

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**“Modulación de la liberación de taurina por ATP en condiciones  
hiposmóticas: vías de señalización involucradas”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BIÓLOGO

PRESENTA

RAFAEL RODRÍGUEZ MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. RODRIGO FRANCO CRUZ



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.

## Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno  
Rodríguez  
Martínez  
Rafael  
56302724  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
096071580
2. Datos del tutor  
Dr  
Rodrigo  
Franco  
Cruz
3. Datos del sinodal 1  
Dr  
Benito  
Ordaz  
Sánchez
4. Datos del sinodal 2  
M en C  
Fernando  
Hernández  
Sánchez
5. Datos sinodal 3  
M en I B B  
Alette  
Ortega  
Gómez
6. Datos sinodal 4  
Dra  
Herminia  
Pasantés  
Ordoñez
7. Datos del trabajo escrito  
Modulación de la liberación de taurina por ATP en condiciones hiposmóticas  
vías de señalización involucradas  
57 p  
2006

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por las bendiciones, fortaleza, paciencia...

A los que emprendieron el viaje eterno: papá, que te has de asomar diario a los amaneceres de Zihuatanejo, visitar de vez en cuando el atlético, y has de querer resolver algo con "pics"; abuelo que estarás pensando en la mecánica y arreglar alguna carcacha; amigo Alfredo con los Beatles y resolviendo enigmas de la Rubisco.

A mi Familia: Mamá, mis hermanas Isa y Xochilt por tanto amor y apoyo, mi abue Lupita, abue Carmelita a mis tíos: Pilar, Alicia, Geor, Eva, Prospero, Luis...; mis primos: Alex, Sara, Lau, Joca, Joel, Adhasa..., todos los que han estado conmigo apoyándome, nadando en carrizales, Chachalacas, Tehuacán o de plano en el lateral del canal o bien los que hemos sufrido comiendo barbacha o parrillada de San Hipólito.

La estancia en Tecamachalco me dejó satisfacciones personales y amigos valiosos como el entrañable Juan y su familia; los Picon: Jami, Daniel, Doc. Rafa...; Cleofás, Jorge, oso, Reyna y a todos mis compañeros en secundaria; a el lobo Rubén, Luz Maria, Gonzalo, Antonia, Juan, Lauro Carrizosa y todos los demás profesores que creyeron en mí y me apoyaron; la familia Ramírez Torres: don David, Ana, Cheo, Eliberto, sobre todo a Sonia y David con quienes a últimas fechas y espero que por mucho tiempo compartimos el sueño DSideris.

Viajar 2 horas al CCH Naucalpan, valía la pena para convivir y haber tenido tantas aventuras, con los Kalchakis: Paredes, Daniel, Roberto, Krishna, Itzel, Rocio, Juan... amigos entrañables para el resto de mi vida.

Ya en la facultad... amigos como Tona, Frias, Hunab, Paty, Alejandro-bucles (chicles), Oliver,... hacían amena la estancia, guardo en la memoria momentos memorables... también en la carrera (que mas bien fue maratón) y fuera de ella con quienes compartí desde estar de Maria Magdalenas hasta la risa cuando ya no puedes mas y te duele la panza y ya ni sabes de que te reías: Olga, Liz, Lucio ahora ya todo un don con Diana y tus hijos David y Yoshua. Los quiero mucho.

A Carlos Martínez, Bárbara y Andrea por habernos apoyado espiritualmente en los momentos difíciles y a las amistades que encontramos por el CEC: Beto, Ana, Moy, los Sandoval, Paola (con mucho cariño),

Con quienes compartí las aulas, amistad y no menos importantes: Edith Dany, Malenita, Fabiola, Nancy, Marlene, Isabel, Erika, Alma, Anita Pasapera, Brenda, Poncho, Yasser, Vela, y todos los que se me lleguen a pasar no es personal, es que ya quiero salir de esto de la tesis que de pronto parecía una pesadilla.

Al laboratorio donde realice la tesis BI-301: Beno, Lenin, a ti Josué por ser buen amigo sabes que te aprecio, Claudia, Rosita, a la Dra. Herminia Pasantes.

A tu apoyo, entusiasmo, ánimo, sonrisa, abrazos, besos: Cuacuatzin Vero, gracias por tenerme en tu corazón, por brindarme tanto tiempo y paciencia, por compartir sueños, anhelos, metas, esperanza para un futuro, también a tu familia que me ha abierto las puertas de su casa.

Ahora busco una nueva meta y en un nuevo lugar comparto con ustedes nuevas aventuras: Josué, Armando, Fernando, Mari Carmen, Noe, Lily, Cecy, Miguel, a los que ya no están ahí pero les agradezco su amistad: Maria, Sergio, Daniel, Roberto, Claudia.

Al departamento de Instrumentación en el INC donde pase gratos momentos de infancia y juventud, al personal que ha pasado y al que aun labora ahí: Polo, Nieves, los "chesters", Oscar, Raúl, Salvador, Pedro, Erika.

A FOTECI por abrimos las puertas cuando otras nos cerraban... Miguel y Raúl Bernal, gracias por su apoyo a mi papá.

A todos los que directa e indirectamente han impulsado este logro.

INDICE	
INTRODUCCION	1
I. Regulación de volumen celular	1
II. Importancia del volumen celular en procesos fisiológicos.	2
III. Mecanismos de regulación del volumen celular.	4
<i>Sensor de volumen</i>	8
<i>Vías de movilización de osmolitos</i>	11
IV. Transducción de señales involucradas en la regulación de las vías de movilización de osmolitos	15
V. ATP como neurotransmisor	18
VI. Participacion del ATP en la regulacion del volumen celular.	20
Objetivos.	22
MATERIALES Y METODOS.	23
I. Cultivos celulares.	23
II. Soluciones y fármacos.	23
III. Flujo de <sup>3</sup> H-Taurina.	24
IV. Determinación de cambios en [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	24
V. Análisis estadístico.	25
RESULTADOS	26
I. La LTO es potenciada por ATP extracelular.	26
II. La potenciación de la LTO por ATP esta mediada por receptores purinérgicos (metabotrópicos) del tipo 2 y 4, P2Y <sub>2</sub> y P2Y <sub>4</sub>	28
III. La potenciación de LTO por ATP esta mediada por la vía de señalización PLC, el incremento en [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> y la activación de CaM y CaMKII	28
IV. La LTO y la potenciación por ATP son sensibles a bloqueadores de canales de Cl <sup>-</sup> y dependen de la actividad de proteínas cinasas de tirosina	35
V. La LTO es abolida por la inhibición conjunta de la CaMKII y de la PI3K.	37
DISCUSION	38
CONCLUSIONES	44
REFERENCIAS	45

## **INTRODUCCION**

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

Las células de los organismos que viven expuestos a variaciones en la composición del medio extracelular e intracelular pueden experimentar cambios en el volumen celular y la capacidad de autorregularse es fundamental. Es por ello que el control del volumen celular es uno de los mecanismos homeostáticos más importantes y probablemente uno de los más antiguos, siendo un rasgo característico preservado a escala evolutiva. Durante mucho tiempo se pensó que la propiedad de regulación de volumen solo se daba en organismos expuestos constantemente a perturbaciones en la osmolaridad del medio donde habitan, o en especies acuáticas que viven en aguas de diferente salinidad durante su ciclo de vida (el salmón es el ejemplo más conocido). Sin embargo, se ha demostrado que los animales terrestres donde la osmolaridad del plasma se mantiene generalmente constante, poseen también esta capacidad y es un proceso activo aun en condiciones fisiológicas.

En mamíferos se han desarrollado mecanismos (como las funciones renales) que regulan el fluido intersticial y el plasma circundante de los tejidos en condiciones normales. A nivel celular, la membrana plasmática es impermeable a proteínas y altamente permeable al agua, lo que provoca que la presión coloidosmótica en el interior celular sea mayor. Si el agua y los iones permanentes se distribuyeran de acuerdo a la teoría de Gibbs-Donnan, la célula se hincharía en condiciones isosmóticas hasta que la concentración de solutos impermeables fuera insignificante, provocando finalmente lisis celular. Sin embargo en condiciones fisiológicas este aumento de volumen celular coloidosmótico no ocurre y las células mantienen niveles constantes de agua y solutos.

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

## **II. Importancia del volumen celular en procesos fisiológicos**

Los efectos más obvios de los cambios en el volumen celular son mecánicos, lo cual puede alterar la función celular. En las neuronas, por ejemplo, debido a que su función depende de su arquitectura, estratificación y la localización especializada de las sinapsis, esta puede verse seriamente comprometida por cambios en el volumen. A nivel celular el aumento o disminución del volumen puede alterar el metabolismo debido al cambio en las concentraciones de enzimas y substratos, y modificar los niveles de moléculas que sirven como mensajeros en la transducción de señales (O'Neill, 1996). Por otra parte, un cambio en el volumen citosólico puede provocar alteraciones en la función de organelos como resultado de fluctuaciones en el pH intracelular y las concentraciones de enzimas, cofactores, calcio y fuerza iónica. El cambio en el volumen de células individuales tiene implicaciones importantes no solo para su funcionalidad propia, sino para el órgano y por consiguiente al organismo al que pertenece. Además de la necesidad de mantener constante la concentración intracelular de solutos, muchos de los cuales son parte de eventos complejos de señalización, se ha propuesto que el volumen celular participa de manera directa

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

## **II. Importancia del volumen celular en procesos fisiológicos**

Los efectos más obvios de los cambios en el volumen celular son mecánicos, lo cual puede alterar la función celular. En las neuronas, por ejemplo, debido a que su función depende de su arquitectura, estratificación y la localización especializada de las sinapsis, esta puede verse seriamente comprometida por cambios en el volumen. A nivel celular el aumento o disminución del volumen puede alterar el metabolismo debido al cambio en las concentraciones de enzimas y substratos, y modificar los niveles de moléculas que sirven como mensajeros en la transducción de señales (O'Neill, 1996). Por otra parte, un cambio en el volumen citosólico puede provocar alteraciones en la función de organelos como resultado de fluctuaciones en el pH intracelular y las concentraciones de enzimas, cofactores, calcio y fuerza iónica. El cambio en el volumen de células individuales tiene implicaciones importantes no solo para su funcionalidad propia, sino para el órgano y por consiguiente al organismo al que pertenece. Además de la necesidad de mantener constante la concentración intracelular de solutos, muchos de los cuales son parte de eventos complejos de señalización, se ha propuesto que el volumen celular participa de manera directa



en el control del metabolismo y expresión de genes, como señal de proliferación, muerte y migración celular, así como “disparador” de mecanismos que originan la inserción de proteínas membranales, canales, receptores y transportadores. A su vez los cambios en el volumen interfieren con el reciclamiento de receptores membranales, y modifican la liberación de hormonas y neurotransmisores (Pasantes-Morales, 1996).

El hígado, sujeto a irrigación sistémica y portal, está sometido a diferencias sustanciales en la concentración de aminoácidos, ácidos biliares y glucosa entre el ayuno y la ingestión de alimentos. El hinchamiento celular representa una señal anabólica, estimulando la síntesis de proteínas, la glucogénesis, la exocitosis y el flujo biliar. Por el contrario, una reducción en el volumen celular desencadena procesos catabólicos, como la proteólisis y la glucogenólisis. Las hormonas que regulan la función hepática tienen efectos sobre el volumen celular, por ejemplo, la insulina y la fenilefrina provocan hinchamiento, mientras que el ATP, el AMPc y el glucagon reducen el volumen (Dunkelberg et al., 2001). En epitelios, el transporte transcelular de iones, nutrientes y productos de desecho se logra por la incorporación de éstos a través de una de las membranas y la expulsión por la contraria (de la célula contigua). Esta constante entrada y salida de sustancias osmóticamente activas durante el transporte epitelial se traduce en cambios continuos del volumen. En el intestino, la vejiga y los túbulos proximales del riñón, la incorporación luminal de sustratos, como glucosa o aminoácidos, está acoplada al gradiente de  $\text{Na}^+$ , lo que provoca hinchamiento celular y una consecuente activación de canales de  $\text{K}^+$  en la membrana basolateral como mecanismo de regulación. Este mecanismo no sólo favorece la regulación de volumen, sino que también mantiene el gradiente electroquímico regenerando el proceso (Lang et al., 1998)

En el cerebro, el volumen total está constituido por la suma de: el volumen sanguíneo, el volumen del líquido cerebro espinal (LCE), el volumen del espacio extracelular y el del parénquima. Debido a que el cráneo es rígido, un

cambio en el volumen de cualquiera de los componentes, aunque pareciera insignificante puede tener consecuencias fatales para el individuo. El hinchamiento celular que se observa en distintas patologías, incrementa la presión provocando la compresión de pequeños vasos sanguíneos, produciendo isquemia y daño celular. Un incremento mayor en la presión puede provocar el desplazamiento del parénquima cerebral por el *foramen mágnum*, comprimiendo los núcleos cardíaco y respiratorio del tallo cerebral lo que puede provocar la muerte del individuo (McManus y Churchwell, 1994). Las patologías que desencadenan cambios en el volumen pueden agruparse en: anisomóticas, que resultan de modificaciones en la osmolaridad plasmática (como el síndrome de secreción inapropiada de hormona antidiurética, la intoxicación por agua, la insuficiencia cardíaca congestiva); y las citotóxicas que a su vez, son el resultado de cambios en el volumen celular que pueden darse incluso en condiciones isomóticas provocando muerte celular (como isquemia, encefalopatía hepática, crisis epilépticas, hipoxia o anoxia y trauma craneoencefálico). El hinchamiento celular que resulta de la patología citotóxica, tiene más riesgos que el causado por hiposmolaridad, ya que no se sabe de sistemas más efectivos de regulación del volumen.

### **III. Mecanismos de regulación del volumen celular**

Las células pueden tener tres tipos de respuestas ante el estrés osmótico:

1. No responder (en cierto intervalo). Ejemplo de ello son los organismos que poseen pared celular como las plantas, algunas bacterias y levaduras.
2. Evadirlo. Los moluscos, pueden evadir cambios en la osmolaridad interna cerrando sus conchas, aunque es necesario que regulen su osmolaridad intracelular.
3. Adecuación. Las células de la mayoría de los organismos activan procesos para adecuarse al gradiente osmótico impuesto, tratando de permanecer en su tamaño original.

cambio en el volumen de cualquiera de los componentes, aunque pareciera insignificante puede tener consecuencias fatales para el individuo. El hinchamiento celular que se observa en distintas patologías, incrementa la presión provocando la compresión de pequeños vasos sanguíneos, produciendo isquemia y daño celular. Un incremento mayor en la presión puede provocar el desplazamiento del parénquima cerebral por el *foramen mágnum*, comprimiendo los núcleos cardíaco y respiratorio del tallo cerebral lo que puede provocar la muerte del individuo (McManus y Churchwell, 1994). Las patologías que desencadenan cambios en el volumen pueden agruparse en: anisomóticas, que resultan de modificaciones en la osmolaridad plasmática (como el síndrome de secreción inapropiada de hormona antidiurética, la intoxicación por agua, la insuficiencia cardíaca congestiva); y las citotóxicas que a su vez, son el resultado de cambios en el volumen celular que pueden darse incluso en condiciones isomóticas provocando muerte celular (como isquemia, encefalopatía hepática, crisis epilépticas, hipoxia o anoxia y trauma craneoencefálico). El hinchamiento celular que resulta de la patología citotóxica, tiene más riesgos que el causado por hiposmolaridad, ya que no se sabe de sistemas más efectivos de regulación del volumen.

### **III. Mecanismos de regulación del volumen celular**

Las células pueden tener tres tipos de respuestas ante el estrés osmótico:

1. No responder (en cierto intervalo). Ejemplo de ello son los organismos que poseen pared celular como las plantas, algunas bacterias y levaduras.
2. Evadirlo. Los moluscos, pueden evadir cambios en la osmolaridad interna cerrando sus conchas, aunque es necesario que regulen su osmolaridad intracelular.
3. Adecuación. Las células de la mayoría de los organismos activan procesos para adecuarse al gradiente osmótico impuesto, tratando de permanecer en su tamaño original.

Dentro de esta última, la movilización de solutos osmóticamente activos en la dirección apropiada es la manera más efectiva y rápida de cambiar la osmolaridad y de esta forma contrarrestar los cambios en el volumen. La regulación del volumen en general, se da cambiando la concentración de intracelular de iones, principalmente  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$ . Sin embargo, cambios en las concentraciones iónicas, alteran la función de diferentes proteínas, incluyendo enzimas, y transportadores membranales. Para evitar lo anterior, las células utilizan osmolitos "compatibles", cuyo cambio en su distribución, no altera la función normal de las proteínas (Lang et al., 1998). A este grupo pertenecen: los osmolitos orgánicos (aminoácidos), polialcoholes y las metilaminas. La concentración de cada uno de estos osmolitos varía según la especie y el tipo celular; de esta manera también varía la importancia que tienen en la regulación del volumen. La célula puede acumular estos osmolitos ya sea aumentando su síntesis, disminuyendo su degradación o estimulando su transporte, así como disminuir su concentración intracelular aumentando su degradación o activando su liberación.

En células animales, los aminoácidos más abundantes son taurina, glutamato, glicina, alanina, GABA y glutamina. La concentración de estos aminoácidos es de 30-40mM, siendo los más abundantes glutamato y taurina. En cultivos primarios de astrocitos de rata, por ejemplo, la concentración intracelular de aminoácidos libres es significativamente mayor, y oscila entre 50 y 60 mM (Pasantes-Morales, 1996).

