeno en diversos tipos celulares ha permitido demostrar que el DRV es dependiente de Ca^{2+} en células epiteliales pero independiente en casi todos los demás tipos celulares. Posiblemente esta diferencia entre células epiteliales y no epiteliales se debe, principalmente, al canal de K^+ involucrado en el DRV. Estos canales de K^+ son del tipo BK, que se activan a concentraciones micromolares de Ca^{2+} y presentan una conductancia de 100-200 ps. Con base en esto, el hinchamiento en células epiteliales activa canales BK hiperpolarizando a la célula y posteriormente se activan los canales de Cl^- . En los demás tipos celulares, incluyendo astrocitos, la activación de la corriente de Cl^- precede a la de K^+ y en general ambas son independientes de Ca^{2+} .

II. Movilización del Cl⁻

Durante el DRV, el hinchamiento induce la liberación de Cl⁻, además del K⁺. Se ha visto que la salida de estos dos iones se lleva a cabo a través de la apertura selectiva de canales activados por hinchamiento, que funcionan como vías difusionales, los cuales son específicos para cada ion pero posiblemente interdependientes. Estudios electrofisiológicos de fijación de voltaje han demostrado que el Cl⁻ se sale de la célula por su propio canal (54). Esos canales muestran una rectificación saliente, con una conductancia unitaria de 40–50 pS a potenciales positivos y de 10-20 pS a potenciales negativos, con una inactivación dependiente de voltaje (generalmente mayor de +40 mV). El canal de Cl⁻ también es permeable a una variedad de aniones incluyendo los de gran tamaño como benzoato, tiocianato y sulfato (27). Los bloqueadores de canales de Cl⁻ tienen un efecto importante en el decremento regulador del volumen, lo que sugiere que su acción no sólo se restringe al flujo de Cl⁻ si no también afecta a otros osmolitos incluyendo aminoácidos, que son liberados de las neuronas por vías difusionales las cuales se ven afectadas por estos bloqueadores de canales de Cl⁻ (55).

El aumento de la permeabilidad aniónica se presenta en neuronas en respuesta a un incremento del volumen celular. Mientras que en condiciones isosmóticas la permeabilidad al Cl⁻ está restringida, durante condiciones de hinchamiento hiposmótico, esta permeabilidad se incrementa ocasionando que el flujo de K⁺ esté limitado por el flujo de Cl⁻ y de agua y consecuentemente por el decremento regulador del volumen (35).

Entre las moléculas que podrían actuar como canales de Cl⁻ durante el proceso de regulación del volumen se encuentran: 1) el canal CIC-2; 2) la glicoproteína-P; 3) ICl_n; 4) La Banda 3; 5) Fosfolema; 6) VDAC.

IV. Movilización de aminoácidos que funcionan como osmolitos

Los mecanismos de movilización de los osmolitos orgánicos en el DRV aun no están totalmente identificados. Se ha demostrado que la exposición de diferentes tipos celulares a medios hiposmóticos produce un incremento en los flujos de aminoácidos y otras

moléculas orgánicas a través de la membrana. En estudios cuantitativos sobre la magnitud de la pérdida de aminoácidos en el DRV se ha demostrado que la liberación de taurina en respuesta al cambio de volumen es independiente del Na^+ extracelular y de la temperatura, lo que descarta la participación del transportador de este aminoácido dependiente de Na^+ como mecanismo de movilización de taurina. Se ha encontrado, en cambio, que el movimiento de taurina en respuesta al aumento en el volumen es dirigido por su gradiente de concentración a través de vías difusionales (56).

Del total de aminoácidos que existen en la naturaleza sólo algunos (alanina, glicina, taurina, ácido glutámico, ácido aspártico, β -alanina y prolina) son de importancia cuantitativa para la regulación del volumen celular. El uso consistente de uno o más de estos aminoácidos por muchos grupos de organismos, sugiere que tienen características compatibles con la función de la regulación del volumen celular (18).

En este sentido, una de las moléculas osmoefectoras especialmente importante es la taurina. Este compuesto es un β -aminoácido sulfónico producto del metabolismo de la cisteína, que se encuentra presente en las células animales desde los grupos más sencillos hasta los más complejos. Se acumula intracelularmente y el gradiente de concentración de mantiene por un transportador dependiente de Na^+ (57). La taurina cumple todos los requisitos de un osmolito ideal: es movilizada a través de la membrana en respuesta a cambios en la osmolaridad y en la composición iónica; debido a su naturaleza electroneutra puede acumularse en el citosol sin alterar el potencial de membrana ni otros procesos celulares; metabólicamente es inerte, no forma parte de proteínas y el costo energético en su producción es muy bajo ya que es un producto final del metabolismo; su único papel bioquímico es la conjugación con el ácido cólico para formar el ácido taurocólico. Por el contrario, todos los otros aminoácidos usados como osmolitos tienen importancia en diversas funciones metabólicas y como transmisores sinápticos, por lo que su concentración y movilización está estrictamente regulada.

En estudio realizados por Sanchez-Olea y col. (50) se muestra una gran similitud en la sensibilidad farmacológica de los flujos de taurina y de Cl^- activados por hiposmolaridad, a las de los canales de Cl^- que son inhibidos por bloqueadores específicos de los mismos.

Además, se observó un efecto de inhibidor de la salida de Cl^- y de taurina por ácidos grasos poliinsaturados.

Esta vía de movilización para los osmolitos sugiere que es un canal poco selectivo, y los aminoácidos neutros pueden ser transportados a través del mismo. La evidencia que sustenta esta idea proviene de los estudios realizados por Banderalli y Roy (58) en células MDCK, en donde observaron corrientes de aminoácidos a través de canales aniónicos de rectificación saliente activados por hiposmolaridad. Esta relación entre los flujos de Cl^- y de taurina posiblemente se deba a: 1) que las vías estén interconectadas, 2) que utilicen la misma vía, o 3) que sean diferentes vías pero sensibles a los mismos compuestos.

7- FISILOGIA DE LA RETINA

La retina es una estructura muy especializada cuya función consiste en convertir la luz en señales eléctricas que procesan las neuronas. La retina es una extensión periférica del sistema nervioso central. Es un tejido neural delgado que en muchas especies recibe nutrientes de la coroides pasando por el epitelio pigmentado de la retina. Como consecuencia, la retina es accesible para la experimentación in vivo e in vitro y puede ser manipulada química y farmacológicamente administrando sustancias por el vítreo o en medios de incubación. Su capacidad para procesar el estímulo luminoso, transformarlo y transmitirlo a través de distintas capas celulares está intacta en los sistemas in vitro, por lo que es un excelente modelo para el estudio de los mecanismos de transmisión que participan en la comunicación intercelular por neurotransmisores o neuromoduladores (59).

Comparada con estructuras del cerebro, la retina es relativamente simple. Está formada por seis tipos de neuronas: los fotorreceptores (conos y bastones), las células bipolares, las horizontales, las amacrinas, las interplexiformes y las ganglionares. El tipo principal de célula glial es la célula de Müller, que se extiende desde la membrana limitante interna hasta la membrana limitante externa, en donde rodea al segmento interno de los fotorreceptores (Figura 4).

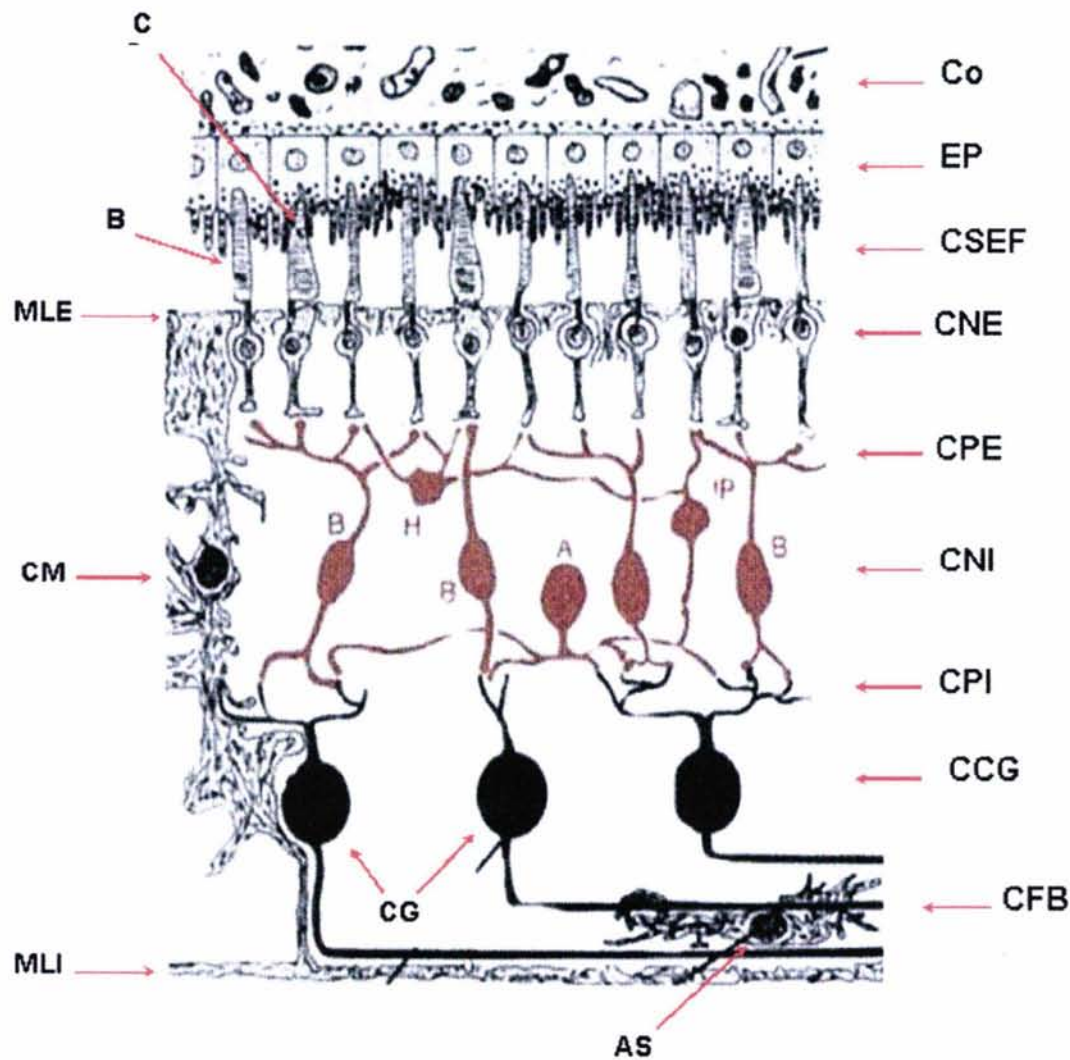


Figura 3. Diagrama esquemático mostrando la organización celular y el arreglo de las capas celulares en la retina de vertebrados. Ebreviaciones: Co, coroides; EP, epitelio pigmentario; CSEF, capa de los segmentos externos de los fotorreceptores; MLE, membrana limitante externa; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CCG, capa de las células ganglionares; CFB, capa de las fibras nerviosas; MLI, membrana limitante interna. C, cono; Ba, bastone; CM, célula de Müller; B, células bipolares; H, célula horizontal; A, célula macrina; IP, célula interplexiforme; CG, célula ganglionar; AS, astrocito.

La retina tiene una estructura estratificada, con una organización separada para los somas celulares (capas nucleares) y las terminaciones sinápticas (capas plexiformes). 1) La capa del epitelio pigmentado de la retina, la cual está en íntimo contacto con el segmento externo de los fotorreceptores; 2) La capa de los segmentos externos, conos y bastones; 3) La membrana limitante externa, formada por lo procesos apicales de las células de Müller, que

están contiguos al segmento interno de los fotorreceptores; 4) La capa nuclear externa, compuesta por los núcleos de los fotorreceptores; 5) La capa plexiforme externa, formada por las terminaciones sinápticas de los fotorreceptores, las células bipolares y las células horizontales; 6) La capa nuclear interna, en donde se localizan los cuerpos de las células bipolares, horizontales y amacrinas. También se localizan en esta capa los somas de las células interplexiformes que son aquellas que conectan con las capas plexiforme externa e interna en algunas especies; 7) La capa plexiforme interna es otra región sináptica donde establecen los contactos sinápticos las células bipolares, amacrinas y las ganglionares; 8) La capa de células ganglionares, cuyos axones forman el nervio óptico; 9) La membrana limitante interna, constituida por los procesos basales de las células de Müller, que forman la interfase retino-vitreal (59) (Figura 3).

Los fotorreceptores son de dos tipos, los conos y los bastones. Los bastones son sensibles a bajos niveles de luz, mientras que los conos se estimulan a intensidades de luz alta y además están especializados en la visión a color. Funcionalmente los fotorreceptores se conectan con las células bipolares y las células ganglionares formando una vía de transmisión directa excitadora. Esta vía está modulada por las interneuronas, células horizontales y células amacrinas.

Como se mencionó anteriormente, la retina de los vertebrados es un tejido neural delgado que fácilmente se puede extraer, por lo que se puede contar con un circuito neuronal íntegro, que la hace un buen modelo para el estudio de los mecanismos de regulación que participan en la comunicación interneural por neurotransmisores o neuromoduladores, haciéndola accesible para la experimentación *in vivo* e *in vitro*.

La retina contiene tanto sinapsis eléctricas (uniones comunicantes) como sinapsis químicas, con mayor predominancia de estas últimas. Las sinapsis eléctricas se forman generalmente entre neuronas del mismo tipo, como es el caso de los fotorreceptores y células horizontales. En los fotorreceptores existen dos tipos de sinapsis químicas con una morfología distinta, las sinapsis que presentan una estructura característica llamada cinta sináptica y las sinapsis basales. Las sinapsis con cinta sináptica funcionan entre conexiones de células bipolares y células amacrinas y ganglionares postsinápticas. Las sinapsis basales

se establecen específicamente entre conos y células bipolares OFF. Las terminales sinápticas de las células bipolares contienen, al igual que los fotorreceptores, la cinta sináptica, además de contactos convencionales. Los fotorreceptores liberan principalmente ácido glutámico y ácido aspártico en forma tónica en la oscuridad. La función de la taurina en estas células podría estar asociada con los mecanismos del control del volumen celular(60).

Además de los neurotransmisores clásicos la mayor parte de los estratos celulares de la retina contienen taurina. El 80% de la taurina se encuentra en los fotorreceptores. Su función precisa en la retina desconoce. Se ha propuesto que participa manteniendo la estructura y la viabilidad de los fotorreceptores, con un mecanismo poco claro. En experimentos usando dietas deficientes de taurina se observó una desorganización del segmento externo del fotorreceptor lo que conlleva a una subsecuente muerte celular y esto a la pérdida de la visión. Una propuesta que cuenta con evidencia experimental sólida es que la taurina participa como un osmolito en el control del volumen celular, que se describe en la siguiente sección

8. EDEMA CELULAR EN LA RETINA

Como se mencionó anteriormente, el edema isosmótico en el cerebro está asociado a patologías como isquemia, encefalopatía hepática, y epilepsia. En la retina existen algunas patologías a las que se asocia un incremento de volumen celular; entre ellas pueden citarse la degeneración retiniana subsecuente a la uveítis, glaucoma, retinopatía diabética y retinopatía hipertensiva. Los cuadros de isquemia y reperfusión son causa de edema y degeneración macular. Los mecanismos que generan edema en estas condiciones son, en general, los procesos que se asocian a un cuadro isquémico en el cerebro.

I. Edema Anisomótico

Estudios realizados por Morán y col. (61), indican que al exponer la retina de rata a una reducción en la osmolaridad se produce una rápida liberación de taurina acompañada de un aumento en el volumen celular. Aun no se tienen identificadas cuáles son las neuronas que

liberan taurina subsecuentemente a una estimulación con hiposmolaridad. En las retinas de rata incubadas con luz hay una gran captura de taurina por los fotorreceptores, las células amacrinas, las células bipolares y las células de Müller, por lo que el hinchamiento asociado a la liberación de taurina puede ocurrir en cualquiera de estas células.

La liberación de taurina estimulada por hiposmolaridad en la retina de rata se inhibe con bloqueadores de canales de Cl^- (61), como sucede en la liberación de taurina estimulada por hiposmolaridad en astrocitos y células granulares en cultivo (62); esto demuestra el parecido en el mecanismo de liberación de taurina en estas células y en la retina de rata. Existe una diferencia en la liberación producida por hiposmolaridad y la producida por alto K^+ , siendo mucho mayor en condiciones hiposmóticas. Esta diferencia se debe posiblemente a que el hinchamiento es más rápido en el primer caso.

II. Edema Isosmótico. Condiciones de alto K^+ extracelular

El hinchamiento producido en las células retinales en respuesta a los altos niveles de K^+ extracelular fue descrito por primera vez por Olney (63) en retinas de embriones de pollo, quien observó que este efecto del K^+ es independiente de Ca^{2+} , y se previene al quitar el Cl^- del medio. Posteriormente los experimentos realizados por Domínguez y col. (64) mostraron que hay dos componentes en la liberación de taurina estimulada por K^+ en la retina de pollo: el primer componente es dependiente de Ca^{2+} y probablemente esta relacionado con la despolarización de la membrana, y el segundo componente es independiente de Ca^{2+} y dependiente de Cl^- ; este último se relaciona con los cambios en el volumen celular que se generan en respuesta a un incremento extracelular de K^+ . El cambio en el volumen celular producido por alto K^+ se debe a la acumulación intracelular de este ion en las células, seguido por el Cl^- , y osmóticamente obligada, el agua. Este hinchamiento se previene al reemplazar el Cl^- por aniones impermeables como los gluconatos (65, 23)

Se sabe que altas concentraciones de K^+ extracelular producen una despolarización de las membranas celulares y promueve la liberación de transmisores. La dependencia de Ca^{2+} en este proceso se considera como evidencia para relacionar la neurotransmisión con un estímulo de secreción acoplado a ella. Estudios realizados por López-Colomé y col. (66)

muestran que la liberación de taurina estimulada por alto K^+ presenta algunas propiedades diferentes a las que exhiben la liberación de los aminoácidos neurotransmisores.

La liberación de taurina estimulada por alto K^+ en la retina de rata difiere en algunos aspectos de la retina de pollo. Una de estas diferencias es el hecho de que en la rata la liberación de taurina por alto K^+ muestra una respuesta inducida por despolarización, la cual es dependiente de Ca^{2+} y no se afecta al quitar el Cl^- del medio o por hiposmolaridad. Sin embargo, ambas retinas presentan una sensibilidad al volumen y una independencia de Ca^{2+} en el mecanismo de liberación de taurina (64). Estas observaciones sugieren la existencia de dos pozas de taurina en la retina de pollo que responden al estímulo con alto K^+ : una relacionada con el hinchamiento y otra con la despolarización, en comparación con la retina de rata que sólo contiene la poza sensible al hinchamiento. La liberación de taurina en astrocitos (62) y en células granulares en cultivo (67), es muy parecida a la observada en la retina de rata, mientras que la que se presenta en células corticales (68) es similar a la retina de pollo. Estas diferentes formas de liberación de taurina se pueden considerar como un indicador de la existencia de varias pozas de taurina en el tejido nervioso, las cuales participan en la actividad sináptica y también en los procesos de regulación del volumen. Además se ha observado la liberación de taurina en respuesta a condiciones de hinchamiento producidas por cuadros de isquemia (69) y de excitotoxicidad (70). El hinchamiento característico del daño retinal producido por condiciones de excitotoxicidad (generado por aminoácidos excitotóxicos) y de alto K^+ es dependiente de Cl^- y de Na^+ pero independiente de Ca^{2+} , lo que conduce a pensar que el componente de liberación de aminoácidos (GABA y taurina) muestra los mismos requerimientos iónicos, relacionándolo con un desbalance iónico y el hinchamiento celular y no con la respuesta sináptica de neurotransmisores (23).

Teniendo en cuenta los antecedentes acerca de que el hinchamiento induce la liberación de iones y de aminoácidos como parte del proceso del DRV en diferentes tipos celulares, el presente trabajo tuvo como objetivo principal **a) Estudiar los mecanismos y las vías de señalización que relacionan la liberación de osmolitos con el edema celular en la retina. b) Caracterizar la vía de movilización de Cl⁻ bajo condiciones de edema isosmótico. c) Explorar diversas estrategias de protección.** Con tal finalidad se establecieron los siguientes objetivos específicos:

1. Comparar los mecanismos de movilización de aminoácidos que funcionan como osmolitos, en modelos de hinchamiento hiposmótico e isosmótico.
2. Examinar el efecto de los cuadros que reproducen alguna de las condiciones presentes en la isquemia y la excitabilidad sobre la liberación de aminoácidos excitadores, que pueden contribuir a la muerte celular. Sustentar la propuesta de que una parte de esta liberación es consecuencia del hinchamiento celular.
3. Explorar la hipótesis de que la entrada de Cl⁻ responsable del incremento en el volumen celular en condiciones de hinchamiento isosmótico, tiene lugar a través de vías difusionales similares a las que regulan la movilización del Cl⁻ y aminoácidos durante al hinchamiento por hiposmolaridad. De comprobarse esta hipótesis, el estudio se centrará en la caracterización de estas vías, buscando su identificación molecular y farmacológica.
4. Determinar y comparar los posibles mecanismos que participan en la regulación de las vías de movilización de osmolitos orgánicos en condiciones de hinchamiento hiposmótico e isosmotico, en la retina.
5. Establecer estrategias de protección en condiciones de edema isosmotico, principalmente en procesos que ocurren durante la isquemia.

PRIMERA PARTE

Los amino ácidos juegan un papel importante en el proceso de regulación del volumen celular en respuesta a un hinchamiento producido por condiciones hiposmóticas. De los aminoácidos que funcionan como osmolitos, la taurina es particularmente importante debido a sus propiedades osmoprotectoras (ver introducción). En contraste con otros aminoácidos como el ácido glutámico que, a diferencia de la taurina, genera condiciones de excitotoxicidad (71). Puede darse lo mismo para los osmolitos inorgánicos como el K^+ y Cl^- , los cuales se movilizan en los tejidos excitables como parte del mecanismo de corrección del volumen celular, lo que conduce a cambios drásticos en la excitabilidad de las células. La participación de la taurina y de otros aminoácidos como osmolitos en la retina no ha sido muy estudiada. Esto es de gran importancia, debido a que se ha asociado el edema de las células retinales con patologías como la isquemia, degeneración de la mácula y cuadros de lipoperoxidación durante la uveítis (72, 73, 74, 75). Esto es aún más grave por una liberación osmosensible de ácido glutámico, el cual exacerba el daño. En esta primera parte del proyecto se examinó la participación de aminoácidos como osmolitos en la retina. El primer paso fue caracterizar la liberación de los aminoácidos en respuesta a un estímulo hiposmótico, para posteriormente compararla con la liberación en respuesta a un incremento de K^+ extracelular, como sucede en la isquemia. Los aminoácidos seleccionados para este estudio fueron: 1) taurina, 2) GABA y 3) ácido glutámico.

RESULTADOS:

Los resultados de esta primera parte se anexan a continuación en el artículo correspondiente.

Artículo 1

Pasantes-Morales H, Ochoa de la Paz LD, Sepúlveda J and Quesada O. 1999. Amino Acids as Osmolytes in the Retina. Neurochem Res. 11: 1339-1346.

Amino Acids as Osmolytes in the Retina*

H. Pasantes-Morales,^{1,2} L. D. Ochoa de la Paz,¹ J. Sepúlveda,¹ and O. Quesada,¹

(Accepted March 4, 1999)

Amino acids play a role as osmolytes during the regulatory volume decrease subsequent to hyposmotic swelling, but less is known about its role when swelling occurs in isosmotic conditions. In this work we examined the efflux of labelled GABA, taurine and glutamate (traced as D-aspartate) from the chick retina, after isosmotic swelling evoked by KCl-containing solutions, and compared its features to those in hyposmotic swelling. In both conditions, GABA and taurine efflux were more sensitive to swelling than glutamate, as assessed by the activation threshold and the amount released. The amino acid efflux in hyposmotic media was decreased by DIDS, tamoxifen and NPPB, agents acting as Cl channels blockers, which also inhibit the osmosensitive Cl efflux. The component associated with swelling in the KCl-stimulated efflux was assessed by the reduction observed when Cl is replaced by an impermeant anion, or by the influence of hyperosmotic media. GABA and taurine efflux exhibited a large swelling-dependent component, which was lower for D-aspartate. This component was markedly decreased by NPPB, but this was due to an effect of the blocker preventing swelling. These results suggest that the influx of Cl, acting as K counterion, which is responsible for cell swelling, occurs through a pathway sensitive to NPPB, similarly to that activated by hyposmolarity. This finding may be of interest in studies aiming at preventing the cell edema which occurs in a number of pathologies.

KEY WORDS: Retina; swelling; edema; amino acids; GABA; taurine.

INTRODUCTION

The ability of cells to respond by rapid and efficient regulatory mechanisms to changes in cell volume elicited by anisomotic extracellular conditions is not restricted to species normally exposed to fluctuations in osmolarity of their environment, but appears to be a biological trait tightly preserved through evolution (1). Cell volume recovery which occurs subsequent to swelling in hyposmotic solutions is an active process accomplished by extrusion of intracellular osmotically active solutes through pathways activated by the cell

volume change. The inorganic ions K and Cl, present in high intracellular concentrations, and organic molecules such as amino acids and polyalcohols, serve this function of osmolytes in most cells. Among amino acids functioning as osmolytes, taurine is particularly important. Taurine has features which are quite unusual for a biological molecule: it is an amino acid but do not participate in protein building, it is accumulated in large amounts particularly in excitable tissues, largely free in the cytosol (2). In those tissues where it is highly concentrated, taurine turnover is extremely low, of about 7–10 days; it is metabolically inert, being involved only in the synthesis of taurocholic acid (2). A switterion at physiological pH, taurine does not carry any net charge. All these properties, fit very well with a function as an osmolyte, placing taurine in a very favorable position as one of the best, if not the best, osmolyte molecules, since it may move from inside to outside the cell or between intracellular com-

¹ Institute of Cell Physiology, Department of Biophysics, National University of Mexico, Mexico City, Mexico.

² Address reprint requests to: Herminia Pasantes-Morales, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apartado Postal 70-253, México, 04510, D.F. Mexico. Tel: (525) 622-5608; Fax: (525) 622-5607 E-mail: hpasante@ifisiol.unam.mx

*Special issue dedicated to Dr. Nico M. van Gelder.

partments, with osmotic purposes, without affecting the cell metabolism nor modifying the membrane potential. This is not the case for other amino acids, which also function as osmolytes, such as glutamic acid, which in contrast to taurine, may be harmful to the cell, creating well known situations of excitotoxicity (3). The same is true for the ionorganic osmolytes, K and Cl, which if mobilized in excitable tissues as part of the mechanism of cell volume correction, lead to dramatic changes in excitability.

The first studies directed to demonstrate a role for taurine as an osmolyte in nervous tissue were those by Thurston et al., (4) showing a decrease of brain taurine in rats with experimental hyponatremia. This early study was followed some years later by those of Wade et al. (5), Martín del Rfo et al. (6) *in vivo*, and Pasantes-Morales and Schousboe in cultured astrocytes (7). A large number of recent work have confirmed the role of taurine as an osmolyte in many tissues and cells other than the nervous tissue (8).

The importance of taurine as an osmolyte in brain was stressed almost ten years ago by van Gelder (9), who made the interesting remark about a need of continuous volume adjustment in brain by both glucose uptake and metabolism and pointed out the linear relationship which exists between brain taurine content and cerebral glucose consumption. This linearity is observed in the brain of species such as the human, containing low amounts of taurine, and the mouse with some of the largest brain taurine contents (9).

Taurine may play a role as osmolyte in the retina, in which its concentration is among the highest found in animal tissues (2,10). It is also remarkable that even when the taurine concentration in tissues varies among the species, it is remarkably similar and high in the retina of most species so far examined (11). Taurine is found to be accumulated in the nuclear layers (cell layers) rather than in the plexiform layers (12). Photoreceptors are among those retinal cells exhibiting the highest taurine levels. The involvement of taurine and other amino acids as osmolytes in the retina has not been closely examined. This is interesting because retinal cell edema is associated with pathologies such as ischemia and reperfusion during diabetic retinopathy, macular edema and neurodegeneration, and edema related to lipoperoxidation in uveitis (13-15). This may be further complicated by an osmosensitive release of glutamic acid increasing damage by excitotoxicity. The ability of cells to deal with hyposmotic or isosmotic edema has not been investigated in detail. In this work, the efflux of amino acids presumably acting as osmolytes was examined in the chick retina. The effect of hyposmotic conditions on

amino acid release and some features of the efflux pathway were characterized. Amino acid release evoked by swelling induced by high concentrations of KCl, as occur in ischemia, was also examined and its properties compared to those of the anisosmotic-evoked efflux. This work extends our previous results about taurine release in the retina (16) and in cultured astrocytes and neurons (8).

