



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química



**Contribución de los aminoácidos libres a la regulación de volumen en
células de tejido nervioso en cultivo.**

T E S I S

que para obtener el Título de

Q U I M I C O

presenta:

Silvestre de Jesus Alavez Espidio

**TESIS CON
FALLA DE CUBRER**

México, D.F.

1993



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 está 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.

INDICE

INDICE.....	1
RESUMEN.....	3
INTRODUCCION.....	4
Antecedentes.....	4
El fenómeno de regulación de volumen.....	6
Regulación de volumen celular en células animales.....	6
Mecanismos iónicos de regulación del volumen.....	8
Osmolitos orgánicos en la regulación del vol. celular.....	9
aa libres y taurina en la regulación del vol. celular.....	10
Regulación del vol. cel. en el tejido nervioso.....	12
Importancia potencial de osmolitos orgs. vs inorgánicos.....	15
OBJETIVOS.....	16
MATERIALES Y METODOS.....	17
Materiales.....	17
Cultivos celulares.....	18
Liberación de osmolitos.....	19
Expresión de resultados.....	22
Estadística.....	23

RESULTADOS.....	24
Liberación de aminoácidos libres.....	24
Astrocitos.....	24
Células corticales.....	37
Células granulares.....	40
DISCUSION.....	45
BIBLIOGRAFIA.....	51

RESUMEN

La regulación del volumen es una propiedad fundamental de las células animales. Algunas especies acuáticas, por estar expuestas continuamente a cambios en la osmolaridad de su entorno, requieren particularmente de esta característica. En cambio, en la mayoría de los animales terrestres las variaciones considerables en el contenido de solutos extracelulares se previenen con una eficiente regulación renal. Sin embargo, en condiciones fisiológicas pueden presentarse pequeños cambios en el volumen celular debidos a la acumulación de solutos intracelulares que son atraídos por las macromoléculas cargadas negativamente del citoplasma o bien a la incorporación de nutrientes y sales minerales; unido a esto, se presentan cambios importantes en el volumen celular durante el crecimiento y la proliferación de las células. En condiciones patológicas, los cambios en la osmolaridad del plasma son la principal complicación en varias enfermedades tanto somáticas como neurológicas; estas alteraciones en la osmolaridad del plasma conducen frecuentemente a manifestaciones clínicas de funciones cerebrales alteradas. El mecanismo adaptativo regulador de las alteraciones en el volumen celular involucra cambios en la concentración de solutos intracelulares osmoticamente activos en la dirección adecuada para llevar a la célula al equilibrio osmótico. Estos compuestos, llamados genericamente osmolitos, se agrupan en dos categorías: iones inorgánicos; Na^+ , K^+ , Cl^- y moléculas orgánicas; tales como aminoácidos, aminas y polioles.

Los resultados obtenidos de experimentos tanto in vivo como in vitro, sugieren que las células del cerebro tienen también la capacidad de regular su volumen y el mecanismo molecular por medio del cual se lleva a cabo esta regulación se ha estudiado solo muy recientemente.

En el presente trabajo se investigará la contribución relativa de los aminoácidos libres y del K^+ al proceso de regulación del volumen celular tanto en glía como en neuronas. Se espera encontrar que en las neuronas los osmolitos movilizados preferentemente, durante un estímulo hiposmótico, sean los orgánicos (aminoácidos libres) ya que los iones inorgánicos juegan un papel determinante sobre el control de la potencial de membrana celular y es de esperarse que su concentración tanto intracelular como extracelular sea exquisitamente regulada.

INTRODUCCION

Antecedentes

Los flujos de agua ocurren siempre que exista un gradiente osmótico entre dos compartimientos separados por una membrana semipermeable y el agua se moviliza del compartimiento de menor al de mayor presión osmótica. La ósmosis es el proceso por el cual el solvente se mueve espontáneamente desde la región de una solución donde la actividad es alta a otra donde la actividad es baja. En la práctica, la ósmosis sólo tiene lugar donde una membrana semipermeable separa la solución, ya bien del solvente puro o bien de una solución del mismo solvente pero con una concentración distinta del soluto (Morris, 1980).

La presión osmótica de una solución se define como "la presión que se debe ejercer sobre la solución para contrarrestar cualquier movimiento neto de solvente entre la solución y el solvente puro, cuando estos están separados por una membrana semipermeable perfecta" (Morris, 1980). La molaridad y la osmolaridad de una solución se encuentran relacionadas de la siguiente manera: una solución 1 M de un soluto no disociable es 1 osmolar (La solución contiene $6.023E23$ partículas por litro), mientras que una solución 1 M de una sal disociable es n osmolar, donde n es el número de iones producidos por moléculas (Segel, 1984). Las soluciones isosmóticas son aquellas que poseen una misma presión osmótica mientras que las que presentan

una presión osmótica diferente son anisomóticas:hiposmóticas si la presión osmótica es menor o hiperosmóticas cuando la presión osmótica es mayor.

El movimiento de agua por el proceso de osmosis también se presenta en las células animales y vegetales, debido a que la membrana celular o plasmática separa dos compartimientos acuosos, el intracelular y el extracelular. Siempre que se presente un gradiente osmótico entre el citoplasma y el medio extracelular se observará un movimiento de agua asociado a cambios en el volumen celular (Dick, 1970; House, 1974). Esto ocurre a pesar de que la membrana plasmática es un medio altamente hidrofóbico debido a su constitución lipídica.

El agua es capaz de cruzar las membranas biológicas a través de la bicapa lipídica y posiblemente también a través de canales iónicos y poros membranales inespecíficos. Estos canales no se han aislado y su existencia se ha propuesto con base en estudios cinéticos de los flujos de agua. Existen dos tipos de medidas para expresar la permeabilidad de la membrana al agua: 1) El coeficiente de permeabilidad osmótico o de filtración (P_o), que se obtiene del estudio de los movimientos de agua inducidos por un gradiente osmótico; y 2) El coeficiente de permeabilidad difusional (P_d), que se determina a partir de la velocidad de intercambio de agua tritiada en el estado de equilibrio (Macey y Brham, 1989). La relación P_o/P_d es un indicador importante de la vía de transporte del agua. Un cociente P_o/P_d igual a 1, sugiere que las moléculas de agua cruzan la membrana por un proceso de difusión simple, a través de la bicapa lipídica. En bicapas lipídicas artificiales (Fettiplace y Haydon, 1980) y en plaquetas humanas (Wong y Verkman, 1987) este cociente es de 1, indicando la ausencia de un mecanismo específico de transporte de agua. En cambio cuando la relación P_o/P_d es mayor que la unidad, el agua es movilizadora además del proceso difusional por un poro. Este cociente es de 3.4 en eritrocitos (Solomon et al., 1984) y 14 en la vejiga urinaria cuando se estimula con vasopresina (Levin et al., 1984).

El fenómeno de regulación de volumen

La capacidad para regular el volumen celular es una respuesta adaptativa que ha conducido a la supervivencia de una gran variedad de especies que enfrentan fluctuaciones en la osmolaridad de su entorno. Esto es posible gracias a mecanismos que ajustan la cantidad de solutos osmóticamente activos en la célula , provocando movimientos netos de agua que limitan las alteraciones en el volumen celular.

La regulación de volumen es también un requerimiento fundamental de las células animales ya que en condiciones isoosmóticas estas contienen normalmente, una gran cantidad de moléculas polianiónicas impermeables rodeadas por una membrana plasmática permeable a iones pequeños y principalmente a agua. En estas condiciones, el agua debe entrar constantemente a las células obedeciendo tanto a la presión oncótica de las moléculas como a la distribución pasiva de los iones permeables de acuerdo al equilibrio de Donnan (Leaf, 1959; Tosteson et al , 1960). En las células vegetales la pared celular proporciona la rigidez necesaria para contrarrestar el hinchamiento celular hidrostático. En cambio, las células animales que requieren mantener la flexibilidad para algunas funciones, incluyendo el movimiento, debieron desarrollar mecanismos para el control del volumen celular.

Regulación de volumen celular en células animales

Los mecanismos que permiten regular el volumen celular han sido estudiados tanto in vivo, en células expuestas de forma

natural a cambios externos de osmolaridad , como en condiciones in vitro, modificando experimentalmente la osmolaridad del medio extracelular . Se han descrito dos mecanismos que corrigen cambios en el volumen celular siguiendo el cambio ya sea en el sentido de un incremento en el volumen celular como respuesta a una reducción en la osmolaridad extracelular ó un decremento del volumen, posterior a un aumento en la osmolaridad. En el primer caso, la célula aumenta primero su volumen como un osmómetro perfecto y luego, por un proceso activo conocido como Decremento Autoregulador de Volumen, al que referiremos en adelante como DAV, disminuye su volumen a pesar de la persistencia de las condiciones hiposmóticas. En el segundo caso, cuando el volumen celular disminuye, el proceso regulador es menos frecuente y en muchas células no se observa. Este proceso es conocido como Incremento Autoregulador del Volumen (IAV)

Estudios en invertebrados eurihalinos muestran que algunos compuestos orgánicos pequeños, predominantemente aminoácidos libres (AA), participan junto con los iones intracelulares K^+ y Cl^- , en los procesos reguladores de volumen (Pierce and Greenberg 1972; Amende and Pierce, 1980). En los vertebrados, el mecanismo iónico para la regulación del volumen ha sido extensamente estudiado, mientras que la información disponible sobre el papel de los aminoácidos es aún escasa, particularmente en especies no marinas.