Cuando las células se exponen a un medio anisomótico cambian su volumen de acuerdo al cambio en la osmolaridad externa. En el caso en que una célula animal este expuesta a una solución hiposmótica, inicialmente el volumen celular aumenta debido a la entrada de agua, por el cambio de presión osmótica extracelular. 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,

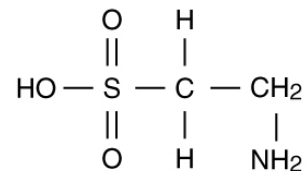
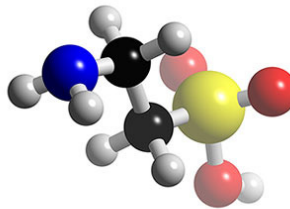
3) la relación entre área de la membrana y el volumen de la célula (Hallows y Knauf, 1994; Hoffmann y Simonsen, 1989). Después de este máximo, el volumen celular disminuye, aún cuando la osmolaridad extracelular se mantenga por debajo del valor del control inicial. Este proceso compensatorio del volumen, 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 recuperarlo mediante el proceso conocido como incremento regulador del volumen (**IRV**). Para reducir el gradiente osmótico en soluciones hiperosmóticas, las células tienen que aumentar los niveles internos de solutos osmóticamente activos.

El contenido celular de  $K^+$  y  $Cl^-$  disminuye en respuesta a la hiposmolaridad, como consecuencia de la activación de los sistemas de transporte encargados de expulsar estos iones. En algunas células, esta salida se da por la activación de un sistema de co-transporte electroneutro. En otros tipos celulares, la movilización de los iones se da por la acción simultánea de sistemas que intercambian aniones y cationes. Generalmente los sistemas que participan en la regulación del volumen celular intercambian  $K^+/H^+$  y  $Cl^-/HCO_3^-$ . A pesar de la existencia de estos sistemas de co-transporte electroneutro, el mecanismo más generalizado para expulsar  $K^+$  y  $Cl^-$  y corregir el volumen celular es la activación de vías electrogénicas, constituidas por canales iónicos presentes en la membrana celular. Se ha demostrado que la exposición de diferentes tipos celulares a medios hiposmóticos produce un incremento en los flujos de taurina y de otros aminoácidos a través de la membrana.

En el caso de la regulación de volumen en condiciones hiperosmóticas, la recuperación del volumen se encuentra asociada con un aumento inicial en los niveles celulares de  $Na^+$ ,  $K^+$  y  $Cl^-$ , seguida de la entrada de agua osmóticamente obligada a la célula. En algunos tipos celulares la hiperosmolaridad induce la

activación del sistema de co-transporte  $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$  (Liedtke y Cole, 2002; Nylander-Koski et al., 2005), por lo que el aumento de volumen es dependiente de la presencia de estos iones en el medio de incubación. En otras células también se propone que la regulación de volumen celular no es dependiente de  $\text{K}^+$  extracelular, por lo que podría estar participando un sistema de co-transporte  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  en la regulación del volumen. Existe una gran cantidad de evidencia experimental respecto a los mecanismos involucrados en el control del volumen celular en condiciones anisomóticas. Sin embargo en adelante este trabajo se enfocará a los fenómenos asociados al DRV en respuesta al hinchamiento hiposmótico.

### Taurina, el osmolito ideal



La taurina es un  $\beta$ - aminoácido sulfónico, producto del catabolismo de la cisteína. Tiene un  $\text{Pka}_1 = 1.5$  y un  $\text{pKa}_2 = 8.82$ , es decir que en pH fisiológico se encuentra como zwitterion (carga neta neutra) y en esta conformación es como se libera en respuesta al cambio hiposmótico. Se puede liberar como tal o unida a sales biliares como taurocolato, taurodisoxilato, etc.

La taurina es llamada un osmolito perfecto. Esto debido a que su transporte y liberación celular es sensible a cambios en la osmolaridad y a que al ser una molécula eléctricamente neutra, no altera el potencial de membrana ni otros procesos celulares; es metabólicamente inerte y el costo energético de su producción es bajo debido a que es producto final del catabolismo (Pasantes-Morales, 1996). Adicionalmente, su incremento en el espacio extracelular, posterior a su liberación, no altera la actividad eléctrica de tejidos excitables como en el caso de glutamato o GABA, importantes neurotransmisores en el cerebro.

La liberación de taurina en condiciones hiposmóticas tiene un curso temporal parecido al cambio en el volumen (figura 1), donde la máxima liberación es entre el minuto uno o dos, a partir de ese momento comienza a disminuir el flujo (Pasantés-Morales et al., 1998).

### **Sensor de volumen.**

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

Estructuras sensibles a cambios en el volumen deben existir en todos los tipos celulares capaces de desencadenar una respuesta reguladora, incluso en varios de los organelos. En bacterias y levaduras se han identificado proteínas transmembranales, cinasas de histidina osmosensoras (Wurgler-Murphy y Saito, 1997), en *Escherichia coli* el sistema de dos componentes EnvZ-OmpR regula la expresión de dos porinas de diferente diámetro de poro, OmpF y OmpC (Cai y Inouye., 2002). En respuesta a un estímulo hiperosmótico en *Saccharomyces cerevisiae*, la proteína Sln 1 activa una cascada de eventos de fosforilación que resultan en la expresión del gen GPD 1, que codifica una enzima fundamental en la síntesis de glicerol, osmolito acumulado para contrarrestar el choque osmótico (Tao et al., 1999). En eucariontes no se han identificado moléculas osmosensoras, aunque se han propuesto algunos mecanismos:

**Agrupamiento de macromoléculas** (Macromolecular crowding). La teoría de la exclusión por volumen postula que la actividad termodinámica de las proteínas en un ambiente altamente concentrado es función de la composición del medio (Al-Habori, 2001). Por lo tanto, cambios en la concentración y tamaño de macromoléculas, pueden alterar de manera significativa la actividad de las

proteínas efectoras y reguladoras, incluso en condiciones donde su concentración no se modifique. Estos cambios se dan en los procesos de hinchamiento, encogimiento y regulación del volumen. Por esto, se ha propuesto al agrupamiento macromolecular como sensor, tomando en cuenta que el interior celular es un ambiente altamente concentrado y que cambios en la actividad termodinámica de proteínas (quinasas, fosfatasas) afectan la permeabilidad de los canales y transportadores efectores. (Summers et al., 1997). Existe evidencia experimental que apoya esta teoría (Colclasure y Parker, 1992; Summers et al., 1997), pero no es suficiente para respaldarla totalmente.

**Fuerza iónica.** La importancia de la fuerza iónica intracelular como sensor de cambios en el volumen en condiciones anisomóticas fue demostrada por primera vez en los trabajos de Motais et al. (1991), en eritrocitos de trucha y ha sido comprobada en otros tipos celulares (Cannon et al., 1998; Cardin et al., 1999; Voets et al., 1999; Wittels et al., 2000). En cultivo de astrocitos de corteza cerebral de rata, la liberación de taurina osmosensible por hinchamiento hiposmótico (LTO) y el DRV son más eficientes cuando el hinchamiento se acompaña de una disminución en la fuerza iónica intracelular (inducido por hiposmolaridad), que cuando el hinchamiento es en condiciones isosmóticas donde la fuerza iónica intracelular no disminuye (Cardin et al., 1999). Si bien no es claro si el efecto de la fuerza iónica actúa directamente sobre las vías de movilización de osmolitos (Voets et al., 1999), regulando el umbral de activación (Cannon et al., 1998) o modificando la actividad de quinasas involucradas en las vías de transducción de señales (Wittels et al., 2000); es evidente que se necesita una reducción en la fuerza iónica intracelular para la activación del flujo de taurina y la corriente de  $\text{Cl}^-$  sensibles a hinchamiento.

**Tensión membranal.** El hecho de que la corriente de  $\text{Cl}^-$  sensible al volumen ( $I_{\text{Cl}^- \text{SV}}$ ) se active por presión y por el tratamiento con sustancias que alteran la forma celular, como clorpromazina y el dipiridamol, sugiere que los cambios en la tensión membranal podrían ser el sensor para la activación de los mecanismos de regulación del volumen. Sin embargo, calculando el área de la



superficie celular en base a medidas de capacitancia y comparándolo con los datos obtenidos midiendo el área de la “esfera celular”, se ha demostrado que la tensión membranal original y que el hinchamiento es a expensas de la pérdida de invaginaciones en la membrana y no de un incremento en la tensión (Okada et al., 1997).

**Citoesqueleto e integrinas.** Los cambios en el volumen provocan perturbaciones en la morfología celular y en consecuencia en el citoesqueleto. Varios de los segundos mensajeros involucrados en la activación de las vías de transporte tienen interacciones funcionales con el citoesqueleto e incluso los canales y transportadores muchas veces están asociados a éste (Janmey, 1998). Tomando en cuenta lo anterior, se ha propuesto que el citoesqueleto, particularmente el de actina, podría estar involucrado en los mecanismos de regulación del volumen, sin embargo, en astrocitos de cerebelo de rata, el tratamiento con citocalacina B y D destruye completamente el citoesqueleto de actina, pero no altera el DRV, la liberación de inositol y  $^{125}\text{I}$  (como marcador del flujo de  $\text{Cl}^-$ ) (Morán et al., 1996). Se ha puesto menos atención en los filamentos intermedios; sin embargo en astrocitos de ratones deficientes en vimentina y en proteína glial fibrilar (GFAP $^{-/-}$ , vim $^{-/-}$ ), la LTO en respuesta a un estímulo hiposmótico es 26-45% menor (Ding et al., 1998). Las integrinas son glicoproteínas transmembranales que interactúan con moléculas de matriz extracelular, citoesqueleto y proteínas que participan en señales intracelulares. Se encuentran en áreas de adhesión focal y transmiten señales relacionadas con el anclaje, el movimiento y la diferenciación. Algunos estudios sugieren que la activación de integrinas juega un papel importante como sensor, lo que ha llevado a postular que un cambio en el volumen podría provocar una acumulación de integrinas y desencadenar las vías de señalización de las adhesiones focales de una manera independiente de ligando. Varias proteínas relacionadas con las vías de activación del DRV, como p125FAK, PKC, src y pequeñas proteínas que unen GTP, actúan en los complejos de adhesión focal después de la activación de las integrinas (Pedersen et al., 2001).

## Vías de movilización de osmolitos

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

El canal de Cl<sup>-</sup> rectificador saliente sensible a volumen (RSSV) tiene una conductancia unitaria de 40-50pS a potenciales negativos, siendo la rectificación una propiedad intrínseca del canal ya que se observa incluso a nivel de canal único. La secuencia de permeabilidad aniónica es: SNCN<sup>-</sup> > I<sup>-</sup> > NO<sub>3</sub><sup>-</sup> > BR<sup>-</sup> > HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> > F<sup>-</sup> > gluconato > glicina > taurina > lactato > aspartato = glutamato. El RSSV se inactiva con el tiempo a voltajes positivos (>50-60mV), siendo la cinética de activación más rápida a medida que aumenta la concentración de [Mg<sup>+2</sup>] intracelular, disminuye el pH extracelular o en presencia de cationes divalentes extracelulares.

La actividad del canal es dependiente de ATP intracelular, ya que cuando éste se depleta no se detectan corrientes de Cl<sup>-</sup> sensibles a hinchamiento, lo que es de relevancia patológica en condiciones de isquemia porque probablemente el canal este inhibido. (Okada et al., 1997; Nilius et al., 2000).

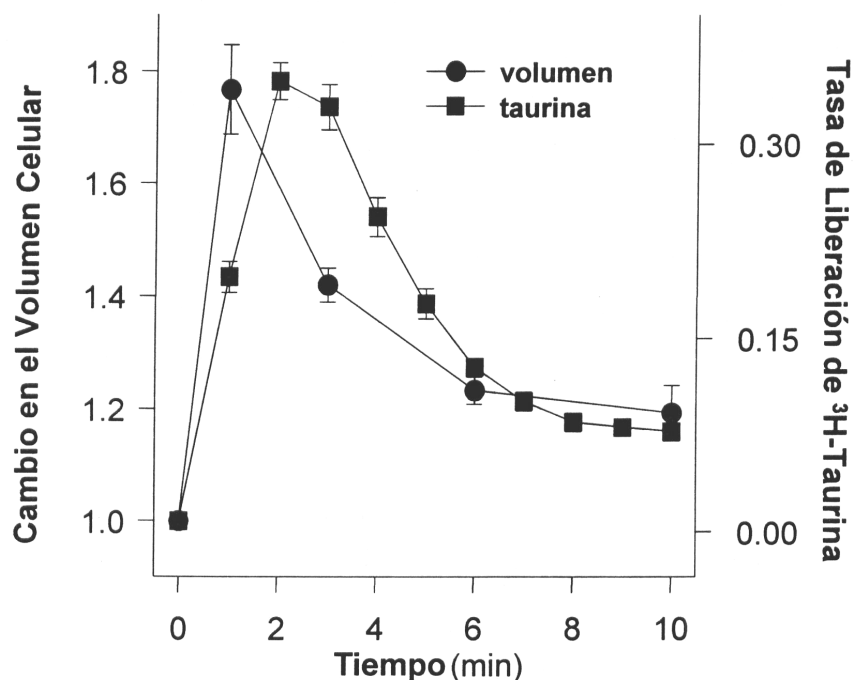


Figura 1. Cambio en el volumen celular y en la tasa de liberación de <sup>3</sup>H-taurina en condiciones hiposmóticas. Experimentos realizados en cultivo de astrocitos de rata expuestos a soluciones hiposmóticas 50% (Cardin et al., 1999)

El RSSV es sensible a bloqueadores clásicos de canales de Cl<sup>-</sup> como DIDS (ácido 4-4'-diisotiocianoestilben-2,2'-disulfónico), SITS (ácido 4-acetamido-4'-isotiocianoestilben-2,2'-disulfónico), NPA (ácido N-fenilantálico), 9AC (ácido 9-aminocamptotécico), NPPB (ácido 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino)benzoico) y ácido niflúmico; inhibidores de la glicoproteína P como tamoxifen, DDFK (1,9-dideoxiforskolina), verapamil, quinina y quinidina (Okada et al., 1997; Nilius et al., 2000) y se inhibe también por ácido araquidónico y otros ácidos grasos polinsaturados (Sanches-Olea, 1995). A la fecha no se ha identificado de manera clara la entidad molecular del canal de Cl<sup>-</sup> RSSV. Sin embargo se han propuesto diferentes candidatos como son la familia de canales de cloro dependientes de voltaje (CIC), el fosfolema, el canal de fibrosis quística (CFTR).

**Canales de K<sup>+</sup>.** Los canales de K<sup>+</sup> osmosensibles se pueden agrupar en dos clases: 1) canales de conductancia unitaria entre 100-200pS dependientes de Ca<sup>+2</sup>, reportados principalmente en células epiteliales, cuyas características biofísicas y farmacológicas corresponden a los canales de K<sup>+</sup> de gran conductancia (BK); 2) canales de conductancia unitaria <100pS, en general independientes de Ca<sup>+2</sup>. (Pasantés-Morales y Morales-Mulía, 2000). En varios tipos celulares el hinchamiento hiposmótico está asociado a una despolarización celular, la cual podría activar canales de K<sup>+</sup> rectificadores salientes dependientes de voltaje. La tranfección del canal dependiente del voltaje Kv1.3, pero no el Kv3.1, confiere a una línea celular de linfocitos T de rata la capacidad de regular volumen (Deutsch y Chen, 1993). También en estas células el bloqueo de la corriente de K<sup>+</sup>, cuya entidad molecular es un canal de K<sup>+</sup> dependiente de Ca<sup>+2</sup> (hSK4), impide el DRV (Khanna et al., 1999).

La proteína IsK se asocia con los canales de K<sup>+</sup> KCNQ1, generando la corriente de K<sup>+</sup> rectificadora tardía de activación lenta. Las células de tráquea de ratones IsK -/- pierden la capacidad de regular el volumen que tienen las células de ratones control (IsK +/+), sugiriendo un papel importante para esta proteína en el DRV. (Lock y Valverde, 2000). No está claro si la corriente de K<sup>+</sup> osmosensible ocurre a través de canales activados directamente por el hinchamiento, canales abiertos en condiciones basales o activados por cambios subyacentes al hinchamiento, como reorganización del citoesqueleto, incrementos en K<sup>+</sup> citosólicos, variaciones en el potencial de membrana y otros.

**Osmolitos orgánicos.** La vía de movilización de osmolitos orgánicos es de tipo difusional y no depende de un transportador dependiente de Na<sup>+</sup>, como el que se utiliza para el transporte de estas moléculas en condiciones basales e hiperosmóticas. Las evidencias que apoyan esto son: a) el flujo de osmolitos es independiente de Na<sup>+</sup>; b) el flujo es insensible a bloqueadores específicos de estas vías; c) el flujo es bidireccional y su dirección está determinada por el gradiente electroquímico; d) el flujo de osmolitos orgánicos no se satura (Pasantés-Morales et al., 1996). El flujo de osmolitos orgánicos es sensible a los

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

En los últimos años se ha acumulado evidencia en varios tipos celulares que sugiere la existencia de vías independientes. En células de Ehrlich los flujos osmosensibles de taurina y  $^{36}\text{Cl}^-$  responden de manera distinta al DIDS y al ácido araquidónico (Lambert y Hoffman, 1994). La LTO y  $I_{\text{ClSV}}$  responden con diferente sensibilidad al DIDS (Stutzin et al., 1997). La expresión de canales aniónicos y transportadores en ovocitos de *Xenopus laevis* resulta en la activación de un flujo de taurina en respuesta a soluciones hiposmóticas, pero la corriente de  $\text{Cl}^-$  no se modifica (Stegen et al., 2000). Hay suficiente evidencia respaldando tanto una vía única, como vías separadas. Incluso existen trabajos que postulan la existencia de vías independientes para cada uno de los osmolitos orgánicos (Junankar y Kirk, 2000). Estas dos hipótesis no son excluyentes, ya que ambos tipos de canales podrían coexistir en la misma célula o un mismo canal podría cambiar sus propiedades según las condiciones experimentales. Hay que tomar en cuenta que células de diferentes organismos incluso de tejidos distintos, tienen diversas maneras de controlar el volumen y por lo tanto de movilizar osmolitos orgánicos.