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Tissue Isolation and Media. Dark-adapted, 1-5 days old chicks were killed by decapitation and the eyes enucleated under dim light. The retinas free of pigment epithelium, were carefully excised and immediately submerged into cold, isosmotic control medium (CM), which contained (in mM): NaCl, 135; KH_2PO_4 , 1.17; KCl, 4.7; CaCl_2 , 1; glucose 5; MgSO_4 1.17; HEPES 10, pH 7.4; osmolarity was 300 mOsmol. Hyperosmotic media (400 mOsmol), were prepared rising NaCl concentration or adding 100 mM sorbitol or raffinose; hyposmotic media (265, 210 or 150 mOsmol/L) contained diminished NaCl concentration. Osmolarity of media was checked by freezing point osmometry and appropriately adjusted. The High K medium contained 54 mM KCl and 85 mM NaCl and was isosmotic. Chloride-free media were prepared with the corresponding gluconate salts; the Na-free one, substituting with N-methyl-D-glucamine (NMDG).

Amino Acid Release. Whole retinas were incubated in 1 ml of CM with either 1 μCi [^3H]taurine for 25 min, or 0.5 μCi [^3H]D-aspartate or [^3H]GABA for 15 min at 37°C and gentle shaking. After the loading period, tissues were washed three times with fresh, cold medium and transferred to individual superfusion chambers. All retinas were initially perfused 25 min with CM, after which a stable release was normally attained. Fractions were collected henceforth, the first 5 min with CM (baseline) and 10 min more with hyposmotic media (15, 30, or 50% hyposmotic) or high K isosmotic medium. At the end of the experiment, tissues were recovered, digested and counted for radioactivity content, along with the aliquots collected. Unless specified, data is reported as % of radioactive tracer present in each fraction, of the total accumulated during the loading period. When the effects of Cl channels blockers were examined, they were preincubated 5 min before the baseline period and henceforth. The agents tested were DIDS (4,4-Diisothiocyanato-stilbene-2,2-disulfonic acid) 1mM, Tamoxifen 100 μM and NPPB (5-nitro-2-[3-phenylpropylamino] benzoic acid) 100 μM . An unpaired Student t-test was applied to assessed statistical significance.

Histological Study. Some retinas were cut in 3 equal, concentric triangles, and pieces exposed to one of the following media: CM, high K medium, or high K plus NPPB (100 μM). After 30 min tissues were recovered, and fixed 1 hr in glutaraldehyde 3% at room temperature, then washed 45 min in phosphate buffer (0.01M) and kept overnight in 30% sucrose. Next day tissues were cut, stained with toluidine blue and examined under a light microscope.

RESULTS AND DISCUSSION

Exposure of the chick retina to media of decreased osmolarity led to a prompt efflux of taurine, GABA and glutamate (traced as D-aspartate). The amount, rate and

onset of the efflux were dependent on the magnitude of the decrease in osmolarity. The release of GABA and taurine was more sensitive to the decrease in osmolarity than that of D-aspartate. Fig. 1 A-C shows the response of the amino acids to mild decreases in osmolarity, of 15% and 30%. In the first condition, no efflux of D-aspartate was activated (Fig. 1A) and that of GABA was only marginal, whereas taurine efflux was clearly increased. Decreases in osmolarity of 30% or 50% always led to markedly higher efflux of GABA and taurine as compared to that of D-aspartate (Figs. 1, 2). All experiments thereafter were carried out using 50% hyposmotic solutions. In this condition, the efflux pattern and the amount released showed some differences between the three amino acids. Taurine and D-aspartate

exhibited a more rapid onset, whereas that of GABA was delayed by about 2 min (Fig. 2). For the amount released, taurine and GABA were similar, with a maximal fraction release of about 10% at the peak and a total net efflux (stimulated minus basal release) of about 43 and 45%, respectively, in the 10 min of the experiment. As for D-aspartate, the peak release fraction was only of about 5% and the total amount released was not higher than 16%. This result contrasts with observations in cultured astrocytes and neurons, where such differences are not that notable (17,18).

The osmosensitive efflux of the three amino acids was only marginally decreased (10%–15%) in the absence of external Ca (results not shown). Replacing Cl in the external medium notably increased the amino

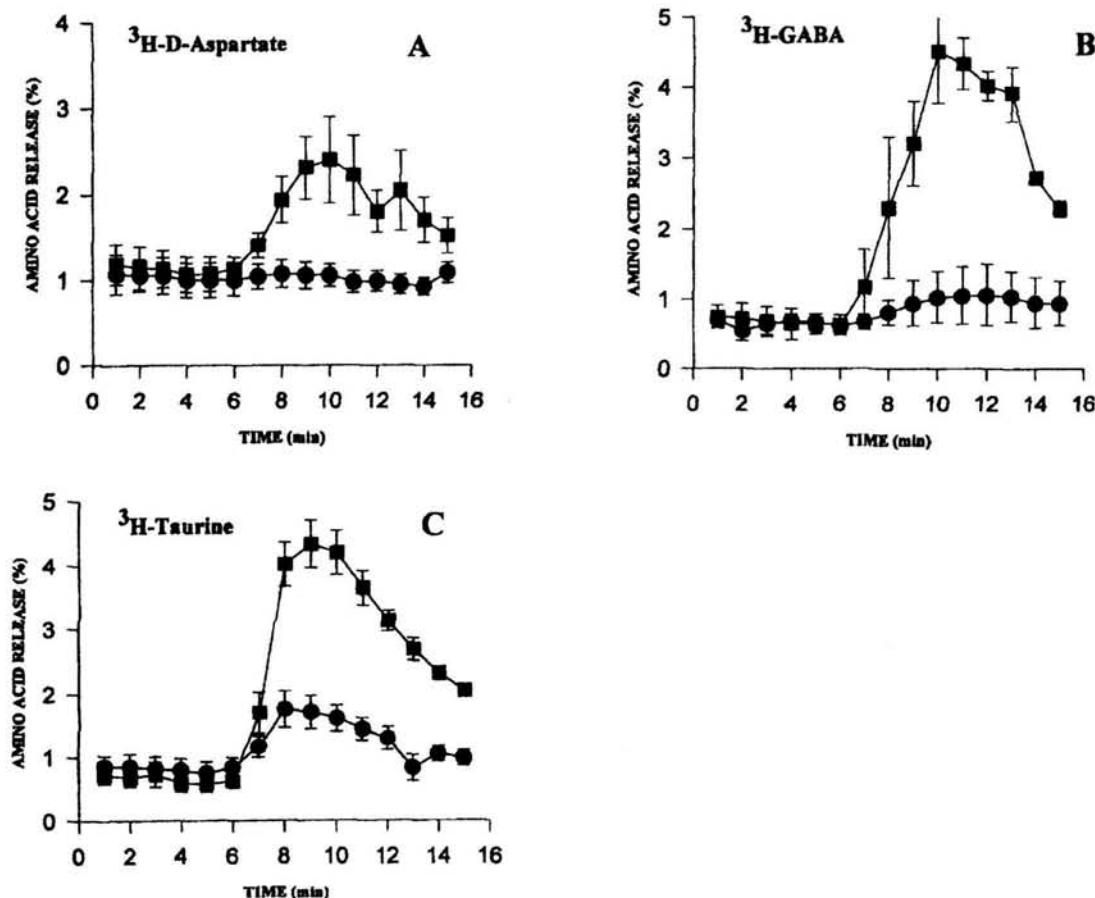


Fig. 1. Fractional release of [³H]D-aspartate, [³H]GABA and [³H]taurine from chick retinas induced by hyposmotic media. Isolated whole retinas from 1-5 days old chicks were loaded with 0.5–1 μCi of [³H]D-aspartate (A), [³H]GABA (B) or [³H]taurine (C) in isosmotic media at 37°C. Then, retinas were washed and superfused with the same medium until a stable efflux was attained. After 5 min baseline collection, media were switched to a 15% (●) or 30% (■) hyposmotic and superfusion continued for 10 min. Data represents the radioactivity released per min expressed as % of the total incorporated and are means ± SE of 4 separate experiments.

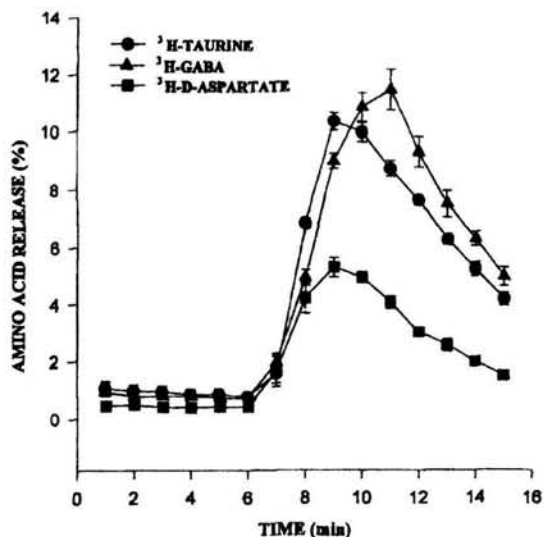


Fig. 2. Fractional release of [3 H]-aspartate, [3 H]-GABA and [3 H]-taurine from chick retinas exposed to 50% hyposmotic medium. Experimental procedure was as fig. 1, but stimulating the tissues with a 50% hyposmotic medium. Data are expressed as in fig. 1 and are means \pm SE of 4 separate experiments.

acid efflux whereas replacing Na by non permeant cations had no influence (results not shown). The osmosensitive efflux of taurine in other preparations, including cultured brain cells, is markedly decreased by Cl channel blockers, such as NPPB, Tamoxifen or DDF (19). The amino acid release from retina was also sensitive to these agents (Fig. 3, although the inhibitory effect was lower than in cultured cells. This may be due to the accessibility of the drugs, which is likely higher in the monolayer than in an integrated tissue. The effect of these agents, as well as results from electrophysiological studies (20), have suggested that amino acids, even without net charge, could permeate through an anion channel with low selectivity. Blockers of the anion exchanger such as niflumic acid and DIDS are also effective inhibitors of Cl outflow and efflux of amino acids in cultured cells. Fig. 3 shows that DIDS was also an efficient blocker of the osmosensitive amino acid efflux. These results point to a similarity of the mechanisms in charge of mobilizing amino acids during volume adjustment in the retina and in cultured brain cells, and emphasize the biological preservation of this essential feature of animal cells.

Once the basic properties of the amino acid efflux in hyposmotic swelling were established, the effect of swelling in isosmotic conditions was next examined. The occurrence of a swelling component of the K-stimulated release of GABA and taurine from

retina is known since our early work (21,22). Potassium concentrations exceeding those required for depolarizing excitable tissues, have an effect increasing the cell water content. Accumulation of K together with Cl as counterion and osmotically obliged water, is responsible for this swelling, which, consequently, is prevented by replacing Cl by an impermeant anion. The mechanism of K and Cl influx is not fully understood. There is evidence suggesting that KCl accumulation is the result of both, the activation of electroneutral cotransporters and diffusional pathways governed by the Donnan forces (23) whereas there is no information about the mechanisms of Cl entry.

There is no evidence of cell volume regulation in this model of cell swelling, at least in cultured cells (24). Due to the profound influence of altered cell volume in the physiology of nervous tissue, it is of interest to examine whether the mechanisms which are normally activated to accomplish the cell volume recovery after hyposmotic swelling are not working when it occurs as a consequence of ion accumulation. Therefore, one of the purposes of the present work is the comparison of the features of amino acid release activated by swelling in isosmotic conditions (KCl) and that elicited by hyposmotic solutions. Replacing the normal medium with 5 mM KCl by an isosmotic medium containing 54 mM KCl, induced an increase in the release of taurine, GABA and D-aspartate (Fig. 4, Control). The release time course was delayed with respect to that in hypo-

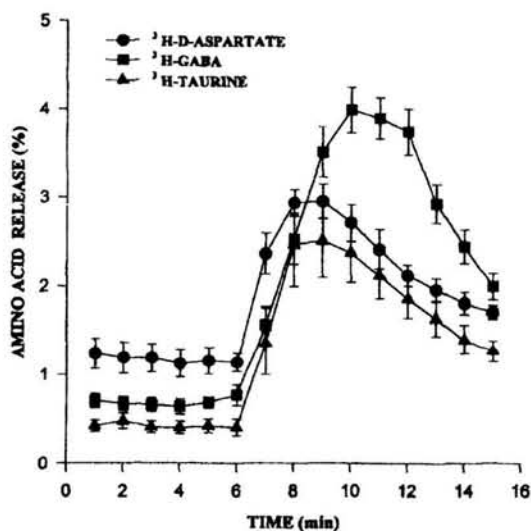


Fig. 4. Fractional release of [3 H]-D-aspartate, [3 H]-GABA and [3 H]-taurine from chick retinas induced by high [K^+] $_o$. Procedure was as described in Fig. 1, but the stimulus was an isosmotic medium with 54 mM KCl. Data are means \pm SE of 8 separate experiments.

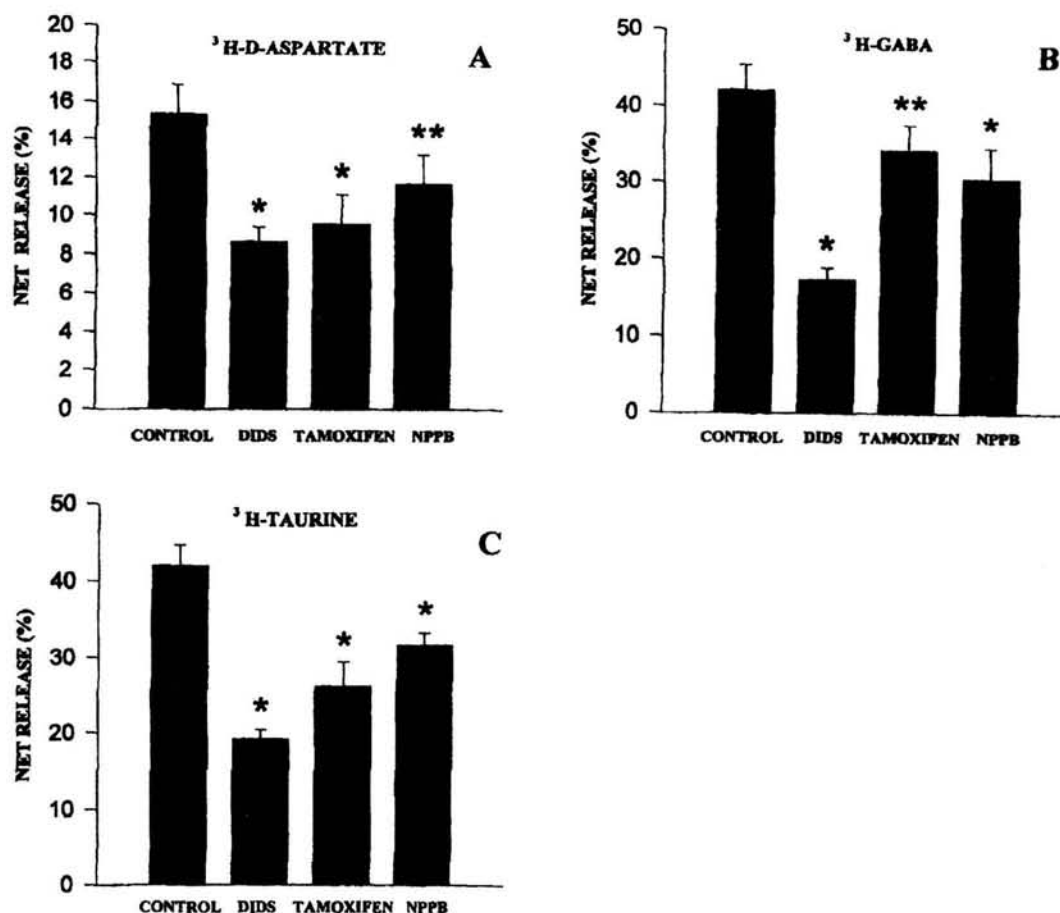


Fig. 3. Effect of different anion channel blockers on the swelling-induced released of aminoacids from isolated chick retinas. Experimental procedure as in Fig. 1, stimulating with a 50% hyposmotic medium without additions (Control), or in the presence of 1 mM DIDS, 100 μ M tamoxifen or 100 μ M NPPB. A: [³H]D-aspartate. B: [³H]GABA. C: [³H]taurine. Data are means \pm SE of the summed radioactivity released during the 15 min stimulation period (net release), expressed as percent of the total amount incorporated. $n = 12$ for controls and 4 for each experimental condition. * $P < 0.001$; ** $P < 0.002$.

smotic solutions, particularly for taurine and GABA efflux. The peak release was only at 4 min for taurine and up to 6 min in the case of GABA. This is consistent with a response associated with swelling occurring as consequence of ion accumulation, instead of just water entry, as in the hyposmotic conditions. About 10% of the D-aspartate labeled pool was released whereas this proportion was 23% and 19% for GABA and taurine, respectively. When the osmosensitive fraction of this release was eliminated in Cl-free media or in solutions made hyperosmotic with sucrose (Fig. 5), raffinose or NaCl (not shown), the release was reduced. The decrease observed was of about the same magnitude for taurine and GABA. In Cl-free media, GABA and taurine release decreased by 60% and 65%, respectively, and 68% and

66% in a hyperosmotic solution (Fig. 5B, C). The efflux of D-aspartate was less affected, with reductions of 55% and 35% in the Cl-free and hyperosmotic media, respectively (Fig. 5A). These results show the functioning of a mechanism for amino acid release in isosmotic swelling, which seems, however, insufficient to restore cell volume. Volume regulatory decrease is accomplished by the efflux of the most abundant intracellular ions, i.e. K and Cl and a number of organic molecules, including amino acids. The contribution of amino acids to the volume regulatory process is essentially determined by their concentration in a cell or tissue, their activation threshold and the proportion of the pool released upon swelling. Although amino acids are highly concentrated in the retina (10) and particularly GABA and

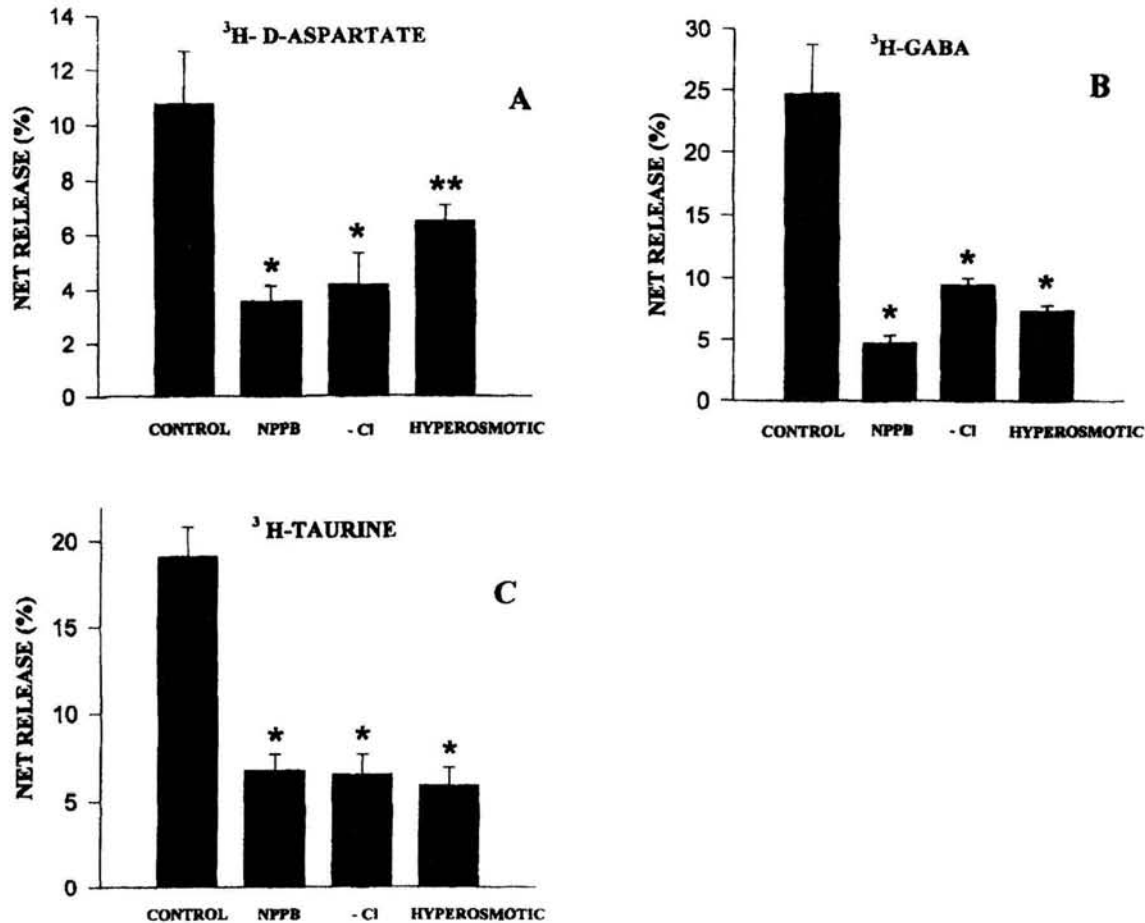


Fig. 5. Inhibitory effects of NPPB, chloride-free and hyperosmotic media on the high K^+ -induced release of aminoacids from chick retinas. Procedure as in fig. 1 but using a 54 mM K^+ medium as the stimulus. All experimental conditions were tested without preincubation. NPPB was tested at 100 μ M; chloride was substituted by the respective gluconate salts; the hyperosmotic medium (400 mOsmol) was made adding 100 mM sorbitol. Data are expressed as in fig. 4 (net release) and are means \pm SE of 4–12 determinations. * $P < 0.001$; ** $P < 0.002$.

taurine are released in substantial amounts (present results), it seems that when swelling is due to ion influx, the amount of water moved by amino acids may be limited, with no noticeable decrease in volume. The accumulation of intracellular ions instead of its decrease as occurs in hyposmotic swelling may, in addition, hamper the efflux of amino acids, since it has been suggested that the trigger for activation of the amino acid pathway is the decrease in ion strength (25). In view of these results, a better approach to efficiently counteract cell edema is to prevent ion accumulation. In this study we found a possible strategy. While characterizing the mechanism of the isosmotic swelling-activated amino acid release, we observed a strong inhibition by NPPB (Fig. 5), while histological examination of the retinas re-

vealed an unanticipated picture of some protective effect of NPPB on cell swelling, instead of the exacerbation expected if the osmosensitive amino acid efflux had been prevented by the inhibitor. Figure 6B shows the marked swelling and cell changes induced by solutions with high K concentration. Swelling was observed in the inner nuclear layer, mainly on the amacrine and horizontal cells, and in the inner plexiform layer, particularly in the region beneath the amacrines. Some swelling was also observed in the ganglion cells stratum and in the outer plexiform layer. Besides the increase in cell volume, some damage was observed at the inner cell layer. In the presence of NPPB, swelling in all layers was reduced, while cell damage in the outer cell layer was still apparent (Fig. 6C). A possible explanation for this result

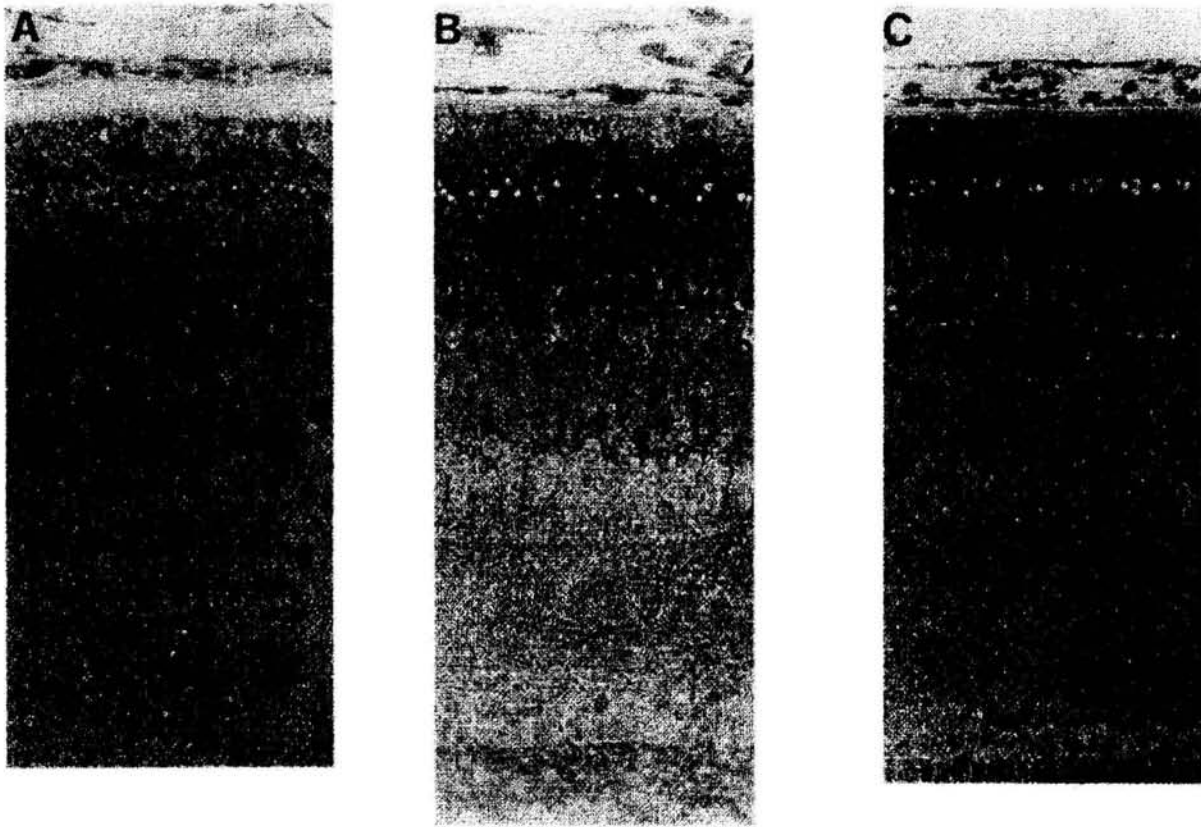


Fig. 6. Histological preparations from a single chick retina exposed to 54 mM K in the presence or absence of NPPB. **A:** Control section showing the typical somata and synaptic regions stratification. INL: Inner nuclear layer; IPL: Inner plexiform layer; GC: Ganglion cells. **B:** High K-treated preparation. Note the swollen amacrine cells (at the bottom region of the INL) and the dearangement of the superior somas above them. Some damage of the IPL is also observed. **C:** High K-treated preparation in the presence of NPPB. Most of the changes observed in B decreased in intensity or disappeared. All micrographs at the same magnification. Bar = 5 mm.

is that NPPB was blocking the Cl influx associated with K accumulation and therefore, the reduction in amino acid outflow would not be due to its effect on the release mechanism but rather to swelling prevention. In a report by Zeevalk et al. (26) it was shown that two compounds affecting Cl transport, DIDS and to a lesser extent, furosemide, protected retinas from the swelling component of excitotoxicity and also prevented the efflux of amino acids activated by swelling. This result was interpreted as involving anion exchangers or electroneutral cotransporters in the mechanism generating swelling. DIDS, like NPPB, but not furosemide, is also a blocker of the osmosensitive pathway for Cl and amino acids in cultured cells. Therefore, we suggest from these results, that the pathway responsible for Cl influx in isosmotic swelling is a leak pathway similar to that activated in the opposite direction during hyposmotic swelling. Some re-

cent reports have shown a marked decrease by Cl channel blockers, of excitatory amino acid efflux during ischemia (27,28). In view of the present results, this effect should be further investigated to clarify whether this decrease indeed represents a blockade of the amino acid outflow pathway or is an effect preventing Cl entry, which in turn leads to swelling. This interpretation may be of interest to prevent the swelling component which concurs in the complex pattern of toxicity associated with this and other pathologies.

ACKNOWLEDGMENTS

The excellent technical assistance of Dr. Rodolfo Paredes is appreciated. This research was supported by grants IN-201297 from DGAPA, UNAM, and 2262-PN from CONACYT, both from Mexico.