La regulación del volumen celular es un proceso complejo que implica varios eventos básicos. Primeramente la célula debe ser capaz de detectar cambios en el volumen. Los sensores del volumen celular no se han identificado, pero podrían ser los canales iónicos (generalmente para cationes) activados por el estiramiento de la membrana plásmática (Christensen, 1987; Ubl et al., 1988; Morris y Sigurdson, 1989 y Taniguchi y Guggino, 1989) o bien canales iónicos (selectivos para cationes), inactivados por el estiramiento (Ubl et al., 1988). También se ha sugerido que el volumen celular podría ser detectado indirectamente por medio de cambios en la concentración de algún componente intracelular, como el calcio (Wong y Chase, 1986) o en el pH

interno (Lauf, 1985). En segundo lugar, la célula debe iniciar un proceso regulador que modifique el contenido intracelular de solutos. Finalmente debe "recordar" su volumen inicial e inactivar los mecanismos iniciados durante el proceso regulador.

Mecanismos iónicos de regulación del volumen

Los principales solutos intracelulares K^+ y Cl^- están involucrados activamente en el DAV, ya que la mayoría de las células que pueden regular su volumen, responden a un hinchamiento osmótico con una pérdida neta de K^+ y Cl^- produciéndose así una salida obligada de agua dirigida por el nuevo gradiente osmótico (Lauf, 1985; Eveloff y Warnek, 1987). El mecanismo responsable de esta pérdida de iones no es el mismo en los distintos tipos celulares. Tanto en células epiteliales como en eritrocitos de aves, peces y mamíferos el flujo iónico sensible a volumen es mediado por un cotransportador $K^+ Cl^-$ eléctricamente neutro, por lo que en estos sistemas el DAV es inhibido por drogas que bloquean este sistema de transporte, como la furosemida y la bumetanida (Ussing, 1982; Kregenow, 1981; Lauf, 1985; Parker, 1983). En otras células, incluyendo acitos de Erlich y linfocitos, el K^+ y el Cl^- salen de la célula por medio de vías conductivas, las cuales están separadas pero pueden ser interdependientes (Hoffman, 1985; Grinstein et al, 1984). El DAV que se induce en parte por la activación del cotransportador $K^+ Cl^-$ es por lo general muy lento, con una duración de minutos a horas; mientras que si el proceso se efectúa a través de vías conductivas, esto es, a través de canales iónicos la respuesta es muy rápida y la regulación tiene lugar en 5 a 10 minutos (Lauf, 1985). En el DAV, las vías conductivas permanecen latentes en condiciones isoosmóticas y son activadas cuando existen cambios en el volumen celular. Hasta el momento no está claro si el incremento en el volumen celular, es una señal suficiente para activar estos movimientos iónicos ó si estos ocurren en respuesta a una ó algunas señales intracelulares

producidas a su vez por un cambio en el volumen.

El IAV, parece estar mediado por la activación de dos sistemas cotransportadores eléctricamente neutros, ya sea $\text{Na}^+\text{K}^+\text{2Cl}^-$ ó Na^+Cl^- . Estos dos sistemas reemplazan el Na^+ intracelular por K^+ a través de la actividad de una ATPasa Na^+K^+ . Este mecanismo ha sido descrito en diferentes sistemas.

En células epiteliales de vejiga urinaria, los dos mecanismos reguladores de volumen se encuentran polarizados, encontrándose los flujos activados por el IAV en la membrana apical mientras que el mecanismo activado por DAV se encuentra en la membrana basolateral (Spring, 1985).

Osmolitos orgánicos en la regulación de volumen celular

Algunos tipos de células renales se protegen de los cambios en osmolaridad, (particularmente en condiciones hiperosmóticas) producidos por las altas concentraciones de NaCl y urea acumulando grandes cantidades de osmolitos orgánicos. Este sistema aparentemente sólo es activo en células del sistema renal, sin embargo debe representar la evolución de un mecanismo primitivo por medio del cual las células en virtualmente todos los organismos, incluyendo bacterias, levaduras, plantas y animales inferiores contrarrestan las tensiones osmóticas. Llama la atención que sin importar la variedad de organismos estudiados, siempre se acumula el mismo tipo de solutos orgánicos, los que pueden agruparse como; aminoácidos y sus derivados, polioles y metilaminas, entre los componentes más destacados de los dos últimos grupos se encuentran; el sorbitol, el inositol, la glicerosforil-colina y la betaína. Algunos estudios *in vitro* han mostrado, en general, que contrario a lo que sucede con los iones inorgánicos, altas concentraciones de estos compuestos no tienen efectos adversos

sobre la estructura o función de proteínas ensayando parámetros tales como, V_{max} , K_m , reactividad de los grupos tioles y velocidad de renaturalización.

Aminoácidos libres y taurina en la regulación de volumen celular

La participación de los AA en la osmoregulación se conoce desde las primeras observaciones de Lange en 1963, sobre la modificación de los niveles intracelulares de estos aminoácidos en moluscos como respuesta a cambios en la osmolaridad externa. Desde entonces, se han reportado evidencias que muestran, en un gran número de invertebrados eurihalinos, la participación de los aminoácidos libres intracelulares como solutos osmóticamente activos en la regulación de volumen durante un desajuste osmótico, en un amplio intervalo de salinidad (Schoffeniels, 1976; Hoffman, 1977; Gilles, 1979). En la mayoría de las especies examinadas, la taurina es el AA intracelular más abundante y también el principal osmoefector.

En tejidos de mamíferos, las primeras observaciones que relacionan a la taurina y a los AA con la regulación de volumen celular fueron hechas en ascitos tumorales de Ehrlich (Hoffman y Hendil, 1976). Se han realizado estudios similares en rebanadas de riñón, en retina (Shultze y Neuhoff, 1983; Dominguez et al, 1989), en linfocitos de conejo (Pasantes-Morales et al, 1991), en cultivos de células MDCK (Roy y Sauvé, 1997) y en astrocitos (Pasantes-Morales y Schousboe, 1988). In vivo se ha mostrado un incremento en los niveles de taurina en el corazón de rata durante la adaptación de volumen subsecuente a una hipernatremia crónica (Thurston et al, 1980-1981). También se han observado incrementos en los niveles de taurina en el cerebro y el músculo de ratas Brattelboro, que sufren de una deshidratación crónica debido a una inhabilitación en la síntesis de vasopresina (Nieminen et al, 1988). En estudios in vivo, se ha mostrado que perfundiendo el músculo femoral de bicep de

rata con soluciones hiperosmóticas, la línea basal de taurina y de fosfoetanolamina decrece (Lehman 1990); también se observa un incremento en la incorporación de taurina como respuesta a una perfusión con soluciones hiperosmóticas en corazones fetales de rata (Atlas et al, 1984). Estas observaciones apuntan hacia una participación de la taurina en el IAV del músculo de mamífero, mientras que la evidencia para un papel similar en el DAV no es clara, puesto que no se observa ningún cambio en el flujo de taurina producido por condiciones hiposmóticas en músculo femoral de bicep de rata (Lehman, 1990).

La ganancia neta de aminoácidos producida por condiciones hiperosmóticas podría ser atribuida a un transporte activo en contra del gradiente de concentración desde la sangre, a un decremento en el flujo espontáneo del aminoácido, a la activación del catabolismo de proteínas ó bien a una síntesis de novo. En el caso particular de la taurina, la modificación de los sistemas de transporte parece ser la alternativa más probable.

Durante el DAV en condiciones hiposmóticas, la poza de aminoácidos libres disminuye como respuesta a una elevada osmolaridad externa. Para la mayoría de los aminoácidos esta reducción intracelular en condiciones hiposmóticas va acompañada de un incremento en su flujo transmembranal (Hoffmann y Lambert, 1983; Fugelli y Thoroed, 1986). La concentración de taurina y AA encontrada en el medio extracelular después de un estímulo hiposmótico, es prácticamente equivalente a la que desaparece de la poza intracelular, indicando la ausencia de reacciones catabólicas involucradas en el proceso (Hoffmann y Lambert, 1983). En general, la liberación de un AA cualquiera producida por cambios en el volumen celular, es proporcional a la concentración intracelular del mismo. Esto sucede de tal forma que cuando la taurina es el principal AA intracelular, lo cual sucede con frecuencia, es también el principal aminoácido en el flujo.