#### **IV. Transducción de señales involucradas en la regulación de las vías de movilización de osmolitos.**

**Cinasas de tirosina.** Son proteínas que transfieren un fosfato- $\gamma$ , generalmente del ATP, a un residuo de tirosina a las proteínas sustrato. Inhibidores de estas proteínas, como tirfostina A23, genisteína, lavendustina A y herbimicina A, disminuyen la  $I_{Cl}SV$  y la LTO en varios tipos celulares (Pasantes-Morales et al., 2000), lo que sugiere un evento de fosforilación de este tipo en la vía de activación del flujo de osmolitos. La cinasa de adhesión focal (p125FAK) es una proteína activada por integrinas que se asocia con proteínas como PI3K, Shc, Grb2, paxilina, miembros de la familia src y p130cas. P125FAK se fosforila en respuesta a un estímulo hiposmótico en células CIH-407, aparentemente esta fosforilación es mediada por la proteína Rho y p125FAK podría ser la proteína que activa PI3K en condiciones hiposmóticas en estas células (Tilly et al., 1996).

**Cinasas activadas por mitógenos o estrés.** El estímulo hiposmótico activa en varios tipos celulares a las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) o estrés (SAPK). Las MAPKs reconocen sitios compuestos de serina o treonina seguidas de prolina y los aminoácidos que rodean estos sitios incrementan la especificidad de reconocimiento. Erk1 y Erk2 se activan en respuesta al estímulo hiposmótico en muchos tipos celulares (Pasantes-Morales et al., 2000) y en astrocitos de corteza estas proteínas están involucradas en la activación de la  $I_{Cl}SV$  (Crépel et al., 1998). En mamíferos se expresan también distintos tipos de cinasas activadas por estrés (SAPK) como son Jun (JNK 1/2/3) y las proteínas p38 (p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ ) y Erk5 son activadas por tipos específicos de cinasas de MAPKs (MEKs): MEK1/2, MEK3/6, MEK4/7 y MEK5 respectivamente (Chang y Karin, 2001). JNK y p38 se activan también en respuesta al hinchamiento hiposmótico, pero a la fecha no se ha encontrado una relación entre la actividad de estas proteínas y la activación de los flujos de osmolitos (Pasantes-Morales et al., 2000).

**Proteínas cinasas C.** La familia de proteínas cinasas C (PKC) se activan por  $\text{Ca}^+$  y 1,2-diacilglicerol (DAG). La LTO es independiente de PKC en el núcleo supraóptico de la rata (Deleuze et al., 2000) y en neuronas granulares de cerebro (Morales-Mulia et al., 2001). El bloqueador de la PKC, queleritina, inhibe el flujo de aminoácidos en células cardíacas (Song et al., 1998) y en sinaptosomas (Tuz et al., 2004). Varios de los canales propuestos como responsables de la corriente de  $\text{K}^+$  sensible a volumen son sustrato de fosforilación de PKC y otras cinasas, pero el efecto específico sobre la corriente en condiciones hiposmóticas no se ha reportado. Los resultados obtenidos apuntan que el papel de esta proteína en los flujos de osmolitos y el DRV es específico para cada tipo celular.

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

**Cinasa del fosfatidilinositol trifosfato (PI3K).** Es una enzima que fosforila al fosfatidilinositol en la posición d-3. Está compuesta de una subunidad catalítica (p110) y una reguladora (p85). Debido a la presencia de dos dominios SH2 en el carboxilo terminal de p85, PI3K puede activarse al unirse con alta afinidad residuos de tirosina fosforilados (Duronio et al., 1998). PI3K se activa en respuesta a hiposmolaridad en hepatocitos de rata (Krause et al., 1996) y en la línea celular de intestino humano 407 (CIH-407) (Tilly et al., 1996). Inhibidores de esta cinasa disminuyen la LTO en neuronas granulares de cerebro (Morales-Mulia et al., 2001) y en fibroblastos de rata en cultivo (Franco et al., 2004); la  $\text{I}_{\text{C}}\text{SV}$  y el DRV en hepatoma HTC (Feranchak et al., 1998) y el flujo de  $^{125}\text{I}$  en células CIH-407 (Tilly et al., 1996).

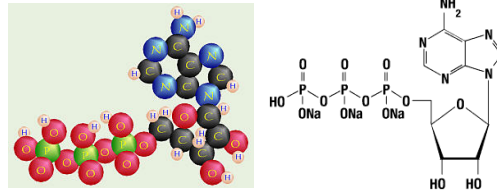
**Fosfolipasas A2.** Las fosfolipasas A2 (PLA<sub>2</sub>) son una familia de enzimas que hidrolizan fosfolípidos de membranas en la posición *sn*-2, produciendo ácido araquidónico que es metabolizado en productos oxigenados, como las prostaglandinas y los leucotrienos. Existen isoformas citosólicas y extracelulares, con varios subtipos cada una. Esta proteína ha sido relacionada con el DRV principalmente en las células de Ehrlich, donde el hinchamiento hiposmótico activa la isoforma citosólica de 85 kDa de PLA<sub>2</sub> (PLA<sub>2c</sub>), que a su vez aumenta la liberación de ácido araquidónico y aumenta de producción de leucotrieno D-4 (LTD<sub>4</sub>) (Thoroed et al., 1997). Si bien este no parece ser un mecanismo de acción general, debido a que el LTD<sub>4</sub> no tiene efectos en otros tipos celulares, la inhibición de PLA<sub>2</sub> tiene efectos en el DRV, la LTO y I<sub>Cl</sub>SV, involucrando así esta enzima con los mecanismos de señalización activados por hiposmolaridad (Pasantés-Morales et al., 2000).

**Calcio.** En la mayoría de los tipos celulares, el hinchamiento hiposmótico provoca un aumento en la concentración de calcio intracelular (Ca<sup>+2</sup><sub>i</sub>), proveniente tanto del medio extracelular como de pozas intracelulares dependiendo del tipo celular, la entrada de Ca<sup>+2</sup> en respuesta al hinchamiento puede ser a través de canales de Ca<sup>+2</sup> dependientes de voltaje, canales catiónicos activados por estiramiento o entrada de Ca<sup>+2</sup> capacitiva. En cultivo de astrocitos de cerebro de rata la entidad molecular responsable de la entrada de Ca<sup>+2</sup> no se ha identificado, pero se sabe que no son canales dependientes de voltaje ni canales sensibles a estiramiento (Morales-Mulia et al., 1998). En cultivo de astrocitos de corteza y cerebelo de rata, la poza sensible a inositol 1.4.5-trifosfato (IP3) es la que colabora en el aumento del Ca<sup>+2</sup> (Fisher et al., 1997; Morales-Mulia et al., 1998). Una de las proteínas más importantes en la transducción de señales en respuesta a aumentos en la concentración de calcio intracelular es la calmodulina (CaM). Una de las acciones principales de CaM es activar a miembros de la familia de proteínas cinasas S/T, entre ellos las proteínas cinasas dependientes de Ca<sup>+2</sup>/CaM (CaMK) (Hook y Means, 2001). Inhibidores de CaM como W7 (N-(6-aminohexil)-5-cloro-1-naftalen sulfonamida),



pimozida y trifluoperazina disminuyen el DRV y los flujos de osmolitos en gran variedad de células (Pasantes-Morales y Morales-Mulia, 2000).

## V. ATP como neurotransmisor



Adenosina Trifosfato (ATP) está normalmente relacionado en el metabolismo o bien, con actividades celulares que requieren energía, es por ello que se denomina “moneda energética” ; sin embargo, se ha reconocido por tener un amplio rango de bioactividades (Di Virgilio et al., 2001). Se ha sugerido que el ATP es liberado al medio extracelular por distintos estímulos con neurotransmisores como acetilcolina,  $\gamma$ -ácido aminobutírico (GABA), glicina y glutamato, actuando como co-neurotransmisor (Lambrecht, 2000). El mecanismo por el cual la célula libera ATP es controversial, a la fecha se han propuesto: exocitosis (Gatof et al., 2004; Van der Wijk et al., 2003), transportadores (Darby et al., 2003; Roman et al., 1997) o bien canales (Hisadome et al., 2002; Wang et al., 1996.).

El ATP actúa mediante los receptores de purinas del tipo 2 o P2, que se dividen en P2X y P2Y (Abbracchio y Burnstock, 1994). Los receptores P2X son una familia de receptores ionotrópicos y ya han sido clonadas siete subunidades (P2X<sub>1-7</sub>) (Chizh y Illes, 2001; Di Virgilio et al., 2001; Lambrecht, 2000). Todas las subunidades de los P2X se expresan en el SNC, en el cerebro se da la expresión preferencial de las subunidades P2X<sub>2</sub> y P2X<sub>6</sub>, y forman homomultímeros excepto la subunidad P2X<sub>6</sub> (Norenberg y Illes, 2000). Los canales receptores a los P2X son permeables a cationes como Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> (Barnard et al., 1994) y están localizados tanto en terminales nerviosas presinápticas como postsinápticas participando en la modulación de la transmisión sináptica (Norenberg y Illes, 2000). Los receptores presinápticos probablemente regulan la liberación de neurotransmisores como glutamato,

acoplar canales iónicos neuronales (Boehm, 2003) y modular respuestas a dolor (Molliver et al., 2002). La contribución de cada uno de los subtipos de receptores P2 en funciones neuronales y su interacción con vías de señales de transducción en el sistema nervioso es aún desconocido.

## **VI. Participación del ATP en la regulación del volumen celular**

Se ha reportado ampliamente que la hiposmolaridad induce la liberación de ATP de una variedad de células (Boudreault et al., 2002; Darby et al., 2003; Feranchak et al., 1998; Hisadome et al., 2002; Gatof et al., 2004; Hazama et al., 1999; Hazama et al., 2000; Mitchell et al., 1998; Sabirov et al., 2001; Taylor et al., 1998; Van der Wijk et al., 1999; Van der Wijk et al., 2003; Roman et al., 1999; Wang et al., 1996) y de corteza cerebral de rata *in vivo* (Phillis et al., 2002). La influencia del ATP como regulador del DRV fue descrito por vez primera en células de hepatoma y en células del conducto de la glándula salivar (Wang et al., 1996; Kim et al., 1996) y desde entonces, otros estudios han confirmado y extendido esta información (Dezaki et al., 2000; Feranchak et al., 2000; Light et al., 1999; Roman et al., 1999).

Se ha observado que el ATP a través de receptores purinérgicos modula la activación de canales de Cl<sup>-</sup> activados por volumen (Darby et al., 2003; Feranchak et al., 2000; Galiotta et al., 1997; Perez-Samartin et al., 2000; Roman et al., 1999; Wang et al., 1996) canales de K<sup>+</sup> (Dezaki et al., 2000; Junankar et al., 2002; Light et al., 2001) y canales de liberación de osmolitos como glutamato (Mongin y Kimelberg, 2002) y taurina (Junankar et al., 2002; Musante et al., 1999). La influencia del ATP como modulador de la liberación de osmolitos inducida por hinchamiento, se ha reportado mediante estudios en los cuales es agregado al medio externo y/o por efecto de bloqueadores de receptores purinérgicos o agentes que degradan el ATP en esta liberación.

A la fecha, existe controversia respecto al papel del ATP en el DRV. Unos estudios reportan que el ATP solo incrementa la eficiencia en la activación de los

flujos de osmolitos debido a que solo se observa un efecto potenciador del ATP en el DRV. Por lo tanto, se postula que el ATP activa una nueva y diferente vía de señales para la liberación de osmolitos o si su influencia actúa solo cuando las vías de señales conocidas han sido activadas, funcionando como un factor de modulación. Por otra parte, existen estudios que postulan la participación del ATP como regulador autocrino que activa de manera directa los mecanismos involucrados en el DRV (Desaki et al., 2000; Feranchak et al., 2000; Light et al., 1999; Roman et al., 1999; Wang et al., 1996). Esto último apoyado en el hecho de que la hiposmolaridad induce liberación de ATP como se ha mencionado anteriormente así como por estudios en los que se reporta que bloqueadores de receptores purinérgicos, inhiben los flujos de osmolitos si se añade ATP extracelular. Las acciones del ATP en el DRV y la liberación de osmolitos involucran principalmente a los subtipos de receptores purinérgicos metabotrópicos P2Y (Darby et al., 2003; Desaki et al., 2000; Feranchak et al., 2000; Junankar et al., 2002; Kim et al., 1996; Light et al., 2001; Mongin et al., 2002; Roman et al., 1999; Wang et al., 1996). Sin embargo, la vía de señalización involucrada en estos fenómenos no ha sido bien esclarecida aún. La activación de estos receptores provoca una bien conocida cascada de señales cuyos elementos incluyen un incremento de PLC, IP3 y  $[Ca^{2+}]_i$  (Lazarowski et al., 2003), por lo cual son obvios candidatos para mediar los efectos del ATP sobre la liberación de osmolitos.

## **OBJETIVOS**

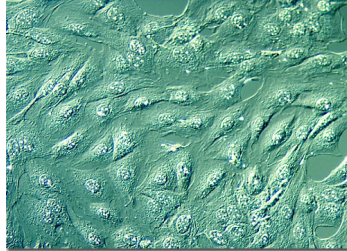
Analizar el papel del ATP en la liberación de taurina osmosensible por hinchamiento hiposmótico (LTO).

Los objetivos particulares del presente trabajo son:

1. Determinar si el ATP participa de manera directa en la activación de la LTO, o si solo modula la eficiencia de este fenómeno.
2. Caracterizar de manera farmacológica los receptores a ATP (purinérgicos) involucrados.
3. Identificar las vías de señalización involucradas en la modulación de la LTO por ATP.
4. Correlacionar los resultados con las vías de señalización involucradas en la LTO previamente descritas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **I. Cultivos celulares**



Fibroblastos 3T3 en cultivo

Se utilizaron cultivos de fibroblastos Swiss 3T3 que se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Celulares (ATCC, Manassas, Va., USA). Los cuales se mantuvieron en medio basal Eagle suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado, 2mM de glutamina, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomocina, en una atmósfera humidificada la cual contenía 5% CO<sub>2</sub> y 95% aire a 37°C.. Para propósitos experimentales, los fibroblastos Swiss 3T3 fueron sembrados a una densidad de  $1.5 \times 10^4$  células/ml en cajas de plástico de 35 mm para medir la liberación de taurina marcada radiactivamente y en cubre objetos de vidrio rectangulares (10x50 mm) para la determinación de cambios cuantitativos de calcio intracelular por fluorescencia. Las células alcanzaron el 90% de confluencia al momento del experimento (48 h). Durante todas las condiciones experimentales, las células en cultivo fueron incubadas a 37°C en una atmósfera humidificada la cual contenía 5% CO<sub>2</sub> y 95% aire.

### **II. Soluciones y fármacos**

El medio isosmótico contenía (en mM): 135 NaCl, 5 KCl, 1.17 MgSO<sub>4</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 10 glucosa y 10 HEPES, pH 7.4, con una osmolaridad de 300 mOsm. Los medios hiposmóticos fueron preparados disminuyendo la concentración de NaCl. La osmolaridad de las soluciones se determinó en un osmómetro de punto de congelación. Los medios libres de Ca<sup>2+</sup> fueron hechos omitiendo el CaCl<sub>2</sub> y agregando 0.25 mM de EGTA, el cual no alteró de manera significativa la

osmolaridad del medio. Para el tratamiento con los distintos fármacos, las condiciones de preincubación se indican en los pies de figura (ver resultados). Los fármacos estuvieron presentes durante todo el experimento. Cuando fue necesario, las células control fueron tratadas en paralelo con el vehículo usado para preparar las soluciones que contenían los fármacos a probar (0.1% de concentración final DMSO).

### **III. Flujos de $^3\text{H}$ -Taurina**

Los fibroblastos Swiss 3T3 se incubaron durante una hora con 1  $\mu\text{Ci/ml}$   $^3\text{H}$ -Taurina en medio isosmótico. Después de la incubación, las células se lavaron durante 10 minutos con medio isosmótico en ausencia del marcador radioactivo. Posteriormente se reemplazó completamente el medio cada minuto, recolectándose 5 muestras para determinar la salida de  $^3\text{H}$ -Taurina en condiciones control (isosmóticas) y 8 muestras para las condiciones experimentales (hiposmótico). Al finalizar el experimento, las células fueron removidas de la caja tomando la última muestra. La radioactividad remanente en la muestra con las células y en las demás muestras colectadas se determinó en un contador de centelleo líquido. Los resultados se expresan como porciento de liberación de cada muestra respecto al total de la marca incorporada durante la carga (siendo este la suma de las muestras recolectadas y de la última muestra con células).

### **IV. Determinación de cambios en $[\text{Ca}^{2+}]_i$**

Como se mencionó anteriormente, los fibroblastos Swiss 3T3 fueron sembrados en portaobjetos de vidrio en forma rectangular. Posteriormente, fueron incubados con el indicador fluorescente de  $\text{Ca}^{2+}$ , Fura-2/AM (2  $\mu\text{M}$ ), por 60 min a temperatura ambiente. Los cubreobjetos fueron cuidadosamente lavados con medio isosmótico para retirar el excedente del indicador fluorescente y se colocaron en un ángulo de  $50^\circ$  relativo a la luz de excitación en una cubeta equipada con un mini agitador magnético y llena con medio

isomótico (300 mOsm) en un espectrofluorómetro de luminiscencia Aminco-Bowman. Los cambios la fluorescencia de Fura, fueron determinados alternando la longitud de onda de excitación entre 340 y 380 nm, mientras que la emisión fue monitoreada a 510 nm para ambas excitaciones. La fluorescencia fue monitoreada bajo condiciones isomóticas y una vez que la lectura fuera estable se procedía a hacer el medio hiposmótico, agregando el volumen correspondiente de agua destilada para alcanzar la hiposmolaridad deseada. Cada experimento fue calibrado individualmente para obtener la fluorescencia máxima lisando las células con 10% de Tritón X-100 y posteriormente se amortiguando todo el  $\text{Ca}^{+2}$  con 25 mM de EGTA (ácido etilenglicol-bis(beta-aminoetil)-N,N,N',N'-tetraacético) para determinar la señal mínima o fluorescencia basal de nuestro sistema. Los valores obtenidos se utilizaron para calcular la concentración de calcio de acuerdo a las ecuaciones publicadas con anterioridad por (Grynkiweicz et al., 1985). Los experimentos fueron realizados a 37°C.