REFERENCES

1. Chamberlin, M. E., and Strange, K. 1989. Anisotonic cell volume regulation: a comparative view. *Am. J. Physiol.* 257: C159-C172.
2. Huxtable, R. J. 1992. Physiological actions of taurine. *Physiol. Rev.* 72:101-163.
3. Goldberg, M. P. and Choi, D. W. 1993. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J. Neurosci.* 13:3510-3524.
4. Thurston, J. H., Hauhart, R. D., and Dirco, J. A. 1980. Taurine: a role in osmotic regulation in mammalian brain and possible clinical significance. *Life Sci.* 26:1561-1568.
5. Wade, J., Olson, J., Samson, F., Nelson, S., and Pazdernik, T. 1988. A possible role of taurine in osmoregulation within the brain. *J. Neurochem.* 51:740-745.
6. Solís, J., Herranz, A., Herrerías, O., Lerma, J., and Martín del Rfo, R. 1988. Does taurine act as an osmoregulatory substance in rat brain? *Neurosci. Lett.* 91:53-58.
7. Pasantes-Morales, H., and Schousboe, A. 1988. Volume regulation in astrocytes: a role for taurine as osmoeffector. *J. Neurosci. Res.* 20:505-509.
8. Pasantes-Morales, H., and Schousboe, A. 1997. Role of taurine in osmoregulation: mechanisms and functional implications. *Amino Acids*, 12:281-292.
9. van Gelder, N. 1990. Neuronal discharge hypersynchrony and the intracranial water balance in relation to glutamic acid and taurine redistribution: migraine and epilepsy. Pages 1-20, in Pasantes-Morales, H., Martín, D. L., Shain, W. And Martín del Rfo, R. (eds.), *Taurine: Functional Neurochemistry, Physiology and Cardiology*. Wiley-Liss, Inc., New York.
10. Pasantes-Morales, H., Klethi, J., Ledig, M., and Mandel, P. 1972. Free amino acids of chicken and rat retina. *Brain Res.* 41: 494-497.
11. Voaden, M. J., Lake, N., Marshall, J., and Morjaria, B. 1977. Studies on the distribution of taurine and other neuroactive amino acids in the retina. *Expl. Eye Res.* 25:249-257.
12. Orr, H. T., Cohen, A. L., and Lowry, O. H. 1976. The distribution of taurine in the vertebrate retina. *J. Neurochem.* 26:609-611.
13. Goto, H., Wu, G. S., Chen, F., Kristeva, M., Sevenian, A., and Rao, N. A. 1992. Lipid peroxidation in experimental uveitis: sequential studies. *Curr. Eye Res.* 11:489-499.
14. Ito, T., Nakano, M., Yamamoto, Y., Hiramitsu, T., and Mizuno, Y. 1995. Hemoglobin-induced lipid peroxidation in the retina: a possible mechanism for macular degeneration. *Arch. Biochem. Biophys.* 316:864-872.
15. Zhang, H., Agardh, E., and Agardh, C. D. 1991. Hydrogen peroxide production in ischaemic retina: influence of hyperglycemia and postischemic oxygen tension. *Diabetes Res.* 16:29-35.
16. Pasantes-Morales, H., Morán, J., and Hurtado, S. 1991. Similar properties of taurine release induced by potassium and hypotonicity in rat retina. *Exp. Eye Res.* 53:347-352.
17. Pasantes-Morales, H., Alavéz, S., Sánchez-Olea, R., and Morán, J. 1993. Contribution of organic osmolytes to volume regulation in rat brain cells in culture. *Neurochem. Res.* 18:445-452.
18. Kimelberg, H. K., Goderie, S. K., Higman, S., Pang, S., and Waniewsky, R. A. 1990. Swelling-induced release of glutamate, aspartate and taurine from astrocyte cultures. *J. Neurosci.* 10: 1583-1591.
19. Pasantes-Morales, H. 1996. Cell volume regulation in brain cells: cellular and molecular mechanisms. *Met. Brain Dis.* 11: 187-204.
20. Roy, G. 1995. Amino acid current through anion channels in cultured human glial cells. *J. Membr. Biol.* 147:35-44.
21. Pasantes-Morales, H., Domínguez, L., Montenegro, J., and Morán, J. 1988. A chloride-dependent component of the release of labeled GABA and taurine from the chick retina. *Brain Res.* 459:120-130.
22. Domínguez, L., Montenegro, J., and Pasantes-Morales, H. 1989. A volume-dependent chloride sensitive component of taurine release stimulated by potassium from retina. *J. Neurosci. Res.* 22:356-361.
23. Walz, W. 1987. Swelling and potassium uptake in cultured astrocytes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65:1051-1057.
24. Motais, R., Guizouarn, H., and Garcia-Romeu, F. 1991. Red cell volume regulation: the pivotal role of ionic strength in controlling swelling-dependent transport systems. *Bichim. Biophys. Acta*, 1075:169-180.
25. Emma, F., McManus, M., and Strange, K. 1997. Intracellular electrolytes regulate the volume set point of the organic osmolyte/anion channel VSOAC. *Amer. J. Physiol.* 272:C1766-1775.
26. Zeevalk, G. D., Hyndman, A. G., and Nicklas, W. J. 1989. Excitatory amino acid-induced toxicity in chick retina: amino acid release, histology, and effects of chloride channel blockers. *J. Neurochem.* 53:1610-1619.
27. Phillis, J. W., Song, D., and O'Regan, M. H. 1997. Inhibition by anion channel blockers of ischemia-evoked release of excitotoxic and other amino acids from rat cerebral cortex. *Brain Res.* 758:9-16.
28. Phillis, J. W., Song, D., and O'Regan, M. H. 1998. Tamoxifen, a chloride channel blocker, reduces glutamate and aspartate release from the ischemic cerebral cortex. *Brain Res.* 780: 352-355.

SEGUNDA PARTE

La regulación del volumen posterior a un estímulo hiposmótico, se genera por una liberación activa de iones y moléculas orgánicas (ver introducción), pero aún no está muy claro si estos mecanismos operan en condiciones isquémicas. La liberación de aminoácidos bajo condiciones isquémicas en preparaciones de cerebro está bien documentada, pero el mecanismo es aún controvertido, particularmente la contribución del hinchamiento a esta liberación. Las cascadas de señalización que transducen el cambio de volumen en la activación de las vías de liberación de osmolitos han sido estudiadas principalmente en condiciones hiposmóticas (76,77), mientras que en condiciones isquémicas el estudio de este tema es muy pobre sobre todo en el sistema nervioso (42). En esta segunda parte del proyecto se investigaron tres aspectos: 1) la presencia de un proceso de regulación de volumen en la retina, en respuesta a condiciones de hiposmolaridad y a un incremento de K^+ extracelular, 2) la contribución de los aminoácidos al proceso de regulación y 3) la existencia de elementos de señalización activados por el incremento de K^+ extracelular o el hinchamiento, y su participación en los mecanismos de liberación de aminoácidos.

RESULTADOS:

Los resultados de esta segunda parte se anexan a continuación en el artículo correspondiente

ARTICULO 2.

Ochoa-de la Paz LD, Lezama R, Torres-Marquez ME and Pasantes-Moreales H. 2002. Tyrosine Kinases and Amino Acids Efflux Under Hyposmotic and Ischaemic Conditions in the Chicken Retina. Pflügers Arch. 445: 87-96.

Lenin D. Ochoa de la Paz · Ruth Lezama ·
M. Eugenia Torres-Marquez ·
Herminia Pasantes-Morales

Tyrosine kinases and amino acid efflux under hyposmotic and ischaemic conditions in the chicken retina

Received: 31 March 2002 / Revised: 31 May 2002 / Accepted: 4 June 2002 / Published online: 28 August 2002
© Springer-Verlag 2002

Abstract The chicken retina was exposed to 20% hyposmotic or ischaemia-like (54 mM KCl and 1 mM ouabain) conditions and changes in cell volume, amino acid release and activation of protein tyrosine kinases measured. To investigate possible connection between these cellular events, the effect of tyrosine kinase blockers on ³fi-aurine, ³H-GABA and ³H-D-aspartate (as a tracer for glutamate) efflux was examined. Both hyposmotic and ischaemic conditions increased phosphorylation of the tyrosine kinase p125 focal adhesion kinase (p125^{FAK}) and the mitogen-activated protein kinase-p38 (MAPK-p38), but not of the extracellular-signal-related kinases-1/2 (ERK1/ERK2), and markedly activated the tyrosine kinase target enzyme phosphatidylinositide 3-kinase (PI3K). Hyposmolarity and ischaemia both led to rapid retinal swelling followed by active volume recovery of 84% (hyposmolarity) and 40% (ischaemia), together with rapid release of taurine, GABA and D-aspartate. Taurine and GABA efflux under both conditions was reduced markedly by tyrosine kinase and PI3K blockers (50 µM tyrphostin A23, 50 µM genistein, 100 nM wortmannin, 25 µM LY294002) and was decreased by 85% when ischaemia-induced swelling was prevented. About 65% of D-aspartate efflux occurred irrespective of swelling in ischaemia and was either less sensitive (hyposmotic) or largely resistant (ischaemia) to the blockers. These results suggest that in ischaemia, GABA and taurine react primarily to swelling with a typical osmolyte response, while glutamate differs in its release mechanisms under both hyposmotic and ischaemic conditions. These findings suggest new strategies for evaluating the contribution of swelling to excitotoxicity in ischaemia.

Keywords Amino acids · Ischaemia · Hyposmolarity · Swelling · Glutamate · Taurine · Tyrosine kinases · PI3K

Introduction

Amino acids are part of the pool of organic osmolytes contributing to volume regulation after hyposmotic swelling in most animal cells, including brain cells and retina [17, 21, 28, 29, 31]. Cells also swell under isosmotic conditions, such as ischaemia, due to ion redistribution followed by osmotically obligated water [14, 35], but it is unclear whether swelling under these conditions activates adaptive regulatory mechanisms for cell volume recovery similar to those in hyposmolarity.

Volume regulation following hyposmotic swelling is accomplished by the active extrusion of K⁺, Cl⁻, amino acids and other small organic molecules [17, 21, 31, 45], but it is unclear whether these mechanisms operate under ischaemic conditions, during which intracellular Na⁺ accumulated due to energy failure is followed by Cl⁻ influx and osmotically obligated water. The subsequent depolarization results in excessive extracellular K⁺ that, when removed by uptake, is also followed by Cl⁻ and water [13]. This could restrict the involvement of K⁺ and Cl⁻ as osmolytes but amino acid extrusion may contribute to some extent to cell volume adjustment or at least to attenuate the magnitude of swelling. The hyposmotic release of taurine has been studied extensively and occurs through a pathway sensitive to Cl⁻ channel blockers [17, 28]. Whether this is similar or different to the volume-sensitive Cl⁻ channel is still a matter of controversy [42]. It has been assumed that all amino acids, when mobilized as osmolytes, follow the same routes and have the same mechanisms. However, recent evidence showing important differences between taurine, a typical osmolyte, and glutamate [8], warrants a more detailed examination of this concept. The efflux of amino acids from brain preparations under ischaemic conditions is well documented but its mechanisms have still some controversial

L.D. Ochoa de la Paz · R. Lezama · H. Pasantes-Morales (✉)
Department of Biophysics, Institute of Cell Physiology,
School of Medicine, National University of Mexico,
Apartado Postal 70-253, 04510, México DF, Mexico
e-mail: hpasante@ifisiol.unam.mx
Fax: +52-55-6225607

M.E. Torres-Marquez
Department of Biochemistry, School of Medicine,
National University of Mexico, Mexico City, Mexico

aspects, particularly the contribution of swelling to this release.

The signalling cascades transducing the change in volume into activation of osmolyte pathways are still poorly defined for hyposmotic swelling [10, 30] and this aspect has been addressed only marginally for ischaemic swelling. The influence of tyrosine kinases in hyposmotic taurine efflux has been documented in cultured cells [11, 12, 40, 44] including brain cells [24] and brain preparations [3, 8]. In the ischaemic heart, the efflux of amino acids is also sensitive to tyrosine kinase blockers [41], but less is known about the effects of their agents in brain preparations.

In the present study in the retina, a model of ischaemia, consisting of exposure to a high extracellular $[K^+]$ and ouabain, was employed to establish whether volume regulation occurs and, if so, whether amino acid release contributes to this process. Efflux of labelled taurine, GABA and glutamate (traced as D-aspartate) was characterized in hyposmotic and ischaemic swelling, stressing the fact that a number of events concurrent with swelling under these conditions could trigger the release of amino acids serving both as osmolytes and neurotransmitters. Attempts were made to identify some elements of the tyrosine kinase signalling cascades activated by ischaemia or swelling and their link with amino acid release mechanisms.

Materials and methods

Chemicals

Tyrphostin A-23, genistein, PD98059, PD169316, SB203580, wortmannin and LY294002 were purchased from Calbiochem-Novabiochem (San Diego, Calif., USA). DIDS, 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid (NPPB), niflumic acid, phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), raffinose, protein A-agarose and Ponceau S were obtained from Sigma (St. Louis Mo., USA). 3H -3-O-Methyl-D-glucose was obtained from New England (Boston, Mass., USA). All salts used for the preparation of media were from Merck (Darmstadt, Germany). The antibodies used, anti-phospho-extracellular signal-related kinases (ERKs), anti-phospho-mitogen-activated protein kinase p38 (MAPK-p38), anti-MAPK-p38, anti-phospho Akt and anti-Akt, and the cell lysis buffer were from Cell Signalling Technology (Beverly, Mass., USA); anti-phospho tyrosine and anti-p125 focal adhesion kinase (p-125^{FAK}) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Calif., USA). The enhanced chemiluminescence (ECL) Western detection system was from Amersham Pharmacia Biotech.

Preparation and media

Young (1- to 5-day-old) chickens were dark-adapted and killed by decapitation and the eyes enucleated under dim red light. Retinas free of pigment epithelium were excised and submerged in cold isosmotic (300 mOsm/l) Krebs-HEPES medium (KH), containing (in mM): NaCl, 135; KH_2PO_4 , 1.17; KCl, 4.7; CaCl₂, 1; glucose, 1; $MgSO_4$, 1.17; HEPES, 10, pH 7.4. Hyposmotic media (-20%, 240 mOsm/l) were prepared by reducing the $[NaCl]$. Hyperosmotic media (400 mOsm/l) were made by adding 100 mM raffinose. Osmolarity was adjusted by freezing point osmometry (Osmette A, Precision Systems, Natick, Mass., USA). The medium for ischaemia-like conditions contained 54 mM KCl and 1 mM ouabain

(K/O), with an equiosmolar reduction of NaCl to maintain isosmolarity.

Tissue water content

Volume changes were assessed by the change in wet weight and 3H -3-O-methyl-D-glucose (3H -3-D-OMG) distribution [15, 19]. For wet weight determinations, initial wet weight was first obtained, then retinas were incubated in KH medium (control) or in the experimental media, for the appropriate times and weighed again for final wet weight. Changes in intracellular volume were assessed from the distribution of 3H -3-D-OMG as described in [15]. Retinas were incubated in the presence of 3H -3-D-OMG (0.5 μ Ci/ml) for 3 min. At min 2.5, 1 mM phloretine was added. Retinas were then washed (10–15 s) with KH medium, weighed, digested and radioactivity content measured.

Amino acid release

Retinas were incubated at 37 °C in 2 ml KH with labelled amino acids: 3H -taurine (1 μ Ci, 25 min), 3H -GABA or 3H -D-aspartate (0.5 μ Ci, 15 min). After the loading period, retinas were washed with fresh KH and transferred to individual superfusion chambers (0.8 ml volume). Retinas were superfused for 25 min with warm KH medium to reach stable release. Fractions were then collected every min for 3 min from retinas superfused with KH medium (baseline) and for 7 min from retinas superfused with hyposmotic or K/O media. At the end of the experiment the tissue was recovered, digested and counted for radioactivity, along with the aliquots collected. To test the effect of kinase blockers, retinas were preincubated with the different agents for periods of 30 min. For Cl⁻ channel blockers preincubation time was 15 min. All drugs were present in media throughout all the experiment. When required, drugs were dissolved in DMSO and in those cases, controls contained the corresponding concentration of the vehicle. DMSO final concentration never exceeded 0.025%. Unless specified, data are reported as the percentage of radioactivity present in each fraction of the total accumulated during the loading period.

Immunoprecipitation and Western blot analysis

Retinas submitted to the experimental conditions were lysed with ice-cold cell lysis buffer and 1 mM PMSF. The whole lysate was sonicated by three 30 s cycles, precipitated with acetone (vol/vol) at 4 °C for 10 min and centrifuged at 10,000 rpm for 10 min at 4 °C. The pellet was dissolved in lysis buffer and the protein concentration determined according to [1]. Immunoprecipitates were obtained by incubating lysates (200 μ g protein) with the appropriate antibodies (1:50 dilution) plus protein A-agarose beads (1.2 mg) at 4 °C overnight. The beads were washed 3 times with lysis buffer and boiled in SDS/ β -mercaptoethanol buffer. Immunoprecipitates were fractionated by 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and blotted onto nitrocellulose membranes. Protein loading after the immunoprecipitation was checked routinely by staining the membranes with red Ponceau S. Blots were blocked with 5% skim milk in TRIS-buffered saline (TBS) and then probed with the indicated antibodies (1:1,000 dilution) overnight at 4 °C. Blots were washed 4 times (5 min each) with TBS and incubated for 1 h in a 1:2,000 dilution of peroxidase-conjugated anti-IgG, washed with TBS and developed with ECL reagent.

Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) activity was assessed indirectly by phosphorylation of Akt protein. Samples were prepared as described above and lysates containing 200 μ g protein were immunoprecipitated with a phospho-specific antibody that recognizes Akt phosphorylated at Ser-473. The phosphorylated form of Akt was detected by immunoblotting using the same antibody. Total Akt levels were measured by immunoprecipitation with a specific Akt antibody and Western blot analysis.

Results

Volume changes

Retinas exposed to 20% hyposmotic solution swelled rapidly, increasing their volume by 80% within 1 min after the osmotic stimulus. Immediately thereafter, cell volume started to decrease, despite the persistence of the hyposmotic medium, thus revealing the occurrence of typical regulatory volume decrease in the retina. Within 10 min, cell volume was only 16% above that in isosmotic medium (KH) (Fig. 1A). Under ischaemia-like conditions (i.e. in K/O medium) there was also a rapid increase in retina volume of about 92%, with the peak being attained after 3 min exposure to the experimental medium. Thereafter, there was some decrease in volume, reaching 54% over the volume in control medium (KH) after 10 min. No further decrease was observed up to 30 min (Fig. 1A). Figure 1B shows the effect of media made hyperosmotic by adding 100 mM raffinose. This prevented swelling in the K/O medium.

Amino acid release

Swelling under both hyposmotic and ischaemic (K/O) conditions stimulated the efflux of labelled taurine, GABA and D-aspartate (the latter a marker for glutamate). Under hyposmotic conditions, amino acid efflux occurred rapidly and peaked within 2 min after the stimulus, followed by gradual inactivation. About 3.4, 5.1 and 5.7% of total radioactivity was released at the peak for taurine, GABA and D-aspartate, respectively (Fig. 2). Following exposure to the K/O medium, amino acid efflux also rapidly activated, with peak release values of 4, 7.5 and 8% for taurine, GABA and D-aspartate, respectively. GABA and D-aspartate effluxes inactivated rapidly but the taurine efflux was sustained (Fig. 2). The contribution to amino acid release of swelling concurrent under the ischaemic conditions was evaluated by following the efflux on exposure to the K/O medium made hyperosmotic with raffinose. This treatment reduced the release of GABA and taurine by about 85% while D-aspartate release was 35% less (Fig. 2).

Tyrosine kinases and PI3K

To examine the influence of tyrosine phosphorylation reactions on amino acid release in the hyposmotic or K/O models, we assessed the effect of two general blockers of tyrosine kinases, tyrphostin A23 and genistein. Both compounds abolished taurine release in the two models of swelling, while GABA release was suppressed by tyrphostin but was less sensitive to genistein (Table 1). D-Aspartate release under hyposmotic conditions was unaffected by tyrphostin and reduced by 63% by genistein (Table 1), but was completely insensitive to these agents under K/O conditions (Table 1). The inactive analogues

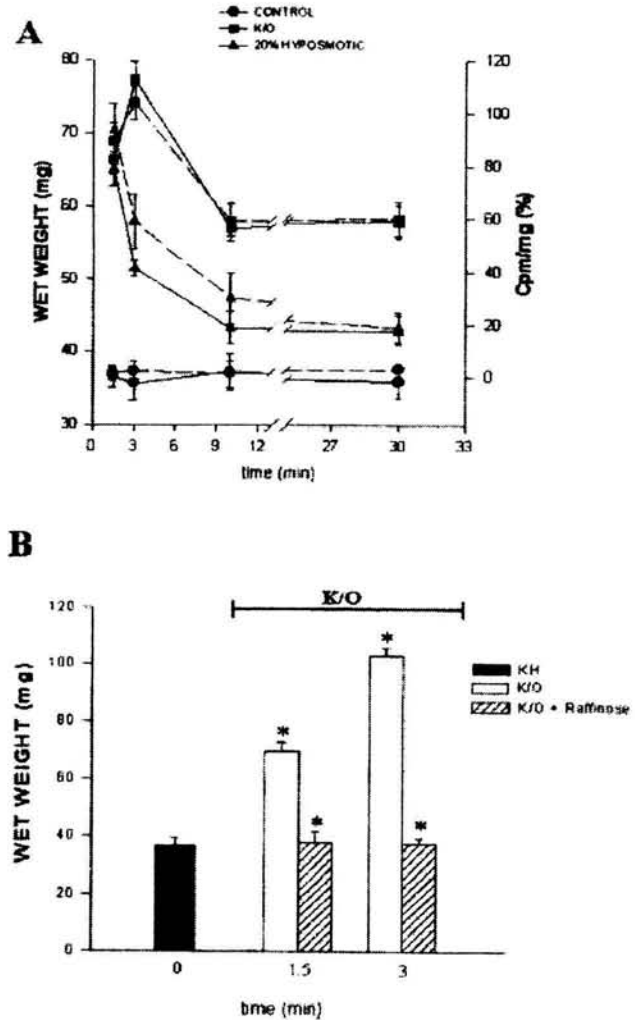


Fig. 1A, B Changes in cell volume in the chicken retina evoked by hyposmotic and ischaemic-like (54 mM K^+ , 1 mM ouabain; K/O) conditions. **A** Retinas were incubated during 1.5–30 min in isosmotic Krebs-HEPES (KH) control medium (control, ●) or in 20% hyposmotic (▲) or K/O media (■). Cell volume was measured as change in wet weight (solid line) or by distribution of 3H -D-O-methylglucose (dashed line) as described in Materials and methods. **B** change in wet weight in retinas treated with K/O medium in the presence or absence of 100 mM raffinose. Means \pm SE, $n=4-5$, hyposmotic; $n=4-6$, K/O and control; $n=4-6$, K/O plus raffinose. * $P < 0.001$ (Student's *t*-test)

of tyrphostin, AG-9, and of genistein, daidzein, were without effect under all conditions (Table 1). These results indicate an influence of tyrosine kinases in the swelling-associated efflux of amino acids. We thus next attempted to identify some of the kinases involved as elements in this signalling cascade and the effect of inhibition of these enzymes on amino acid release. No activation of ERK1/ERK2 could be observed in the retina under either hyposmotic or K/O conditions (Fig. 3A). Neither basal phosphorylation nor the efflux of amino acids was affected by the mitogen-activated, extracellular

Fig. 2 Release of ^3H -taurine (A), ^3H -GABA (B) and ^3H -D-aspartate (C) from retinas evoked by hyposmotic or ischaemic (K/O) conditions. Retinas were loaded with the labelled amino acids, washed and superfused with KH control medium. At the time indicated by the arrow, the medium was switched to hyposmotic (■) or K/O media (●) or K/O medium made hyperosmotic with raffinose (▲). Data are the radioactivity released per minute, expressed as percentage of the total radioactivity incorporated. Means \pm SE, $n=4-7$

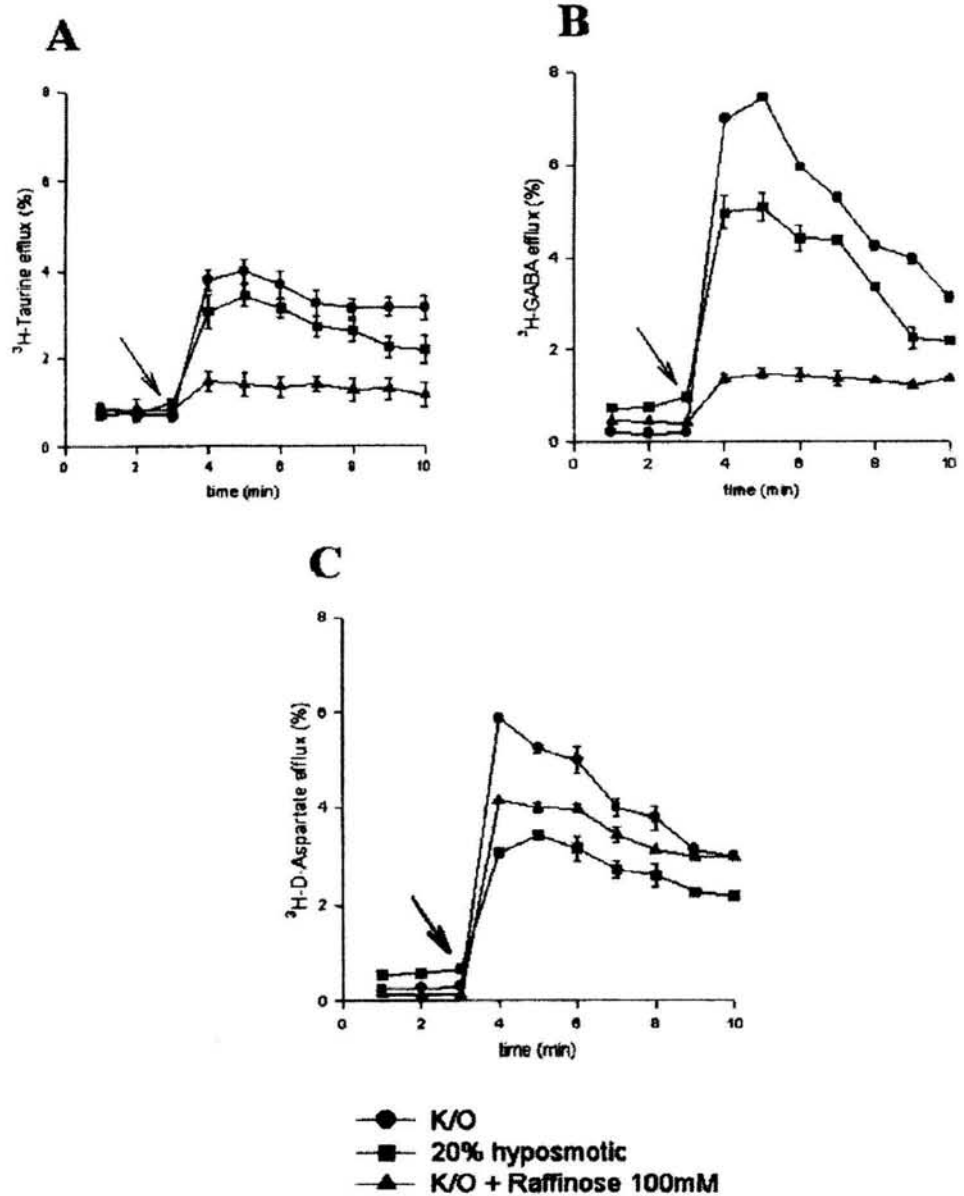


Table 1 Effect of tyrosine kinase blockers and their inactive analogues on ^3H -taurine, ^3H -GABA and ^3H -D-aspartate release from chicken retinas under hyposmotic (-20%) and ischaemia-like [54 mM K^+ , 1 mM ouabain (K/O)] conditions. Retinas loaded with the amino acid tracers were treated with the drugs (all 50 μM) as

described in Materials and methods. Data represent net release, i.e. the percentage radioactivity released during the superfusion period with the experimental media (7 min) minus the basal release. Means \pm SD, $n=4-6$

	K/O			20% hyposmotic		
	^3H -Taurine (%)	^3H -GABA (%)	^3H -D-Aspartate (%)	^3H -Taurine (%)	^3H -GABA (%)	^3H -D-Aspartate (%)
Control	22.7 \pm 1.86	36.0 \pm 2.6	28.7 \pm 2.3	16.9 \pm 1.6	25.7 \pm 4.3	22.8 \pm 3.5
Tyrphostin	2.5 \pm 0.82*	2.6 \pm 1.9**	34.5 \pm 3.0	1.8 \pm 0.2**	3.4 \pm 1.2*	19.0 \pm 2.2
Genistein	3.8 \pm 0.60*	19.5 \pm 3.0*	32.7 \pm 3.4	1.9 \pm 0.51**	25.0 \pm 1.1	8.2 \pm 1.4*
Daidzein	23.5 \pm 2.2	36.9 \pm 1.5	29.5 \pm 3.8	17.2 \pm 0.54	26.7 \pm 2.5	22.1 \pm 2.8
AG 9	22.8 \pm 0.59	35.9 \pm 0.97	28 \pm 2.5	16.4 \pm 2.1	26.1 \pm 1.1	23.5 \pm 0.97

* $P<0.02$; ** $P<0.001$ vs. control (Student's t -test)