Las características de liberación de aminoácidos libres y de taurina producida por alteraciones en el volumen se han estudiado en algunas preparaciones. En invertebrados, se ha sugerido que la permeabilidad de la membrana celular a estos

aminoácidos esta regulada por el calcio en la superficie de la membrana y depende de la síntesis de ATP (Amende y Pierce, 1980). En eritrocitos, un componente de la incorporación de taurina independiente de sodio se incrementa dramáticamente bajo condiciones hipoosmóticas mientras que se observa una reducción de actividad en el componente dependiente de sodio (Fincham et al, 1986 y Wolowyk et al, 1990). No se observó ningún efecto del sodio intracelular en estas preparaciones, pero se sugiere alguna participación del sistema del AMP-cíclico.

Regulación de volumen celular en tejido nervioso

La regulación de la osmolaridad intracelular en el tejido nervioso se demostró primeramente trabajando con axones de invertebrados osmoconformeros eurihalinos. Los cambios en la poza de aminoácidos y del K^+ intracelular se observaron en axones aislados sometidos a tensiones osmóticas (Schoffeniels y Gilles, 1970; Treherne, 1980). Desde entonces, se han encontrado mecanismos similares a este en otras células animales que funcionan en el tejido nervioso de invertebrados.

Las células del cerebro en los vertebrados se comportan como osmómetros modificados ó imperfectos ya que su volumen intracelular puede ser regulado parcialmente como respuesta a cambios en la osmolaridad del fluido externo. Estas perturbaciones pueden presentarse tanto en condiciones patológicas como en condiciones fisiológicas (revisado en Ballani y Grafe, 1988). Durante la actividad sináptica normal del cerebro, los neurotransmisores son liberados y al interactuar con el receptor provocan flujos transmembranales de iones que alteran la composición iónica del espacio extracelular. Esto podría tener un efecto directo sobre el volumen celular tanto de neuronas como de glía. En condiciones fisiológicas pueden presentarse pequeños cambios en el volumen celular debidos a la acumulación de solutos intracelulares que son atraídos por

las macromoléculas cargadas negativamente del citoplasma o bien a la incorporación de nutrientes y sales minerales;unido a esto, se presentan cambios importantes en el volumen celular durante la proliferación y el crecimiento. En condiciones patológicas los cambios en la osmolaridad del plasma son la principal complicación en varias enfermedades tanto somáticas como neurológicas, tales como ;hiperexcitabilidad, hipoglucemia, status epilepticus, isquemia, anoxia, traumatismo craneal y encefalopatía hepática (revisado en Kimelberg y Ransom, 1986). Experimentalmente, el hinchamiento en el tejido nervioso puede ser inducido in situ perfundiendo el cerebro con soluciones que contengan altas concentraciones de K⁺, con medios de osmolaridad reducida, con aminoácidos excitadores, con adenosina ó con inhibidores metabólicos(Bourke et al, 1981;Sztriha, 1986) y tambien in vitro, exponiendo cortes de cerebro a las mismas condiciones o soluciones(Bourke et al, 1983;Schousboe, 1973;Chan y Fishman, 1985). Los estudios efectuados sobre estas preparaciones se vieron limitados por la complejidad y la heterogeneidad que dificultó localizar los sitios celulares en los que ocurrían los cambios de volumen, por el contrario, los cultivos celulares mostraron ser una preparación sumamente ventajosa para examinar la respuesta de una población de células relativamente homogénea.

Los astrocitos en particular debido a su función homeostática de regular el contenido de agua y la concentración de iones en el espacio extracelular (Hertz, 1978) son afectados preferentemente por situaciones que conducen al hinchamiento celular (Kimelberg y Ransom, 1986). El hinchamiento en neuronas tambien se ha observado particularmente en las dendritas (Van Harrevel y Khattab, 1967;Trubatch et al., 1977;Sztriha, 1986). Los cultivos de astrocitos responden a decrementos en la osmolaridad con un hinchamiento inmediato seguido por una lenta fase de recuperación del volumen que persiste aunque las condiciones hiposmóticas continuen afectando el medio (Olson y Holzman, 1982;Kimelberg y Frangakis, 1985). El mecanismo por el cual ocurre este IAV no esta totalmente explorado; se sabe que los astrocitos tienen cotransportadores eléctricos y

sistemas intercambiadores, entre los que se cuentan; un intercambiador Cl/HCO_3^- sensible a SITS, un sistema intercambiador Na^+/H^+ sensible a amilorida y un sistema de transporte K^+Cl^- sensible a furosemida y bumetanida (Hertz, 1982) y como mencionamos previamente, estos sistemas de transporte iónico juegan un papel importante en la regulación de volumen en muchas células, Sin embargo, es improbable que esto suceda por lo menos en astrocitos ya que el DAV producido por condiciones hiposmóticas, no se inhibe por SITS, furosemida, bumetanida ó amilorida (Kimmelberg y Frangakis, 1986). Por todo esto, parece factible que el flujo de potasio y cloro tenga lugar a través de canales durante la respuesta rápida de ajuste de volumen en los astrocitos, pero estos flujos conductivos no han sido estudiados en detalle. Los cultivos de astrocitos también presentan hinchamiento cuando son expuestos a altas concentraciones de potasio o ácido glutámico. El hinchamiento producido por alto potasio parece resultar de una acumulación de este ión provocada por canales difusionales que obedecen a fuerzas de Donnan ya que no es afectado por furosemida, bumetanida, SITS o bario excluyéndose así el transporte de potasio a través de cotransportadores, intercambiadores o canales de potasio (Kimmelberg y Frangakis, 1986; Kettenmann, 1987). Sin embargo es posible que el hinchamiento en los astrocitos durante elevaciones fisiológicas de potasio se deba a la activación de acarreadores de este ión (Walz, 1987).

En cuanto al IAV se han sugerido mecanismos para el IAV observando la desviación del comportamiento osmótico ideal producido cuando se eleva la osmolaridad del plasma y así se ha visto que el cerebro responde a esta tensión hiperosmótica con una ganancia de solutos osmoticamente activos y muestra, efectivamente, una regulación de volumen. Los osmolitos envueltos en esta respuesta son Na^+ , K^+ , Cl^- y probablemente algunos aminoácidos libres junto con otros compuestos orgánicos. Durante estados hiperosmóticos agudos en la rata, el contenido de K^+ y Cl^- en el cerebro incrementa proporcionalmente a la osmolaridad del plasma.

Los astrocitos en cultivo, carecen, aparentemente de el proceso de IAV, ya que estas células no se recuperan de una reducción de volumen producido por condiciones hiperosmóticas. El IAV sólo se observa en los astrocitos cuando estos son colocados en un medio isotónico después de exponerlos a un medio hiposmótico (Kimelberg y Frangakis, 1985);sin embargo, reportes recientes describen la activación de un cotransportador $K^+ Na^+ Cl^-$ producido por soluciones hiperosmóticas en células astrogliales (Tas et al., 1987;Chassande et al., 1988).

Importancia potencial de osmolitos orgánicos vs inorgánicos en el tejido nervioso

Por todo esto, parece importante poner de manifiesto si los osmolitos orgánicos (aminoácidos libres) y el K^+ tienen o no un papel importante en el DAV producido por hiposmolaridad en células de tejido nervioso y de ser así, determinar cuales de estos son los más importantes y en que porcentaje son movilizados en la regulación del volumen celular provocada por un choque hiposmótico, utilizando como modelo cultivos primarios de glía y neurona. Debido al papel determinante de los iones inorgánicos sobre el control del potencial de membrana celular cabe pensar que su concentración tanto intracelular como extracelular de ser exquisitamente regulada y por esto los osmolitos usados preferentemente deben ser del tipo orgánico.