## **V. Análisis estadístico**

La significancia de las diferencias en las medias, fue calculada usando la prueba de *t* de Student a dos colas.

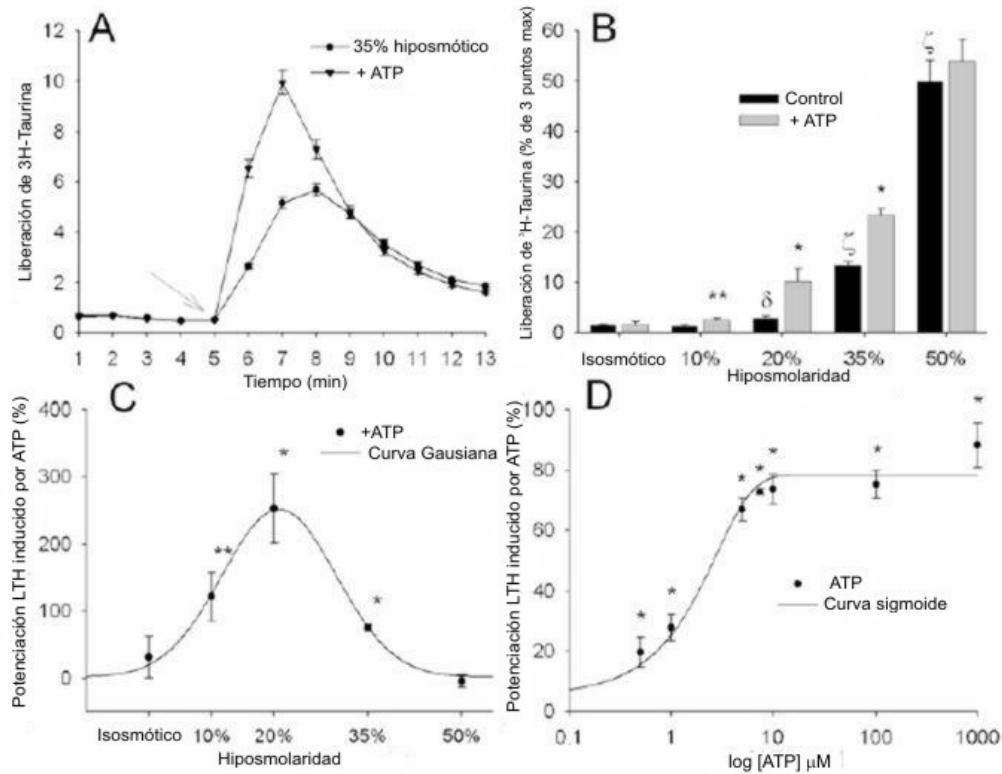
## RESULTADOS

### I. La LTO es potenciada por ATP extracelular

La figura 2A muestra que la liberación de  $^3\text{H}$ -taurina en fibroblastos Swiss 3T3, expuestos a una solución 35% hiposmótica (H-35%), es inducida de manera inmediata después del estímulo. La liberación de taurina incrementó de 0.7% a 5.6% (del total de radioactividad acumulada) observando su máximo a los 3 minutos después del estímulo, y posteriormente la liberación disminuyó lentamente hasta niveles basales. El ATP extracelular (100  $\mu\text{M}$ ) potenció la liberación de taurina sensible a osmolaridad (LTO) en las tres fracciones iniciales colectadas después del estímulo. En la figura 2B se muestra la liberación de taurina en respuesta a diferentes reducciones en la osmolaridad. La máxima LTO fue a 50% de hiposmolaridad (H-50%) y mayores reducciones en la osmolaridad no aumentaron la LTO. En presencia de ATP extracelular, la liberación de taurina fue activada y potenciada por ATP desde el nivel más bajo de hiposmolaridad (10%) hasta H-35%, pero no a H-50%. Como se ha reportado anteriormente (Franco et al., 2004b), la liberación de taurina es un proceso saturable que sigue una función sigmoide y, como se muestra en la figura 2B, el ATP tiene un punto de activación a 10% de hiposmolaridad (H-10%). En condiciones isosmóticas, el ATP no tiene efecto sobre la liberación de taurina. El ATP induce potenciación de LTO a diferentes hiposmolaridades comportándose como una curva Gausiana (Figura 2C) mostrando un efecto máximo (incremento de 240%) en 20% de reducción en la osmolaridad (H-20%). A H-35% la potenciación de ATP es más baja (75%) y no fue aumentada en H-50%. Estos resultados sugieren que el ATP puede incrementar la sensibilidad de la LTO a la hiposmolaridad. La curva de la LTO en respuesta a la concentración de ATP (Figura 2D) muestra una  $\text{EC}_{50}$  de 1.5  $\mu\text{M}$  ATP en su efecto potenciador. Pese a que la máxima potenciación por ATP se observa en H-20%, los siguientes experimentos se realizaron en condiciones de H-35% bajo los cuales la liberación de taurina en ausencia de ATP es más alta que en H-20% de



hiposmolaridad, por lo cual, es más conveniente para la comparación de los datos con respecto al control y la potenciación de liberación de taurina.



**Figura 2.** Efecto del ATP extracelular sobre la Liberación de Taurina inducida por Hiposmolaridad (LTO) en cultivos celulares de fibroblastos Swiss 3T3. **A.** Las células preincubadas con  $^3\text{H}$ -taurina, fueron perfundidas con medio isosmótico por 5 min. Posteriormente, el medio de perfusión se cambio a medio hiposmótico 35% (flecha) ( $\bullet$ ). El ATP ( $100 \mu\text{M}$ ,  $\blacktriangledown$ ) fue agregado al medio hiposmótico, y mantenido durante todo el experimento. Los datos se representan como liberación de radiactividad en cada tiempo, expresado como porcentaje del total de radiactividad acumulada durante el experimento. **B.** Efecto del ATP ( $100 \mu\text{M}$ ) sobre la liberación de  $^3\text{H}$ -taurina en respuesta a varias reducciones en la osmolaridad del medio: 10% (270 mOsm); 20% (240 mOsm); 35% (195 mOsm); 50% (150 mOsm), o en medio isosmótico (300 mOsm). Las barras representan el porcentaje de taurina liberada en las primeras tres fracciones de 1-min después del estímulo hiposmótico (minutos 6–8 en la gráfica), en presencia (barras grises) o ausencia (barras negras) de ATP  $100 \mu\text{M}$ . **C.** La potenciación de la liberación de  $^3\text{H}$ -taurina por ATP es proporcional a la reducción de la osmolaridad. Los datos se expresan como porcentaje de liberación con respecto al control en ausencia de ATP, y se ajustó a una curva Gaussiana (línea continua). **D** Curva dosis/respuesta de la potenciación que induce el ATP en la LTO. Los resultados se expresan como en **C** y se ajustan a una curva sigmoide (línea continua). Los datos representan promedios  $\pm$  la desviación estándar (DE)  $n = 6-8$ . \* $P < 0.005$ , \*\* $P < 0.01$  en relación a la LTO en ausencia de ATP;  $\zeta$   $P > 0.005$ ,  $\delta$   $P > 0.001$  respecto al control en condiciones isosmóticas.

## **II. La potenciación de la LTO por ATP esta mediada por receptores purinérgicos (metabotrópicos) del tipo 2 y 4, P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>4</sub>**

Para identificar el subtipo de receptor purinérgico involucrado en la potenciación de la LTO inducida por ATP, se usaron agonistas y antagonistas relativamente específicos a los diferentes subtipos de receptores. Uridin trifosfato o UTP (100  $\mu$ M), un agonista de receptores P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>4</sub> pero no de P2Y<sub>1</sub>, potencia la LTO de igual forma como lo hace el ATP (Figura 3A y B). Por el contrario, el adenosina difosfato (ADP) y el Me-ATP, ambos agonistas de receptores P2Y<sub>1</sub> no afectaron la LTO (Figura 3B). De manera similar, el agonista a receptores P2X ( $\beta\gamma$ -ATP) no potenció la LTO (Figura 3B), lo cual excluye la participación de receptores purinérgicos de tipo ionotrópicos (P2X). Estos resultados apuntan a la participación de receptores P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>4</sub> en la potenciación de LTO por ATP. Para aclarar la participación de estos dos subtipos, se examinó el efecto de suramina y PPADS, antagonistas específicos para P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>4</sub> respectivamente sobre la LTO. Suramina (10  $\mu$ M) y PPADS (20  $\mu$ M) inhibieron la LTO en un 21% y 37%, respectivamente, y cuando estos se agregan de manera simultanea, la LTO disminuye en un 62%. La liberación de taurina en presencia de ATP extracelular fue inhibida 55% por suramina y 51% por PPADS cuando son agregados por separado, y la potenciación es completamente inhibida cuando ambos antagonistas se agregan juntos (Figura 3C). Estos resultados apuntan a que la potenciación de la LTO por ATP esta mediada por la activación de los receptores P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>4</sub>, los cuales modulan de manera parcial la LTO en ausencia de ATP.

## **III. La potenciación de LTO por ATP esta mediada por la via de señalización PLC, incrementos en [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> y activación de CaM y CaMKII**

Como se mencionó anteriormente, la activación de receptores purinérgicos de tipo metabotrópico lleva a la liberación de Ca<sup>2+</sup> intracelular y la activación subsecuente de distintas cascadas de señalización. Por lo tanto, se decidió estudiar el papel de cambios en el contenido de calcio intracelular [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>,

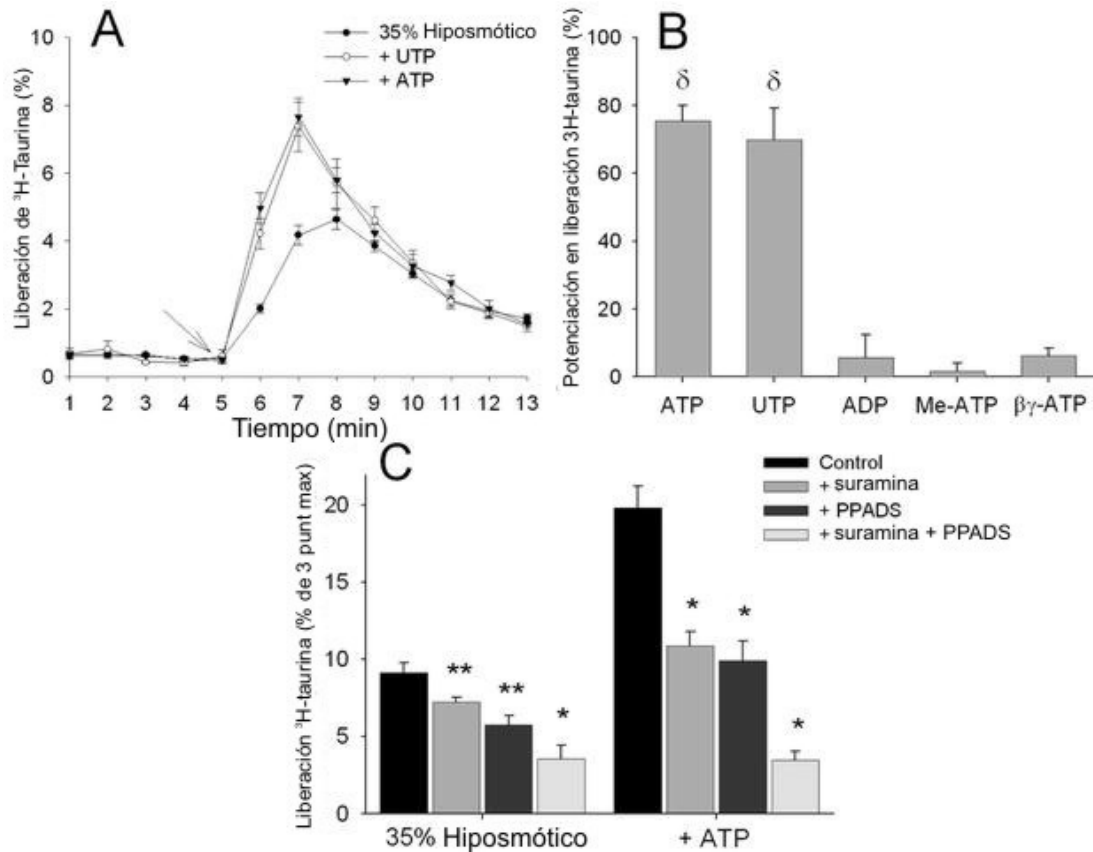
## **II. La potenciación de la LTO por ATP esta mediada por receptores purinérgicos (metabotrópicos) del tipo 2 y 4, P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>4</sub>**

Para identificar el subtipo de receptor purinérgico involucrado en la potenciación de la LTO inducida por ATP, se usaron agonistas y antagonistas relativamente específicos a los diferentes subtipos de receptores. Uridin trifosfato o UTP (100  $\mu$ M), un agonista de receptores P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>4</sub> pero no de P2Y<sub>1</sub>, potencia la LTO de igual forma como lo hace el ATP (Figura 3A y B). Por el contrario, el adenosina difosfato (ADP) y el Me-ATP, ambos agonistas de receptores P2Y<sub>1</sub> no afectaron la LTO (Figura 3B). De manera similar, el agonista a receptores P2X ( $\beta\gamma$ -ATP) no potenció la LTO (Figura 3B), lo cual excluye la participación de receptores purinérgicos de tipo ionotrópicos (P2X). Estos resultados apuntan a la participación de receptores P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>4</sub> en la potenciación de LTO por ATP. Para aclarar la participación de estos dos subtipos, se examinó el efecto de suramina y PPADS, antagonistas específicos para P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>4</sub> respectivamente sobre la LTO. Suramina (10  $\mu$ M) y PPADS (20  $\mu$ M) inhibieron la LTO en un 21% y 37%, respectivamente, y cuando estos se agregan de manera simultánea, la LTO disminuye en un 62%. La liberación de taurina en presencia de ATP extracelular fue inhibida 55% por suramina y 51% por PPADS cuando son agregados por separado, y la potenciación es completamente inhibida cuando ambos antagonistas se agregan juntos (Figura 3C). Estos resultados apuntan a que la potenciación de la LTO por ATP esta mediada por la activación de los receptores P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>4</sub>, los cuales modulan de manera parcial la LTO en ausencia de ATP.

## **III. La potenciación de LTO por ATP esta mediada por la via de señalización PLC, incrementos en [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> y activación de CaM y CaMKII**

Como se mencionó anteriormente, la activación de receptores purinérgicos de tipo metabotrópico lleva a la liberación de Ca<sup>2+</sup> intracelular y la activación subsecuente de distintas cascadas de señalización. Por lo tanto, se decidió estudiar el papel de cambios en el contenido de calcio intracelular [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>,

en la LTO y su potenciación por ATP. La hiposmolaridad provoca de manera consistente un incremento en  $[Ca^{2+}]_i$ ; cuya magnitud y origen es específico para cada tipo celular (Hoffmann y Pedersen, 1998; Jakab et al., 2002).

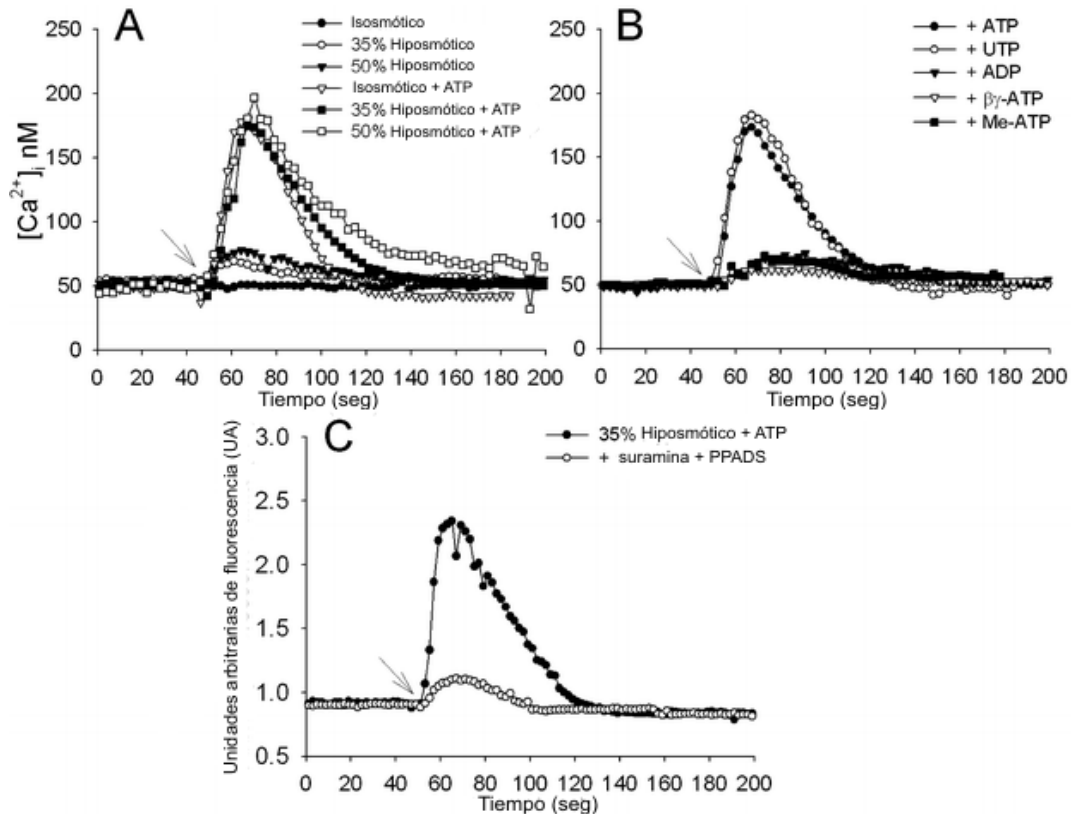


**Figura 3.** Efecto de los agonistas o antagonistas de receptores purinérgicos sobre la LTO y su potenciación por ATP. Las células fueron preincubadas con  $^3H$ -taurina y perfundidas como se indica en la figura 2A. Efecto de ATP y UTP (100  $\mu$ M) extracelular sobre la liberación de  $^3H$ -taurina en respuesta a medio 35%. Los resultados están expresados como en la figura 2A. **B.** Efecto de ADP, 2-metil-tio-ATP (*Me-ATP*) o  $\beta,\gamma$ -metileno-ATP ( $\beta,\gamma$ -*ATP*) (100  $\mu$ M) sobre la LTO. El efecto de ATP y UTP se incluye en la comparación.  $\delta P < 0.001$  respecto a la LTO en ausencia de los agonistas. Todos los agonistas fueron agregados en el estímulo hiposmótico y estuvieron presentes durante el resto del experimento. **C.** Efecto de suramina (10  $\mu$ M) y ácido piridoxal fosfato-6-azofenil-2',4'-disulfónico, PPADS (20  $\mu$ M) sobre la LTO y en la potenciación provocada por ATP. Los fármacos fueron agregados 15 min antes del estímulo hiposmótico en presencia o ausencia de ATP y estuvieron presentes durante el resto del experimento. Las *barras* representan la liberación de  $^3H$ -taurina en las primeras tres fracciones después del estímulo hiposmótico como en la figura 2B. Los resultados representan el promedio  $\pm$  DE,  $n=4-8$ , \* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.05$  respecto al control en presencia o ausencia de ATP extracelular.