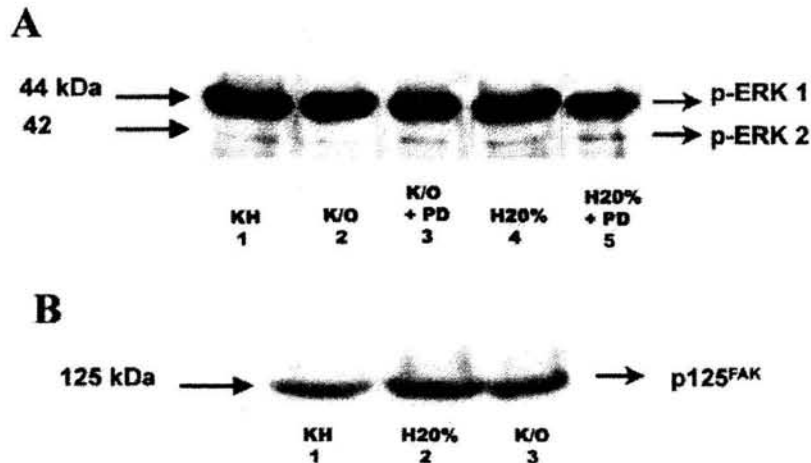
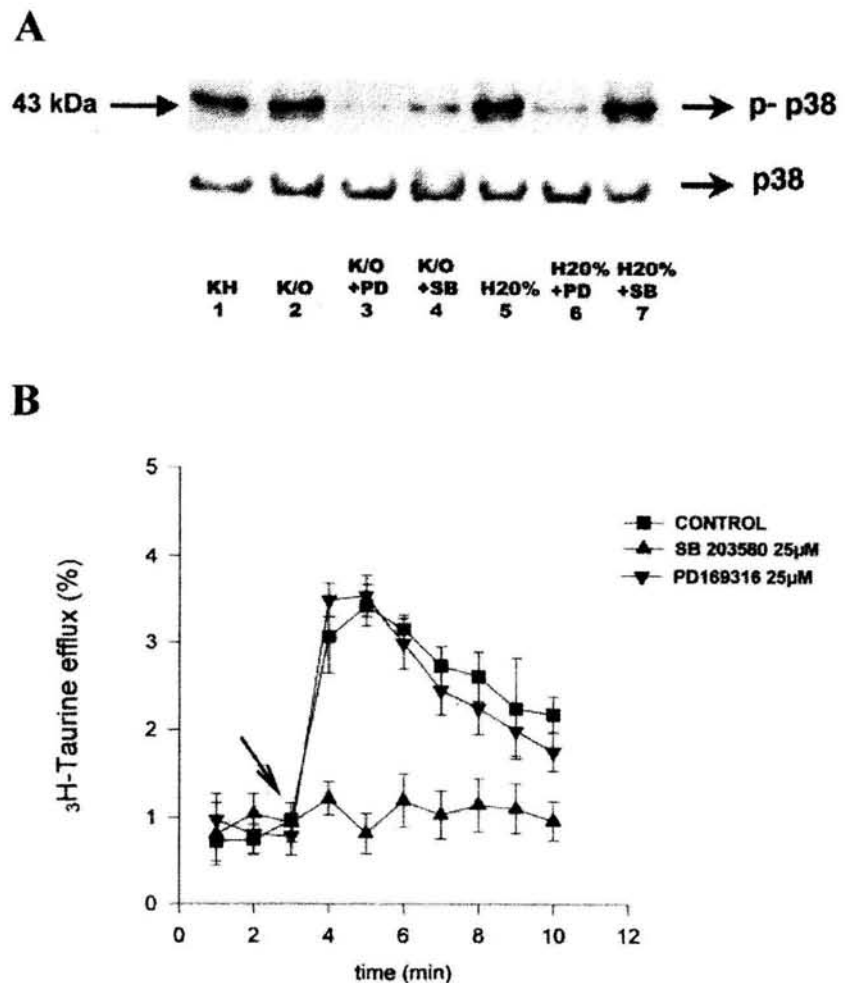


Fig. 3A, B. Effect of hyposmotic and K/O conditions on extracellular signal-related kinases-1/2 (*ERK1/ERK2*) and p125 focal adhesion kinase (*p125^{FAK}*) phosphorylation in retina. **A** Lysates immunoprecipitated and blotted with anti-phospho-ERK antibody from retinas under the following conditions: lane 1 control (KH); lane 2 K/O medium; lane 3 K/O plus 50 μ M PD98059 (K/O+PD);

lane 4 20% hyposmotic medium (H20%); lane 5 20% hyposmotic medium plus 50 μ M PD98059 (H20%+PD). **B** Lysates immunoprecipitated with anti-phospho-tyrosine antibody and blotted with anti-*p125^{FAK}* antibody from retinas under the following conditions: lane 1 KH; lane 2 H20%; lane 3 K/O medium. Representative results of three independent experiments

Fig. 4A, B Effect of hyposmotic or K/O conditions on mitogen-activated protein kinase-p38 (*MAPK-p38*) phosphorylation in retina. **A** Lysates were immunoprecipitated and blotted with anti-phospho-MAPK-p38 antibody (upper row) or with anti-MAPK-p38 (lower row) from retinas under the following conditions: lane 1 control (KH); lane 2 K/O medium; lane 3 K/O plus 25 μ M PD169316 (K/O+PD); lane 4 K/O plus 25 μ M SB203580 (K/O+SB); lane 5 H20%; lane 6 H20% plus 25 μ M PD169316 (H20%+PD); lane 7 H20% plus 25 μ M SB203580 (H20%+SB). Representative results of three independent experiments. **B** ³H-Taurine release assayed as in Fig. 2. (■), Control; (▲) 25 μ M SB203580; (▼) 25 μ M PD169316. Means \pm SE, n=4-5



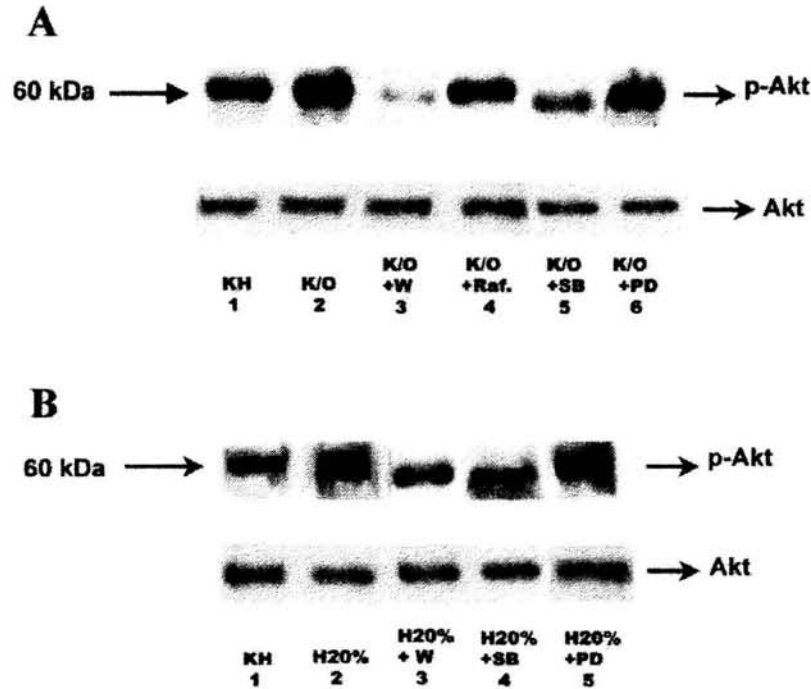


Fig. 5A, B Effect of hyposmotic and K/O conditions on phosphoinositide 3-kinase (PI3K) activity measured as Akt phosphorylation in retina. **A** Kinase activity in K/O medium. Lysates immunoprecipitated and blotted with anti-phospho Akt (upper row) or anti-Akt (lower row) antibodies from retinas under the following conditions: lane 1 control (KH); lane 2 K/O medium; lane 3 K/O plus 100 nM wortmannin (K/O+W); lane 4 K/O plus 100 mM raffinose

(K/O+Raf); lane 5 K/O plus 25 μM SB203580 (K/O+SB); lane 6 K/O plus 25 μM PD169316 (K/O+PD). **B** Kinase activity in 20% hyposmotic medium. Assay conditions as in A: lane 1 control; lane 2 H20%; lane 3 H20% plus 100 nM wortmannin (H20%+W); lane 4 H20% plus 25 μM SB203580 (H20%+SB); lane 5 H20% plus 25 μM PD169316 (H20%+PD). Representative results of five independent experiments

signal related kinase (MEK) inhibitor PD980859 (results not shown). Both hyposmotic and K/O conditions led to activation of the tyrosine kinase p125^{FAK} (Fig. 3B).

Phosphorylation of MAPK-p38 increased in response to both hyposmotic and K/O stimuli (Fig. 4A), although the total level of this enzyme did not change (Fig. 4A). To test a possible connection between this increased activity and osmolyte fluxes, taurine efflux was measured in the presence of SB203580 and PD169316, described as specific blockers of this enzyme. Figure 4A shows the inhibitory action of these agents on p38 phosphorylation in the two experimental models. Although in both cases PD169316 had a more potent inhibitory effect than SB203580, they affected the hyposmotic-stimulated taurine release differently: while SB203580 markedly inhibited the efflux, PD169316 had no effect (Fig. 4B). A study on retinoblastoma [20] has reported SB203580 inhibition of PI3K, an enzyme that seems to play a crucial role in the swelling-evoked release of taurine. Therefore, the inhibition observed in the presence of this agent may be unrelated to an action on p38, but rather on PI3K. That this was the case is shown in Fig. 5.

PI3K activity (assayed as Akt phosphorylation) was enhanced markedly by both hyposmolarity and K/O, without affecting total Akt levels (Fig. 5A, B). Preventing swelling in K/O with 100 mM raffinose decreased PI3K

activation (Fig. 5A). The PI3K blocker wortmannin potentially reduced the kinase activation evoked by both hyposmotic and ischaemic stimuli (Fig. 5A, B). As mentioned above, SB203580 had a similar strong inhibitory effect (Fig. 5A, B).

The effect of wortmannin and LY294002, another PI3K blocker, on the efflux evoked by hyposmotic and K/O media is shown in Fig. 6. Taurine and GABA fluxes under both conditions were reduced markedly by the two blockers (Fig. 6A, B). In contrast, the release of D-aspartate was less sensitive to wortmannin and LY294002 under hyposmotic conditions and was essentially resistant under K/O conditions (Fig. 6C).

Effects of Cl⁻ channel blockers

The different influence of tyrosine kinases on D-aspartate and taurine efflux prompted comparison of other features of the release of these two amino acids under isosmotic and hyposmotic conditions. We examined the effect of Cl⁻ channel blockers, which in brain cultured cells and in brain preparations effectively reduce the release of taurine elicited by hyposmolarity [3, 28]. We examined the effect of 100 μM NPPB, 600 μM niflumic acid and 500 μM DIDS on the release of taurine and D-aspartate in the two

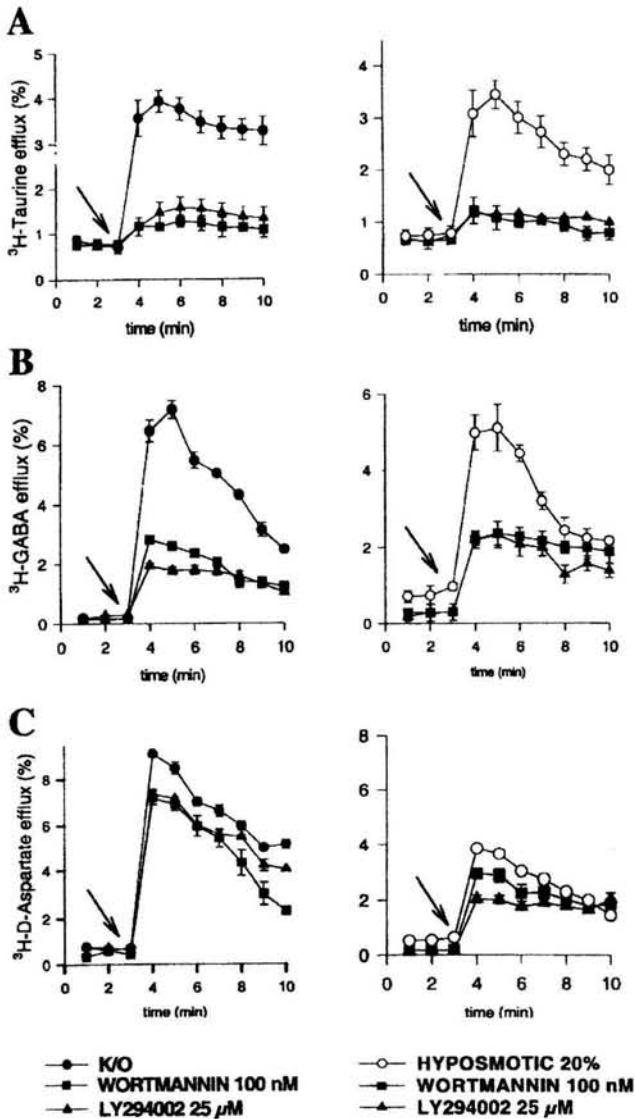


Fig. 6 Effect of PI3K blockers on the release of (A) ^3H -taurine, (B) ^3H -GABA and (C) ^3H -D-aspartate under hypotonic or K/O conditions. Amino acid release was assayed as in Fig. 2. (●) Control; (■) wortmannin (100 nM); (▲) LY294002 (25 μM). Means \pm SE, $n=6-8$

swelling models. Figure 7 shows that whereas NPPB and niflumic acid reduced the hypotonic efflux of taurine by more than 60%, that of D-aspartate was not affected significantly. DIDS decreased the release of both amino acids by about 30%. The effect of these blockers was not tested in the K/O medium, since they may affect the magnitude of swelling, as previously reported for NPPB [29, 37], thus indirectly reducing the release of osmolytes.

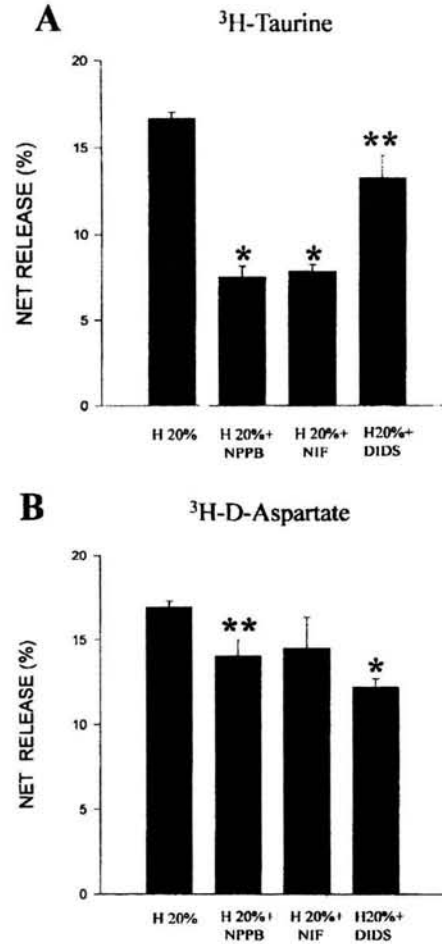


Fig. 7 Effect of anion channel blockers on (A) ^3H -taurine and (B) ^3H -D-aspartate release evoked by 20% hypotonic medium. Amino acid release assayed as in Fig. 2. The blockers NPPB, 100 μM , 600 μM niflumic acid or 500 μM DIDS, were present 15 min prior to the experiment and through all the superfusion period. Data represent net release, i.e. the percentage radioactivity released during the superfusion period with the experimental media (7 min) minus the basal release. Means \pm SE, $n=7$. * $P<0.05$; ** $P<0.001$ (Student's t -test)

Discussion

Swelling and complete volume recovery occurred in retinas exposed to mild hypotonicity, while under conditions simulating ischaemia (K/O) retinas also swelled but exhibited only partial volume recovery. Both experimental conditions increased the release of the most abundant amino acids in the retina, taurine, GABA and glutamate, and also activated a number of signal proteins of the tyrosine kinase pathways. The aim of the present study was to establish whether there is a link between these two events in ischaemic and hypotonic swelling.

Inhibition of over 80% of taurine release under hypotonic and K/O conditions by the tyrosine kinase blockers tyrphostin A23 and genistein, underlines the influence of these kinases on the release process. This

feature, also documented for the osmosensitive taurine release in other brain and non-brain cells and preparations [3, 8, 11, 12, 23, 26, 40], has not been reported previously for ischaemic conditions. Glutamate fluxes were markedly less influenced by tyrosine kinases (present results, [8, 23]), suggesting either different stimuli for release or/and different pathways modulated by other types of kinases. Noteworthy, tyrosine kinases are also involved in the activation of osmosensitive Cl^- currents in various cell types [7, 22, 26, 44].

The identity of the tyrosine kinases related to osmolyte permeation has not been yet established. In the retina, both hyposmolarity and K/O rapidly enhanced phosphorylation of p125^{FAK} and p38, without affecting ERK1/ERK2. The tyrosine kinase target PI3K was also notably activated by swelling concurrent with both conditions. However, kinase activation does not prove per se a link with the transduction cascade of swelling-evoked osmolyte efflux. Both swelling and ischaemia are complex phenomena resulting in a variety of events required for the cell to adapt to the change in cell volume and to the stressful ischaemic condition, evoking in turn a plethora of signals that may or may not be connected with the activation of osmolyte fluxes. A more direct way to establish such a correlation is to examine the effect of tyrosine kinase blockers on these fluxes. The MAP kinases ERK1/ERK2 appear not to be involved in the mechanism of osmolyte release since neither are activated by the stimulus (present results, [7, 8, 46]) or, if activated, osmolyte fluxes remain unaffected when the activation is blocked [24, 44]. Only in cortical astrocytes these two events appear connected [2]. Hyposmolarity also phosphorylates another MAP kinase, p38, in the retina as well as in hepatocytes, cholangiocytes and hippocampal slices [7, 8, 44, 46], but again, this reaction appears unlinked to osmosensitive taurine or Cl^- permeation (present results, [8, 44]). Therefore, even though the influence of tyrosine kinases on osmolyte exit mechanisms is well documented, the precise kinases involved remain largely unidentified. The closest approach to ascribe a specific tyrosine kinase to an osmolyte efflux pathway comes from studies on the influence of src kinases p72^{syk} and p56^{lyn} on taurine efflux in skate blood cells [12] and of p56^{ck} on Cl^- currents in lymphocytes [22].

A tyrosine kinase target, PI3K, seems to be an important element in the signal transduction cascade linking cell swelling to taurine and GABA efflux in the retina, as shown by the pronounced decrease of these fluxes by PI3K blockers, under both hyposmotic and K/O conditions. We have shown previously such a correlation for osmosensitive taurine efflux in cerebellar granule neurons [24] and hippocampal slices [8] but this is the first report of a similar connection for osmosensitive GABA efflux and for ischaemia-evoked amino acid release. Besides our results in brain cells, PI3K activation by hyposmolarity has only been observed in hepatocytes and in the intestinal 407 cell line [5, 46] in which this enzyme has a definite influence on volume-activated Cl^- currents [6, 43]. All these results, while stressing the

importance of PI3K in volume regulation processes, provide no information about its link with specific components of the tyrosine kinase pathways, or about its influence on the mechanisms ultimately resulting in osmolyte efflux.

Amino acid release in the ischaemic brain has been reported widely, but less is known about possible modulation of this release by tyrosine kinase reactions. Ischaemia activates phosphorylation of ERKs, p38, JNK and PI3K in the brain [18, 25, 27] and of PI3K and MAPK in the retina [9], but, in most cases, phosphorylation occurs rather in connection with reperfusion, and in any case a link with amino acid fluxes has been established. An important point often raised is the extent to which amino acid efflux in ischaemia is a primary response to swelling concurrent with the ischaemic episode. The similarities here found between ischaemia- and hyposmolarity-evoked GABA and taurine release, suggest indeed swelling as the primary stimulus for release, a notion further supported by its over 85% reduction when swelling is prevented under ischaemic conditions. Also in ischaemic models *in vivo*, taurine efflux shows properties essentially similar to those of osmosensitive fluxes described in retina and in cultured cells, suggesting a main osmolyte-type response [4, 38]. As for glutamate, we showed here that swelling contributes with about 35% to the ischaemia-evoked release. The features of this release were clearly different from those of taurine and GABA, notably in its lower sensitivity to tyrosine kinase and PI3K blockers, as well as to Cl^- channel inhibitors. Noteworthy, however, is that even the hyposmolarity-evoked release of glutamate is clearly different from that of taurine ([8] and present results). This suggests either different routes for the swelling-evoked glutamate release or/and a response to phenomena concurrent with the hyposmolar condition, such as depolarization, or ionic imbalance. This may be particularly true in a complex preparation as the retina, in which such changes may evoke multiple responses from the diverse cell types.

These considerations are relevant to the still largely controversial question of the contribution of swelling to the increased extracellular glutamate levels in ischaemia [34, 36]. Pertinent to this subject is the fact that studies on the effects of Cl^- channel blockers on glutamate efflux, often used as tools to evaluate such contribution, have often produced conflicting results. Studies in rat brain cortex *in vivo* report glutamate efflux reduction only with high concentrations of NPPB (300 μM) [32]. The anion channel blocker, L-644,711 fails to affect glutamate efflux in a high- K^+ model of ischaemia in hippocampal slices while it is effective in cultured astrocytes [36, 37]. The anion exchanger blocker 4,4'-dinitrostilbene-2-2'-disulphonic acid (DNDS) decreases ischaemic glutamate release but DIDS is ineffective [4, 39]. Tamoxifen, a putative blocker of volume-activated Cl^- channels, also reduces glutamate efflux [16, 34]. All these results, together with data from the present study showing that glutamate release evoked by hyposmotic swelling clearly deviates from a typical osmolyte response, including

notably its sensitivity to anion-channel blockers, suggest new strategies for the accurate evaluation of the contribution of glutamate efflux through swelling-activated pathways to the excitotoxicity-derived pathogenesis in ischaemia.

Acknowledgements This work was supported in part by grants No. 34886-M and 35806 from CONACYT and IN204900 from DGAPA, UNAM.

References

- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Crepel V, Panenka W, Kelly ME, MacVicar BA (1998) Mitogen-activated protein and tyrosine kinases in the activation of astrocyte volume-activated chloride current. *J Neurosci* 18:1196–1206
- Deleuze C, Duvoid A, Moos FC, Hussy N (2000) Tyrosine phosphorylation modulates the osmosensitivity of volume-dependent taurine efflux from glial cells in the rat supraoptic nucleus. *J Physiol (Lond)* 523:291–299
- Estevez AY, Song D, Phillis JW, O'Regan MH (2000) Effects of the anion channel blocker DIDS on ouabain- and high-K⁺-induced release of amino acids from the rat cerebral cortex. *Brain Res Bull* 52:45–50
- Feranchak AP, Roman RM, Schwiebert EM, Fitz JG (1998) Phosphatidylinositol 3-kinase contributes to cell volume regulation through effects on ATP release. *J Biol Chem* 273:14906–14911
- Feranchak AP, Roman RM, Doctor RB, Salter KD, Toker A, Fitz JG (1999) The lipid products of phosphoinositide 3-kinase contribute to regulation of cholangiocyte ATP and chloride transport. *J Biol Chem* 274:30979–30986
- Feranchak AP, Berl T, Capasso J, Wojtaszek PA, Han J, Fitz JG (2001) p38 MAP kinase modulates liver cell volume through inhibition of membrane Na⁺ permeability. *J Clin Invest* 108:1495–1504
- Franco R, Torres-Marquez ME, Pasantes-Morales H (2001) Evidence for two mechanisms of amino acid osmolyte release from hippocampal slices. *Pflugers Arch* 442:791–800
- Hayashi A, Kim HC, de Juan E Jr (1999) Alterations in protein tyrosine kinase pathways following retinal vein occlusion in the rat. *Curr Eye Res* 18:231–239
- Hoffmann EK (2000) Intracellular signalling involved in volume regulatory decrease. *Cell Physiol Biochem* 10:273–288
- Huang CC, Chang CB, Liu JY, Basavappa S, Lim PH (2001) Effects of calcium, calmodulin, protein kinase C and protein tyrosine kinases on volume-activated taurine efflux in human erythrocyte cells. *J Cell Physiol* 189:316–322
- Hübner EM, Musch MW, Goldstein L (2000) Inhibition of volume-stimulated taurine efflux and tyrosine kinase activity in the skate red blood cell. *Pflugers Arch* 440:132–139
- Kimelberg HK (1990) Chloride transport across glial membranes, in chloride channels and carriers in nerve, muscle, and glial cells. In: Alvarez-Leefmans, Russell (Eds) Plenum Press, New York, pp 1–9
- Kimelberg HK (1999) Astrocytic edema in CNS trauma. *J Neurotrauma* 9:S71–S81
- Kimelberg HK, O'Connor ER, Sankar P, Keese C (1992) Methods for determination of cell volume in tissue culture. *Can J Physiol Pharmacol* 70:S323–S333
- Kimelberg HK, Feustel PJ, Jin Y, Paquette J, Boulos A, Keller RW Jr, Tranmer BI (2000) Acute treatment with tamoxifen reduces ischemic damage following middle cerebral artery occlusion. *Neuroreport* 11:2675–2679
- Kirk K (1997) Swelling-activated organic osmolytes channels. *J Membr Biol* 158:1–16
- Kitagawa H, Warita H, Sasaki C, Zhang WR, Sakai K, Shiro Y, Mitsumoto Y, Mori T, Abe K (1999) Immunoreactive Akt, PI3-K and ERK protein kinases expression in ischemic rat brain. *Neurosci Lett* 274:45–48
- Kletzien RF, Pariza MW, Becker JE, Potter VR (1975) A method using 3-O-methyl-D-glucose and phloretin for the determination of intracellular water space of cells in monolayer culture. *Anal Biochem* 68:537–544
- Lali FV, Hunt AE, Turner SJ, Foxwell BM (2000) The pyridinyl imidazole inhibitor SB203580 blocks phosphoinositide-dependent protein kinase activity, protein kinase B phosphorylation, and retinoblastoma hyperphosphorylation in interleukin-2-stimulated T cells independently of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 275:7395–7402
- Lang F, Busch GL, Ritter M, Völkl H, Waldegger S, Gulbins E, Häussinger D (1998) Functional significance of cell volume regulatory mechanism. *Physiol Rev* 48:247–306
- Lepple-Wienhues A, Szabo I, Wieland U, Heil L, Gulbins E, Lang F (2000) Tyrosine kinases open lymphocyte chloride channels. *Cell Physiol Biochem* 10:307–312
- Mongin AA, Reddi JM, Charniga C, Kimelberg HK (1999) [³H]taurine and D-[³H]aspartate release from astrocyte cultures are differently regulated by tyrosine kinases. *Am J Physiol* 276:C1226–C1230
- Morales-Mulia S, Cardin V, Torres-Marquez ME, Crevenna A, Pasantes-Morales H (2001) Influence of protein kinases on the osmosensitive release of taurine from cerebellar granule neurons. *Neurochem Int* 38:153–161
- Namura S, Iihara K, Takami S, Nagata I, Kikuchi H, Matsushita K, Moskowitz MA, Bonventre JV, Alessandrini A (2001) Intravenous administration of MEK inhibitor U0126 affords brain protection against forebrain ischemia and focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:11569–11574
- Nilius B, Eggermont J, Droogmans G (2000) The endothelial volume-regulated anion channel, VRAC. *Cell Physiol Biochem* 10:313–320
- Park KM, Chen A, Bonventre JV (2001) Prevention of kidney ischemia/reperfusion-induced functional injury and JNK, p38 and MAPK kinase activation by remote ischemic pretreatment. *J Biol Chem* 276:11870–11876
- Pasantes-Morales H (1996) Volume regulation in brain cells: cellular and molecular mechanisms. *Metab Brain Dis* 11:187–204
- Pasantes-Morales H, Ochoa de la Paz LD, Sepúlveda J, Quesada O (1999) Amino acid as osmolytes in the retina. *Neurochem Res* 24:1339–1346
- Pasantes-Morales H, Cardin V, Tuz K (2000) Signaling events during swelling and regulatory volume decrease. *Neurochem Res* 25:1301–1314
- Pasantes-Morales H, Franco R, Torres-Marquez ME, Hernández-Fonseca K, Ortega A (2000) Amino acid osmolytes in the regulatory volume decrease and isovolumetric regulation in brain cells: contribution and mechanisms. *Cell Physiol Biochem* 10:361–370
- Phillis JW, Song D, O'Regan MH (1997) Inhibition by anion channel blockers of ischemia-evoked release of excitotoxic and other amino acids from rat cerebral cortex. *Brain Res* 758:9–16
- Phillis JW, Song D, O'Regan MH (1998) Tamoxifen, a chloride channel blocker, reduces glutamate and aspartate release from the ischemic cerebral cortex. *Brain Res* 780:352–355
- Phillis JW, Ren J, O'Regan MH (2000) Transporter reversal as a mechanism of glutamate release from the ischemic rat cerebral cortex: studies with DL-threo-beta-benzyloxyaspartate. *Brain Res* 880:224–229
- Rosenberg GA (1999) Ischemic brain edema. *Prog Cardiovasc Dis* 42:209–216
- Rossi DJ, Oshima T, Attwell D (2000) Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403:316–321

37. Rutledge EM, Aschner M, Kimelberg HK (1998) Pharmacological characterization of swelling-induced D-[³H]aspartate release from primary astrocyte cultures. *Am J Physiol* 274:C1511–C1520
38. Saransaari P, Oja SS (1999) Characteristics of ischemia-induced taurine release in the developing mouse hippocampus. *Neuroscience* 94:949–954
39. Seki Y, Feustel PJ, Keller RW Jr, Tranmer BI, Kimelberg HK (1999) Inhibition of ischemia-induced glutamate release in rat striatum by dihydrokainate and an anion channel blocker. *Stroke* 30:433–440
40. Shen MR, Chou CY, Browning JA, Wilkins RJ, Ellory JC (2001) Human cervical cancer cells use Ca²⁺ signalling, protein tyrosine phosphorylation and MAP kinase in regulatory volume decrease. *J Physiol (Lond)* 537:347–362
41. Song D, O'Regan MH, Phillis JW (1998) Protein kinase inhibitors attenuate cardiac swelling-induced amino acid release in the rat. *J Pharm Pharmacol* 50:1280–1286
42. Stutzin A, Eguiguren AL, Cid LP, Sepulveda FV (1997) Modulation by extracellular Cl⁻ of volume-activated organic osmolyte and halide permeabilities in HeLa cells. *Am J Physiol* 273:C999–C1007
43. Tilly BC, Edixhoven MJ, Tertoolen LG, Morii N, Saitoh Y, Narumiya S, de Jonge HR (1996) Activation of the osmosensitive chloride conductance involves P21rho and is accompanied by a transient reorganization of the F-actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* 7:1419–1427
44. Van der Wijk T, Tomassen SF, de Jonge HR, Tilly BC (2000) Signalling mechanisms involved in volume regulation of intestinal epithelial cells. *Cell Physiol Biochem* 10:289–296
45. Verbalis JG, Gullans SR (1991) Hyponatremia causes large sustained reductions in brain content of multiple organic osmolytes. *Brain Res* 567:274–282
46. Vom Dahl S, Schliess F, Graf D, Häussinger D (2001) Role of p38(MAPK) in cell volume regulation of perfused rat liver. *Cell Physiol Biochem* 11:285–94

TERCERA PARTE

El incremento de volumen es consecuencia de numerosas patologías en el cerebro, entre las que podemos mencionar la isquemia, la encefalopatía hepática y la epilepsia. En el caso de la retina, el edema celular se origina por cuadros isquémicos generados en patologías como el glaucoma, hipertensión arterial y la retinopatía diabética (78, 79, 80). Una causa del hinchamiento es el aumento de K^+ extracelular, como ocurre en la epilepsia durante la fase de despolarización anóxica. En estas condiciones, el K^+ extracelular se incrementa hasta alcanzar una concentración de 80 mM (80, 81, 35). El Cl^- es, en muchos casos, un factor causal del hinchamiento en condiciones isosmóticas, ya que se moviliza como anión acompañante del K^+ y del Na^+ cuando se acumula intracelularmente. Estas vías de entrada de Cl^- no han sido caracterizadas con detalle. Esta fase del proyecto tuvo como objetivo identificar el mecanismo de hinchamiento producido por un incremento de K^+ extracelular, enfocándonos primordialmente en el mecanismo de entrada de Cl^-

RESULTADOS:

Los resultados de esta tercera parte se anexan a continuación en el manuscrito correspondiente que se encuentra en revisión.