OBJETIVOS

- **Examinar la liberación en respuesta a cambios en el volumen celular de aminoácidos libres que pueden funcionar como osmolitos y del potasio, en astrocitos y neuronas en cultivo.**
- **Registrar el umbral de reducción en osmolaridad que evoca la salida de cada osmolito.**
- **Registrar los cursos temporales en cada sistema y para cada osmolito.**
- **A partir de los resultados de estas investigaciones, relacionar los datos obtenidos con la regulación de volumen observada en condiciones hiposmóticas y tratar de determinar la contribución de cada osmolito al proceso regulador en los tipos celulares estudiados.**

MATERIALES Y METODOS

Materiales

Los AA con marca radiactiva utilizados en este estudio, presentaban las siguiente distribución y características:

Aminoácido	Posición de la marca	Actividad específica
[³ H]-Ala	CH ₃ CH(NH ₂)COOH	85 Ci/mmol
[³ H]-Gly	H ₂ NCHCOOH	1mCi/ml
[³ H]-Tau	H ₂ NCH ₂ CH ₂ SO ₂ OH	1mCi/ml
[³⁵ S]-Cys	HSCH ₂ CH(NH ₂)COOH	11.04mCi/ml
[³ H]-GABA	H ₂ NCH ₂ (CH ₂)COOH	1mCi/ml
[¹⁴ C]-Glu	L-[U ¹⁴]-Glu	0.25nCi/2ml
[³ H]-D-Asp	HOOCCH ₂ CH ₂ (NH ₂)COOH	1mCi/ml

Para determinar la participación del K⁺ en la regulación del volumen celular, se uso como marcador ⁸⁶Rb⁺, en la forma química de ⁸⁶RbCl disuelto en HCl 0.5 N. Con una actividad de 10 mCi/0.261ml. Para determinar la participación del glutamato, se utilizó tanto un analogo estructural no metabolizable, a saber, el [³H]-D-Aspartato como 10 μM de DL-sulfoximina de la metionina, para prevenir la degradación metabólica.

En los experimentos en los que se mide la participación de GABA se agregó al medio de perfusión 0.1 mM de ácido aminooxiacético para prevenir la degradación metabólica.

Cultivos celulares

Para la obtención del modelo experimental, se lograron cultivos primarios altamente enriquecidos (>90%) en; astrocitos, células granulares y células corticales de cerebelo utilizando la técnica descrita por Morán y Patel (Morán y Patel, 1989). En esta técnica la suspensión de células disociadas aisladas a partir de cerebelos de rata de 8 días post-natales, se colocan a una densidad de 250x10³ células/cm² en frascos Falcon de 60mm de diámetro. El medio de cultivo contiene medio basal de Eagle complementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, glutamina 10 mM y 50 U/ml de estreptomicina. Las cajas de cultivo se incuban a 37°C en presencia de CO₂ al 5 % saturado con vapor de agua. Para la obtención de ambos cultivos neuronales, las cajas de cultivo se tratan previamente con poli-L-Lisina (5 μg/ml) y se agrega citosina arabinosa al medio de cultivo para prevenir la proliferación de células no neuronales. La composición celular de los cultivos se prueba utilizando

anticuerpos específicos para cada tipo celular incluyendo fibroblastos y oligodendrocitos.

Liberación de osmolitos

Para estudiar el curso temporal de la salida estimulada por hiposmolaridad tanto de los AA como del $^{86}\text{Rb}^+$, los cultivos fueron perfundidos de acuerdo a la técnica descrita por Pasantes-Morales y Schousboe (Pasantes-Morales y Schousboe, 1988) que se detalla a continuación.

Después de dos semanas *in vitro* para el caso de los astrocitos ó después de 5 a 6 días para el caso de las neuronas, las células (cajas de 35mm) fueron incubadas ya sea con $^{86}\text{Rb}^+$ (2 $\mu\text{Ci/ml}$ durante 60 minutos), [^3H]-taurina (2 $\mu\text{Ci/ml}$ durante 30 minutos), [^3H]-alanina (2 $\mu\text{Ci/ml}$ durante 30 minutos), [^3H]-gly (2.5 $\mu\text{Ci/ml}$ durante 60 minutos) y con D- [^{14}C] aspartato y [^{14}C]-glutamato (0.25 $\mu\text{Ci/ml}$ durante 15 minutos). Seguido a esta incubación, el medio de cultivo se sustituye con medio Krebs-HEPES isosmótico el cuál contiene; 135 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de CaCl_2 , 1.17 mM de MgCl_2 , 10 mM de HEPES y 5 mM de glucosa a un pH de 7.4, al que nos referiremos en adelante como medio Krebs normal. Después de lavar dos veces los cultivos celulares con un mililitro de medio Krebs normal, las células fueron perfundidas a una velocidad de 1 ml/min durante 10-15 minutos utilizando un sistema en el que dos bombas peristálticas actúan sincronicamente, una para entregar un mililitro de medio de perfusión por minuto y la otra para retirar éste mismo volumen en la misma unidad de tiempo. Para lograr una perfusión homogénea en cada población de células, se dispone sobre estas un delgado filtro de seda que permite la adecuada distribución del líquido de perfusión, esto se continúa hasta obtener un flujo basal de radiactividad. Al tiempo indicado en cada experimento, el medio Krebs normal fué remplazado en el flujo de la perfusión por otro con una osmolaridad reducida

(50 y 70 % generalmente) el cual fué preparado reduciendo la concentración de NaCl en el medio. El experimento fué seguido colectando muestras cada minuto durante 20 minutos una vez alcanzada la liberación basal y transcurrido este tiempo, la cantidad de radiactividad contenida tanto en el medio como en las células mismas fué recuperado y medido por espectrometría de centelleo. Los resultados de estos experimentos estan expresados en porcentaje de liberación de la radiactividad total.

El contenido de glutamina y β -alanina en las células, el contenido de la poza de aminoácidos libres y la cantidad liberada por estas al ser expuestas a medios de osmolaridad reducida (50, 70 y 80 %) se determinó utilizando la técnica de HPLC (High Performance Liquid Chromatography) de acuerdo a lo descrito por Geddes y Wood (Geddes y Wood, 1984). En éste metodo la separación se basa en el intercambio iónico, la adsorción, el tamaño de exclusión o el coeficiente de partición de los compuestos a resolver, mejorandose sensiblemente la separación usando columnas de alta resolución que permiten reducir también los tiempos de retención. Estas columnas se empacan con finísimas esferas de plástico o de vidrio que presentan adsorbida en su superficie una delgada capa de la fase estacionaria. La fase móvil es un solvente particular para cada sistema, este es impulsado por la columna de separación a una presión de más de 10 000 psi, lo que permite reducir aún más los tiempos de análisis. Finalmente en el líquido eluido por la columna, deben ser detectados los compuestos que se pretenden separar, para esto se utilizan generalmente parámetros físicos como el índice de refracción, la absorción en el ultravioleta y medidas de emisión de fluorescencia ya sea de los compuestos per se o de derivados químicos preparados para éste fin. En nuestro caso particular, la resolución de aminoácidos se lleva a cabo de acuerdo a lo descrito por Geddes y Wood (Geddes y Wood, 1984) que a su vez es una modificación al método de Lenda y Svenneby (Lenda y Svenneby, 1980) en el que se utiliza una columna ultrasférica de 250 x 4.6 mm, la fase móvil es $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_3\text{COOK}$ 0.1 M pH 5.5 (25 % / 75 %) que se invierte a (75 % / 25 %) con lo que eluyen los aminoácidos ácidos seguidos de los polares neutros y finalmente los básicos y no polares (Figura 2). La columna

se mantiene a temperatura ambiente y la derivación de los aminoácidos se efectúa con aldehído o-ftálico (1 mg/ml) en amortiguador de boratos 0.4 M pH 10.4, diluyendo 1:2 en presencia de 25 μ l de β -mercaptoetanol/ml de reacción (Figura 1). Después de 3 minutos se inyectan las muestras a la columna y los productos analizados en un detector de fluorescencia a una longitud de excitación de 340 nm y a una longitud de emisión aproximada de 418 nm.

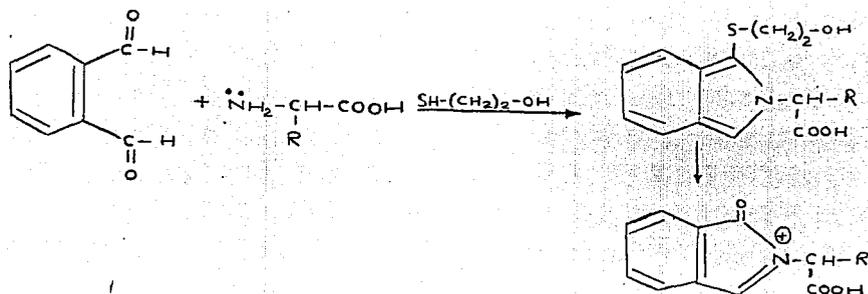


Figura 1. Reacción de un aminoácido (amina primaria) con aldehído o-ftálico (OPA) para producir un derivado fluorescente en presencia de β -mercaptoetanol, la conversión química a un derivado no fluorescente se indica con la flecha descendente.