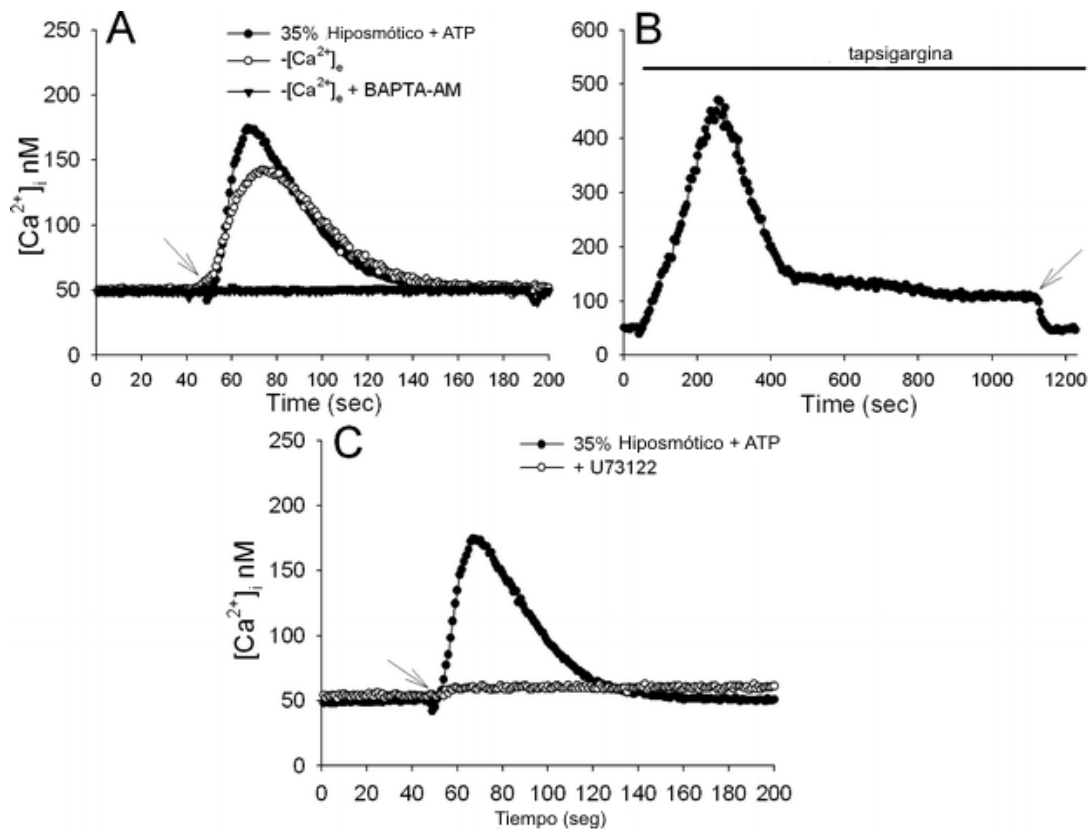
En células Swiss 3T3, la hiposmolaridad (H-35%, H-50%) induce solo un pequeño aunque significativo incremento en  $[Ca^{2+}]_i$  (figura 4A). La adición de ATP extracelular al medio isosmótico, incrementa  $[Ca^{2+}]_i$  de manera considerable de 50 a 180 nM, para luego disminuir. El incremento en  $[Ca^{2+}]_i$  en condiciones de H-50% ya sea en ausencia o presencia de ATP, solo aumentó ligeramente con respecto a H-35% aunque la liberación es más sostenida (Figura. 4A), lo que sugiere que el mecanismo de liberación de  $Ca^{2+}$  tiene un punto de saturación. El UTP pero no ADP, incrementa  $[Ca^{2+}]_i$  de manera muy similar al ATP en condiciones isosmóticas (Figura 4B). Por otra parte, los agonistas  $\beta, \gamma$ -ATP y Me-ATP no incrementan el  $[Ca^{2+}]_i$  (Figura 4B). Posteriormente se examinaron los efectos de PPADS o suramina sobre el incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por ATP. En el presente modelo experimental, ambos fármacos interfieren por si mismos con la fluorescencia de fura-2, incrementando la fluorescencia a 380 nm de excitación y alterando la quelación de  $[Ca^{2+}]_i$  con EGTA, por lo que la calibración de la  $[Ca^{2+}]_i$  ya no fue posible. Por lo tanto, el efecto de suramina y PPADS esta expresado en unidades arbitrarias de fluorescencia radiométrica. La figura 4C muestra que el incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por ATP fue prevenido por la acción de suramina y PPADS.

A continuación se examinó el origen del incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por ATP. Al omitir  $Ca^{2+}$  extracelular se reduce ligeramente la liberación de  $[Ca^{2+}]_i$  inducida por ATP. Por otro lado, al preincubar las células con el quelante intracelular de  $Ca^{2+}$  BAPTA-AM (50 $\mu$ M), se inhibe por completo el incremento en  $[Ca^{2+}]_i$  (Figura 5A). Este resultado sugiere que el incremento en  $[Ca^{2+}]_i$  por ATP se origina principalmente de reservas intracelulares. Esto fue confirmado al depletar de  $Ca^{2+}$  al retículo endoplásmico usando el inhibidor de la bomba de  $Ca^{2+}$ , tapsigargina (1  $\mu$ M), en ausencia de  $Ca^{2+}$  extracelular. En la figura 5B se observa que la tapsigargina induce un incremento inicial de  $[Ca^{2+}]_i$  que subsecuentemente decae, después de este tratamiento no hubo incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  agregando H-35% + ATP (Fig. 5B). Estos resultados apuntan a que el retículo endoplásmico es la principal fuente de origen del incremento de  $[Ca^{2+}]_i$ .

inducido por ATP. Mas aún, el incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  parece estar mediado por la activación de la fosfolipasa C (PLC) como se muestra por la clara inhibición de la LTO en presencia del bloqueador de la PLC, U73122 (100 $\mu$ M) (Figura 5C).



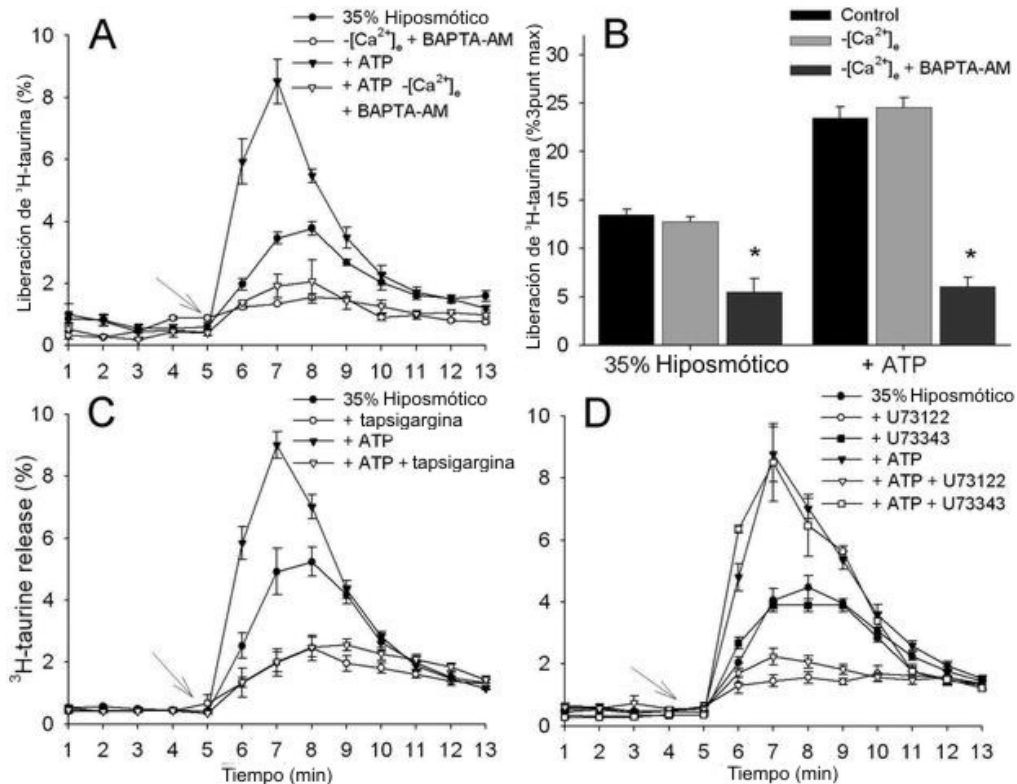
**Figura 4.** Cambios en la concentración de calcio citosólico ( $[Ca^{2+}]_i$ ) inducidos por hiposmolaridad y por la activación de receptores purinérgicos. El  $Ca^{2+}$  intracelular fue determinado analizando los cambios en fluorescencia de fura-2/AM, como se detalla en los métodos. Los niveles de  $[Ca^{2+}]_i$  basales fueron determinados bajo condiciones isosmóticas. Una vez que la fluorescencia basal estaba estable, la osmolaridad del medio fue reducida (*flecha*), agregando el volumen apropiado de agua destilada. **A.** Efecto de la hiposmolaridad sobre el  $[Ca^{2+}]_i$  en presencia o ausencia de ATP extracelular. **B.** Efecto de los agonistas purinérgicos sobre  $[Ca^{2+}]_i$  en condiciones isosmóticas. En **A** y **B**, los agonistas ATP, UTP, ADP Me-ATP o  $\beta$ - $\gamma$ -ATP (100  $\mu$ M), fueron agregados al medio hiposmótico y permanecieron durante todo el experimento. El  $[Ca^{2+}]_i$  se expresa en nM. **C.** Efecto de antagonistas de receptores purinérgicos sobre la fluorescencia de fura-2 inducida por un medio 35% hiposmótico más ATP 100  $\mu$ M. Los antagonistas a receptores purinérgicos suramina (10  $\mu$ M) y PPADS (20  $\mu$ M) estuvieron presentes durante todo el experimento. Los resultados están expresados como unidades arbitrarias de fluorescencia. Los trazos en **A-C** son representativos de entre cuatro y seis experimentos independientes.



**Figura 5.** Participación de la PLC y el retículo endoplásmico en el incremento en  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por ATP. **A.** Efecto de un medio libre de  $Ca^{2+}$  ( $-[Ca^{2+}]_e$ ) y BAPTA-AM sobre el  $[Ca^{2+}]_i$ . El medio libre de  $Ca^{2+}$  fue hecho por omisión de  $CaCl_2$  y agregando  $0.25 \mu M$  de EGTA a las soluciones experimentales. En donde se indica, las células fueron preincubadas con  $50 \mu M$  de BAPTA-AM en medio isosmótico durante 30 min. **B.** Efecto del tratamiento con  $1 \mu M$  de tapsigargina (20 min.) sobre el incremento en el  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por ATP. **C.** Efecto del inhibidor de la fosfolipasa C (PLC), U73122. Las células fueron preincubadas por 30 min con  $100 nM$  de U73122. El bloqueador estuvo presente durante el resto del experimento. La flecha indica el estímulo hiposmótico 35% más  $100 \mu M$  de ATP. Los trazos en **A-C** son representativos de entre cuatro y seis experimentos realizados por separado.

La dependencia de  $Ca^{2+}$  intracelular de la LTO y la participación de la PLC fue lo siguiente a examinar. La LTO fue independiente de  $Ca^{2+}$  extracelular, sin embargo, el tratamiento con BAPTA-AM redujo en un 58% la LTO (Figura 6A y B). Al depletar de  $Ca^{2+}$  el retículo endoplásmico mediante el tratamiento con tapsigargina, la LTO decae un 56%, mientras que el bloqueador de PLC U73122 la reduce 59%. El análogo inactivo del U73122, el U73343, no tuvo efecto alguno

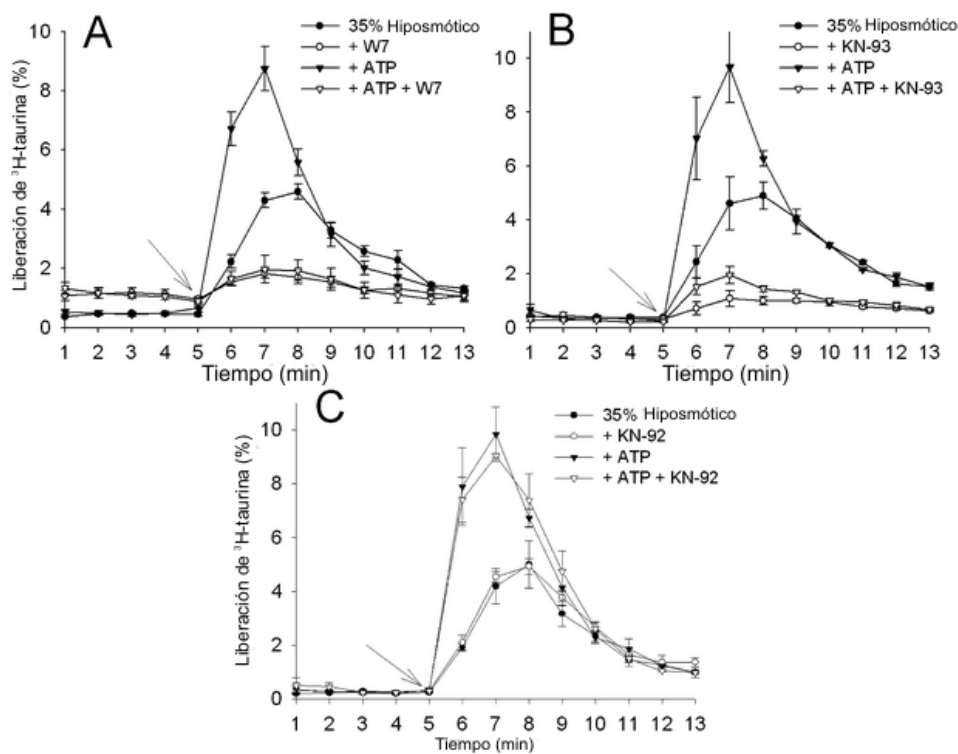
(Figura 6D). Estos resultados indican la participación de la PLC y de liberación  $[Ca^{2+}]_i$  proveniente del retículo endoplásmico, en la vía de señalización que activa la LTO. De manera similar, la potenciación de la LTO inducida por ATP fue bloqueada cuando se trató a las células con BAPTA-AM, tapsigargina o el bloqueador de PLC (Fig. 6).



**Figura 6.** Participación de la PLC y el retículo endoplásmico en la modulación de la LTO y de la potenciación por ATP. Las células fueron prelavadas con  $^3H$ -taurina y perfundidas como en la Figura 2A. **A.** Efecto del bufero de  $[Ca^{2+}]_i$  por BAPTA-AM. Las soluciones extracelulares estuvieron libres de  $Ca^{2+}$  ( $[-Ca^{2+}]_e$ ). Las células fueron preincubadas por 30 min con 50  $\mu M$  de BAPTA-AM. **B.** Efecto un medio libre de  $Ca^{2+}$  extracelular sobre la LTO en la presencia o ausencia de ATP. Las *barras* representan la liberación de  $^3H$ -taurina en las tres primeras fracciones de 1 min, después del estímulo hiposmótico como en la Figura 2B. El efecto del BAPTA-AM esta expresado en la misma forma y se incluye para la comparación. \* $P < 0.001$  respecto al control en presencia o ausencia de ATP extracelular. **C.** Efecto de depleción de  $Ca^{2+}$  del retículo endoplásmico con tapsigargina (1  $\mu M$ , 20 min antes del experimento, ver Figura 5B) sobre la LTO. El fármaco estuvo presente durante todo el experimento. **D.** Efecto del inhibidor de la PLC, U73122 (100 nM) y de su análogo no funcional, U73343 (100 nM) sobre la LTO y su potenciación por ATP. Los fármacos se preincubaron 30 min y estuvieron presentes todo el experimento. La *flecha* indica el estímulo hiposmótico 35% en presencia o ausencia de ATP extracelular (100  $\mu M$ ). Los resultados están expresados como en la Figura 2A y son promedios  $\pm$  DE de  $n=6-8$ .