Texto 3.

Ochoa-de la Paz LD, Toscano B and Pasantes-Morales H. Mechanisms of Chloride Influx in the KCl-Induce Swelling of the Chicken Retina. *Plüger Archives*

Ochoa-de la Paz LD, Lezama R, Toscano B
and Pasantes-Morales H

Mechanisms of chloride influx in the KCl-induced swelling in the chicken retina

Abstract The mechanisms of Cl^- influx and swelling induced by increased extracellular K^+ were examined in the chicken retina. K^+ -induced swelling was completely Cl^- -dependent. Swelling plotted vs external K^+ concentration showed two components, one operating at K^+ up to 35 mM and the other one at higher K^+ concentrations. Swelling evoked by KCl 25 mM (K25) was 66% reduced by 1 mM bumetanide, 76% by 100 μ DIOA and 17% by 1 mM furosemide. The Cl^- channel blockers NPPB and niflumic acid were largely ineffective, and DIDS reduced swelling by 38%. Swelling in K25 was 50% reduced in Na^+ -free medium. Swelling at 54 mM external K^+ (K54) was 14%-16% reduced by bumetanide and DIOA. Furosemide and NPPB decreased swelling by 90-95%, with IC_{50} of 173 μ M and 60.7 μ M, respectively. Swelling was 75% reduced by DIDS and 95% by niflumic acid. K54 swelling was unaffected by Na^+ omission. These blockers similarly affected ^{86}Rb uptake. K25 and K54 induced swelling at the inner but not at the outer retinal layers. In K25 swelling was found at the lower part of the inner nuclear layer, and specially at the ganglion cell layer. Swelling was prevented by bumetanide. In K54, swelling appears in essentially all layers of the inner retina, and was markedly decreased by furosemide, NPPB and niflumic acid. These results suggest that Cl^- influx and swelling at K25 occurs by the operation of electroneutral cotransporters (both NKCC and KCC being possibly involved). Further K^+ rise elicits influx via a Cl^- channel-like pathway, sharing the pharmacology of the volume-activated anion channels.

Key words: K/Cl, Na/K/Cl cotransporters, Cl^- channels, retinal edema

Ochoa-de la Paz LD, Lezama R, Toscano B and Pasantes-Morales H Department of Biophysics, Institute of Cell Physiology, National University of Mexico, (UNAM), Aparrado postal 70253, 04510 México DF, México e-mail: hpasante@ifc.unam.mx

Introduction

Cell swelling occurs whenever an osmotic imbalance across the cell membrane is followed by osmotically obligated water. This occurs in conditions of reduced external osmolarity, but also in isosmolarity, due to ion redistribution elicited by numerous factors including energy depletion, acidosis, and by the influence of hormones, secretagogues or neurotransmitters, which modify the activity of ion channels, transporters or exchangers (1). Isosmotic swelling is a sequel in numerous brain pathologies, including ischemia, hepatic encephalopathy, and head trauma. In the retina, cellular swelling occurs after ischemic episodes associated with glaucoma, high blood pressure and diabetic retinopathy (2, 3, 4). One of the swelling-inductor elements is the rise of extracellular K^+ . In physiological conditions, the concentration of extracellular K^+ is tightly kept within a range of 3-5 mM. This is regulated mainly by the net K^+ accumulation, accomplished by the joint operation of the Na/K ATPase and the NKCC cotransporter (5). High extracellular K^+ occurs in epilepsies, due to the abnormally high firing of neurons. Extracellular K^+ elevates also in anoxic depolarization and in ischemia. The K^+ concentration may reach levels of 15 mM in epilepsy and up to 80 mM in ischemia (12, 13). The increase in

extracellular K^+ and its subsequent accumulation in brain cells, particularly astrocytes, consistently leads to isosmotic swelling (6, 7, 8). Retinal swelling is also induced by high external K^+ (4, 9, 10, 11). Besides leading to swelling per se, K^+ -induced depolarization activates the release of glutamate from the widespread glutamatergic synapses and then, excessive glutamate is accumulated into the intracellular compartment by the highly effective transporters, which by their intrinsic mechanism, coupled to Na^+ , Cl^- and water, are also swelling-inductors (14).

Cl^- influx, either following K^+ accumulation or driven by increased Na^+ cytosolic levels is in most cases, an important causal factor of isosmotic swelling. These Cl^- entry pathways have not been characterized in detail. In the present study in the retina, we aimed to identify the mechanisms of isosmotic swelling elicited by elevated external K^+ , with emphasis on the mechanisms of Cl^- influx. The retina is a readily accessible portion of the central nervous system. Its relatively simple, well defined and stratified structure makes it a suitable preparation for the analysis of cells affected by swelling. At least, three mechanisms may contribute to K^+ uptake and to the associated Cl^- influx: i) the Na^+/K^+ ATPase, ii) the electroneutral K^+ cotransporters and iii) a channel-mediated passive K^+ permeation (4). In all cases, Cl^- will follow the accumulation of intracellular K^+ , carried either by the electroneutral cotransporters, or by a passive route mediated by Cl^- channels. To investigate the occurrence and contribution of these two main mechanisms of Cl^- influx, in the present study, we examined the effect of ion omission (Na^+ or Cl^-), as well as the effect of a number of transporter- and anion channel-blockers on the swelling in retina evoked by increased extracellular K^+ . We found that both, cotransporters and channels appear

involved, with a predominance depending on the magnitude of the extracellular K^+ increase.

Materials and methods

Chemicals

3-(4-hydroxyphenyl)-1-(2,4,6-trihydroxyphenyl)-1-propanone (phloretine), 3-(4-5-nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid (NPPB), 4,4'-diisothiocyanato stilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS), niflumic acid, Furosemide, DIOA and Bumetanide were obtain from Sigma (St. Louis Mo., USA). 3H - 3-O-methyl-D-glucose was obtained from New England (Boston Mass., USA) and ^{86}Rb was obtained from Amersham (Piscataway, NJ, USA). All salts used for the preparation of media were from Merck (Darmstadt, Germany).

Preparation and solutions

Young (1-5 days old) chickens were dark-adapted and killed by decapitation and the eyes enucleated under dim red light. Retinas free of pigment epithelium were excised and submerged in cold isosmotic (300 mOsm/L) Krebs-HEPES medium (KH), containing (in mM): NaCl, 135; KH_2PO_4 , 1.17; KCl, 4.7; CaCl, 1; glucose, 5; $MgSO_4$, 1.17; HEPES, 10; pH 7.4. Hyposmotic medium (-20%, 240 mOsm/ml) was prepared by reducing the NaCl concentration. The osmolarity was adjusted by freezing point osmometry (Osmette A, Precision system, Natic, Mass., USA). The medium for the elevated KCl condition contained 54mM (K54) or 25mM (K25) KCl, with an equiosmolar reduction of NaCl. Chloride-free media were prepared replacing Cl^- by the corresponding gluconate salts; the Na^+ -free medium was prepared replacing Na^+ with N-methyl-D-glucamine (NMDG). The cotransporter blockers

used furosemide (0.25 – 1mM), bumetanide (0.2 – 2mM) and DIOA (100µM), as well as the chloride channels inhibitors NPPB (10-250µM), DIDS (500µM) and niflumic acid (600µM) were 15-20 preincubated, and were present in media throughout all experiment. When required, drugs were dissolved in DMSO and in those cases, controls contained the corresponding concentration of the vehicle. DMSO final concentration never exceeded 0.025%.

Retinal water content

Volume changes were assessed by the change in wet weight or by ³H- 3-O-mehtyl-D-glucose (3-OMG) distribution. For wet weight determinations, initial wet weight was first obtained, and then the retinas were incubated in KH medium (control) or in the experimental media, for appropriate times and weighed again for final wet weight. Changes in intracellular volume were assessed from distribution of 3-OMG as described in (15). Retinas were incubated in the presence of 3-OMG (0.5 µCi/ml) for 3 min. At 25 min 2.5, 1 mM phloretine was added. Retinas were then washed (10-15 s) with KH medium, weighed, digested and radioactivity content measured. Unless specified, data are reported like wet weight increased over control (S-B).

⁸⁶Rb uptake assay.

Uptake of ⁸⁶Rb uptake was performed at 37°C in retinas under the experimental condition indicated (K54 and K25). Retinas were incubated in the presence of ⁸⁶Rb (0.5µCi/ml) for 3 min, in the conditions indicated for each experiment, and after that, retinas were washed 3 times in KH media, digested and radioactivity content measured.

Histological preparation

1-5 days old chicks were killed by decapitation and the eyes enucleated

under normal light. The eyes were hemisected to maintain the retina linked (cup) and immediately submerged in cold isosmotic control medium (KH) and treated with the conditions indicated for each experiment. After treatment, retinas were fixed 1 hr in gluteraldehyde 3% at 4°C, then washed 2 times in phosphate buffer (0.1M) and kept over night in 30% sucrose. Next day all cups were cut in the area between optic nerve and parental axes to avoid different thickness in the slice. The pieces were processed and cut in slices of 0.5µ and stained with toluidine blue and examined under light microscope.

Every cup was exposed to one of the following condition: KH medium for control, K54 or K25 for 3 min plus the corresponding drug. The chloride channels, NPPB (100µM), DIDS (500µM) and niflumic acid (600µM) and cotranporters blockers furosemide (0.25mM) and bumetanide (1 mM) were pre-incubated during 15-20 min.

Immunofluoresence and confocal microscopy.

After histological preparation the tissues were permeabilized and blocked by 30 min with PBS-SBA (0.3% triton and 3% light milk). After rising with PBS-T (PBS plus 0.1% triton), the tissues were incubate overnight in cold, with the first antibody diluted 1:50 or 1:70 in PBS-BSA. After that, the tissue were rinsed with PBS-T and the secondary antibody anti-goat IgG tagged with Cy5 was added for two hours at room temperature (1:25 dilution in PBS-BSA). After rising with PBS-T, the tissue were mounted on glass slices containing 50 µl of DAKO or DAPI fluorescent mounting medium for observation in a confocal laser microscope (BioRad, Hercules, Calif. USA). Optical sections were collected at 0.5 µm intervals. The fluorescence intensity was analyzed

using the program Laser Sharp (BioRad). Eight fields, containing one tissue, were analyzed for at least three independent experiments. Laser output power and photomultiplier settings were kept at similar throughout all experiments.

Results

KCl-induced retinal swelling

Increasing external K^+ from 4.7 to 54 mM resulted in rapid swelling of the retina, reaching a peak at about 3 min after the treatment. At this time, the retinal wet weight of 32 mg in average, in the normal KH medium, increased to 70 mg. The maximal swelling attained in this condition is higher than that elicited by 20% hyposmotic medium, but whereas under this later, retinal volume is almost fully recovered, in the elevated K^+ condition, swelling initially decreased but remained still 45% higher than in control medium during the time of the experiment (30 min) (Fig. 1). Replacement of Cl^- by gluconates completely prevented swelling in the K^+54 condition, thus stressing the role of Cl^- influx as causal agent of swelling. Values in Fig. 1 are expressed as the change in retinal wet weight (see Methods), which is highly reproducible. The volume increase was measured also by the accumulation of 3-O-methyl-D-glucose, and results were similar to those obtained by measuring changes in retinal wet weight.

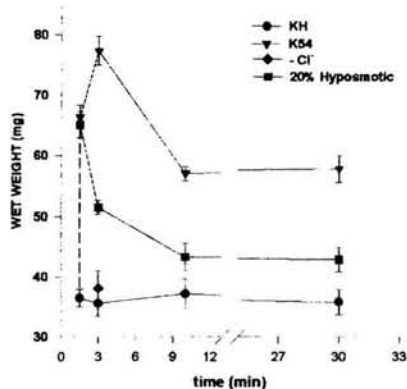


Fig.1. Volume changes in the chick retina evoked by hyposmotic or 54 mM KCl conditions. Retinas were incubated during 1.5-30 min in: (●) isosmotic Krebs-HEPES (KH); (■) 20 % hyposmotic or (▼) KCl 54 mM (K54). In (◆), retinas were exposed to a medium with K54 and all Cl^- substituted by the respective gluconate salts. Cell volume was measured as the change in wet weight as described in Methods. The points are means \pm SE of 4-8 experiments.

To assess the relative contribution of the Na^+/K^+ ATPase to K^+ influx and retinal swelling, the change in wet weight was estimated in conditions of KCl 10, 25 or 54 mM in retinas treated with 3 mM ouabain during 30 min. Fig. 2B shows that blockade of the Na/K ATPase by ouabain increased retinal volume over the increase elicited by KCl, by 6.6, 8.0 and 3.1 mg at KCl 10, 25, and 54, respectively. The observed swelling in conditions of blockade of the ATPase may be due to intracellular Na^+ accumulation, followed by Cl^- since ouabain led, as expected, to a reduction in K^+ ($^{86}Rb^+$) influx of about 10% in both KCl 25 and 54 mM (dpm/mg protein).

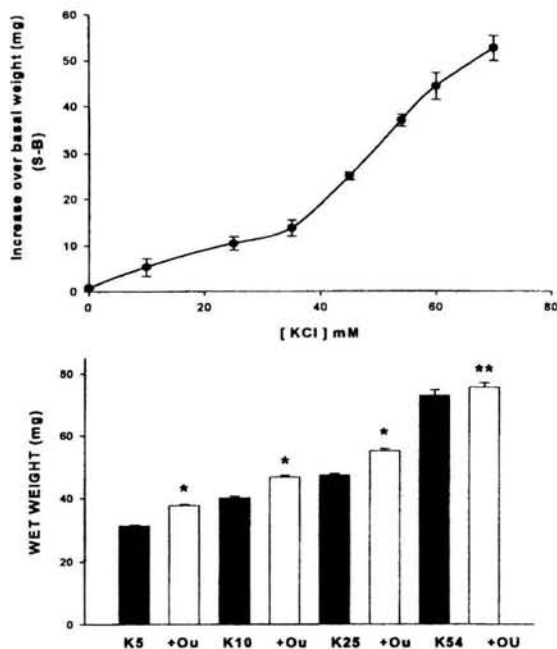


Fig.2. A: Volume increase in the chicken retina at increased external KCl. Retinas were excised, placed in KH medium (5.4 mM KCl) and then incubated during 3 min in the same KH medium or in media containing the indicated KCl concentration up to 70 mM, prepared by correspondingly reducing NaCl to maintain osmolarity. After this time, retinas were weighted. The wet weight of retinas in KH medium is the basal weight (B), and that of retinas in the media with high external K is the weight after the stimulus (S). B: blockade of the Na/K ATPase by ouabain increased retinal volume over the increase elicited by KCl. In A the weight increase expressed as S-B, is plotted at each point; and B each point represent the change in wet weight. Data are means \pm SE, $n = 5-6$. All points were significantly different from the control (basal weight) by $P < 0.001$.

Blockade of glutamate receptors did not affect the K-evoked retinal swelling

The high K^+ concentrations here tested have a depolarizing effect, which will increase the efflux of neurotransmitters. Although most of them may generate microgradients at the synaptic level, glutamate is the only one reported to evoke cell swelling, to an extent that could significantly contribute to increase cell volume and contribute to the retinal swelling estimated in our study. Swelling

by glutamate occurs essentially by the ionotropic receptors AMPA/kainate and NMDA subtypes, which permeate Na (and Cl) and Ca. Accumulation of Ca may in turn result in generation of free radicals, ion overload and further swelling. However, at the time of the experiments in our study, blockers of NMDA and of AMPA/kainate receptor, MK-801 and CNQX did not reduce the K-induced swelling, neither at K25 nor K54. The increase over basal weight in K25 was of 15.7 ± 0.92 and of 15.4 ± 0.7 and 16.3 ± 0.51 in the presence of CNQX or MK-801, respectively. For K54, the wet weight increase was of 38.9 ± 1.62 , and it was of 37.5 ± 1.23 and 36.7 ± 1.16 , in the presence of CNQX or MK-801, respectively.

Effect of Cl⁻ channel- and electroneutral cotransporter- blockers on swelling induced by 25 mM KCl.

Retinal swelling evoked by 25 mM K^+ (K25) was markedly inhibited by bumetanide and DIOA, 66% and 76%, respectively. Furosemide decreased swelling by only 17% (Fig. 3A). The Cl⁻ channel blockers were largely ineffective, excepted DIDS which reduced swelling by 38% (Fig. 3 B). These results suggest an important contribution of electroneutral cotransporters in the retinal swelling evoked by K25. To discriminate between the involvement NKCC and the KCC transporters, we performed experiments replacing NaCl by N-methylglucamine or choline, cations which are not transported by the NKCC. Fig. 4A shows that this maneuver reduced swelling elicited by 10, 25 or 54 mM KCl by 55%, respectively. These results together, with the effect of DIOA, suggest the involvement of the two types of cotransporters in the K25-evoked swelling. To further support this possibility, ^{86}Rb influx at K25 was measured vs external Cl⁻ concentration.

The two cotransporters have different Cl⁻ saturation kinetics, as KCC saturates at 9-12 mM KCl, while NKCC saturation is around 60-80 mM (16). Fig. 4 B shows a curve with two components saturating at 9 mM and 60 mM, respectively.

Effect of Cl⁻ channel- and electroneutral cotransporter- blockers on swelling induced by 54 mM KCl.

Swelling evoked by 54 mM KCl (K54), was much less sensitive to bumetanide and DIOA, swelling being reduced by only about 16% and 14%, respectively. Furosemide, in contrast, exhibited a very potent effect and essentially abolished swelling (Fig. 5A). Fig. 5B shows a concentration-dependent curve of the effect of this blocker, from which an IC₅₀ 173 μM was calculated. The Cl⁻ channel blockers NPPB and niflumic acid fully prevented swelling, while DIDS reduced it by 75% (Fig. 5C). Fig. 5D shows the concentration-dependent effect of NPPB, with a still significant reduction of about 10% observed at 25 μM. The calculated IC₅₀ was of 60.7 μM. Swelling evoked by K 54 was essentially unaffected when all Na⁺ in the solutions was replaced by NMDG (Fig. 4A). The effects of cotransporter- and Cl⁻ channel- blockers was examined on K⁺ uptake, followed by ⁸⁶Rb. Data shown in Fig. 6 confirmed the results on swelling, i.e. a suppression of K⁺ uptake

by furosemide, NPPB, and niflumic acid, a marked reduction by DIDS, and only a marginal inhibitory effect of bumetanide. Cell swelling at the retinal layers after exposure to 54 mM or 25 mM KCl

The above results, altogether, show different mechanisms for K⁺-evoked

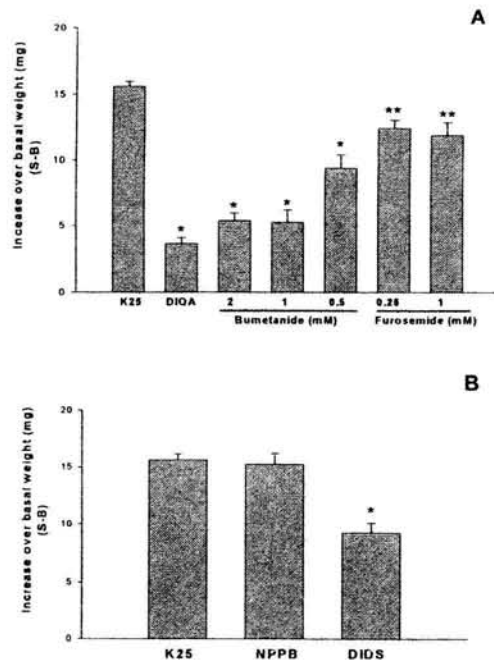


Fig.3. Effect of cotransporter- or Cl⁻ channel-blockers on the retinal volume increase elicited by K25. The experimental procedure and results expression are as in Fig. 2. **A.** Cotransporter blockers: DIOA (100μM), bumetanide (0.5 - 2mM), furosemide (0.25 - 1mM). Retinas were preincubated with the drugs during 20 min in KH medium, before exposure to K25 during 3 min. Drugs were also present during this period. **B.** Cl⁻-channel blockers: NPPB (100μM), DIDS (500μM). Retinas were preincubated with the drugs during 15 min and then treated as in A. Data represent the wet weight increase over control condition (S-B). Data are means ± SE of 6-8 experiments. *P < 0.001; **P < 0.002 (t-student).

swelling, depending on the external K⁺ concentration. Since the retina is a complex preparation, with different cell types, the possibility exists that K⁺ may affect different cell layers, depending on the magnitude of the K⁺ increase. This was examined in retinal sections

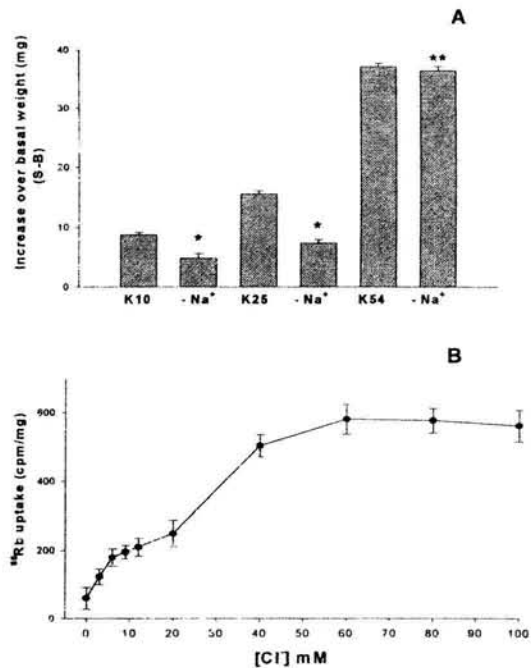


Fig. 4. A: Effect of Na⁺-free medium on wet weight increase of retina under K25 conditions. Retinas were pre-incubated during 15 min in KH Na⁺-free medium and then exposed to K25 Na⁺-free medium, during 3 min. Na⁺ was substituted by NMDG. Data are expressed as in Fig. 3. B: Effect of extracellular Cl⁻ concentration on ⁸⁶Rb uptake under K25 conditions. Retinas were incubated during 3 min in media containing KCl 25 mM and the indicated Cl⁻ concentration, adjusted with gluconate salts as described in Methods. All media contained ⁸⁶Rb (0.5 μ Ci/ml). Data represent the radioactivity accumulated in cpm/mg of wet weight. Points are means \pm SE of 4-5 experiments. *P < 0.001; **P < 0.002 (t-student).

exposed to K25 or K54. Treatment with K25 caused marked swelling and some lysis at the lower part of the inner nuclear layer, while the upper part appears essentially spared. Also, the inner plexiform layer appears unaffected. In the ganglion cell layer, cells appear markedly swollen and disorganized. Bumetanide reduced swelling in cells at the lower part of the inner nuclear layer and afforded full protection to swelling and damage of the ganglion cell layer. In K54, cell swelling appears in essentially all layers of the inner retina. The upper part of the inner

nuclear layer shows pycnotic cells and extensive swelling. Mild swelling is observed at the lower part of the inner nuclear layer, and swelling is visible also at the inner plexiform layer. The most affected area was the ganglion cell layer, in which most cells appear markedly swollen. Treatment with furosemide decreased, but not suppressed swelling at the inner nuclear layer and showed a marked effect preventing swelling at the inner plexiform layer as well as protecting from swelling and damage at the ganglion cell layer. Swelling prevention similar to that provided by furosemide was also found for NPPB and niflumic acid (fig 7).

Swelling of Muller cells

In order to detect changes in glial cells due to exposure to high concentrations of KCl, we examined the effect of the treatment on Muller cells, the only glial cell type found in the chicken retina. Cell swelling was followed by immunofluorescence using an antibody against glutamine synthetase, an enzyme restricted to glial cells. Muller cells the only glial cell type present in the chicken retina, and span the entire length of the retina, with a variety of processes projecting to the inner and outer plexiform layers. Other processes branching from the main cell body form extensive sheaths around the neuronal cell bodies, dendrites and the axons of ganglion cells at the optic-fiber layer. A prominent Muller cell process is the endfoot, located at the inner border of the retina adjacent to the vitreous humor. The endfoot spans the ganglion cell layer and the nerve fiber layer. Fig. 8 shows the immunofluorescence characteristic of these type of glial cells, with the processes surrounding the neuronal somas, which appear as dark areas.

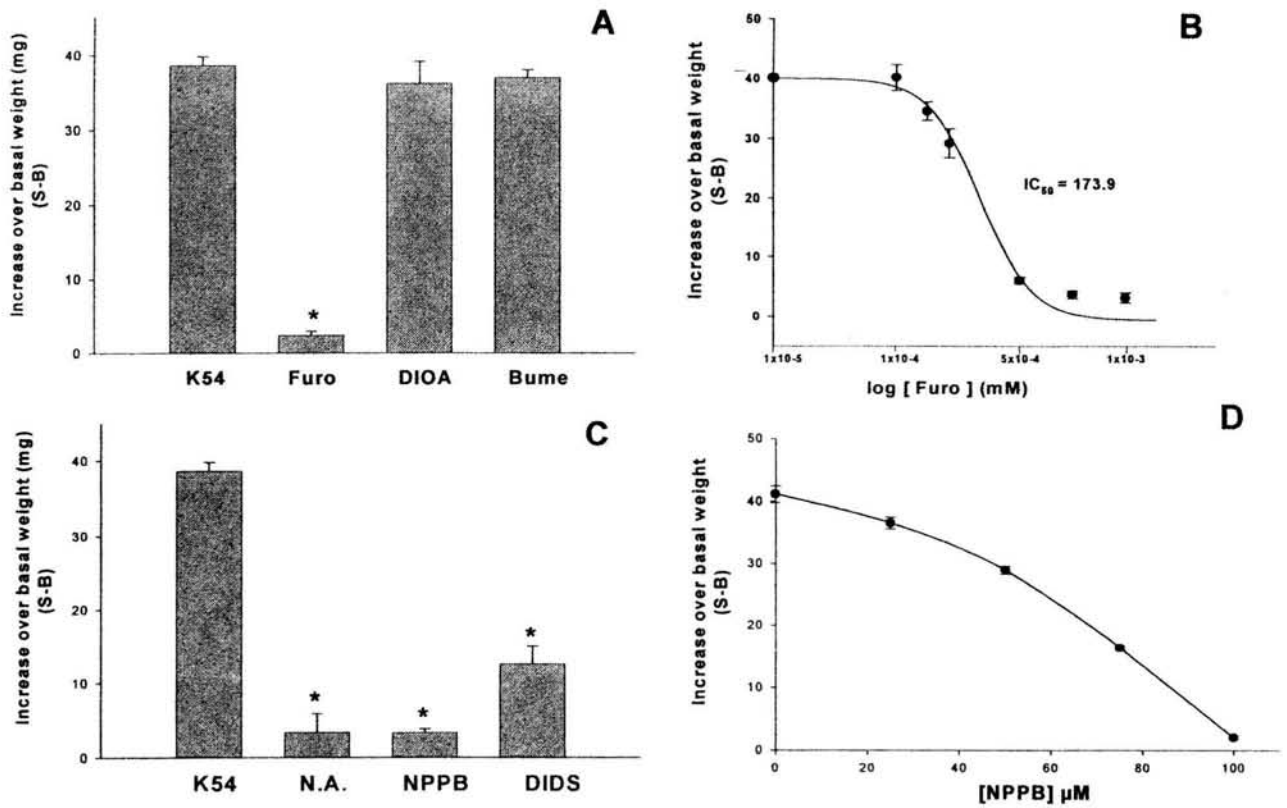
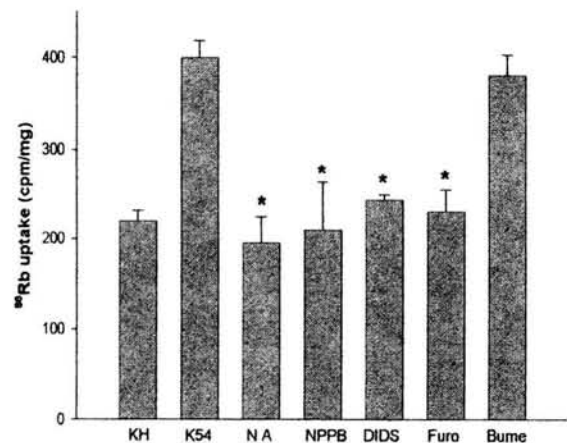


Fig. 5. Effect of cotransporter- or Cl⁻ channel-blockers on the retinal volume increase elicited by 54 mM KCl. The experimental procedure and results expression are as in Fig. 2. **A.** Cotransporter blockers: furosemide (0.25mM), DIOA (100µM) and bumetanide (1mM). The conditions were as in Fig. 3. **B.** Concentration-dependent (0.01-1mM) effect of furosemide on the retinal volume increase elicited by KCl 54 mM. **C:** Cl⁻ channel blockers: niflumic acid (600µM), NPPB (100µM), DIDS (500µM). The experimental procedure and results expression are as in Fig. 2. **D.** Concentration-dependent effect of NPPB (25- 100µM) on the retinal volume increase elicited by KCl 54 mM. Data means ± SE of 4-5 experiments. *P < 0.001; **P < 0.002 (t-student).