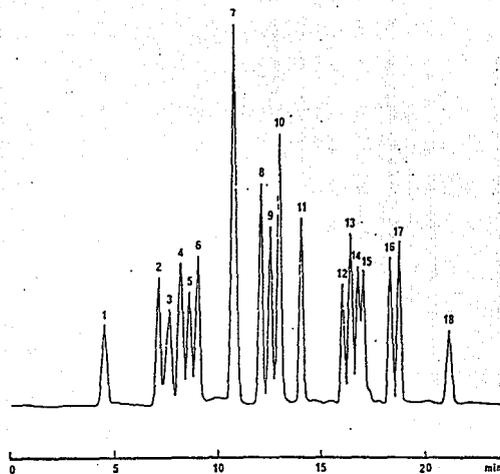


Figura 2. Separación por HPLC de 21 estándares de aminoácidos derivatizados con OPA (las condiciones experimentales se describen en el texto). (1) Asp, (2) Asn, (3) Glu, (4) Ser, (5) His, (6) Gln, (7) Gly + Arg + Thr, (8) Tau, (9) β -Ala, (10) Ala + Tyr, (11) GABA, (12) Trp, (13) Met, (14) Val, (15) Phe, (16) Ile, (17) Leu, (18) Lys.

Expresión de los resultados

Los resultados de los experimentos de liberación se expresan como porcentaje del total de radiactividad liberada en los

20 minutos siguientes a la obtención del flujo basal mas la radiactividad remanente en las células utilizadas para cada experimento. Esto, para cada una de las muestras colectadas, puede representarse con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de liberación} = R_m * 100 / R_t$$

Donde: R_m = Radiactividad de la muestra

R_t = Radiactividad total

Estadística

Para el análisis estadístico de los resultados, se utilizó como medida de desviación el error estandar, el cual es aplicable a muestras pequeñas como las obtenidas en éste trabajo (promedios de aproximadamente 6 experimentos), que involucra tanto a la desviación estandar como al número de observaciones (grados de libertad) y que se calcula de la siguiente manera:

$$s = \sigma / (N-1)^{1/2}$$

Donde: s = Error estandar

σ = Desviación estandar

N = Grados de libertad

RESULTADOS

Liberación de aminoácidos libres

El efecto de un estímulo hiposmótico en la liberación de los principales constituyentes de la poza de aminoácidos libres se examinó en cultivos tanto de astrocitos como de neuronas (células corticales y granulares) obtenidas de cerebelo de rata.

En la mayor parte de los experimentos, el curso temporal de esta liberación fue seguido utilizando aminoácidos marcados radiactivamente ⁸⁶Rb (como marcador de potasio) para comparar la contribución de estos osmolitos, a los dos componentes del proceso de regulación del volumen celular (un rápido hinchamiento seguido de una fase lenta de recuperación) descrito previamente (Pasantes-Morales y Schousboe, 1986) y para determinar el umbral de sensibilidad osmótica de estos AA en cada uno de los modelos estudiados.

Astrocitos

Los aminoácidos libres mas abundantes en los cultivos de astrocitos fueron: glutamato, glutamina, taurina, glicina, alanina y β-alanina como se observa en el cromatograma de la Figura 3, en concordancia con reportes previos (Patel y Hunt,

1985; Holopainen et al, 1986; Lehman y Hansson, 1987). Para nuestros propósitos cabe resaltar que estos seis aminoácidos representan más del 88 % de la poza intracelular de aminoácidos libres calculada a partir de los datos extraídos de la Figura 3.

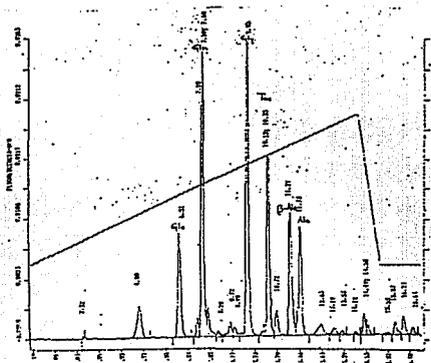


Figura 3. Cromatograma (HPLC) producido por el extracto etanólico de un cultivo de astrocitos bajo condiciones de isosmolaridad, en donde se indican los picos correspondientes a los principales constituyentes de la poza de aminoácidos libres.

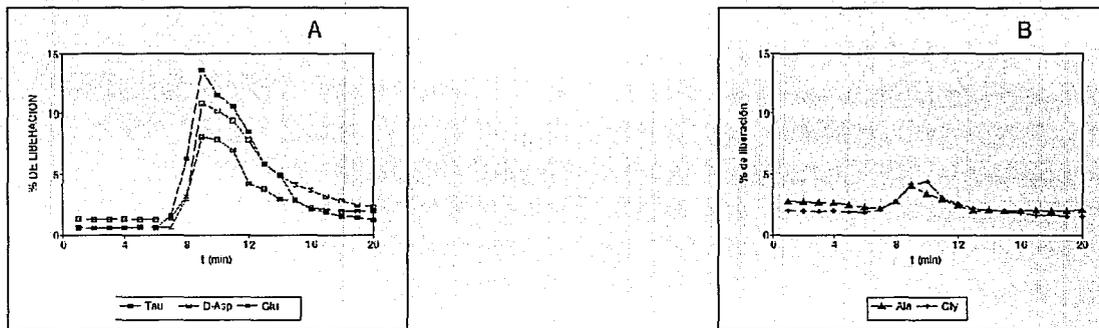
El curso temporal de liberación de estos aminoácidos producida por hiposmolaridad, fue estudiado utilizando aminoácidos marcados radiactivamente excepto para la glutamina que sufre degradación metabólica importante y para la β -alanina de la que no se dispone de una forma radiactiva. Para estos aminoácidos se usó la técnica de HPLC descrita previamente. El D-aspartato que es un análogo no metabolizable del glutamato, se usó como marcador de este aminoácido y en algunos

experimentos hechos directamente con [³H]- glutamato se agregó al medio de perfusión un inhibidor de la glutamino sintetasa la sulfoximina de la metionina, a una concentración final de 10 μ M para impedir la degradación metabólica del glutamato.

De acuerdo a las características particulares de liberación en condiciones isosmóticas y a su respuesta a soluciones hiposmóticas, los AA estudiados pueden dividirse en dos grupos con marcadas diferencias. Por un lado se agrupan la taurina, el D-aspartato, el glutamato y la β -alanina cuya liberación bajo condiciones de isosmolaridad (perfusión con medio isosmótico, 300 mOsm) fue del 5-8 % durante diez minutos (liberación basal), lo que indica que estos AA son retenidos fuertemente en el medio intracelular. La respuesta de este grupo de AA a soluciones hiposmóticas del 50 % (150 mOsm) tiene un curso temporal muy rápido, alcanzándose un máximo de liberación en 1-2 minutos después de la exposición a las condiciones hiposmóticas extremas. El proceso de liberación disminuye con el tiempo sin importar la persistencia de condiciones hiposmóticas en el medio, hasta alcanzar niveles de liberación muy cercanos al flujo basal. El patrón de liberación de taurina, D-aspartato y glutamato fue muy similar (gráfica 1 a). La cantidad liberada de estos aminoácidos en un medio hiposmótico durante diez minutos expresada como porcentaje de la poza intracelular, fue aproximadamente del 65 % para la taurina y el D-aspartato, 50 % para el glutamato y 54 % para β -alanina como se muestra en la Tabla 2. Cabe señalar que no se encontraron diferencias significativas en el patrón de liberación del glutamato en presencia ó ausencia del inhibidor de la actividad de la glutamino sintetasa.

Otro grupo de AA, constituido por la glicina, la alanina y la glutamina muestran respuestas que difieren tanto en el curso temporal como en la cantidad del AA liberado en respuesta al estímulo. En condiciones de isosmolaridad durante diez minutos la liberación basal fue claramente mayor para estos aminoácidos que para los descritos previamente, observándose una liberación de 13 %, 41 % y 22 % respectivamente lo que indica que este grupo de aminoácidos se retiene menos en el espacio

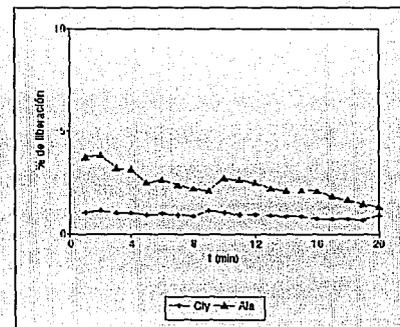
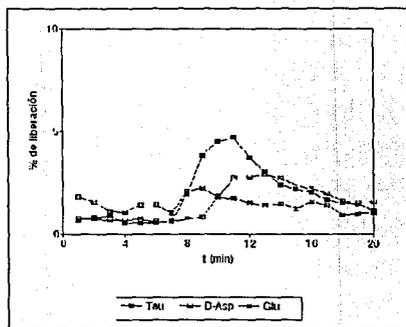
intracelular. La liberación observada en condiciones drásticas de hiposmolaridad (150 mOsm) aunque claramente manifiesta, fué de sólo un 30% aproximadamente para alanina y glicina durante los mismos diez minutos y de un 62% (aproximadamente un 20% de incremento) para la glutamina como se muestra tanto en las Gráficas 1b y 4 como en la tabla 1.