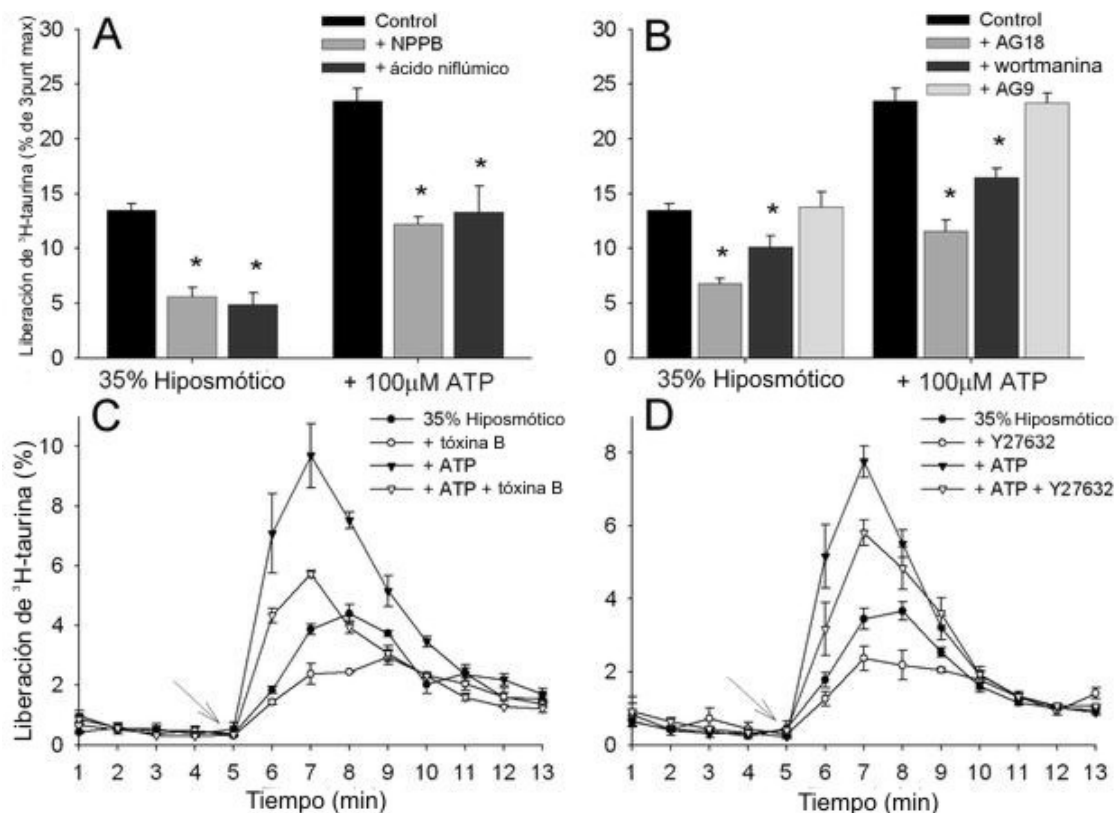
Incrementos en la  $[Ca^{2+}]_i$  activan una gran variedad de eventos de señalización de los cuales la proteína cinasa C (PKC) y la vía de la calmodulina (CaM) junto con la calmodulina cinasa (CaMKII) son los principales efectores. En base a esto, se examinó la participación de la PKC, CaM ó CaMKII en la cascada de señales que modulan la LTO y sobre el efecto potenciador del ATP. El antagonista de CaM, W7 (50  $\mu$ M), y el inhibidor de CaMKII, KN-93 (10  $\mu$ M), redujeron la LTO en un 54% y 76% respectivamente. Asimismo, estos agentes inhibieron completamente la potenciación por ATP (Figura 7A y B). Por otra parte, el análogo inactivo de KN93, el KN92 no tuvo efecto sobre la LTO (Figura 7C). Los inhibidores de la PKC, queleritina (2.5  $\mu$ M) y GÖ6976 (1  $\mu$ M) no afectaron la LTO ni la potenciación inducida por ATP (datos no mostrados).



**Figura 7.** Papel de la calmodulina (CaM) y la cinasa II dependiente de calmodulina (CaMKII) sobre la LTO y su potenciación por ATP. Las células fueron preincubadas con  $^3$ H-tyrosina y perfundidas como en la Figura 2A. **A, B.** Efecto del antagonista de la CaM, W7 (50  $\mu$ M, **A**), y del inhibidor de la CaMKII, KN93 (10  $\mu$ M, **B**). **C.** Efecto del KN-92 (10  $\mu$ M), análogo inactivo del KN-93. Las células fueron preincubadas con los fármacos por 30 min y estuvieron presentes durante todo experimento. Los resultados están expresados como en la Figura 2A y son promedios  $\pm$  DE de  $n=6-8$ .

#### **IV. La LTO y la potenciación por ATP son sensibles a bloqueadores de canales de Cl<sup>-</sup> y dependen de la actividad de proteínas cinasas de tirosina.**

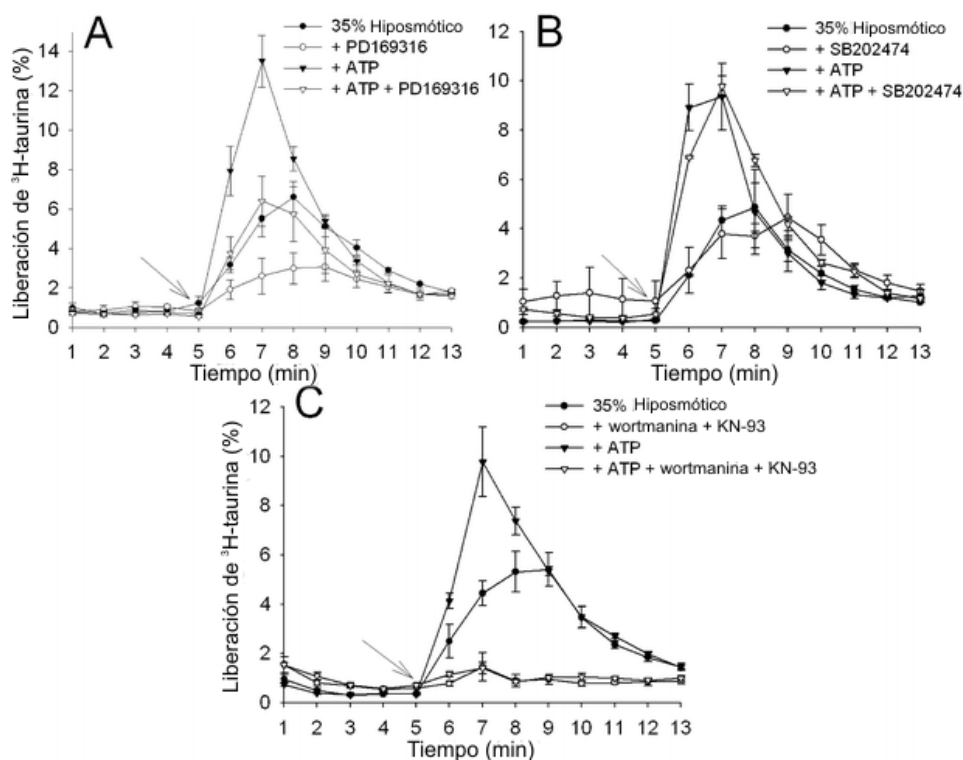
Una característica de la LTO es su sensibilidad a bloqueadores de canales de Cl<sup>-</sup> y que esta regulada por la actividad de proteínas cinasas de tirosina y de PI3K (Cardin et al., 2003; Franco et al., 2001; Franco et al., 2004b; Pasantes-Morales y Franco, 2002; Pedersen et al., 2002). Esto mismo ocurre en los fibroblastos Swiss 3T3 como se ilustra en la figura 8A, donde se muestra una inhibición del 59% y 64% en presencia de los bloqueadores de canales de Cl<sup>-</sup>, NPPB (100μM) y ácido niflúmico (300μM), respectivamente. La potenciación inducida por ATP fue inhibida proporcionalmente por estos fármacos. El bloqueador general de cinasas de tirosina, tirfostina AG18 (50μM), inhibe en un 50% la LTO, mientras que su análogo inactivo AG9 (50μM) no tuvo efecto alguno (Figura 8B). Como se ha reportado previamente (Franco et al., 2004b) el inhibidor de la PI3K, wortmanina (100nM), inhibe de manera significativa la LTO lo que corrobora la participación de esta cinasa en la LTO (Figura 8B). La fracción de la potenciación inducida por ATP fue también inhibida de manera proporcional por wortmanina (Figura 8B). La influencia sobre la LTO en la cascada de señales de p21-rho y la cinasa de p21-rho (ROCK) fueron evaluadas usando toxina B (20 ng/ml), un inhibidor de p21-rho, y Y27632 (10μM), bloqueador de la ROCK. Ambos fármacos redujeron la LTO en un 30-34% y disminuyeron de manera similar la potenciación por ATP (Figura 8C y D). La influencia de la cinasa activada por estrés p38 fue evaluada usando el inhibidor específico PD169316 (50 μM), un bloqueador específico de esta cinasa. La figura 9A, muestra una marcada reducción de la LTO (46%) por este bloqueador y un efecto similar es observado en la LTO estimulada por ATP. Por otra parte, el análogo inactivo del PD169316, el SB202474 (50 μM) no tuvo efecto en la LTO ni en la potenciación por ATP (Figura 9B).



**Figura 8.** Efecto de los bloqueadores de canales de Cl<sup>-</sup> y de los inhibidores de la vía de la p21rho-ROCK sobre la LTO y su potenciación por ATP. Las células fueron preincubadas con <sup>3</sup>H-aurina y perfundidas como en la Figura 1A. **A.** Efecto de los bloqueadores de canales de Cl<sup>-</sup>, (**A**) ácido benzoico 5-nitro-3-(3-fenilpromilamino) (*NPPB*, 100 µM) y ácido niflúmico (300 µM). Los fármacos fueron agregados al medio hiposmótico y estuvieron presentes durante el experimento. **B.** Las células fueron preincubadas con el inhibidor general de cinasas de tirosina AG18 (50 µM), su análogo no funcional AG9 (50 µM) o el inhibidor de la cinasa de fosoinositol trifosfato (PI3K) wortmanina (100 nM) por 30 min, los fármacos estuvieron presentes durante el resto del experimento. En **A** y **B**, las *barras* representan la liberación de <sup>3</sup>H-aurina en las primeras 3 fracciones de 1 min, después del estímulo hiposmótico como en la Figura 2B. Los datos son promedios de ± DE de n= 6-8; \*P<0.001 respecto al control correspondiente (*barras negras*) en presencia o ausencia de ATP, como se indica. **C** y **D.** Efecto de la inhibición de p21rho y de la cinasa asociada con p21 rho (ROCK) sobre la LTO. **C.** Las células fueron tratadas con el inhibidor de p21 rho, toxina B (*Clostridium difficile*) preincubando (2 ng/ml) por 6 horas antes del experimento. **D.** Las células fueron preincubadas bloqueador de la ROCK Y27632 (10 µM, 1 h) y el fármaco estuvo presente durante todo el experimento. Los resultados están expresados como en la Figura 2A y son promedios ± DE de n= 6-8.

## V. La LTO es abolida por la inhibición conjunta de la CaMKII y de la PI3K

Como se observa en las figuras 7 y 8 la inhibición de la CaMKII y de la PI3K inhiben de manera significativa la LTO. La inhibición de la vía de señalización de la PLC a la CaMKII inhibe de manera consistente la fracción dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  de la LTO, sin embargo, la LTO nunca se ve suprimida completamente. Esta fracción de liberación que persiste puede estar mediada de manera independiente por la vía de cinasas de tirosina y la activación de la PI3K. Debido a esto, se estudió la posibilidad de que ambas vías de señalización estuviesen actuando de manera conjunta en la LTO. La figura 9C muestra de manera clara que si se bloquea simultáneamente la CaMKII y la PI3K, la LTO es abolida ya sea en ausencia o presencia de ATP.



**Figura 9.** Las células fueron preincubadas con  $^3\text{H}$ -taurina y perfundidas como en la Figura 1A. **A, B** Las células fueron preincubadas con el bloqueador de p38, PD169316 (50  $\mu\text{M}$ , **A**) ó el análogo inactivo del PD169316, el SB202474 (50  $\mu\text{M}$ , **B**) por 1h. **C.** Las células fueron preincubadas durante 30 min con el inhibidor de la CaMKII, KN-93 (10  $\mu\text{M}$ ) junto con el inhibidor de PI3K, wortmanina (100 nM). Los fármacos estuvieron presentes durante todo el experimento. Los resultados promedios  $\pm$  DE de  $n=6-8$ .

## DISCUSION

En el presente estudio se muestra que el ATP extracelular modula la LTO sin afectar el flujo de taurina en condiciones isosmóticas. Estos efectos del ATP parecen estar mediados por receptores purinérgicos, particularmente por los subtipos de receptores metabotrópicos P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>4</sub>. Lo cual está sustentado por el efecto del agonista UTP y de los antagonistas, suramina y PPADS, sobre la potenciación de LTO inducida por ATP. Se sabe a la fecha que la activación de receptores P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>4</sub> provocan una serie de reacciones que resultan en la liberación de Ca<sup>2+</sup> de pozas internas, particularmente del retículo endoplásmico, vía PLC (Lazarowski et al., 2003). El mismo fenómeno se observa en el presente estudio, en el cual el incremento de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> inducido por ATP es anulado por el inhibidor de la bomba de Ca<sup>2+</sup> del retículo endoplásmico, tapsigargina. Además, se observó que la liberación de Ca<sup>2+</sup> esta mediada por la activación de PLC. Asimismo, la potenciación de la LTO por ATP resultó completamente dependiente de este aumento de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> y de la subsiguiente activación de la vía de la CaM/CaMKII. Estudios previos en cultivo de astrocitos de rata (Cardin et al., 2003) demostraron de manera similar, el papel potenciador de un incremento en [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> y la activación de CaM/CaMKII inducido por ionomicina sobre la LTO. El efecto modulador (pero no activador) de incrementos en el [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> sobre la LTO es sustentado por los resultados que muestran que ATP o ionomicina en condiciones isosmóticas no inducen LTO, a pesar del marcado incremento de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> provocado por ambos fármacos, como se muestra en este trabajo y en el reporte de Cardin et al. (2003). Por consiguiente, la activación y operación de la vía de señales del flujo de taurina es un prerrequisito para la influencia de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> sobre la LTO.

Por lo tanto la siguiente pregunta a responder es en que sitios y/o mecanismos dentro de la vía de señalización que activan la LTO esta participando el ATP. Se sabe que la LTO depende de la activación de proteínas cinasas de tirosina (Cardin et al., 2003; Franco et al., 2001; Franco et al., 2004b; Morales-Mulia et al., 2001; Pasantes-Morales y Franco 2002). Otro elemento de

señalización en esta vía es la PI3K, un blanco de tirosinas cinasas que es activado por hiposmolaridad; cuando PI3K es inhibida, la LTO se inhibe de manera significativa (Cardin et al., 2003; Feranchak et al., 1998; Franco et al., 2001; Franco et al., 2004b; Morales-Mulia et al., 2001). La vía de señalización de tirosina cinasas-PI3K involucrada en la LTO puede tener relación con la vía de p21rho y ROCK (Pedersen et al., 2002).

En este estudio, la LTO fue reducida significativamente tanto por tirfostina AG18, un bloqueador general de cinasas de tirosinas, como por wortmanina, un inhibidor de PI3K, así como por bloqueadores de p21rho y ROCK, y de manera similar, todos estos agentes atenuaron la potenciación de la LTO inducido por ATP. En el presente estudio también se observó que la cinasa activada por estrés p38, está involucrada en la vía de señalización de la LTO inducida por ATP. El estrés osmótico activa p38 en varios tipos celulares estudiados (Franco et al., 2001; Tilly et al., 1996), sin embargo, se requieren más estudios para esclarecer cual es la relación entre la p38 y la activación de las cinasas de tirosina que posiblemente participan en la LTO.

Por otra parte, el efecto potenciador del ATP a través del  $Ca^{2+}$ , sobre la LTO puede resultar simplemente de la amplificación de los mecanismos responsables de la fracción de LTO dependiente de tirosina cinasas. Esta fracción dependiente de  $Ca^{2+}$  contiene como elementos de señalización la activación de la PLC, liberación de  $Ca^{2+}$  del retículo endoplásmico, y subsecuentemente se activa la vía de CaM y CaMKII. La inhibición de cualquiera de estos eventos, en ausencia de ATP, reduce la LTO de 54-59% y suprime al 100% la fracción potenciada por ATP. Estos resultados sustentan la hipótesis de que el ATP modula la fracción dependiente de  $Ca^{2+}$  de la LTO. Adicionalmente, también se observó que la inhibición de la vía de la PLC  $\rightarrow$  incremento en  $[Ca^{2+}]_i$   $\rightarrow$  CaM  $\rightarrow$  CaMKII también participa en la LTO en ausencia de ATP extracelular. La PLC $\beta$  que es el subtipo de PLC activada por receptores purinérgicos, y recientemente se ha reportado su interacción con PI3K y p38 (Barr et al., 2002). Se ha reportado que la isoforma PLC $\gamma$  esta asociada a receptores de cinasas de

tirosina (Rhee, 2001), particularmente del tipo activado por hiposmolaridad en fibroblastos Swiss 3T3 (Franco et al., 2004b). Por lo tanto, es posible que alguno de estos subtipos de PLC formen parte de la vía de señalización dependiente de cinasas de tirosina que modula la LTO. El ATP, en teoría, debería estar potenciando la LTO mediante la activación de la PLC $\beta$  únicamente. Esos resultados junto con el hecho de que la LTO se inhibe totalmente con el tratamiento simultáneo de KN-93 y wortmanina, sugiere la operación de una vía dependiente de tirosinas cinasas-PI3K, la cual puede ser positivamente modulada por una vía dependiente de Ca<sup>2+</sup>, sobre la cual tiene efecto el ATP.