Fig. 6. Effect of cotransporter- or Cl⁻ channel-blockers on ⁸⁶Rb influx in K54. Retinas were preincubated with niflumic acid (600µM), NPPB (100µM) or DIDS (500µM) during 15 min or with furosemide (0.25mM) or bumetanide (1mM) during 20 min. After this time, the retinas were incubated during 3 in media containing K54 and ⁸⁶Rb (0.5 µCi/ml) and the tested drug. Results are expressed as in Fig. 3B. The data are means ± SE of 6-8 experiments *P < 0.001; **P < 0.002 (t-student).



At the outer cell layer the microvilli processes of Muller cells projecting into the photoreceptor layer are also apparent. The soma is conspicuously visible at the inner nuclear layer. At the ganglion cell layer, the fluorescence is particularly strong at the upper part of the ganglion cell layer.

To better examine the effect of swelling at the ganglion cell layer, retinas were treated with a more dilute antibody. In this condition, the control retinas, incubated with K5 (KH), the fluorescence is observed surrounding the cell body of the ganglion cells, observed as dark areas in the micrograph, and expanding as the endfoot at the inner border of the retina. Upon exposure to K25, the endfoot appears markedly swollen and the ganglion cell bodies appear enlarged and deformed. At K54 the ganglion cells appear markedly swollen and disorganized. The fluorescence at the Muller cell endfeet appears concentrated at the more inner part of the layer, possibly due to the pressure exerted by the swollen ganglion cell somas. This disorganization of the ganglion cell layer is also evident when the cell nuclei are stained by DAPI. The nuclei which appear as ordered layers in the control retina, look markedly disorganized in the K25 condition. At the K54 the nuclei appear pycnotic and refringent, as an indication of cell damage at this layer (fig. 8).

Discussion

The present results showed retinal swelling induced by an increase in external KCl, of a magnitude dependent on the KCl concentration. According to our present study, swelling in the retina occurs by several mechanisms, which activate at different KCl concentrations and also differently contribute to swelling. Omission of Cl^- prevents swelling in all cases, stressing its role in

swelling generation. The purpose of this study was to identify the mechanisms of Cl^- entry following K^+ uptake, which together with osmotically obligated water, are responsible for the cell volume increase.

K^+ clearance from the extracellular space occurs essentially by three mechanisms: 1. the Na/K ATPase, 2. the electroneutral cotransporters, and 3. permeation through K^+ channels. In all cases, Cl^- fluxes accompany the K^+ movements. The ATPase contribution to K^+ uptake, assessed by the effect of its blockade by ouabain on $^{86}\text{Rb}^+$ uptake, was found to be of about 10%, regardless of the external KCl concentration. However, ATPase blockade resulted in additional retinal swelling of 6-9%, possibly due to Na^+ (and Cl^-) accumulation, carried by the NKCC transporter, or/and by colloid osmotic Na^+ entry.

The biphasic pattern of the swelling vs external K^+ curve, as well as the different pharmacological sensitivity of the two components of the curve, support the involvement of two different mechanisms for K^+ and Cl^- uptake. Differences in the pharmacological profile provided useful information about the nature of the mechanisms involved. At K25, corresponding to the first component of the swelling curve, the volume increase was markedly inhibited by bumetanide (67%) and DIOA (76%), mildly decreased by DIDS (30%), and insensitive to NPPB or niflumic acid. This suggests the electroneutral cotransporters as the main contributors to the KCl-induced swelling in this condition. Both, NKCC and KCC may be participating. The involvement of KCC is suggested by the inhibitory effect of DIOA, which is more specific for this cotransporter, and by the swelling reduction by DIDS, which is known to also affect this carrier (17,18). Normally KCC extrudes K^+ , but under conditions

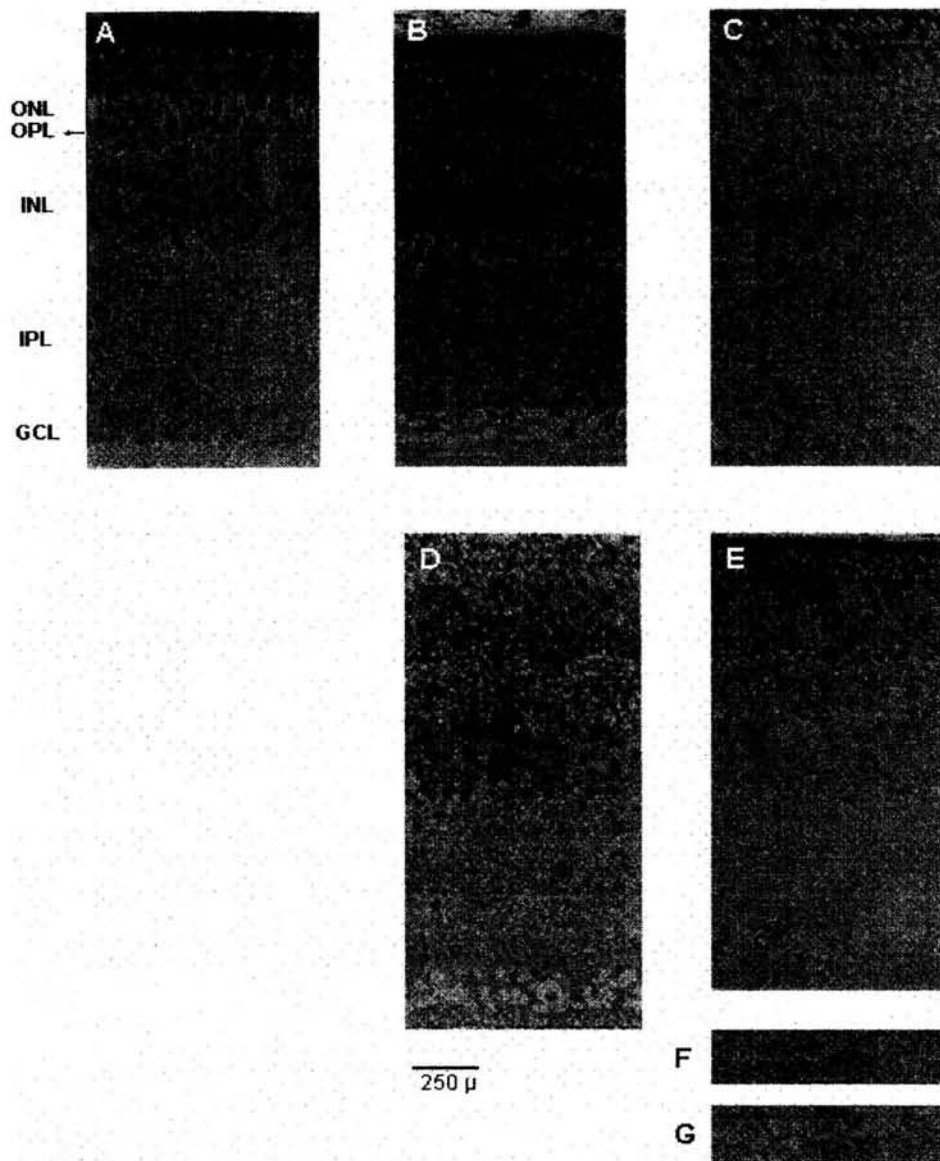


Fig. 7. Light micrographs of isolated chicken retinas exposed to K54 or K25. Effects of cotransporter- or Cl^- channel-blockers. Retinas were excised and preincubated with the blockers during 15-20 min (see Methods) and then exposed during 3 min to KH, K25 or K54, in the presence of the blockers when indicated. After the experiment retinas were prepared for histological sections as described in Methods. **A.** Control section, 3 min in KH medium. **B.** K25, no blockers added. **C.** K25 plus 1 mM bumetanide. **D.** K54, no blockers added. **E.** K54 plus 250 μM furosemide. Ganglion cell layer of retinas treated with **F.** K54 and 100 μM NPPB and **G.** K54 plus 600 μM niflumic acid. Note the swelling in the lower part of the INL, and the acute swelling and lysis in the GCL after exposure to K25. The ONL, OPL and IPL appear unaffected. Bumetanide protected from damage at the GCL. Retinas treated with K54 show damage at the upper part of the INL, and conspicuous swelling at the lower part of this layer, extensive vacuolization of the IPL and swelling and vacuolization at the GCL. The outer layers are unaffected. Furosemide protected from swelling at all layers, excepted the upper part of the INL. The Fig. F and G also shows the protective effect of NPPB and niflumic acid on the GCL of retinas treated with K54. ONL: outer nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, INL: inner nuclear layer, IPL: inner plexiform layer, GCL: ganglion cell layer. All micrographs are at the same magnification (20 x). Bar = 0.25 mm.

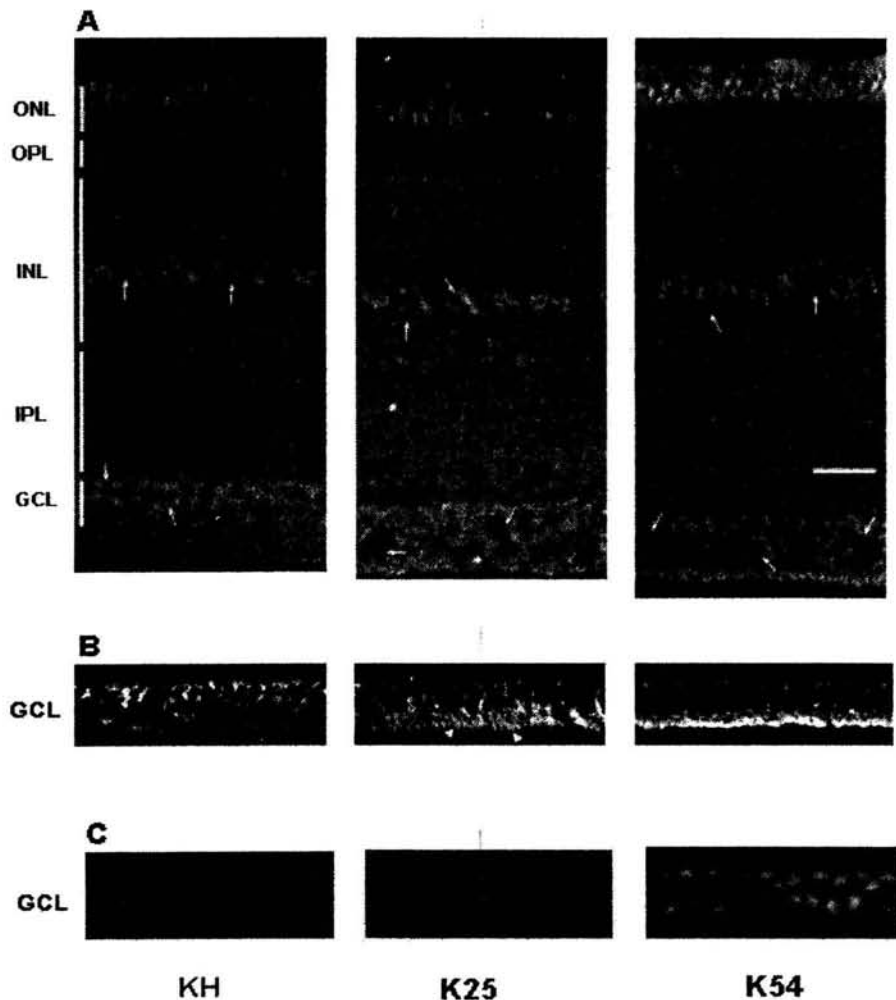


Fig. 8. Immunofluorescent micrographs of isolated retinas exposed to K54 or K25, stained with GFAP and DAPI. Retinas were excised and exposed by 3 min to KH (control), K25 or K54. After the experiment retinas were fixed, incubated with GFAP (A-B) and DAPI (C) antibodies, as describe in methods, and visualized by confocal microscopy. The images shown are from the ninth section of the series. **A.** KH shows the immunofluorescence characteristic of the Müller cells, with the processes surrounding the neuronal somas, which appear as dark areas (arrows). K25 note the swelling in middle part of the INL and GCL. Retinas treated with K54 show conspicuous swelling in the INL and extensive welling at GCL (arrows). **B.** GCLs of retinas treated with a more dilute GFAP antibody. Observed the fluorescence surrounding the cell body of the ganglion cells (arrows head), and expanding as the endfoot (arrows head) at the inner border of the retina. Upon K25, the ganglion cell bodies appear deformed and the endfoot appears markedly swollen. At K54 the ganglion cells appear markedly swollen and the fluorescence at the Müller cell endfeet appears concentrated at the more inner part of the layer. **C.** The ganglion cell layer disorganization is also evident when the cell nuclei are stained by DAPI. The nuclei which appear as ordered layers in the KH retina look markedly disorganized in the K25 condition. At the K54 the nuclei appear pycnotic and refringent, as an indication of cell damage at this layer. ONL: outer nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, INL: inner nuclear layer, IPL: inner plexiform layer, GCL: ganglion cell layer. All micrographs are at the same magnification (40 x). Bar = 0.25 mm.

of high extracellular K^+ , its driving force direction is changed, being then able of an efficient uptake (19).

The involvement of NKCC is suggested by the effect of a Na^+ -free medium reducing swelling by more than 50%. A Na^+ -free medium will also block the Na/K ATPase, and reduce K^+ accumulation, but as above discussed, in the presence of ouabain, swelling increases and not decreases. Therefore, the swelling decrease observed in Na^+ -free conditions cannot be ascribed to Na/K ATPase inhibition. The involvement of both NKCC and KCC in K25 conditions is further supported by results showing the saturation kinetics of ^{86}Rb uptake vs external Cl^- concentration. The ^{86}Rb uptake curve showed two components, one which saturates at about 9 mM and the other one at about 60 mM, closely corresponding to the Cl^- saturation kinetics for the two transporters reported as of 9 mM for KCC and about 60-80 mM for NKCC.

A somewhat conflicting result of our study regards the low sensitivity of K25-induced swelling to furosemide, which reduced it only by 17%. Furosemide is a blocker of both NKCC and KCC (various isoforms), similar in potency to bumetanide (17,18). However, furosemide was tested at concentrations of up to 1 mM, in parallel experiments with bumetanide, in retinas from the same chicken, and consistently exhibited a much weaker effect than bumetanide in reducing swelling (17% and 67%, respectively). In contrast, as next discussed, furosemide has a notably potent effect preventing swelling at higher KCl concentrations, and its effect is similar to that of Cl^- channel blockers.

Expression of both NKCC and a KCC isoform (KCC2) has been found in rat, mice, rabbit and monkey retina (20, 21) with specific expression at different retinal layers. Both transporters express at the outer plexiform layer, but only KCC2 is present at somas in the upper two tiers of the inner nuclear layer. KCC2 but not NKCC is found in the inner plexiform layer. At the ganglion cell layer, NKCC is absent from the somas and present in the axons, whereas the opposite is observed for KCC2 (20). It is unknown yet, whether a similar distribution occurs in the chick retina. The difference in swelling found in our study, between the various retinal layers may reflect such a different distribution.

Swelling evoked by K54 differs from swelling at K25 in the following points: i) swelling is prevented by NPPB and niflumic acid and is more strongly inhibited by DIDS, ii) it is Na^+ -independent, and iii) it is much less affected by bumetanide and DIOA. These results show that, at this KCl concentration, Cl^- channels, more than the cotransporters, are contributing to retinal swelling. Rather unexpectedly, swelling at this KCl concentration was prevented by furosemide. Thus, in our conditions, the effects of furosemide are similar to those of the Cl^- channel blockers such as NPPB and niflumic acid, rather than to the cotransporter blockers DIOA and bumetanide. These atypical actions of furosemide might reflect either a lower sensitivity to furosemide of the transporters in the chick retina, that as above mentioned, have not yet been examined, or alternatively, that furosemide has an action on a Cl^- channel activated during KCl accumulation.

Micrographies of retinas exposed to K25 or K54 were examined notably affected the ganglion cell layer, in which swelling occurs in the two conditions, being

higher at K54. The inner nuclear and the plexiform layers were affected only by K54, while in all cases, the outer layers were spared. In agreement with the results in the whole retina, bumetanide prevented cell swelling evoked by K25 and furosemide, niflumic acid and NPPB protected from swelling in K 54. It is so far unclear whether these differences reflect a different localization of the swelling-inducing mechanisms at the various cell populations, or if it just the expression of a quantitatively increasing operation of the same transport mechanisms. The ganglion cell somas contain the cotransporter KCC2 as well as K^+ channels of the Kv type, which may both contribute to cell swelling.

Swelling observed in some retinal layers, particularly at the inner synaptic and the ganglion cell layers, may reflect swelling of Muller cells, due to the close apposition of these cells with neurons, dendrites and nerve endings. This is particularly true at the inner plexiform layer and at the ganglion cell layer at which the endfoot is located. The Muller cells are the elements in charge of the K redistribution known as spatial buffering, by which excess of extracellular K resulting from neuronal activity, is taken up and temporarily stored, before being released into the vitreous or the perivascular membranes in the case of vascularized retinas. A main site for K redistribution in Muller cells is the endfoot, which contains the highest density of inward-rectifying K channels, mainly from the Kir 4.1 subtype. Marked swelling of the Muller cell endfoot was clearly observed in K25, together with an enlargement and disorganization of the ganglion cells. At K54, the marked swelling of ganglion cells appears to constrict the Muller cell area at this layer.

The mechanism of KCl-evoked swelling has been studied in some detail in cultured astrocytes, but the three

studies so far available (22, 23, 24) suggest the involvement of the KCC cotransporter (22) or a NPPB-sensitive Cl channel (23). Both mechanisms may be acting as suggested by our present results as well as by those in a recent study in a human osteoblast cell line (25). This report shows the activation by high KCl concentrations, of a volume-sensitive Cl⁻ channel occurring subsequent to the Cl⁻ increase due to the KCC cotransporter activity. From all these results, a sequence of events is suggested following the external KCl rise: 1. an increase in intracellular Na⁺, K⁺ and Cl⁻ carried by the cotransporters NKCC and KCC, followed by osmotically obligated water, 2. As external KCl concentration continues rising, further accumulation of K⁺ and Cl⁻ occurs as consequence of passive fluxes trough channels, resulting in more extensive and conspicuous swelling. The trigger for activation of these channels may be either the initial Na⁺, K⁺ and Cl⁻ accumulation, or the increase in cell volume resulting from this accumulation or another still unidentified signal. It is likely that the two mechanisms, i.e. carrier-mediated transport and channel-mediated influx operate and complement each other with some sort of interplay. Although in all cases, the key role played for Cl⁻ in K⁺-evoked swelling is unquestionable, the various mechanisms involved, and the different sensitivity to drugs, must be considered in any strategy directed to prevent swelling and its subsequent injuring cascade. The finding in this study of the high sensitivity of the ganglion cell layer to KCl-induced swelling is of particular interest in view of the potential damage that swelling and its cascade of injuring effects may have on the optic nerve.

Acknowledgements. We acknowledge the technical assistance of Mr. Rodolfo Paredes, and Mr. Jorge Sepulveda and Federico for histological and

microscopy. Dr. Fernando for confocal assistance. We greatly appreciate the help of Dr. Ana María López Colomé in providing us with the antibodies for the fluorescence detection of glutamine synthetase. Supported in part by grants Nos. IN206403-3 from DGAPA, UNAM, and 3586-N from CONACYT.

References

1. Brauer M, Frei E, Claes L, Grissmer S, Jager H (2003) Influence of K-Cl cotransporter activity on activation of volume-sensitive Cl⁻ channels in human osteoblasts. *Am J Physiol Cell Physiol.* 285:C22-30.
2. Cunha-Vaz J. (1998) Diabetic macular edema. *Eur. J. Ophthalmol.* 8:127-130.
3. Dahlem YA, Dahlem MA, Mair T, Braun K, Muller SC (2003) Extracellular potassium alters frequency and profile of retinal spreading depression waves. *Exp Brain Res.* 152:221-228.
4. Doberstein C, Fineman I, Hovda DA, Martin NA, Keenly L, Becker DP (1994) Metabolic alterations accompany ionic disturbances and cellular swelling during a hypoxic insult to the retina: an in vitro study. *Acta Neurochir Suppl.* 60:41-44.
5. Dominguez L, Montenegro J, Pasantes-Morales H (1989) A volume dependent, chloride-sensitive component of taurine release stimulated by potassium from retina. *J Neurosci Res.* 22:356-361.
6. Hansen AJ. (1985) Effect of anoxia on ion distribution in the brain. *Physiol Rev.* 65:101-148.
7. Hansson E, Muyderman H, Leonova J, Allansson L, Sinclair J, Blomstrand F, Thorlin T, Nilsson M, Ronnback L (2000) Astroglia and glutamate in physiology and pathology: aspects on glutamate transport, glutamate-induced cell swelling and gap-junction communication, *Neurochem. Int.*, 37: 317-329.
8. Kempinski O (2001) Cerebral edema. *Semin Nephrol.* 21:303-7.
9. Kempinski O, Staub F, Schneider GH, Weigt H, Baethmann A (1992) Swelling of C6 glioma cells and astrocytes from glutamate, high K⁺ concentrations or acidosis. *Prog Brain Res.* 94:69-75.
10. Kletzen RF, Pariza MW, Becker JE and Potter VR (1975) A method using 3-O-Methyl-D-glucose and phloretin for the determination of intracellular water space of cells in monolayer culture. *Anal Biochem.* 68: 537-544.
11. Lang F, Busch GL, Ritter M, Volkl H, Waldegger S, Gulbins E, Haussinger D (1998) Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev.* 78:247-306.
12. Lauf PK, Adragna NC (2000) K-Cl cotransport: properties and molecular mechanism. *Cell Physiol Biochem.* 10: 341-54.
13. MacVicar, BA, Feighan D, Brown A, Ransom B (2002) Intrinsic optical signals in the rat optic nerve: role for K⁽⁺⁾ uptake via NKCC1 and swelling of astrocytes, *Glia*, 37, 114-123.
14. Mercado A, De Los Heros P, Vazquez N, Meade P, Mount DB, Gamba G (2001) Functional and molecular characterization of the K-Cl cotransporter of *Xenopus laevis* oocytes. *Am J Physiol.* 281: C670-C680.
15. Pasantes-Morales H, Ochoa de la Paz LD, Sepulveda J, Quesada O (1999) Amino acids as osmolytes in the retina. *Neurochem Res.* 24:1339-1346.
16. Pasantes-Morales H, Schousboe A (1989) Release of taurine from astrocytes during potassium-evoked swelling. *Glia* 2: 45-50.
17. Payne JA. (1997) Functional characterization of the neuronal-specific K-Cl cotransporter: implications for [K⁺]_o regulation. *Am J Physiol.* 273:C1516-1525.
18. Russell JM (2000) Sodium-potassium-chloride cotransport. *Physiol Rev.* 80:211-276.
19. Rutledge, EM, Aschner, M, and Kimelberg, HK (1998) Pharmacological characterization of swelling-induced D-[³H]aspartate release from primary

- astrocyte cultures, *Am. J. Physiol.*, 274, C1511-C1520.
20. Somjen GC (1979) Extracellular potassium in the mammalian central nervous system. *Annu. Rev. Physiol.* 41: 159-177.
 21. Su G, Kintner, DB, and Sun, D (2002) Contribution of Na(+)-K(+)-Cl(-) cotransporter to high-[K(+)](o)- induced swelling and EAA release in astrocytes, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 282, C1136-C1146.
 22. Vardi N, Zhang LL, Payne JA, Sterling P (2000) Evidence that different cation chloride cotransporters in retinal neurons allow opposite responses to GABA. *J Neurosci.* 20:7657-7663.
 23. Vu TQ, Payne JA, Copenhagen DR. (2000) Localization and developmental expression patterns of the neuronal K-Cl cotransporter (KCC2) in the rat retina. *J Neurosci.* 20:1414-1423.
 24. Walz W (1992) Mechanism of rapid K(+)-induced swelling of mouse astrocytes. *Neurosci Lett.* 135:243-246.
 25. Walz W (2000) Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochem Int.* 36:291-300.

DISCUSION GENERAL

I. Mecanismos de liberación de aminoácidos en respuesta a condiciones de edema hiposmótico o isosmótico.

La respuesta celular consistente en movilizar osmolitos orgánicos, incluidos los aminoácidos, ante un incremento en volumen debido a la reducción en la osmolaridad externa se ha estudiado desde hace varios años. En cambio, la presencia de este tipo de respuesta en condiciones isosmóticas, se conoce mucho menos. En la investigación que llevamos a cabo y cuyos resultados se incluyen en los dos primeros artículos, tuvimos el interés de estudiar comparativamente la participación de los aminoácidos en las dos condiciones mencionadas. Abordamos dos aspectos en particular, uno, la caracterización farmacológica del mecanismo de liberación, y otro, la investigación de algunas de las señales de transducción que conectan la información sobre el cambio en el volumen y la activación de los efectores, en este caso, la liberación de los aminoácidos. Se seleccionaron tres aminoácidos para este estudio, aquéllos que, son los más abundantes en el tejido estudiado, y se conoce que tienen un papel de osmolitos en otras preparaciones. Estos son el ácido glutámico, la taurina y el GABA. La selección de estos aminoácidos tiene el interés adicional de que el glutamato y el GABA, además de una posible función como osmolitos, funcionan de manera importante como neurotransmisores. Su liberación en respuesta a condiciones hiposmóticas podría reflejar no sólo un papel como osmolitos, sino además una respuesta a condiciones concurrentes con la hiposmolaridad, como pueden ser la despolarización y la entrada de calcio. Asimismo, en condiciones de hinchamiento isosmótico como las seleccionadas en este estudio, la liberación de estos aminoácidos podría tener un componente de respuesta al incremento en volumen asociado con el incremento en los niveles de K^+ y a la falla energética causada por la anoxia.

En el caso de la liberación por reducción de la osmolaridad, se observó que, de los tres aminoácidos examinados, la taurina es la más sensible a cambios pequeños en la osmolaridad, mientras que el ácido glutámico sólo se libera ante un estímulo hiposmótico más alto (Fig. 1 Art. 1). Estos resultados son similares a los obtenidos por Pasantes-Morales y col. (20) en neuronas y astrocitos en cultivo. Un umbral menor de osmolaridad para la

taurina en comparación con el ácido glutámico, se reportó también en estudios in vivo (82). Esta mayor sensibilidad de la taurina a los cambios en osmolaridad es de particular interés en el sistema nervioso, en el que la utilización de GABA y el ácido glutámico como parte de los mecanismos de control del volumen celular en las células nerviosas, parecería ser un recurso extremo ante un exagerado cambio en volumen, que raramente se observa, aun en situaciones patológicas y prácticamente nunca en condiciones fisiológicas. Este comportamiento de las células nerviosas podría tener una lógica de supervivencia funcional, ya que la liberación al espacio extracelular de concentraciones muy elevadas de compuestos como el GABA y el ácido glutámico, que ejercen una profunda influencia sobre la excitabilidad neuronal, y que consecuentemente tendría repercusiones negativas sobre la comunicación neuronal. Basta recordar que alteraciones en la excitabilidad cerebral como las que se observan, por ejemplo en la epilepsia, son el resultado de una desregulación de los mecanismos que controlan la cantidad y el tiempo de permanencia de estos aminoácidos en el espacio sináptico. Igualmente, la movilización de estos aminoácidos, en particular del glutamato, puede explicar la aparición de estados convulsivos en condiciones de hiponatremia (83), así como el incremento en la amplitud de los potenciales excitadores postsinápticos (y en menor medida la de los potenciales inhibidores) que se ha reportado en rebanadas de hipocampo expuestas a medios de osmolaridad reducida (84). En cambio, la movilización de la taurina no tiene mayor riesgo, ya que su actividad sináptica se ejerce sólo a concentraciones muy elevadas. Estas observaciones refuerzan el carácter de la taurina como un osmolito ideal, que puede moverse del interior y al exterior de la célula sin afectar ningún aspecto ya sea metabólico o de interacción con receptores extracelulares que pudieran modificar el estado funcional de la célula o la comunicación intercelular, incluida la mediada por la transmisión sináptica en el sistema nervioso.