Gráfica 1. Curso temporal de liberación de AA marcados radiativamente estimulada por una hiposmolaridad del 50% (150 mOsm) en astrocitos de cerebelo. Las células fueron manejadas como se describe en Métodos. El flujo de liberación esta expresado como la radiactividad liberada cada minuto en relación a la radiactividad total.

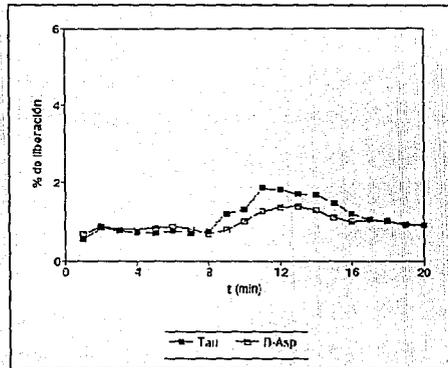
las diferencias descritas entre los dos grupos de AA se ven aún más claramente cuando la osmolaridad del medio se reduce en un 30% (210 mOsm). En estas condiciones observamos el mismo comportamiento de los grupos de AA identificados en los

experimentos anteriores, ya que sólo la liberación de taurina, D-aspartato y glutamato presenta un aumento significativo con relación al flujo basal (aunque puede resaltarse un ligero retraso en la respuesta del D-aspartato, alrededor de 2 minutos, y una conducta irregular para el glutamato). Por otra parte la alanina y la glicina, no se movilizan bajo estas condiciones de osmolaridad (210 mOsm en el medio) como puede observarse en la Gráfica 2b, en donde ya no es posible detectar picos de liberación del AA producidos por este estímulo; la liberación producida durante diez minutos en condiciones hiposmóticas de la liberación basal (Tabla 2).



Gráfica 2. Curso temporal de liberación de AA marcados radiactivamente estimulada por una hiposmolaridad del 70 % (210 mOsm). Las condiciones experimentales son las que se describen en la Gráfica 1.

La respuesta de los dos grupos de aminoácidos descritos a una reducción aún menor en la osmolaridad del medio, equivalente a un 15 % de la osmolaridad total (255 mOsm), fué significativa sólo en el caso de la [³H]-taurina y el [³H]-D-aspartato. La liberación con respecto al flujo basal durante diez minutos es aproximadamente el doble para el D-aspartato y casi el triple para la taurina mientras que el glutamato no presenta un aumento significativo como puede verse en la Tabla 1.



Gráfica 3. Curso temporal de liberación para taurina y D-aspartato producida por una hiposmolaridad del 85 % (255 mOsm).

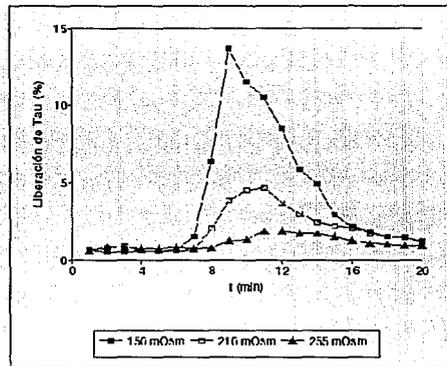
Las condiciones experimentales son las que se describen en la Gráfica 1.

Tabla 1. Efecto de la hiposmolaridad sobre la liberación de aminoácidos libres en astrocitos de cerebelo.

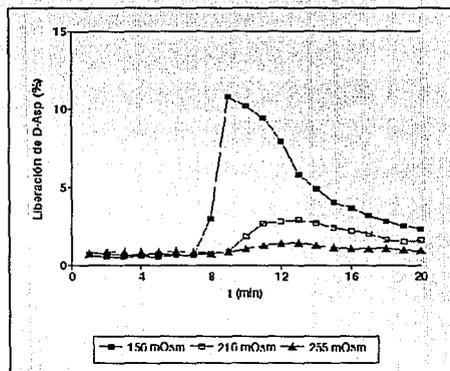
Los astrocitos fueron incubados como se describe en Métodos. Una vez transcurridos el tiempo de incubación, las células fueron lavadas y perfundidas con medio hiposmótico (6 min) e inmediatamente con medios de osmolaridad decreciente. Se colectaron muestras cada minuto (durante 15 minutos) y la radiactividad medida por espectrometría de centelleo. La liberación esta expresada como por ciento del total de radiactividad presente al empezar los experimentos de liberación. Los resultados son el promedio de 6-12 experimentos.

AMINOACIDOS	OSMOLARIDAD (mOsm)			
	300	255	210	150
D-ASPARTATO	5.8	12.9	28.8	63.6
GLUTAMATO	9.9	11.0	15.5	50.2
TAURINA	6.3	18.8	31.3	65.8
GLICINA	18.8	—	19.6	29.0
ALANINA	25.1	—	26.2	32.8

Para fines comparativos, en las Gráficas 4 y 5 se muestran los patrones de liberación en función de la osmolaridad para los dos aminoácidos que presentan mayor sensibilidad a cambios en la osmolaridad (taurina y D-aspartato). De estas gráficas se deduce que ambos osmolitos son movilizados por los astrocitos a umbrales reducidos y en cantidades significativas para el proceso de regulación del volumen. En cuanto a diferencias entre estas dos gráficas, se aprecia una movilización de taurina mayor en cantidad que la observada para D-aspartato y una diferencia temporal en el aumento del flujo de liberación producido por disminuciones en la osmolaridad del 15 (225 mOsm) y el 30 % (210 mOsm) en el que la taurina es movilizada 2-3 minutos antes que el D-aspartato.

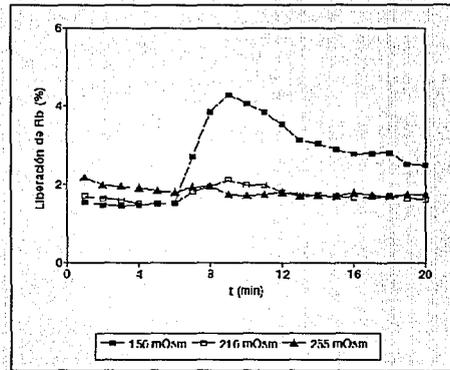


Gráfica 4. Curva contra osmolaridad para taurina. El manejo experimental es el que se describe para las Gráficas anteriores.



Gráfica 5. Curva contra osmolaridad para el D-aspartato. El manejo experimental es el mismo que para las Gráficas anteriores.

El efecto de la hiposmolaridad sobre la liberación del ión inorgánico K^+ , en astrocitos en cultivo, fue medido usando ^{86}Rb como marcador de este ión. Los astrocitos retienen una cantidad significativa de la marca radiactiva por lo que es posible obtener un valor de flujo basal estable a los 6 minutos de perfusión. Cuando se disminuye la osmolaridad del medio en un 50 % (150 mOsm) se nota un claro incremento en el flujo de liberación de ^{86}Rb que es unas 3 veces superior al que se libera en condiciones isosmóticas. En soluciones con una disminución del 30 % (210 mOsm) y menor no se observa incremento significativo en la liberación de ^{86}Rb .



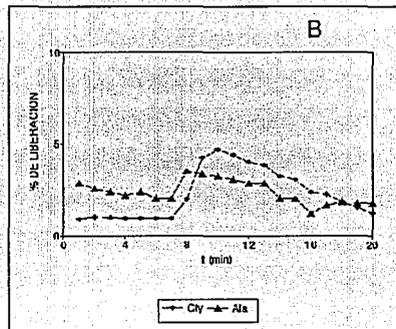
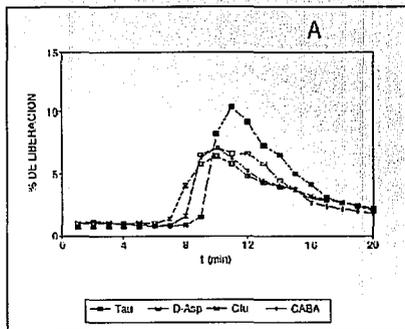
Gráfica 6. Curso temporal de liberación de ^{86}Rb estimulada por hiposmolaridad. La manipulación experimental es la que se describe en Métodos. Los resultados son promedios de 4-12 experimentos.

Células corticales

En este tipo celular al igual que en los astrocitos, los aminoácidos más abundantes fueron; el glutamato, la glutamina, la taurina, la glicina y la alanina. Cabe resaltar que en estas preparaciones, el GABA se manifiesta como un constituyente importante de la poza de aminoácidos como podría esperarse en atención a su papel como neurotransmisor en estas células (figura 4), mientras que la concentración de β -alanina es muy baja en comparación con lo observado en astrocitos. Para

transaminasa, el ácido aminooxiacético, a una concentración de 0.1 mM para prevenir la degradación metabólica del aminoácido.