La potenciación de la LTO mediada por incrementos en [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> puede afectar también la liberación de otros osmolitos, como el glutamato, K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>. Por lo que el ATP puede participar como modulador general de los mecanismos que subyacen el DRV. Sin embargo, la pregunta sobre si el ATP incrementa liberación de osmolitos mediante una vía autócrina presente en la LTO en condiciones control (en ausencia de adición de ATP extracelular) se sustenta por un gran número de reportes acerca de que la hiposmolaridad induce liberación de ATP. Este aspecto no fue explorado en detalle en el presente trabajo, aunque la inhibición sustancial por suramina y PPADS de la LTO en ausencia de ATP externo soporta esta hipótesis. De manera consistente, estudios previos en células de hepatoma, muestran una marcada reducción en la liberación de taurina por apirasa, una enzima que hidroliza ATP presente en el espacio extracelular (Junankar et al., 2002). Se ha reportado que la apirasa no tiene efecto sobre la liberación de D-aspartato inducida por hiposmolaridad en astrocitos cultivados, aunque la potenciación por ATP es abolida (Mongin et al., 2002). La activación autócrina mediada por ATP de canales osmosensibles de Cl<sup>-</sup> ha sido demostrada en algunos estudios (Musante et al., 1999; Feranchak et al., 2000), pero cuestionado en otros (Hisadome et al., 2002; Junankar et al., 2002). Además de esto, se ha reportado que los subtipos de receptores purinérgicos P2Y<sub>2</sub> pueden ser activados por la interacción con integrinas y FAK (Soltoff et al., 1998; Erb et al., 2001) dos posibles elementos implicados en

sensar volumen y subsecuentemente en la respuesta de regulación (Hoffmann y Pedersen, 1998).

Estos resultados sobre el efecto de la activación de receptores purinérgicos metabotrópicos y el subsiguiente incremento en  $[Ca^{2+}]_i$ , y sus efectos potenciadores de la LTO y posiblemente el DRV sugiere la posibilidad de que otro tipo de receptores conectados a mecanismos que incrementan el  $[Ca^{2+}]_i$  puedan estar participando en la modulación del DRV en condiciones fisiológicas. Esto incluye un gran número de receptores ionotrópicos y metabotrópicos que puedan ser estimulados durante el hinchamiento hiposmótico o citotóxico. Esto debido a la posible liberación al medio extracelular de hormonas o factores que provocan incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  y pequeños cambios de volumen celular. Si este es el caso, la potenciación de flujo de osmolitos mediada por  $Ca^{2+}$  intracelular, puede contribuir a una mayor eficiencia en la recuperación del volumen celular en sistemas *in vivo* donde el espacio extracelular está más reducido en comparación con las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo, lo que incrementaría la concentración local de estos factores. Un reporte reciente (Loveday et al., 2003) muestra la potenciación en la liberación de taurina y mioinositol por activación del receptor colinérgico muscarínico concordando con esta hipótesis lo que seguro llevara a mas estudios en esa dirección.

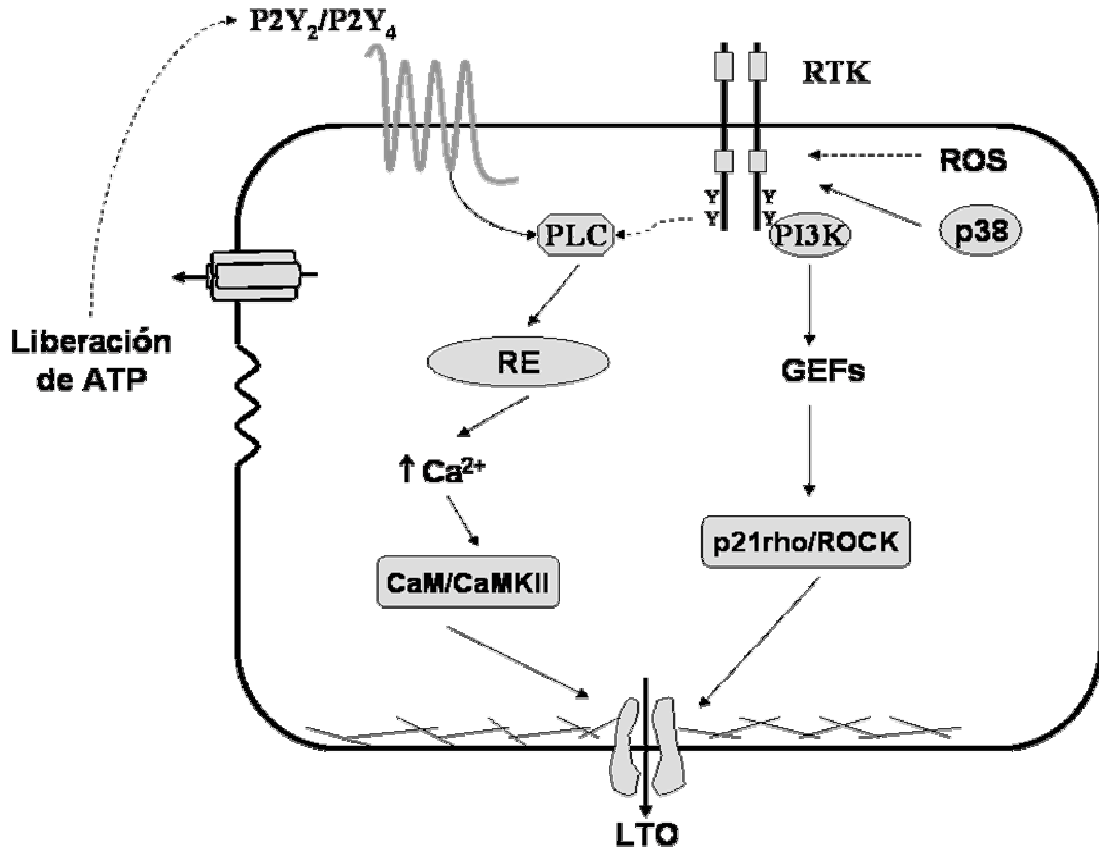
El siguiente modelo (Figura 10), es un intento de recopilar todos los resultados obtenidos de una manera esquemática, junto con los datos previos a este estudio. De manera general, la hiposmolaridad genera una señal que involucra la activación de un sensor de volumen. Estudios previos han propuesto la activación inicial de receptores membranales con actividad de cinasa de tirosina (RTK) en la vía de señalización que activa la LTO. Esta vía involucra la activación de la PI3K y la vía de la p21rho/ROCK (Pedersen et al., 2002), aunque su jerarquía en esta cascada está todavía a discusión. Se ha reportado que la PI3K puede activar la vía de p21rho/ROCK mediante la modulación de la actividad de factores de intercambio de nucleótidos GDP (Pasantés-Morales y Franco, 2002). Adicionalmente, la activación de la p38 también está involucrada



en esta vía, en este trabajo se especula que ésta cinasa puede estar siendo parte del sistema de “sensado” de los cambios en volumen, aunque su participación parece ser específica al tipo celular estudiado. El estrés osmótico activa p38 en varios tipos celulares estudiados (Franco et al., 2001; Tilly et al., 1996), posiblemente por un mecanismo mediado por la generación de especies reactivas de O<sub>2</sub> asociadas con el cambio en la osmolaridad (Lambert, 2004).

En este estudio la liberación de ATP inducida por hiposmolaridad, o la adición externa del mismo, regula de manera positiva la LTO mediante la activación de receptores P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>4</sub> los cuales activan la vía de PLC → incremento en [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> → CaM → CaMKII. Vías que parecen estar mediando de manera conjunta la LTO, sin embargo no se descarta que en otro tipo celular puedan participar otros subtipos de los receptores purinérgicos metabotrópicos P2Y o bien, posiblemente otra vía de señales.

### Vías de señalización involucradas en la LTO



**Figura 10. Modelo hipotético de las vías de señalización involucradas en la regulación de la LTO.** Ver texto. Abreviaturas: *ATP*, adenosina trifosfato; *CaM*, calmodulina; *CaMKII*, cinasa dependiente de  $Ca^{2+}$  y calmodulina tipo II;  $Ca^{2+}$ , calcio; *RE*, retículo endoplásmico; *GEFs*, factores de intercambio de nucleótidos de tipo GDP; *LTO*, liberación de taurina sensible a osmolaridad; *p21rho*, *P2Y<sub>2</sub>/P2Y<sub>4</sub>*, receptores purinérgicos metabotrópicos de tipo 2 y 4; proteína G pequeña rho de 21 Kd; *ROCK*, cinasa dependiente de p21rho; *p38*, cinasa activada por estrés de 48Kd; *PI3K*, cinasa de fosfatidil inositol trifosfato; *PLC*, fosfolipasa C; *RTK*, receptores con actividad intrínseca de tirosina cinasa; *ROS*, especies reactivas de oxígeno.

## CONCLUSIONES

- La liberación de taurina sensible a osmolaridad (LTO) se potencia por la presencia de ATP extracelular. Esta potenciación es saturable alcanzando su máximo a baja osmolaridad.
- El efecto del ATP esta mediado por la activación de receptores purinérgicos de tipo metabotrópico, P2Y. De manera particular, la caracterización farmacológica de estos receptores sugiere la participación de receptores P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>4</sub>.
- La potenciación de la LTO por ATP esta mediada por el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  mediado por la activación de la PLC, y la subsiguiente activación de la vía de la CaM / CaMKII.
- La LTO es modulada por las siguientes cascadas de señalización:
  1. La vía de PLC → incremento en  $[Ca^{2+}]_i$  → CaM → CaMKII, sobre la cual actúa el ATP. Esta vía parece estar involucrada en la regulación de la “sensibilidad” de la LTO a la hiposmolaridad, pero no activa por si misma la LTO.
  2. La vía dependiente de eventos de fosforilación de tirosina y que involucra la activación de la PI3K, p38, p21rho y ROCK. Esta vía es necesaria para la activación de la LTO.
  3. La vía involucrada en la LTO en ausencia o presencia de ATP esta dada por una vía sensible a bloqueadores de canales de Cl<sup>-</sup>. Esto sugiere una misma identidad molecular para ambos fenómenos.
- Los resultados obtenidos no son suficientes para esclarecer si la activación de receptores purinérgicos esta involucrada en la LTO en ausencia de ATP extracelular.
- El estudio de la participación de receptores metabotrópicos en la LTO y los mecanismos involucrados en la subsiguiente modulación del DRV y la liberación de osmolitos, es una línea de investigación nueva que puede originar el conocimiento necesario para generar o hacer más eficientes las terapias dirigidas a la disminución de los daños ocasionados por el edema en distintas condiciones patológicas.

## REFERENCIAS

Abbracchio M.P., G. Burnstock, Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors?, *Pharmacol. Ther.* 64.1994. 445–475.

Al-Habori M . Macromolecular crowding and its role as intracellular signalling of cell volume regulation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001. Sep;33(9):844-64.

Arthur DB, Akassoglou K, Insel PA. P2Y2 receptor activates nerve growth factor\_TrkA signaling to enhance neuronal differentiation. *Proc Natl acadSci, USA.* 2005. Dec 27; 102(52): 19138-43.

Barnard E.A., G. Burnstock, T.E.Webb, G protein-coupled receptors for ATP and other nucleotides: a new receptor family, *Trends Pharmacol. Sci.* 1994.15. 67–70.

Barnard EA, Simon J, and Webb TE. Nucleotide receptors in the nervous system. An abundant component using diverse transduction mechanisms. *Mol Neurobiol.* 1997.15: 103–129.

Barr AJ, Marjoram R, Xu J, Snyderman R. Phospholipase C-beta 2 interacts with mitogen-activated protein kinase kinase 3. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002. 293:647–652

Berl T. Treating hyponatremia: damned if we do and damned if we don't. *Kidney Int.* 1990. 37:1006-1018

Boehm S. P2Ys go neuronal: modulation of Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> channels by recombinant receptors. *Br j Pharmacol.* 2003. Jan; 138(1): 1-3. Review

Boese SH, wehner F, Kinne RK. Taurine Permeation trough swelling-activated anion conductance in rat IMCD cells in primary culture. *Am J Physiol.* 1999. 271: F498-F507.

Bogdanov YD, Wildman SS, Clements MP, King BF, and Burnstock G. Molecular cloning and characterization of rat P2Y4 nucleotide receptor. *Br J Pharmacol.* 1998. 124: 428–430.

Boudreault F, Grygorczyk R Cell swelling-induced ATP release and gadolinium-sensitive channels. *Am J Physiol.* 2002. 282:c219–c226

Burnstock G., C. Kennedy, Is there a basis for distinguishing two types of P2 - purinoceptors?, *Gen. Pharmacol.* 1985.16. 433–440.

Burnstock G., Knight GE. Cellular distribution and functions of P2 receptors subtypes in different systems. *Int Rev Cytol.* 2004; 240: 31-304. Review

Cai SJ, Inouye M.; EnvZ-OmpR interaction and osmoregulation in *Escherichia coli.*; *J Biol Chem.* 2002 Jul 5;277(27):24155-61

Cannon CL, Basavappa S, Strange K. Intracellular ionic strength regulates the volume sensitivity of a swelling-activated anion channel. *Am J Physiol.* 1998 Aug;275(2 Pt 1):C416-22.

Cardin V, Pena-Segura C, Pasantes-Morales H. Activation and inactivation of taurine efflux in hyposmotic and isosmotic swelling in cortical astrocytes: role of ionic strength and cell volume decrease. *J Neurosci Res.* 1999. Jun 15;56(6):659-67.

Cardin V, Lezama R, Torres-Marquez ME, Pasantes-Morales H. Potentiation of the osmosensitive taurine release and cell volume regulation by cytosolic Ca<sup>2+</sup> rise in cultured cerebellar astrocytes. *Glia.* 2003. 44:119–128.

Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature.* 2001. Mar 1;410(6824):37-40.

Chang K, Hanaoka K, Kumada M, and Takuwa T. Molecular cloning and functional analysis of a novel P2 nucleotide receptor. *J Biol Chem.* 1995. 270: 26152–26158.

Chen Z-P, Krull N, Xu S, Levy A, and Lightman SL. Molecular cloning and functional characterization of a rat pituitary G protein-coupled adenosine triphosphate (ATP) receptor. *Endocrinology.* 1996.137: 1833–1840.

Chizh B.A., P. Illes, P2X receptors and nociception, *Pharmacol. Rev.* 53. 2001. 553–568.

Colclasure GC, Parker JC. Cytosolic protein concentration is the primary volume signal for swelling-induced [K-Cl] cotransport in dog red cells. *J Gen Physiol.* 1992 Jul;100(1):1-10.

Communi D., N.S. Gonzalez, M. Detheux, S. Brezillon, V. Lannoy, M. Parmentier, J.M. Boeynaems, Identification of a novel human ADP receptor coupled to Gi, *J. Biol. Chem.* 276. 2001. 41479– 41485.

Clarke LL, Chinet T, and Boucher RC. Extracellular ATP stimulates K1 secretion across cultured human airway epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*1997. 272: L1084–L1091.

Crepel V, Panenka W, Kelly ME, MacVicar BA. Mitogen-activated protein and tyrosine kinases in the activation of astrocyte volume-activated chloride current. *J Neurosci.* 1998. Feb 15;18(4):1196-206.

Darby M, Kuzmiski JB, Panenka W, Feighan D, MacVicar BA. ATP released from astrocytes during swelling activates chloride channels. *J Neurophysiol.* 2003. 89:1870 –1877

Deleuze C, Duvoid A, Moos FC, Hussy N. Tyrosine phosphorylation modulates the osmosensitivity of volume-dependent taurine efflux from glial cells in the rat supraoptic nucleus. *J Physiol.* 2000. Mar 1;523 Pt 2:291-9.

Deutsch C, Chen LQ. Heterologous expression of specific K<sup>+</sup> channels in T lymphocytes: functional consequences for volume regulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993. 90(2): 10036-10040

Dezaki K, Tsumura T, Maeno E, Okada Y Receptor-mediated facilitation of cell volume regulation by swelling-induced ATP release in human epithelial cells. *Jpn J Physiol*. 2000. 50:235–241

Dezaki K, Tsumura T, Maeno E, Okada Y Receptor-mediated facilitation of cell volume regulation by swelling-induced ATP release in human epithelial cells. *Jpn J Physiol*. 2000. 50:235–241

Di Virgilio F., P. Chiozzi, D. Ferrari, S. Falzoni, J.M. Sanz, A. Morelli, M. Torboli, G. Bolognesi, O.R. Baricordi, Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells, *Blood*. 2001.97. 587–600.

Ding M, Eliasson C, Betsholtz C, Hamberger A, Pekny M. Altered taurine release following hypotonic stress in astrocytes from mice deficient for GFAP and vimentin. *Brain Res Mol Brain Res*. 1998. Nov 12;62(1):77-81.

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

Duronio V, Scheid MP, Ettinger S. Downstream signalling events regulated by phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Cell Signal*. 1998. Apr;10(4):233-9

Dranoff, Jonathan A., Anatoly I. Masyuk, Emma A. Kruglov, Nicholas F. LaRusso, and Michael H. Nathanson. Polarized expression and function of P2Y ATP receptors in rat bile duct epithelia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001. 281: G1059–G1067.

Erb L, Liu J, Ockerhausen J, Kong Q, Garrad RC, Griffin K, Neal C, Krugh B, Santiago-Perez LI, Gonzalez FA, Greham HD, Turner JT, Weisman GA. An RGD sequence in the P2Y<sub>2</sub> receptor interacts with  $\alpha_v \beta_3$  integrins and is required for G<sub>o</sub>-mediated signal transduction. *J Cell Biol*. 2001. 153:491–501.

Fabre JE, Nguyen M, Latour A, Keifer JA, Audoly LP, Coffman TM, and Koller BH. Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y<sub>1</sub>-deficient mice. *Nat Med*. 1999. 5: 1199–1202.

Feranchak AP, Fitz JG, Roman RM. Volume-sensitive purinergic signaling in human hepatocytes. *J Hepatol*. 2000. 33:174–182

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

Fischer R, Schliess F, Haussinger D. Characterization of the hypo-osmolarity-induced Ca<sup>2+</sup> response in cultured rat astrocytes. *Glia*. 1997. May;20(1):51-8.

Foos TM, Wu JY. The role of taurine in the central nervous system and the modulation of intracellular calcium homeostasis.; *Neurochem Res.* 2002 Feb;27(1-2):21-6. Review.

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

Franco R, Quesada O, Pasantes-Morales H.; Efflux of osmolyte amino acids during isovolumic regulation in hippocampal slices. *J Neurosci Res.* 2000. Sep 15;61(6):701-11.