Como se mencionó anteriormente, nuestro interés en el presente estudio es el de investigar si las propiedades de la liberación de los aminoácidos estudiados corresponden a las de tipo osmolito o bien representan una respuesta de tipo neurotransmisor, evocada por fenómenos concurrentes con las condiciones experimentales empleadas. Desde hace algunos años se ha descrito en forma consistente que la liberación de taurina activada por un estímulo hiposmótico se puede bloquear con compuestos caracterizados como inhibidores de canales

de cloro (48, 85, 18, 3). Esto se ha observado prácticamente en todas las células que tienen la respuesta de liberación de taurina como parte del mecanismo de regulación de volumen. En estudios en paralelo, examinando la sensibilidad farmacológica de los flujos osmosensibles de cloro, los canales activados por hiposmolaridad, y la liberación de taurina, se ha observado esta semejanza en el perfil farmacológico en forma muy consistente. Ello llevó a postular que la taurina se moviliza en respuesta al hinchamiento a través de un canal aniónico poco específico. Posteriormente, en estudios electrofisiológicos se demostró que, efectivamente, la taurina, el ácido glutámico, el ácido aspártico y algunos otros aminoácidos neutros pueden permear a través de un canal aniónico activado por volumen (58), siempre y cuando se encuentren en forma de aniones. Lo que muestran estos resultados es que, en efecto, el canal de Cl^- sensible a volumen tiene el tamaño suficiente para permitir el paso de moléculas como los aminoácidos, aún aquellos del tamaño del ácido glutámico. Sin embargo, esto puede no ocurrir en condiciones fisiológicas, al menos para la taurina y el GABA, que se encuentran en forma de zwitterion, sin carga neta. Algunas evidencias recientes parecen sustentar, por el contrario, la existencia de dos vías distintas de liberación de Cl^- y taurina. En cualquier caso, una conclusión que se deriva de la bien documentada similitud en el perfil farmacológico de las vías de movilización del Cl^- y de los aminoácidos que actúan como osmolitos, es que las vías están estrechamente interconectadas. Asimismo, los bloqueadores de los canales de Cl^- son una herramienta útil para identificar el tipo de movilización de aquellos aminoácidos que como el glutamato y el GABA pueden tener una función como osmolitos y como neurotransmisores, con un mecanismo de liberación distinto.

En el presente trabajo se observó que la liberación de aminoácidos en respuesta a hiposmolaridad en la retina mostró algunas diferencias con respecto a los sistemas de neuronas y astrocitos en cultivo en cuanto a la sensibilidad a los bloqueadores de canales de Cl^- , siendo el DIDS más eficiente y el NPPB menos eficiente en la retina (Fig. 3, Art. 1), al contrario de lo que se observa en células nerviosas en cultivo (20). En un estudio en rebanadas de hipocampo de cerebro de rata se observaron resultados más parecidos a los obtenidos en la retina, es decir una mayor sensibilidad al DIDS que al NPPB (86).

Para el estudio de la respuesta celular a cambios en volumen en condiciones isosmóticas se utilizó un modelo experimental que reproduce una condición inicial en situaciones de isquemia, que es el incremento en la concentración extracelular de K^+ . En un cuadro isquémico en condiciones in vivo, los niveles extracelulares de este ion pueden llegar hasta 80 mM, y se ha considerado que esta situación es la responsable en buena medida, del incremento en el volumen celular en el cerebro asociada a esta patología. El incremento en el volumen se debe a la acumulación de K^+ en la célula, acompañado de Cl^- y agua osmóticamente obligada. Utilizamos también una condición experimental que simula lo que ocurre durante la isquemia, adicionalmente al incremento en la concentración de K^+ , que es la inhibición de la ATPasa Na^+/K^+ por ouabaina, reproduciendo la falla energética debida a la reducción del aporte de oxígeno y la consiguiente alteración en la función mitocondrial. Esta condición incrementa notablemente la liberación de los tres aminoácidos estudiados (Fig. 5, Art. 1 y Fig. 2, Art. 2). La liberación de taurina en estas condiciones es, en su mayor parte, una respuesta al incremento en volumen, como se demuestra por el hecho de que se inhibe más del 75% cuando el medio se hace hiperosmótico, o en cuando el Cl^- en las soluciones se sustituye por el anión impermeable gluconato, ambas condiciones, que previenen el aumento en volumen (Fig. 5, Art. 1 y Fig. 2, Art. 2). Estos resultados sugieren que la taurina funciona principalmente como osmolito en estas condiciones (87, 88). En el caso del glutamato, la reducción por las condiciones que previenen el aumento en volumen es menor (30%-50%) (Fig. 5, Art. 1 y Fig. 2, Art. 2) lo que sugiere un mecanismo de liberación diferente, posiblemente en respuesta a la despolarización inducida por las condiciones del modelo, es decir el incremento en K^+ extracelular y la concentración elevada de Na^+ intracelular resultante de la inhibición de la ATPasa de Na^+/K^+ . En estos estudios se examinó por primera vez el efecto de condiciones hiposmóticas y de hinchamiento isosmótico sobre la liberación de GABA (Figs. 1-5, Art. 1, Fig. 2, Art. 2). Los resultados muestran que en la retina, el GABA muestra un patrón de respuesta más similar al de la taurina que al del ácido glutámico, es decir, su movilización en condiciones isosmóticas responde más al incremento en el volumen que a la despolarización.

En conjunto, nuestros resultados mostraron que la liberación de taurina y GABA en modelos que reproducen algunas de las condiciones asociadas a la isquemia, muestra propiedades características de la movilización de los osmolitos, más que una respuesta tipo

neurotransmisor. En el caso del ácido glutámico, aunque una fracción de la liberación se asemeja a la de los osmolitos, otra fracción, posiblemente más importante, tiene otras características y posiblemente sea, como se mencionó anteriormente, el resultado de la despolarización (Figura 4). Estas observaciones deben tomarse en cuenta en aquellas investigaciones destinadas a conocer las características de la liberación de estos aminoácidos neuroactivos en respuesta a distintos estímulos despolarizantes, que como se demostró en el presente estudio, conllevan un incremento en el volumen celular, lo que induce una respuesta de liberación de aminoácidos asociada con este cambio, y no con la despolarización. Tal sería el caso para la veratridina o para el incremento en glutamato extracelular. En el caso de la veratridina se produce una despolarización por la entrada de Na^+ , que se acompaña de Cl^- para mantener la electroneutralidad, a lo cual se sigue una entrada obligada de agua. Lo mismo ocurre en el caso del ácido glutámico o de sus agonistas, los cuales, al activar a los receptores postsinápticos generan una entrada de Na^+ con el consiguiente incremento del volumen por los mecanismos ya mencionados. Estas consideraciones son también relevantes en la aún controvertida contribución del incremento de volumen al aumento en la concentración extracelular de glutamato durante la isquemia (89, 90) una situación de particular importancia, ya que la excitotoxicidad es uno de los factores críticos en la muerte neuronal que acompaña al cuadro isquémico, en particular en el área perifocal.

Los resultados del presente estudio hicieron patente la incapacidad de las células de la retina para recuperar eficientemente su volumen en condiciones de hinchamiento isosmótico (Fig. 1, Art. 2). Este resultado es, en cierta forma, el esperado, ya que la contribución de los componentes iónicos (K^+ y Cl^-) de la regulación del volumen es muy importante, y en las condiciones en las que el incremento en el volumen se debe precisamente a la entrada de estos iones, la respuesta adaptativa recae únicamente en los osmolitos orgánicos, cuya capacidad para ajustar el volumen celular es limitada, debido a la concentración presente en las células, o posiblemente también a la estrecha conexión con los mecanismos de movilización de Cl^- , discutidos en esta sección. Por estas razones, hemos considerado que en el caso del edema isosmótico, podría contemplarse una estrategia de prevención.

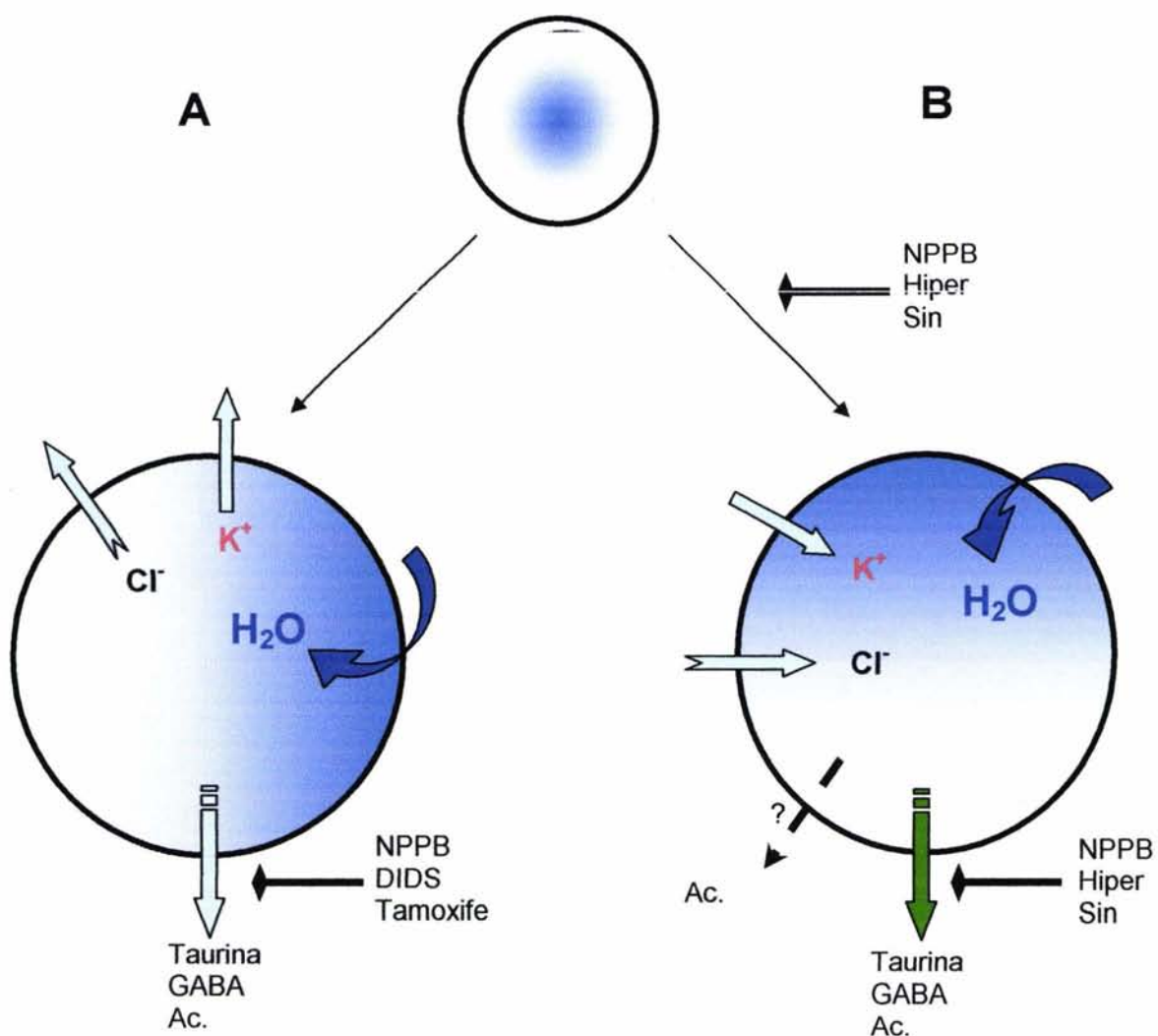


Figura 4. Mecanismo de liberación de osmolitos orgánicos en respuesta a un incremento de volumen. La Liberación de taurina, GABA y Ac. aspártico en condiciones Anisomóticas (A) y en condiciones Isomóticas (B) es inhibida por bloqueadores generales de canales de Cl^- indicando que, aparentemente, en ambas condiciones de edema los aminoácidos son liberados por una vía aniónica inespecífica en respuesta al hinchamiento. El Ac. aspártico muestra una fracción de su liberación independiente del hinchamiento. El incremento de volumen en condiciones Isomóticas se previene en ausencia de Cl^- y con NPPB.

II. Identificación de algunos elementos de las vías de señalización activadas por el incremento en volumen y su vínculo con la liberación de aminoácidos.

En esta parte de nuestra investigación, nos interesamos en conocer las señales de transducción activadas en respuesta a un incremento en el volumen y su influencia en la movilización de los aminoácidos que funcionan como osmolitos. Los resultados indican una participación de cinasas de tirosina, en particular de aquellas que son especialmente

sensibles a las tirfostinas. Estos resultados son similares a los obtenidos previamente en el laboratorio en relación con la liberación de taurina en neuronas y astrocitos en cultivo y en rebanadas de hipocampo en respuesta a hiposmolaridad, pero los resultados en condiciones isosmóticas son los primeros en ser reportados. Una observación interesante en este sentido fue la diferencia encontrada para el glutamato en cuanto a la sensibilidad a inhibidores de cinasas de tirosina, en comparación con la observada para la taurina y el GABA. Tanto en la condición hiposmótica como en la de K/O, la tirfostina bloquea casi por completo la liberación de estos dos últimos, mientras que no tiene prácticamente efecto sobre la liberación del glutamato (Tabla 1, Art. 2). Estos resultados sustentan la posibilidad esbozada en la sección anterior, en el sentido de que la liberación del GABA y la taurina corresponden en general, a su movilización como osmolitos, mientras que la del glutamato responde a condiciones tales como la despolarización y el incremento de Ca^{2+} que son concurrentes con el estímulo hiposmótico, aunque también no se puede descartar la participación de los transportadores de glutamato funcionando en reversa. En la condición de K/O, evidentemente la despolarización es el estímulo primario para la liberación del glutamato, mientras que este estímulo es responsable sólo de una parte de la liberación de la taurina y el GABA, mientras que la restante responde al incremento en volumen.

La participación de las cinasas de tirosina en los mecanismos de adaptación al incremento en el volumen a través de la liberación de osmolitos va adquiriendo cada vez mayor sustento experimental, pero hasta la fecha, la identidad molecular de la/las enzimas involucradas no se conoce. En el presente estudio encontramos que las MAP-cinasas ERK1/ERK2 aparentemente no participan en los mecanismos de liberación de osmolitos, (Fig. 3, Art. 2) (presente trabajo, 91, 92, 93). Estas enzimas sí se activan en respuesta a hiposmolaridad en otros tipos celulares, pero aún así, no participan en el mecanismo de liberación de osmolitos. (39, 94). En el presente estudio encontramos que las cinasas de tirosina p38 y p125^{FAK} se activan por hiposmolaridad, pero en el caso de la p38, su inhibición no modifica el flujo corrector de aminoácidos. La ausencia de un vínculo entre la activación de estas enzimas y la movilización de osmolitos no es sorprendente, ya que el incremento en volumen, tanto en condiciones isosmóticas como hiposmóticas es un fenómeno complejo al que concurren una variedad de eventos necesarios para la adaptación de la célula a los cambios de volumen, tales como cambios en la organización

del citoesqueleto, fenómenos de adhesión, y respuestas al estrés, entre otros. En el caso del hinchamiento isosmótico, a esto debe sumarse la despolarización y la falla energética inherentes al modelo empleado, lo que induce un conjunto de señales que pueden o no estar conectadas con la activación de las vías de liberación de osmolitos. Así, en el caso de la p38, que es típicamente una enzima activada por estrés, es de esperarse que su activación sea la consecuencia del estrés asociado con el estímulo hiposmótico y con la despolarización resultante en la condición de K/O. Previamente se ha reportado activación de la p38 en condiciones hiposmóticas en hepatocitos, colangiocitos, astrocitos en cultivo y neuronas de hipocampo (presente trabajo 94,93). En el caso de p125^{FAK}, su activación podría estar relacionada, ya sea con la activación de integrinas o alguna otra molécula de adhesión extracelular, desencadenada por el cambio en el volumen celular (Figura 5).

Por lo que se refiere a otras cinasas de tirosina, se ha identificado la participación de las cinasas de la familia Src, específicamente p72^{src} y p56^{lyn} en la liberación de taurina en eritrocitos de raya (95) y de la cinasa p56^{lyn} en las corrientes osmosensibles de Cl⁻ en linfocitos (96). La importancia de esta familia de cinasas de tirosina citosólicas en otras células, distintas de elementos del sistema sanguíneo, no se ha descrito hasta la fecha.

Un posible vínculo entre la activación de las cinasas de tirosina y la liberación de osmolitos en respuesta al hinchamiento, tanto isosmótico como hiposmótico, puede ser la cinasa PI3K. Esta no es una cinasa de tirosina y de manera general, puede ser activada por subunidades $\beta\gamma$ de proteínas G heterotriméricas; por la unión de regiones ricas en prolina a cinasas tipo src y JAK, y su posterior fosforilación; o por el reconocimiento de residuos de tirosina fosforilados en receptores membranales con actividad de cinasa de tirosina (RTK), como los receptores a factores de crecimiento, cuya participación hemos descrito recientemente (97). La actividad de la PI3K, medida a través de la fosforilación de PKB (ver métodos Art. 3), se incrementa en respuesta a condiciones hiposmóticas así como en presencia de K/O (Fig. 5 Art. 2). Esta activación se previene en ambos casos por los bloqueadores de la PI3K wortmannina y LY294002, así como por soluciones hiperosmóticas en el caso de K/O. El vínculo con la movilización de aminoácidos que funcionan como osmolitos se establece por el efecto inhibitorio de estos agentes sobre la

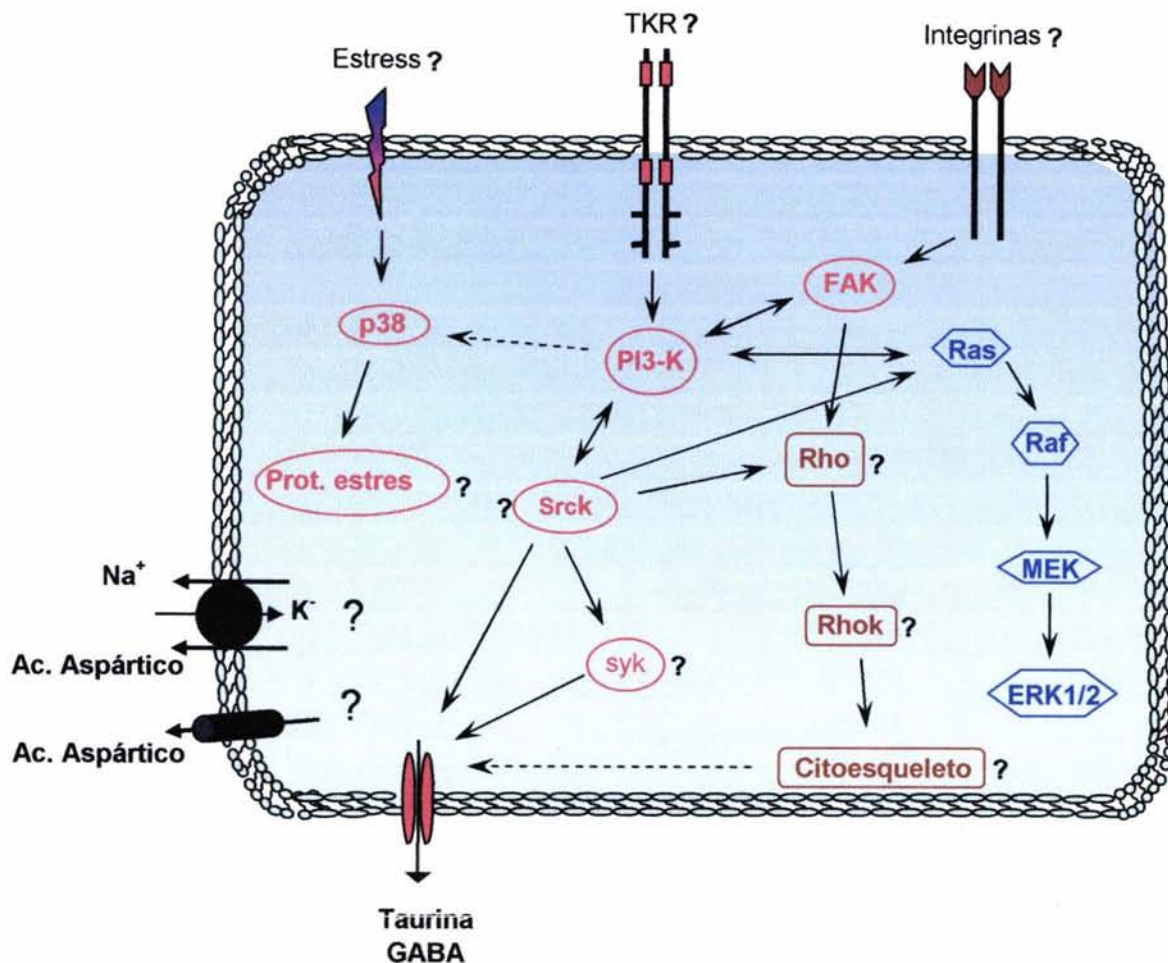


Figura 5. Esquema de las quinasas de tirosina activadas por un incremento de volumen, así como de los posibles (?) sensores de volumen y moléculas blanco corriente abajo, involucrados en la osmotransducción y liberación de taurina y GABA en la retina. Aparentemente la liberación de Ac. aspártico no es regulada por este tipo de señales, por lo que posiblemente su liberación sea por un mecanismo diferente.

liberación taurina y GABA en respuesta al incremento en volumen en las dos condiciones estudiadas. En congruencia con la independencia de la liberación del glutamato de quinasas de tirosina, esta movilización tampoco es sensible a modificaciones en la actividad de la PI3K. En conjunto, estos resultados destacan el papel de la PI3K en los mecanismos de señalización que conectan el cambio en volumen y la activación de los efectores (Figura 5). Este resultado, ya estudiado en trabajos previos nuestros y de otros grupos, se conoce por primera vez para el caso del incremento en volumen en condiciones isosmóticas.

En resumen, los resultados de estos dos estudios, permiten las siguientes conclusiones 1. La condición hiposmótica induce la respuesta adaptativa de decremento regulador de volumen, ampliamente generalizada en las células animales, 2. La reducción en la osmolaridad externa desencadena la liberación de aminoácidos que funcionan como osmolitos, aún de aquéllos que como el GABA y el glutamato, tienen un importante papel como neurotransmisores. 3. Las características de la liberación de la taurina corresponden, en general, a las observadas en otros tipos celulares, no así las del glutamato, que muestra características distintas, en cuanto a su perfil farmacológico y a su asociación con cinasas de tirosina por lo que esta liberación podría ser la consecuencia de eventos concurrentes con la hiposmolaridad, tales como la despolarización y el incremento en calcio citosólico. 4. La condición hiposmótica induce la liberación de GABA con características similares, en general, a las de la liberación de taurina. 5. En condiciones de hinchamiento isosmótico, que replican algunos de los cambios que tienen lugar en episodios de isquemia, el decremento regulador de volumen es parcial 6. La liberación de taurina y GABA en estas condiciones es, en su mayor parte, una consecuencia del hinchamiento y no de la despolarización, en tanto que lo opuesto es cierto para la liberación del glutamato. 7. Las cinasas de tirosina, en particular aquéllas sensibles a tirfostinas, tienen un papel importante como señales de asociación entre el cambio en el volumen celular y la respuesta adaptativa consistente en la activación de la salida de osmolitos. 8. La identidad molecular de estas cinasas aún no se conoce, pero podrían descartarse las MAP cinasas ERK1/ERK2 y la p38, cuya función puede estar asociada a mecanismos de adaptación al estrés. 9. La PI3K parece ser un elemento importante en la vía de señalización que conecta el cambio en volumen y la liberación de los osmolitos, posiblemente a través de una acción iniciada por cinasas de tirosina.

III. Mecanismos generadores de hinchamiento en condiciones isosmóticas: el modelo de K^+ /ouabaina

Los resultados de nuestros estudios mostraron que la retina responde con un mecanismo regulador del volumen al incremento inducido por condiciones hiposmóticas, pero que este proceso es mucho menos eficiente en condiciones isosmóticas, al menos en el modelo

empleado en nuestro trabajo (Fig. 1, Art.2, Fig. 1. Ms.3). Es lógico suponer que la poca capacidad de ajuste del volumen sea similar en otras condiciones isosmóticas en las que el hinchamiento se produce por una redistribución iónica seguida de la acumulación intracelular de agua. Por esta razón, suponemos que una mejor estrategia para evitar las consecuencias desfavorables del hinchamiento es su prevención. Con este propósito, en el modelo experimental seleccionado (K/O) examinamos los posibles mecanismos responsables del edema y una vez conocidos, probamos la eficiencia de su inhibición para contrarrestar el hinchamiento. Basándonos en el hecho, en cualquier caso, de que el Cl^- es un factor causal de edema, ya sea que acompañe al K^+ , como en el modelo experimental utilizado en nuestro estudio, o al Na^+ en los casos de hinchamiento por acidosis láctica, o por acumulación de glutamato, o por lipoperoxidación de las membranas, condiciones todas que acompañan al edema por traumatismo craneano, isquemia o encefalopatía hepática. Nuestro interés, por tanto, se centró en los mecanismos responsables de la entrada de Cl^- , un abordaje que se sustenta claramente por la observación de que en nuestro modelo, el hinchamiento se previene por completo al sustituir el Cl^- externo por un anión impermeable como el gluconato (Fig. 1 Ms.3). Una observación interesante en nuestro estudio fue la de que los mecanismos que llevan al hinchamiento de las células de la retina son distintos dependiendo de la magnitud del incremento en los niveles extracelulares de K^+ . Así, pudimos mostrar que mientras que a concentraciones inferiores a $\text{K} 25 \text{ mM}$, el cotransporte electroneutro de K^+ y Cl^- es predominante como mecanismo de acumulación de Cl^- y agua, a niveles más altos de K^+ , tales como los que se obtienen en condiciones de isquemia, la acumulación de Cl^- tiene lugar, posiblemente, a través de mecanismos difusionales mediados por el incremento en la permeabilidad de canales. Esta conclusión se basó prácticamente en el empleo de agentes inhibidores ya sea de los transportadores (bumetanida y DIOA) o de los canales de Cl^- (NPPB y ácido niflúmico) (Fig. 3 y 5, Ms. 3). A pesar de una cierta inespecificidad de los bloqueadores para inhibir los distintos tipos de transportadores, en su caso, o los canales de Cl^- , en el suyo, no hay ninguna duda acerca del tipo de transporte que es afectado por cada uno de los dos grupos de inhibidores, lo que valida nuestras conclusiones. Una observación interesante en este sentido es la del efecto de la furosemida, la cuál, en nuestro modelo, tuvo efectos claramente más cercanos a los de los bloqueadores de canales de Cl^- , lo que sugiere la posibilidad de que, además de su efecto perfectamente documentado como bloqueador de los transportadores electroneutros,

mediendo directamente la acción de la furosemida en el canal de Cl^- activado por volumen en una preparación de células aisladas (Figura 6).