Al igual que en los astrocitos, pudieron observarse semejanzas y diferencias entre los AA que permiten clasificarlos en dos grupos; uno formado por taurina, D-aspartato, glutamato y GABA y el otro por glicina, alanina y glutamina. El flujo basal de los aminoácidos que componen al primer grupo durante un periodo de diez minutos y bajo condiciones de isosmolaridad, representa entre el 7 y el 9 % del total liberado. En el segundo grupo la alanina mostró un flujo basal que representa el 19 % del total liberado pero en estas condiciones la liberación de la glicina fué más bien semejante a la de los miembros del primer grupo de aminoácidos (Gráfica 7 y Tabla 2). Al exponer a estas células a la acción de un medio hiposmótico (150 mOsm), la taurina, el glutamato, el D-aspartato y el GABA fueron rapidamente liberados alcanzando un máximo de liberación en 1 a 2 minutos despues del estímulo y el curso temporal de liberación fué muy similar para todos estos aminoácidos (Gráfica 7a). En lo que se refiere a la cantidad liberada al reducir la osmolaridad se observan tambien diferencias entre los dos grupos. Alrededor del 56-65 % de la poza de taurina, GABA, glutamato y D-aspartato es liberada al medio al decrecer la osmolaridad en un 50 % (150 mOsm) mientras que sólo se liberó en respuesta al estímulo hiposmótico un 22 % y un 13 % de la poza de glicina y la alanina respectivamente.



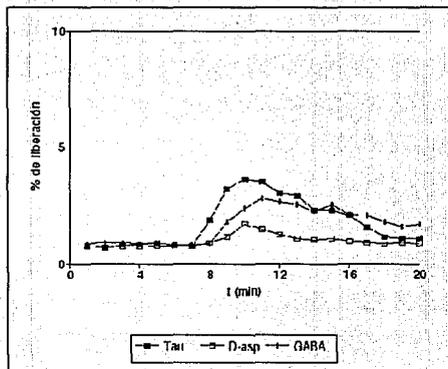
Gráfica 7. Curso temporal de liberación de AA marcados radiactivamente en células corticales de cerebello producido por una hiposmolaridad del 50% (150 mOsm). El manejo experimental es el que se describe para las gráficas anteriores.

Quando la osmolaridad del medio se reduce al 70% (210 mOsm), se observa un aumento de liberación significativo sólo para taurina, D-aspartato y GABA. Este corresponde a un 29% para la taurina, 13% para el D-aspartato y un 18% para el GABA. Estos resultados se muestran en la Gráfica 8 donde se observa un curso temporal muy similar para los tres aminoácidos movilizados a esta osmolaridad. La principal diferencia es la cantidad del osmolito liberado, mientras que el D-aspartato y el GABA aumentan al doble su flujo basal de liberación la taurina aumenta este flujo tres veces con relación a la basal. Por otra parte, no se aprecia ningún incremento significativo en la liberación de glicina, alanina y glutamina como se observa tanto en la Tabla 2 como en la Gráfica 9.

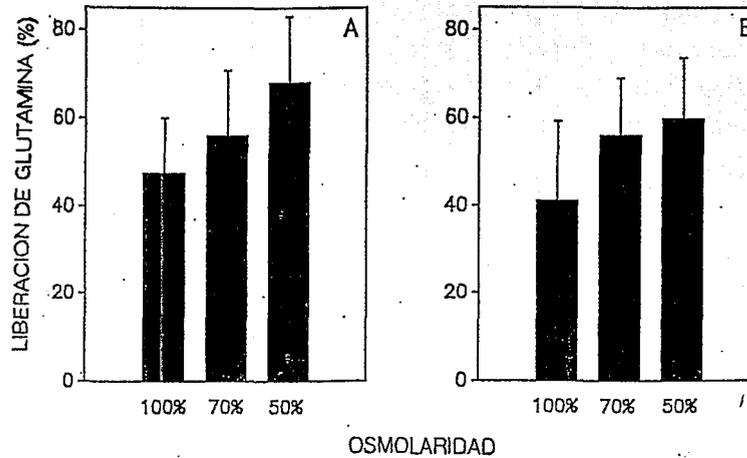
Tabla 2. Efecto de la hiposmolaridad sobre la liberación de aminoácidos libres en células corticales de cerebelo.

AMINOACIDOS	OSMOLARIDAD (mOsm)		
	300	210	150
D-ASPARTATO	7.6	13.2	56.3
GABA	9.3	18.2	50.7
TAURINA	8.1	29.0	65.3
GLICINA	8.6	9.7	20.1
ALANINA	18.8	21.4	31.0

Las condiciones experimentales son las que se describen en la Tabla 1. Los resultados son el promedio de 6-12 experimentos.

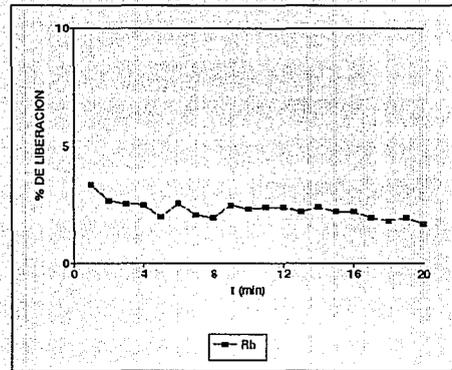


Gráfica 8. Curso temporal de la liberación de AA marcados radiactivamente en células corticales de cerebelo producido por una hiposmolaridad del 70 % (210 mOsm). El manejo experimental es que se describe para las gráficas anteriores.



Gráfica 9. Curva contra osmolaridad para la liberación de glutamina endógena en (a) Células corticales y (b) astrocitos de cerebelo. El medio de cultivo fué removido, las células lavadas 2 veces con MKN y expuestas durante 10 minutos al medio con la osmolaridad correspondiente. Al finalizar la incubación, los aminoácidos fueron extraídos con etanol y determinados por HPLC como se indica en Métodos.

En estas células, el ^{86}Rb usado como marcador de potasio no es retenido en el interior, por lo que el flujo de liberación no produce una basal estable y no se observa ningún flujo de liberación aún reduciendo la osmolaridad a un 30 % del valor normal (Gráfica 10).



Gráfica 10. Patrón de liberación de ⁸⁶Rb producido por condiciones hiposmóticas (70, 50 y 30 % de hiposmolaridad). Las condiciones experimentales son las que se describen para las gráficas anteriores.

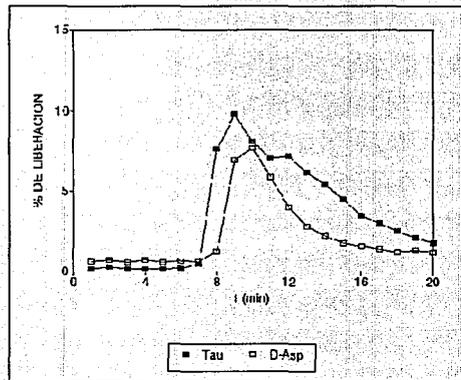
Células granulares

En este tipo celular, los principales componentes de la poza de aminoácidos son el glutamato, la taurina, la glutamina y el GABA (Figura 5). La β-alanina no se encuentra en cantidades apreciables en estas células. El patrón de liberación observado en estas células tanto para taurina como para D-aspartato, es muy similar al observado en células corticales. Así, la liberación basal para estos AA durante diez minutos, es de aproximadamente 2 % para la taurina y de 6.8 % para el D-aspartato como

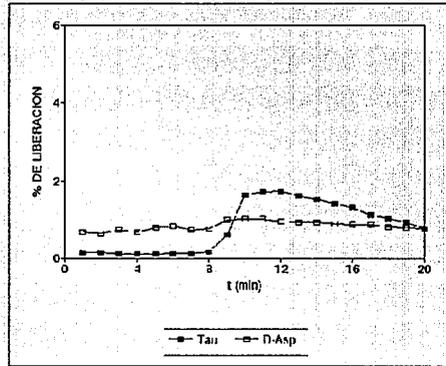
se muestra en la Tabla 3. Una exposición a un medio de osmolaridad reducida en un 50 % produce la liberación de un 62 % de la poza de taurina y de un 34.9 % de la poza de D-aspartato (Tabla 3 y Gráfica 11). La disminución de un 30 % en la osmolaridad del medio eleva la liberación de taurina unas 6 veces por encima de la basal mientras que la liberación de D-aspartato es solo ligeramente mayor que la observada en condiciones isosmóticas (Figura 3 y Gráfica 12).

Tabla 3. Efecto de la hiposmolaridad sobre la liberación de taurina y D-aspartato en cultivos de células granulares de cerebelo. Las condiciones experimentales son las que se describen para las tablas anteriores y los resultados son promedios de 6-10 experimentos.