Franco R, Rodriguez R, Pasantes-Morales H. Mechanisms of the ATP potentiation of hyposmotic taurine release in Swiss 3T3 fibroblasts. *Pflugers Arch.* 2004a Nov;449(2):159-69. Epub 2004 Aug 19.

Franco R, Lezama R, Ordaz B, Pasantes-Morales H. Epidermal growth factor receptor is activated by hyposmolarity and is an early signal modulating osmolyte efflux pathways in Swiss 3T3 fibroblasts. *Pflugers Arch.* 2004b 447:830–839.

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

Gatof D, Kilic G, Fitz JGVesicular exocytosis contributes to volume-sensitive ATP release in biliary cells. *Am J Physiol.* 2004. 286:G538–G546

Ginnan R, Singer HA. CaM kinase II-dependent activation of tyrosine kinases and ERK1/2 in vascular smooth muscle. *Am J Physiol.* 2002. 282:C754–C761.

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

Hazama A, Shimizu T, Ando-Akatsuka Y, Hayashi S, Tanaka S, Maeno E, Okada Y Swelling-induced, CFTR-independent ATP release from a human epithelial cell line: lack of correlation with volume-sensitive Cl<sup>-</sup> channels. *J Gen Physiol.*1999. 114:525–533.

Hazama A, Fan HT, Abdullaev I, Maeno E, Tanaka S, Ando-Akatsuka Y, Okada Y Swelling-activated, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-augmented ATP release and Cl<sup>-</sup> conductances in murine C127 cells. *J Physiol (Lond).* 2000. 523:1–11

Hisadome K, Koyama T, Kimura C, Droogmans G, Ito Y, Oike M Volume-regulated anion channels serve as an auto/paracrine nucleotide release pathway in aortic endothelial cells. *J Gen Physiol.* 2002. 119:511–520

Hoffmann EK, Pedersen SF. Sensors and signal transduction in the activation of cell volume regulatory ion transport systems. *Contrib Nephrol.* 1998. 123:50–78.

Hollopeter G., H.M. Jantzen, D. Vincent, G. Li, L. England, V. Ramakrishnan, R.B. Yang, P. Nurden, A. Nurden, D. Julius, P.B. Conley, Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs, *Nature* 409 (2001) 202–207

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

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

Huwiller A, Rolz W, Dorsch S, Ren S, Pfeilschifter J Extracellular ATP and UTP activate protein kinase B/Akt cascade via the P2Y<sub>2</sub> purinoceptor in renal mesangial cells. *Br J Pharmacol.* 2002. 136:520–529.

Jacques-Silva MC, Rodnight R, Lenz G, Liao Z, KongQ, Tran M, Kang Y, Gonzalez FA, Weisman GA, Neary JT P2X<sub>7</sub> receptors stimulate AKT phosphorylation in astrocytes. *Br J Pharmacol.* 2004. 141:1106–1117.

Jakab M, Furst J, Gschwentner M, Botta G, Garavaglia ML, Bazzini C, Rodighiero S, Meyer G, Eichmueller S, Woll E, Chwatal S, Ritter M, Paulmichl M Mechanisms sensing and modulating signals arising from cell swelling. *Cell Physiol Biochem.* 2002. 12:235–258

Janmey PA. The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. *Physiol Rev.* 1998 Jul;78(3):763-81.

Junankar PR, Karjalainen A, Kirk K The role of P2Y<sub>1</sub> purinergic receptors and cytosolic Ca<sup>2+</sup> in hypotonically activated osmolyte efflux from a rat hepatoma cell line. *J Biol Chem.* 2002. 277:40324–40334

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

Kato F., E. Shigetomi, Distinct modulation of evoked and spontaneous EPSCs by purinoceptors in the nucleus tractus solitarii of the rat, *J. Physiol.* 530 (2001) 469–486

Khakh B.S., G. Henderson, Modulation of fast synaptic transmission by presynaptic ligand-gated cation channels, *J. Auton. Nerv. Syst.* 81. 2000. 110–121

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

Kim HD, Bowen JW, James-Kracke MR, Landon LA, Camden JM, Burnett JE, Turner JT Potentiation of regulatory volume decrease by P2U purinoceptors in HSG-PA cells. *Am J Physiol.* 1996. 270:C86–C97



Krause U, Rider MH, Hue L. Protein kinase signaling pathway triggered by cell swelling and involved in the activation of glycogen synthase and acetyl-CoA carboxylase in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem.* 1996. Jul 12;271(28):16668-73.

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

Lambert IH. Regulation of the cellular content of the organic osmolyte taurine in mammalian cells. *Neurochem Res.* 2004. 29:27-63.

Lambrecht G., Agonists and antagonists acting at P2X receptors: selectivity profiles and functional implications, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 362. 2000. 340-350.

Lang F, Busch GL, Ritter M, Völkl H, Waldegger S, Gulbins E, Haussinger D. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev.* 1998. Jan;78(1):247-306.

Lazarowski ER, Boucher RC, Harden TK Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X and P2Y-receptor activating molecules. *Mol Pharmacol.* 2003. 64:785-795

Leon C, Hechler B, Freund M, Eckly A, Vial C, Ohlmann P, Dierich A, LeMeur M, Cazenave JP, and Gachet C. Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y(1) receptor-null mice. *J Clin Invest.* 1999.104: 1731- 1737.

Liedtke CM, Cole TS. Activation of NKCC1 by hyperosmotic stress in human tracheal epithelial cells involves PKC-delta and ERK. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Feb 13;1589(1):77-88.

Light DB, Capes TL, Gronau RT, Adler MR Extracellular ATP stimulates volume decrease in *Necturus* red blood cells. *Am J Physiol.* 1999. 277:C480-C491

Light DB, Dahlstrom PK, Gronau RT, Baumann NL Extracellular ATP activates a P2 receptor in *Necturus* erythrocytes during hypotonic swelling. *J Membr Biol.* 2001. 182:193-202

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

Lohr J, Grantham J.; Isovolumetric regulation of isolated S2 proximal tubules in anisotonic media;. *J Clin Invest.* 1986 Nov;78(5):1165-72

Loveday D, Heacock AM, Fisher SK. Activation of muscarinic cholinergic receptors enhances the volume-sensitive efflux of *myo*-inositol from SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Neurochem.* 2003. 87:476-486.

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

Massieu L, Montiel T, Robles G, Quesada O. Brain amino acids during hyponatremia in vivo: clinical observations and experimental studies. *Neurochem Res.* 2004 Jan; 29(1):73-81

Mitchell CH, Carre DA, McGlenn AM, Stone RA, Civan MM A release mechanism for stored ATP in ocular ciliary epithelial cells. *Proc Nat Acad Sci USA.*1998. 95:7174–7178

Molliver DC, Cook SP, Carlsten JA, Wright DE, McCleskey EW. ATP and UTP excite sensory neurons and induce CREB phosphorylation through the metabotropic receptor, P2Y<sub>2</sub>. *Eur J Neurosci.* 2002. Nov; 16(10): 1850-60

Mongin AA, Kimelberg HK ATP potently modulates anion channel-mediated excitatory amino acid release from cultured astrocytes. *Am J Physiol.* 2002. 283:C569–C578

Morales-Mulia S, Cardin V, Torres-Marquez ME, Crevenna A, Pasantes-Morales H. Influence of protein kinases on the osmosensitive release of taurine from cerebellar granule neurons. *Neurochem Int.* 2001. Feb;38(2):153-61.

Morales-Mulia S, Vaca L, Hernandez-Cruz A, Pasantes-Morales H. Osmotic swelling-induced changes in cytosolic calcium do not affect regulatory volume decrease in rat cultured suspended cerebellar astrocytes. *J Neurochem.* 1998 Dec;71(6):2330-8.

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

Morán J, Sabanero M, Meza I, Pasantes-Morales H. Changes of actin cytoskeleton during swelling and regulatory volume decrease in cultured astrocytes. *Am J Physiol.* 1996. Dec;271(6 Pt 1):C1901-7.

Morán J, Molares-Mulia M, Pasantes-Morales H. Reduction of phospholemman expresión decreases osmosensitive taurine efflux in astrocytes. *Biochim Biophys Acta.* 2001. 1538: 313-320

Motais R, Guizouarn H, Garcia-Romeu F. Red cell volume regulation: the pivotal role of ionic strength in controlling swelling-dependent transport systems. *Biochim Biophys Acta.* 1991. Oct 10;1075(2):169-80.

Musante L, Zegarra-Moran O, Montaldo PG, Ponzoni M, Galletta LJ Autocrine regulation of volume-sensitive anion channels in airway epithelial cells by adenosine. *J Biol Chem.*1999. 274:11701–11707

Nilius B, Voets T, Prenen J, Barth H, Aktories K, Kaibuchi K, Droogmans G, Eggermont J. Role of Rho and Rho kinase in the activation of volume-regulated anion channels in bovine endothelial cells. *J Physiol*. 1999. Apr 1;516 ( Pt 1):67-74.

Nilius B, Eggermont J y Droogmans G. The endothelial volume-regulated anion channel, VRAC. *Cell Physiol Biochem*. 2000. 10:313-320

Norenberg W., P. Illes, Neuronal P2X receptors: localization and functional properties, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2000. 362. 324–339

North R.A., E. Barnard, Nucleotide receptors, *Curr. Opin. Neurobiol*. 1997.7 . 346–357.

Nylander-Koski O, Mustonen H, Kiviluoto T, Kivilaakso E. Cell volume regulation during hyperosmotic shrinkage is mediated by Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporter in *Necturus gastricus* surface epithelial cells. *Dig Dis Sci*. 2005 Nov;50(11):2043-9.

O' Neill LA. Interleukin I receptors and signal transduction. *Biochem Soc Trans*. 1996. Feb; 24(1): 207-211.

Okada Y. Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl<sup>-</sup> channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor. *Am J Physiol*. 1997. Sep;273(3 Pt 1):C755-89. Review.

Pasantés-Morales H . Volume regulation in brain cells: cellular and molecular mechanisms. *Metab Brain Dis*. 1996. Sep;11(3):187-204. Review.

Pasantés-Morales H, Cardin V, Morales-Mulia S, Quesada O. Regulatory volume decrease in cultured brain cells: rate limiting factors. En: *Cell volume regulation: the molecular mechanism and volume sensing machinery*. Editor: Okada Y. Elsevier Science B.V. 1998:43-48

Pasantés-Morales H, Cardin V, Tuz K. Signaling events during swelling and regulatory volume decrease. *Neurochem Res*. 2000. Oct;25(9-10):1301-14.

Pasantés-Morales H, Morales Mulia S. Influence of calcium on regulatory volume decrease: role of potassium channels. *Nephron*. 2000 Dec;86(4):414-27.

Pasantés-Morales H, Pena Segura C, Garcia O, Morales Mulia M, Sanchez Olea R, Moran J. Characterization of the volume-activated taurine pathway in cultured cerebellar granule neurons. *Adv Exp Med Biol*. 1996. 403:393-400.

Pasantés-Morales H, Franco R Influence of protein tyrosine kinases on cell volume change-induced taurine release. *Cerebellum*. 2002. 1:103–109.

Pedersen SF, Hoffmann EK, Mills JW. The cytoskeleton and cell volume regulation. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2001. Oct;130(3):385-99

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

Perez-Samartin AL, Miledi R, Arellano RO. Activation of volume-regulated Cl<sup>-</sup> channels by ACh and ATP in *Xenopus* follicles. *J Physiol.* 2000. (Lond) 525:721–734

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

Rhee SG. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem.* 2001. 70:281–312

Phillis JW, O'Regan MH Evidence for swelling-induced adenosine and adenine nucleotide release in rat cerebral cortex exposed to monocarboxylate-containing or hypotonic artificial cerebrospinal fluids. *Neurochem Int.* 2002. 40:629–635

Ralevic V. and Burnstock G. Receptors for Purines and Pyrimidines. *PharmacolRev.* 1998. Sep;50(3): 413-92. Review

Robertson S.J., S.J. Ennion, R.J. Evans, F.A. Edwards, Synaptic P2X receptors, *Curr. Opin. Neurobiol.* 2001.11. 378–386

Roman RM, Feranchak AP, Salter KD, Wang Y, Fitz JG Endogenous ATP release regulates Cl<sup>-</sup> secretion in cultured human and rat biliary epithelial cells. *Am J Physiol.* 1999. 276:G1391–G1400

Roman RM, Wang Y, Lidofsky SD, Feranchak AP, Lomri N, Scharschmidt BF, Fitz JG Hepatocellular ATP-binding cassette protein expression enhances ATP release and autocrine regulation of cell volume. *J Biol Chem.* 1997. 72:21970–21976

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

Rubio M.E., F. Soto, Distinct localization of P2X receptors at excitatory postsynaptic specialization, *J. Neurosci.* 2001.21. 641–653

Sabirov RZ, Dutta AK, Okada Y Volume-dependent ATP-conductive large-conductance anion channel as a pathway for swelling-induced ATP release. *J Gen Physiol.* 2001. 118:251–266

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

Sauzeau V, Le Jeune H, Cario-Toumaniantz C, Vaillant N, Gadeau AP, Desgranges C, Scalbert E, Chardin P, Pacaud P, and Loirand G. P2Y1, P2Y2, P2Y4, and P2Y6 receptors are coupled to Rho and Rho kinase activation in vascular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000. 278: H1751–H1761.

Schlenker T, Joelle M, Romac J, Sharara AI, Roman RM, Kim SJ, LaRusso N, Liddle RA, and Fitz JG. Regulation of biliary secretion through apical purinergic receptors in cultured rat cholangiocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 1997. 273: G1108–G1117.

Soltoff SP. Related adhesion focal tyrosine kinase and the epidermal growth factor receptor mediate the stimulation of mitogen-activated protein kinase by the G-protein-coupled P2Y2 receptor. Phorbol ester or  $[Ca^{2+}]_i$  elevation can substitute for receptor activation. *J Biol Chem*. 1998. 273:23110–23117.

Song D, O'Regan MH, Phillis JW. Protein kinase inhibitors attenuate cardiac swelling-induced amino acid release in the rat. *J Pharm Pharmacol*. 1998 Nov;50(11):1280-6.

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

Stutts MJ, Fitz JG, Paradiso AM, and Boucher RC. Multiple modes of regulation of airway epithelial chloride secretion by extracellular ATP. *Am J Physiol Cell Physiol*. 1994. 267: C1442–C1451.

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

Summers JC, Trais L, Lajvardi R, Hergan D, Buechler R, Chang H, Pena-Rasgado C, Rasgado-Flores H. Role of concentration and size of intracellular macromolecules in cell volume regulation. *Am J Physiol*. 1997. Aug;273(2 Pt 1):C360-70.

Tao W, Deschenes RJ, Fassler JS. ; Intracellular glycerol levels modulate the activity of Sln1p, a *Saccharomyces cerevisiae* two-component regulator.; *J Biol Chem*. 1999. Jan 1;274(1):360-7.

Taylor AL, Kudlow BA, Marrs KL, Gruenert DC, Guggino WB, Schwiebert EM. Bioluminescence detection of ATP release mechanisms in epithelia. *Am J Physiol*. 1998. 275:C1391–C1406.

Thoroed SM, Lauritzen L, Lambert IH, Hansen HS, Hoffmann EK. Cell swelling activates phospholipase A2 in Ehrlich ascites tumor cells. *J Membr Biol*. 1997. Nov 1;160(1):47-58.

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

Tilly BC, Edixhoven MJ, Tertoolen LG, Morii N, Saitoh Y, Narumiya S, de Jonge HR. Activation of the osmo-sensitive chloride conductance involves P21rho and is accompanied by a transient reorganization of the F-actin cytoskeleton. Mol Biol Cell. 1996. Sep;7(9):1419-27

Tokuyama Y, Hara M, Jones EMC, Fan Z, and Bell GI. Cloning of rat and mouse P2Y purinoceptors. Biochem Biophys Res Commun. 1995. 211: 211-218.

Troade J.D., S. Thirion, G. Nicaise, J.R. Lemos, G. Dayanithi, ATP-evoked increases in [Ca<sup>2+</sup>] and peptide release from rat isolated neurohypophysial terminals via a P2X purinoceptor, J. Physiol. 1998. 511. 89–103

Tuz K, Ordaz B, Vaca L, Quesada O, Pasantes-Morales H. Isovolumetric regulation mechanisms in cultured cerebellar granule neurons. J Neurochem. 2001. Oct;79(1):143-51.

Tuz K, Pena-Segura C, Franco R, Pasantes-Morales H. Depolarization, exocytosis and amino acid release evoked by hyposmolarity from cortical synaptosomes. Eur J Neurosci. 2004 Feb;19(4):916-24.

Van der Wijk T, Tomassen SF, Houtsmuller AB, de Jonge HR, Tilly BC Increased vesicle recycling in response to osmotic cell swelling Cause and consequence of hypotonicityprovoked ATP release. J Biol Chem. 2003. 278:40020–40025

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

Voets T, Droogmans G, Raskin G, Eggermont J, Nilius B. Reduced intracellular ionic strength as the initial trigger for activation of endothelial volume-regulated anion channels. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999. Apr 27;96(9):5298-303.

von Kugelgen I., A. Wetter, Molecular pharmacology of P2Y- receptors, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 2000. 362. 310–323

Wang Y, Roman R, Lidofsky SD, Fitz JG Autocrine signaling through ATP release represents a novel mechanism for cell volume regulation. Proc Natl Acad Sci USA. 1996. 93:12020–12025

Wittels KA, Hubert EM, Musch MW, Goldstein L. Osmolyte channel regulation by ionic strength in skate RBC. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2000. Jul;279(1):R69-76.

Wong A.Y., G. Burnstock, A.J. Gibb, Single channel properties of P2X receptors in outside-out patches from rat hippocampal granule cells, *J. Physiol.* 2000. 527. 529–547

Wurgler-Murphy SM, Saito H. Two-component signal transducers and MAPK cascades. *Trends Biochem Sci.* 1997. May;22(5):172-6.