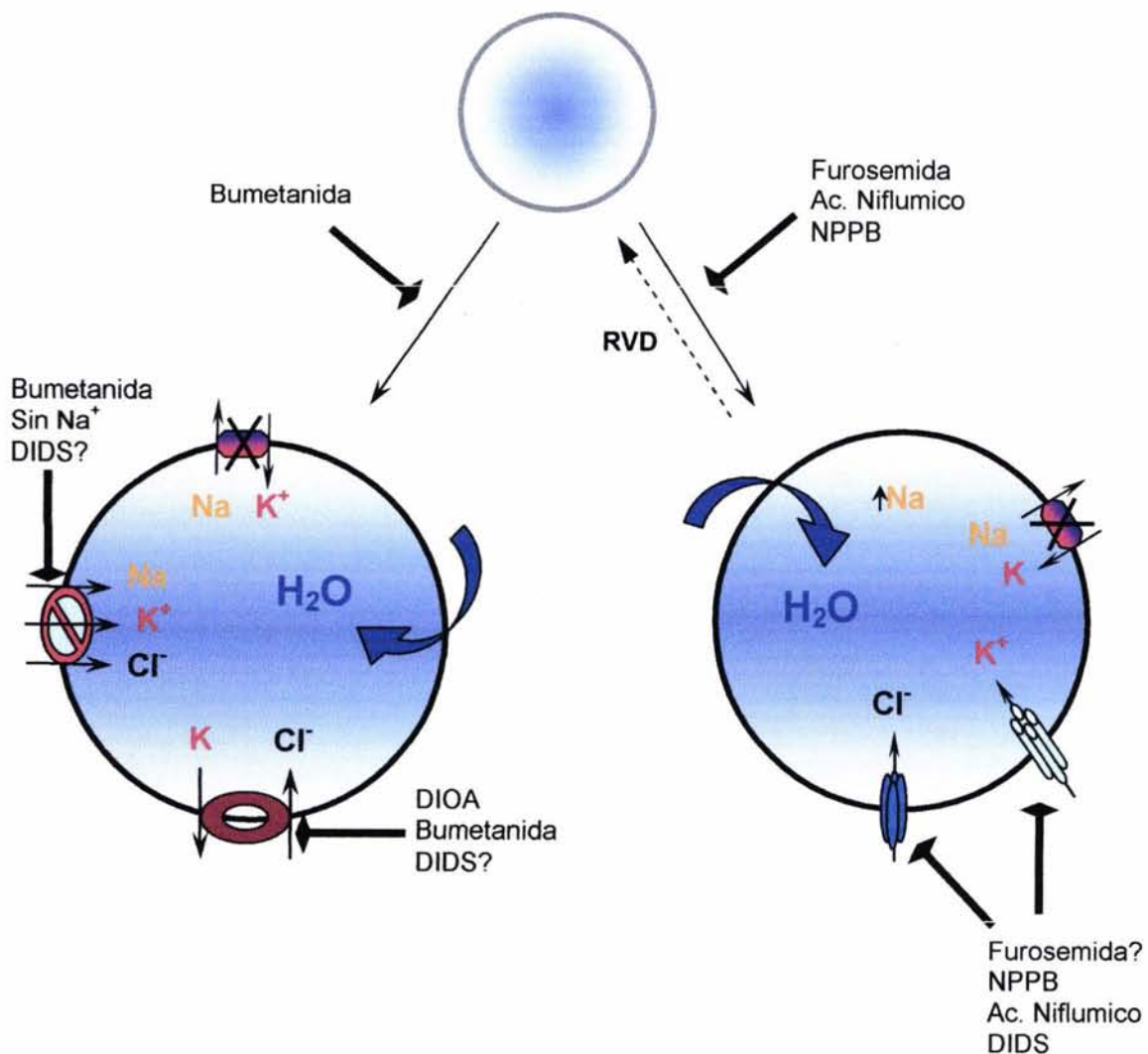


Figura 6. Representación esquemática mostrando las posibles vías de entrada de Cl^- en condiciones de edema Isosmótico, utilizando diferentes concentraciones de K^+ extracelular mas Ouabaina. **A:** aparentemente en condiciones de $\text{K}^+25 \text{ mM}$ mas Ouabaina 1mM , los cotransportadores $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ y K^+/Cl^- son los responsables de la Entrada de Cl^- . **B:** en condiciones de $\text{K}^+54 \text{ mM}$ mas Ouabaina 1 mM son canales por los cuales entra el Cl^- . Curiosamente la furosemida tiene un efecto inhibitor en estas condiciones. El hinchamiento se da principalmente en las células ganglionares, y en algunas células amacrinas de la retina. Este hinchamiento se previene con NPPB, Ac niflúmico, Furosemida en $\text{K}^+54 \text{ mM}$ y con Bumetanida en K^+25mM . Bajo condiciones de edema Isomótico (K^+54mM) la retina muestra una regulación parcial del volumen celular.

El análisis histológico de las retinas tratadas con concentraciones de K^+ distintas, mostró diferencias interesantes en cuanto al incremento en volumen en las distintas capas de la retina. En nuestro estudio observamos, por ejemplo, una clara resistencia al edema de la capa de los fotorreceptores, tanto en el soma como en las terminaciones sinápticas. A la concentración de 25 mM de K^+ extracelular, se observa edema en la mitad inferior de la capa nuclear interna y en la zona de las células ganglionares. A la concentración de K^+ más elevada (54 mM), se observa hinchamiento en las mismas capas celulares, pero además, la zona superior de la nuclear interna aparece dañada y tanto la plexiforme interna como la zona de las fibras del nervio óptico aparecen con muestras de hinchamiento. Es posible que el incremento en el volumen en las dos condiciones tenga un componente muy importante de participación de las células gliales de Müller. Estas células recorren la retina, desde la capa de fibras nerviosas hasta la capa de los fotorreceptores. La zona nuclear se localiza en la mitad inferior de la capa nuclear interna. Las células de Müller presentan numerosas ramificaciones que penetran en las dos capas plexiformes rodeando a las dendritas de las neuronas y a las terminaciones sinápticas. A nivel de las capas celulares, las prolongaciones de las células de Müller envuelven a los somas neuronales, en particular a nivel de la capa de células ganglionares. En esta zona y en la zona de fibras inmediatamente adyacente, es donde se localiza el llamado pie terminal de las células de Müller. Esta asociación de las células de Müller, junto con sus propiedades fisiológicas que se discutirán más adelante, sugieren que el hinchamiento que observamos asociado al incremento en K^+ extracelular, refleja prioritariamente un efecto sobre las células gliales. Esta suposición se sustenta, además, en el hecho de que una de las funciones mejor caracterizadas de las células de Müller, que comparte con otros tipos de células gliales en el sistema nervioso, es la de eliminar el K^+ extracelular, generado como consecuencia de la actividad neuronal. Los mecanismos hasta ahora descritos para esta remoción del K^+ externo son la actividad de la ATPasa de Na^+/K^+ y la actividad de canales de K^+ del tipo de los rectificadores entrantes. Una vez acumulado el K^+ , su eliminación tiene lugar a través del mecanismo conocido como de amortiguamiento espacial, o de sifoneo, que es también típico de las redes gliales en el tejido nervioso. En el caso de las células de Müller, la estratificación característica de la retina, y en el caso particular de la retina del pollo, su carácter no vascularizado, hacen que el amortiguamiento espacial tenga algunas propiedades distintas de las de la red glial, en las que el amortiguamiento ocurre a través de las uniones comunicantes que se

establecen entre los astrocitos. En las retinas no vascularizadas, el K^+ acumulado en distintas zonas de la célula de Müller sale preferentemente por el pie terminal hacia el vítreo (99) sin embargo, en nuestras condiciones experimentales, esta movilización del K^+ hacia el vítreo a través del pie de la célula posiblemente no se efectúa, debido a las condiciones de alto K^+ extracelular. En este proceso, los canales rectificadores entrantes de K^+ juegan un papel fundamental. Son los canales más abundantes en estas células y su distribución no es uniforme ya que se localizan preferentemente en el pie terminal (100). Es entonces en esta región de la retina, en la que ocurre una acumulación máxima de K^+ , lo que puede explicar el mayor incremento en volumen observado en este estrato. Es posible que el hinchamiento observado a concentraciones altas de K^+ (54 mM) en la capa plexiforme interna y en la zona de las fibras nerviosas, sea también debido a un incremento en el volumen de las prolongaciones de las células de Müller ubicadas en estas zonas. A otros niveles, la activación de la ATPasa de Na^+/K^+ , que también ocurre en respuesta al incremento en el K^+ extracelular, permitiendo la remoción del K^+ y su acumulación en el compartimiento intracelular, estaría contribuyendo al hinchamiento en otras zonas celulares.

Los resultados obtenidos en este trabajo con respecto al efecto de inhibidores de los transportadores de K^+/Cl^- y de canales de Cl^- en el incremento en volumen inducido por K^+ , sugieren la participación de los dos mecanismos de transporte. La acción de los bloqueadores de los canales puede situarse sin dificultad a nivel de la entrada de Cl^- como ion acompañante del K^+ , cuya ausencia o disminución terminaría por reducir el transporte del catión. En cuanto a la acción de los inhibidores de los transportadores, bumetanida y DIOA, el mecanismo de prevención del hinchamiento puede situarse ya sea a nivel de las células ganglionares, en las que en la retina de los vertebrados se ha descrito la presencia del cotransportador KCC2, o bien a nivel del pie terminal de las células de Müller, en las que, sin embargo, no se ha reportado que se encuentre ningún tipo de cotransportador.

Una opción interesante para explicar el efecto de los inhibidores de los transportadores es la que sugiere un trabajo reciente en osteoclastos, en los que al ser expuestos a concentraciones elevadas de K^+ , se describe la apertura de un canal de Cl^- sensible a volumen, luego de que la acción del cotransportador de K^+/Cl^- , lleva a la entrada de agua y el incremento en volumen. La distribución del Cl^- en el espacio extracelular y en el interior

de la célula, haría que en estas condiciones, este canal permitiera la entrada de Cl^- al compartimiento intracelular, contribuyendo al mayor incremento en el volumen. Esta posibilidad requeriría sin embargo, que el cotransportador estuviera presente en las células de Müller, o bien que el aumento en volumen por este mecanismo se ubicara a nivel neuronal. Otra opción planteada también en este trabajo, es que los propios bloqueadores del transportador ejercieran un efecto inhibitor sobre el canal de Cl^- . La idea se sustenta en que el DIOA inhibe el canal de Cl^- sensible a volumen en condiciones hiposmóticas. Lo mismo podría plantearse para la furosemida, cuya acción, como se describe en nuestro estudio, es en todo similar a la de los bloqueadores de canales de Cl^- sensibles a volumen, como el NPPB y el ácido niflúmico.

El mecanismo de hinchamiento producido por KCl ha sido estudiado en astrocitos en cultivo obtenidos de la corteza cerebral de la rata. (98) principalmente por dos grupos, quienes obtienen resultados opuestos en relación con el mecanismo responsable del edema. Mientras que en uno de los estudios el hinchamiento se previene con bumetanida, a concentraciones características de la inhibición del cotransportador electroneutro, en el otro, el incremento en volumen disminuye drásticamente en presencia de bloqueadores de canales de Cl^- . Puesto que ambos estudios se llevaron a cabo en el mismo tipo celular, y utilizando concentraciones similares de K^+ extracelular, no hay razones muy claras que expliquen la discrepancia, a no ser que ambos bloqueadores sean igualmente eficientes, a pesar de que sus acciones características se ubiquen en mecanismos de acción distintos, como son los cotransportadores y los canales de Cl^- . Debe hacerse notar que en los estudios referidos no se probaron otros bloqueadores distintos de los mencionados en cada uno de ellos. Estos resultados, junto con los del presente estudio, señalan la necesidad de llevar a cabo estudios comparativos del efecto de estos fármacos sobre los canales de Cl^- que se activan por el incremento de volumen.

Los resultados de nuestro trabajo constituyen una de las primeras aproximaciones a caracterizar los mecanismos de entrada de Cl^- en condiciones de incremento en volumen isosmótico. Un hallazgo interesante es en el sentido de que agentes como la furosemida, que se han utilizado ampliamente en la clínica, pueden ejercer una acción preventiva del edema en la retina, particularmente en los casos en los que el componente sea de origen celular.

REFERENCIAS

1. Alvarez-Leefmans F, Reus L. 1996. Operación orquestada de los sistemas de transporte a través de la membrana plasmática: regulación y mantenimiento del volumen celular en: *Biofísica y Fisiología Celular*, Latorre R., López-Barneo J., Bezanilla F., Llinás R., Eds. Universidad Sevilla, 177 – 214.
2. Agre P, Kozono D. 2003. Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases. *FEBS Lett.* 555: 72-8.
3. Pasantes-Morales H. 1996. Volume regulation in brain cells: cellular and molecular mechanisms. *Metab Brain Dis.* 1: 187-204.
4. Lang F, Busch GL, Volkl H. 1998. The diversity of volume regulatory mechanisms. *Cell Physiol Biochem.* 8:1-45.
5. Hoffmann EK, Simonsen LO. 1989. Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells. *Physiol Rev.* 69:315-82.
6. McManus ML, Churchwell KB. 1994. Clinical significance of cellular osmoregulation. En *Cellular and Molecular Physiology of the Cell Volume Regulation*. Edit. Strange K. CRC Press. USA. 63-77.
7. Payen JF, Fauvage B, Falcon D, Lavagne P. 2003. Brain oedema following blood-brain barrier disruption: mechanisms and diagnosis *Ann Fr Anesth Reanim.* 22:220-5.
8. Jencean SM. 2003. Brain edema -- a new classification. *Med Hypotheses.* 61:106-9.
9. Jefferys JGR, Hass HL. 1982. Synchronized bursting of CA1 hippocampal pyramidal cells in the absence of synaptic transmission. *Nature.* 200: 448-450.
10. Taylor CP, Dudek FE, 1982. Synchronous neural afterdischarge in rat hippocampal pyramidal cells without active chemical synapses. *Science.* 218: 810-812.
11. Baker EA, Tian Y, Adler S, Verbalis JG. 2000. Blood-Barrier disruption and complement activation in the brain following rapid correction of chronic hyponatremia. *Exp. Neurol* 165: 221-230.
12. Macdonald RL, Stoodley M. 1998. Pathophysiology of cerebral ischemia. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 8:1-11.
13. Butterworth RF, 2003. Molecular neurobiology of the acute liver failure. *Semin. Liver Dis.* 23: 251

14. Martinez-Hernandez A, Bell KP, Norenberg MD. 1997. Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science*. 195: 1356.
15. Felipo V, Butterworth RF. 2002. Neurobiology of ammonia, *Prog Neurol*. 67:259
16. Lassmann H, Petsche U, Kitz K, Baran H, Sperk G, Seitelberger F, Hornykiewicz O. 1984. The role of brain edema in epileptic brain damage induced by systemic kainic acid injection. *Neuroscience*.13:691-704.
17. Hallows KR, Knauf PA. 1994. en *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation*, Strange K, Eds. CRC Press. Boca Raton. 3-30 pp.
18. Lang F., Guillian, L.B., Markus, R., Holard, V., Siegfriel, W., Erich, G., and Dieter, H.1998. Functional Significance of Cell Volume Regulatory Mechanism. *Phys. Reviews*. 78: 248-273.
19. Kimelberg HK, Goderie SK, Higman S, Pang S, Waniewski RA. 1990. Swelling-induced release of glutamate, aspartate, and taurine from astrocyte cultures. *J Neurosci*. 10:1583-91
20. Pasantes-Morales H, Maar TE, Moran J. 1993b. Cell volume regulation in cultured cerebellar granule neurons. *J Neurosci Res*. 34:219-24.
21. Pasantes-Morales H, Murray RA, Lilja L, Moran J. 1994a. Regulatory volume decrease in cultured astrocytes. I. Potassium- and chloride-activated permeability. *Am J Physiol*. 266:C165-71.
22. Kimelberg HK. Ranson BR. 1986. Physiological aspects of astrocytic swelling. Edit. Federoff S, Vernadakis A. *Astrocytes*, Vol. 3 San Diego: Academic Press. 129-166 pp.
23. Pasantes-Morales H, Schousboe A. 1989. Release of taurine from astrocytes during potassium-evoked swelling. *Glia*. 2:45-50.
24. Pasantes-Morales H, Alavez S, Sanchez Olea R, Moran J. 1993. Contribution of organic and inorganic osmolytes to volume regulation in rat brain cells in culture. *Neurochem Res*. 18:445-52.
25. Sanchez Olea R, Pasantes-Morales H, Lazaro A, Cereijido M. 1991. Osmolarity-sensitive release of free amino acids from cultured kidney cells (MDCK). *J Membr Biol*. 121:1-9.
26. Bedford JJ, Leader JP. 1990. The effects of a hyperosmotic challenge in vivo on tissue composition of rat cardiac and skeletal muscle. *J Cardiovasc Pharmacol*. 16: Suppl 7:S24-6.

27. Pasantes-Morales H, Murray RA, Sanchez-Olea R, Moran J. 1994b. Regulatory volume decrease in cultured astrocytes. II. Permeability pathway to amino acids and polyols. *Am J Physiol.* 266:C172-8.
28. Pasantes-Morales H, Morales Mulia S. 2000. Influence of calcium on regulatory volume decrease: role of potassium channels. *Nephron.* 86:414-27.
29. Tilly BC, van den Berghe N, Tertoolen LG, Edixhoven MJ, de Jonge HR. 1993. Protein tyrosine phosphorylation is involved in osmoregulation of ionic conductances. *J Biol Chem.* 268:19919-22.
30. Sadoshima J, Qiu Z, Morgan JP, Izumo S. 1996. Tyrosine kinase activation is an immediate and essential step in hypotonic cell swelling-induced ERK activation and c-fos gene expression in cardiac myocytes. *EMBO J.* 15:5535-46.
31. Crepel V, Panenka W, Kelly ME, MacVicar BA. 1998. Mitogen-activated protein and tyrosine kinases in the activation of astrocyte volume-activated chloride current. *J Neurosci.* 18:1196-206.
32. Lepple-Wienhues A, Szabo I, Laun T, Kaba NK, Gulbins E, Lang F. 1998. The tyrosine kinase p56lck mediates activation of swelling-induced chloride channels in lymphocytes. *J Cell Biol.* 141:281-6.
33. Musch MW, Hubert EM, Goldstein L. 1999. Volume expansion stimulates p72(syk) and p56(lyn) in skate erythrocytes. *J Biol Chem.* 274:7923-8.
34. Niisato N, Post M, Van Driessche W, Marunaka Y. 1999. Cell swelling activates stress-activated protein kinases, p38 MAP kinase and JNK, in renal epithelial A6 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 266:547-50.
35. Lang F., Guillian, L.B., Markus, R., Holard, V., Siegfriel, W., Erich, G., and Dieter, H.1998. Functional Significance of Cell Volume Regulatory Mechanism. *Phys Reviews.* 78: 248-273.
36. Nilius B, Eggermont J, Voets T, Buyse G, Manolopoulo V, Droogmans G. 1997. Properties of volume-regulated anion channels in mammalian cells. *Prog Biophys Molec. Biol.* 68: 69-119.
37. Farenchak AP, Roman RM, Schwiebert EM, Fitz JG. 1998. Phosphatidylinositol 3-kinases contribute to cell volumeregulation through effects on ATP release. *J Biol Chem.* 273: 14906-14911.
38. Wymann MP, Pirola L. 1998. Structure and function of phosphoinositide 3-kinase. *Biochim Biophys Acta.* 436: 127-150.

39. Morales-Mulia S, Cardin V, Torres-Márquez ME, Crevenna A, Pasantes-morales H. 2000. Influence of protein kinases on the osmosensitive release of taurine from cerebellar granule neurons. *Neurochem. Int.* 38: 153-161.
40. Nilius B, Voets T, Prenen J, Barth H, Aktories K, Kaibuchi K, Droogmans G, Eggermont J. 1999. Role of Rho and Rho kinases in the activation of volume-regulate anion channels in bovine endothelial cells. *J Physiol.* 516: 67-74.
41. Phillis JW, O' Regan MH. 1996. Mechanisms of glutamate and aspartate release in the ischemia rat cerebral cortex. *Brain Res.* 730: 150-164.
42. Song D, O' Regan MH, Phillis JW. 1998. Protein kinase inhibitors attenuate cardiac swelling-induced amino acid release in the rat. *J Pharm Pharmacol.* 50: 1280-1286.
43. Kitagawa H, Warita H, Sasaki C, Zhang WR, Sakai K, Shiro Y, Mitsumoto Y, Mori T, Abe K. 1999. Immunoreactive Akt, PI3-K and EERK protein kinases expression in ischemic rat brain. *Neurosci Lett.* 274: 45-48.
44. Namura S, Iihara k, Takami S, Nagata I, kikuchi H, MatsushitaK, Moskowitz MA, Bonventre JV, Alessandrini A. 2001. Intravenous administration of MEK inhibitors UO126 affords brain protection against forebrain ischemia and focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci. USA* 98: 11569-11574.
45. Park KM, Chen A, Bonventre JV. 2001. Prevention of kidney ischemia/reperfusion-induced functional injury and JNK, p38 and MAP kinases activation by remote ischemia pretreatment. *J Biol Chem.* 276: 11870-11876.
46. Hayashi A, Kim HC, de Juan E Jr. 1999. Alteration in protein tyrosine kinases pathways following retinal vein occlusion in the rat. *Curr Eye Res.* 18: 231-239.
47. Ninning R, Schliess F, Kutis R, Hässinger D. 1997: Osmosignalling in C6 glioma cells. *FEBS Lett.* 400: 163-167.
48. Tilly BC, Gaestel M, Engl K, Edixhoven MJ, Junge HR. 1996. Hypo-osmotic cell swelling activated the p38 MAP-Kinase signaling cascade. *FEBS Lett.* 395: 133-136.
49. Falke BC, Mislner. 1989. Activity of anion channel during volume regulation by clonal N1E115 neuroblastoma cell. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86: 3919-3923.
50. Sanches-Olea, Moráles M, García O, Pasantes-Morales H. 1996a. Cl⁻ channel blockers inhibit the volume-activated efflux of Cl⁻ and taurine in cultured neurons. *Am. J. Physiol.* 270: C1703-C1708.
51. Deutsch C, Chen LQ. 1993. Heterologous expression of specific K⁺ channels in T lymphocytes: Functional consequences for volume regulation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90: 10036-10040

52. Baraban, S.C., Bellingham, M.C., Berger, A.J., Schwartskroin, P.A.1997: Osmolarity modulate K^+ channel function on rat hippocampal interneurons but not CA1 pyramidal neurons. *J. Physiol.* 498: 679-689.
53. Pasantes-Morales H, Morales-Mulia S. 2000. Influence of calcium on regulatory volume decrease: role of potassium channels. *Nephron.* 86: 414-4327.
54. Strange K, Emma F, Jackson PS.1996. Celular and molecular physiology of volume-sensitive anion channels. *Am J Physiol.* 270: C711-C730.
55. Schousboe A, Sánchez-Olea R, Morán J and Pasantes-Morales H. 1991. Hyposmolarity-induced taurine release in cerebelar granule cell in associated with diffusion and not with high-affinity transport. *J Neurosci Res.* 30: 661-665.
56. Sánchez-Olea R, Morán J, Schousboe A, and Pasantes-Morales H.1991. Hyposmolarity-activated fluxes of taurine in astrocytes are mediated by diffusion. *Neurosci Lett.* 130: 233-236.
57. Banderali U. Roy G. 1992. Anion channels for amino acids in MDCK cells. *Am J Physiol.* 263: C1200-7.
58. Huxtable RJ. 1992. Physiological action of taurine. *Physiol. Rev.* 72: 101-163.
59. Beerman ER. 1991. *Biochemistry of the Eye.* Plenum press. New York. 46 pp.
60. Ruben A, Debora F. 1996. *The Retina. A Model for Cell Biology Studies.* Part II. Academic Press,INC. London. 337 pp
61. Morán, J., S. Hurtado and Pasantes-Morales, H.1991. Similar propertis of taurine release induced by potassium and hyposmolarity in the rat retina. *Exp. Eyes Res.* 53: 347-352.
62. Pasantes-Morales H, Morán J, and Schousboe A. 1990b. Volume-sensitive release of taurine and free aminoacid from astrocytes; propertis and mechanism. *Glia.* 3: 427-32.
63. Olney JW, Price MT, Samsom L. and Labroyere J. 1986. The role of specific ions in glutamate neurotoxicity. *Neurosci. Lett.* 102: 64-69.
64. Domínguez L, Montenegro J, and Pasantes-Morales H. 1989. A volume-dependent chloride-sensitive component of taurine release stimulated by potassium from retina. *J Neurosci Res.* 22: 356-61.
65. Walz W. 1986. Swelling and potassium uptake in cultured astrocytes. *Can J Physiol Pharmacol.* 65: 1051-7.
66. López-Colome and Pasantes-Morales H. 1978. Potassium-stimulated release of glycine, GABA and taurine from the chick retina. *Neurochem Res.* 3: 431-41.

67. Schousboe A, Morán J. and Pasantes-Morales H. 1990b. Potassium stimulated release of taurine from cultured cerevelar granule neurons is associated with cell swelling. *J Neurisci Res.* 27: 71-77.
68. Schousboe A, Morán J. and Pasantes-Morales H. 1990b. Potassium stimulated release of taurine from cultured cerevelar granule neurons is associated with cell swelling. *J Neurisci Res.* 27: 71-77.
69. Lehmann A, Hagberg H, Jacobsen I, and Hamberger A. 1985 a. Effects of status epilepticus on extracelular amino acid in the hippocampus. *Brain Res.* 359: 147-51.
70. Menéndez N, Herrera O, Solís JM, Herranz AS. and Martín del Río R. 1989. Extracelular taurine increase in rat hippocampus evoked by specyfic glutamate receptor activation is related to the excitatory potency of glutamate agonist. *Neursci. Lett.* 65: 65-71.
71. Goldberg MP, Choi DW. 1993. Combined oxygen and glucosa deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium –independent mechanisms of neuronal injury. *J Neurosci.* 13: 3510-3524.
72. Orr H, Cohen AL, Lowry OH. 1976. The distribution of taurine in the vertebrate retina. *J Neurochem.* 26: 609-611.
73. Goto H, Wu GS, Chen F, Kristeva M, Sevenian A. Rao NA. 1992. Lipid peroxidation in experimental uveitis: sequential studies. *Curr Eyes Res.* 11: 489-499.
74. Ito T, Nakao M, Yamamoto Y, Hiramitsu T, Mizuno Y. 1995. Hemoglobin-induced lipid peroxidation in the retina: a possible mechanism for macular degeneration. *Arch Biochem Biophys.* 316: 864-872.
75. Zhang H, Agardh E, Agardh CD. 1991. Hydrogen peroxide production in ischemic retina: influence of hyperglycemia and postischemic oxygen tension. *Diabetes Res.* 16: 29-35.
76. Hoffmann EK. 2000. Intracellular signaling involved in volume regulatory decrease. *Cell Physiol Biochem.* 10: 273-288.
77. Pasantes-Morales H, Cardin V, Tuz K. 2000. Signaling events during swelling and regulatory volume decrease. *Neurochem Res.* 25: 1301-1314.
78. Cunha-Vaz J. 1998. Diabetic macular edema. *Eur J Ophthalmol.* 8: 127-130.
79. Dahlem YA. Dahlem MA, Mair T, Braun K, Muller SC. 2003. Extracellular potassium alters frequency anf profile of retinal spreading depression waves. *Exp Brain Res.* 152: 221-228.

80. Doberstein C, Fineman I, Hovda DA, Martin NA, Keely L, Becker DP. 1994. Metabolic alterations accompany ionic disturbances and cellular swelling during a hypoxic insult to the retina: an in vitro study. *Acta Neurochim Suppl.* 60: 41-44.
81. Kempinski O, Staub F, Schneider GH, Weigt H, Baethmann A. 1992. Swelling of C6 glioma cells and astrocytes from glutamate, high K⁺ concentration or acidosis. *Prog Brain Res.* 94: 69-75.
82. Solis JM, Herranz AS, Herreras O, Lerma J, Martin Del Rio R. 1988 Low chloride-dependent release of taurine by a furosemide-sensitive process in the in vivo rat hippocampus. *Neuroscience.* 24: 885-891.
83. Arief IA. 1986. Hyponatremia, convulsions, respiratory arrest, and permanent brain damage after elective surgery in healthy women. *N Engl J Med.* 314:1529-1535.
84. Somjen GG. 1999. Low external NaCl concentration and low osmolarity enhance voltage-gated Ca currents but depress K currents in freshly isolated rat hippocampal neurons. *Brain Res.* 851:189-197.
85. Kirk K. 1997. Swelling-activate organic osmolytes channels. *J Membr Biol.* 158: 1-16.
86. Pasantes-Morales H, Franco R, Torres-Marquez ME, Hernandez-Fonseca K, Ortega A. 2000. Amino acid osmolytes in regulatory volume decrease and isovolumetric regulation in brain cells: contribution and mechanisms. *Cell Physiol Biochem.* 10:361-370.
87. Estevez AY, Song D, Phillis JW, O'Regan MH. 2000. Effects of the anion channel blocker DIDS on ouabain- and high K(+)-induced release of amino acids from the rat cerebral cortex. *Brain Res Bull.* 52:45-50.
88. Saransaari P, Oja SS. 1999. Characteristics of ischemia-induced taurine release in the developing mouse hippocampus. *Neuroscience.* 94:949-954.
89. Phillis JW, Ren J, O'Regan MH. 2000. Transporter reversal as a mechanism of glutamate release from the ischemic rat cerebral cortex: studies with DL-threo-beta-benzyloxyaspartate. *Brain Res.* 880:224.
90. Rossi DJ, Oshima T, Attwell D. 2000. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature.* 403:316-21.
91. Feranchak AP, Berl T, Capasso J, Wojtaszek PA, Han J, Fitz JG. 2001. p38 MAP kinase modulates liver cell volume through inhibition of membrane Na⁺ permeability. *J Clin Invest.* 108:1495-1504.
92. Franco R, Torres-Marquez ME, Pasantes-Morales H. 2001. Evidence for two mechanisms of amino acid osmolyte release from hippocampal slices. *Pflugers Arch.* 442:791-800.

93. vom Dahl S, Schliess F, Graf D, Haussinger D. 2001. Role of p38(MAPK) in cell volume regulation of perfused rat liver. *Cell Physiol Biochem.* 11:285-294.
94. van der Wijk T, Tomassen SF, de Jonge HR, Tilly BC. 2000. Signalling mechanisms involved in volume regulation of intestinal epithelial cells. *Cell Physiol Biochem.*10:289-296.
95. Hubert EM, Musch MW, Goldstein L. 2000. Inhibition of volume-stimulated taurine efflux and tyrosine kinase activity in the skate red blood cell. *Pflugers Arch.* 440:132-139.
96. Lepple-Wienhues A, Szabo I, Wieland U, Heil L, Gulbins E, Lang F. 2000. Tyrosine kinases open lymphocyte chloride channels. *Cell Physiol Biochem.* 10:307-312.
97. Franco R, Lezama R, Ordaz B, Pasantes-Morales H. 2004. Epidermal growth factor receptor is activated by hyposmolarity and is an early signal modulating osmolyte efflux pathways in Swiss 3T3 fibroblasts. *Pflugers Arch.* 447: 830-839.
98. Rutledge EM, Aschner M, Kimelberg HK. 1998. Pharmacological characterization of swelling-induced D-[³H]aspartate release from primary astrocytes cultures. *Am J Physiol.* 274: C1511-C1520.