AMINOACIDO	OSMOLARIDAD (mOsm)		
	300	270	150
TAURINA	1.98	12.95	62.31
D-ASPARTATO	6.48	9.61	34.9

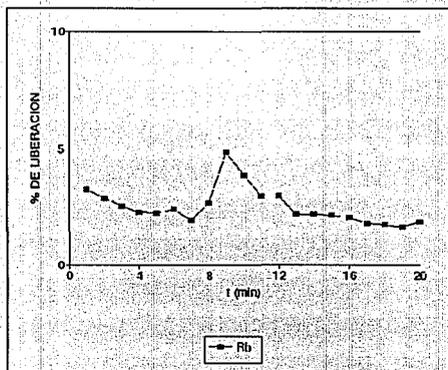


Gráfica 11. Curso temporal de liberación de taurina y D-aspartato producida por una hiposmolaridad del 50 % (150 mOsm) en células granulares del cerebelo. Las condiciones experimentales son las descritas en las gráficas anteriores.



Gráfica 12. Curso temporal de liberación de taurina y D-aspartato, producido por una disminución en la osmolaridad del medio del 30 % (270 mOsm) en células granulares de cerebelo.

A diferencia de lo descrito para las neuronas corticales, las neuronas granulares del cerebelo no presentan un patrón definido de movilización de ^{86}Rb ante la hiposmolaridad ya que en algunos experimentos (2 o 3) se observa una ligera inducción de liberación del isótopo al ser estimulado con un medio conteniendo 150 mOsm. La Gráfica 13 muestra un experimento representativo de lo descrito en este párrafo. Sin embargo la disminución de un 30 % en la osmolaridad del medio, no muestra diferencias significativas con respecto a la basal en ninguno de los experimentos realizados.



Gráfica 13. Experimento representativo de la liberación de ^{86}Rb producido en algunos experimentos por una hiposmolaridad del 50 % (150 mOsm).

DISCUSION

Mientras que el papel de los osmolitos inorgánicos en la regulación de volumen esta ampliamente documentado tanto en vertebrados como en invertebrados, el de los osmolitos orgánicos se ha investigado en invertebrados (Pierce, 1982) pero solo muy recientemente se ha reconocido su contribución al proceso de regulación de volumen en vertebrados (Law y Burg, 1991; Pasantes Morales y Martin del Rio, 1990).

Algunos estudios realizados principalmente en células renales han examinado en forma comparativa la contribución de los osmolitos orgánicos e inorgánicos al proceso de regulación del volumen celular, encontrandose que esta se efectúa por medio de la activación de flujos transmembranales de solutos osmoticamente activos en la dirección adecuada para contrarrestar una alteración de la cantidad de agua en el medio extracelular (Hoffman y Simonsen, 1989; Sarkadi y Parker, 1991). Al ser sometidas a condiciones hiposmóticas, las células muestran un rápido incremento en su volumen seguido de una lenta fase de recuperación de este, la cual se manifiesta a pesar de la persistencia de condiciones de hiposmolaridad (Macnight, 1988; Hoffman y Somensen, 1989). Aunque en astrocitos se han reportado procesos de regulación de volumen (Schousboe et al, 1990; Olson et al, 1986; Kimelberg y Frangakis, 1986), no existen en la literatura evidencias que presuman esta habilidad en neuronas, mientras que si se ha observado hinchamiento de dendritas en algunas patologías (Van Harreveld y Khattab, 1967; Söderfeldt et al, 1981; Van Harreveld y Fifkova, 1971).

Desde que los principales osmolitos orgánicos involucrados en la regulación de volumen en células renales, tales como el inositol y la betaína (García-Pérez y Burg, 1991) se encuentran a muy bajas concentraciones en tejido nervioso es improbable que estos contribuyan de manera importante al proceso regulador de volumen en este tejido. Cuando un cultivo de astrocitos se expone a medios de osmolaridad reducida, estos muestran un rápido aumento en el volumen celular seguida de una fase reguladora que reduce el volumen a valores muy cercanos al basal. Esta fase reguladora presenta dos componentes, en el primero se pierde más de la mitad del volumen aumentado por efectos osmóticos en un lapso de 5 minutos (fase rápida) y en el segundo se lleva a la célula a un volumen muy cercano al normal, nunca al valor normal, en un lapso de 10 minutos (fase lenta) de acuerdo a lo reportado muy recientemente por Pasantes Morales et al, 1993.

Para fines comparativos, en este estudio hemos examinado la movilización de los principales constituyentes de la poza de aminoácidos y del potasio tanto en astrocitos como en células corticales y granulares de cerebelo. Analizando los cursos temporales y la proporción de la poza intracelular que se moviliza de estos dos grupos de osmolitos. En astrocitos se observa que aunque el flujo de AA es activado a tiempos más cortos que el de potasio, ambos contribuyen de manera significativa al componente rápido de recuperación de volumen mientras que la inactivación de los flujos producida en el componente lento es más rápida para los AA que para el Rb^+ . De una manera general puede decirse que el curso de liberación de la mayoría de los AA concuerda más de cerca con el curso temporal del proceso de regulación de volumen, estas consideraciones se refieren a los experimentos en los que la reducción de la osmolaridad alcanza un 50 % (210 mOsm), en los que por la potenciación del efecto se las características del proceso pueden disecarse con mayor claridad.

De acuerdo a esto la respuesta general de las células del cerebelo estudiadas, en cuanto a flujos de AA y de potasio, difiere marcadamente de lo observado en células renales donde el potasio es movilizado antes de que se active algún flujo de AA (Roy

y Sauvé, 1987). Por otra parte en linfocitos humanos, los flujos de taurina y potasio producidos por hiposmolaridad tienen un curso temporal muy parecido en donde el pico de liberaci3n se alcanza casi inmediatamente después del estímulo. Estos resultados sugieren que, los AA son importantes en la fase rápida de regulaci3n de volumen en los astrcitos. Una clara diferencia entre los flujos de AA y de potasio en estas condiciones es que los flujos de potasio s3lo son activados cuando se realizan reducciones relativamente severas de osmolaridad, entendiendose por esto una disminuci3n del 50% o más de donde se desprende su menor sensibilidad en este tejido a diferencia de lo que ocurre en otras células que poseen la capacidad de regular su volumen.

Como se esperaba, en las neuronas corticales estas diferencias se acentuan ya que no pudo detectarse flujo alguno de potasio aún en condiciones drásticas de osmolaridad. El que en las células granulares del cerebello, el potasio sea liberado en algunos experimentos podrá asociarse a estadios del desarrollo de las células ya que los experimentos no fueron realizados a la misma cantidad de días in vitro. En neuronas como en astrcitos, son también la taurina y el D-aspartato los AA que se libera preferente y significativamente en condiciones hiposm3ticas severas (150 y 210 mOsm en el medio) y siguiendo el mismo patr3n de liberaci3n observado en los dos tipos de células revisados anteriormente.

Mientras el curso temporal de liberaci3n, producida por hiposmolaridad, fué muy similar para todos los aminoácidos en los diferentes tipos celulares estudiados, se observan marcadas diferencias tanto en la cantidad del osmolito movilizado como en la sensibilidad de cada aminoácido a disminuciones graduales de hiposmolaridad. La taurina y el D-aspartato son los dos aminoácidos movilizados en mayor cantidad. En el caso de la taurina, existen una gran cantidad de reportes que apoyan la idea de un papel osmoregulator para este aminoácido, mientras que la liberaci3n del análogo no metabolizable del glutamato por encima de la liberaci3n del glutamato mismo podrá explicarse suponiendo al D-aspartato como marcador de una poza

de este aminoácido especialmente sensible a hiposmolaridad lo que lo haría más accesible a flujos producidos por estas condiciones.

La taurina y el D-aspartato fueron también los dos aminoácidos más sensibles a pequeños cambios en osmolaridad y tomando en cuenta que el flujo basal de la taurina es de cuatro a cinco veces menor que el del D-aspartato, podríamos pensar en la taurina como el principal osmoefector en estas células. El mínimo recambio de la taurina aunado a su rápida y significativa movilización en condiciones hiposmóticas, puede relacionarse con el hecho de que la taurina en el cerebro es metabólicamente inerte y que la mayor parte de esta se encuentra en pozas sensibles a osmolaridad por lo que es tan importante en los procesos de liberación asociados a regulación de volumen. Estas particularidades aunadas al hecho de que la taurina no está asociada a la membrana ni a organelos intracelulares, lo convierten en el osmolito ideal y apoyan la posibilidad de que este sea su función principal en las células de tejido excitable, pero su contribución en condiciones severas de hiposmolaridad es reforzada por algunos aminoácidos (D-aspartato-Glutamato) en una manera gradual. La conclusión de estas observaciones es que en las células del cerebelo, contrario a lo que sucede en células de tejido no excitable, los osmolitos orgánicos tienen un papel más importante que los inorgánicos en los procesos de regulación de volumen. El que la movilización de potasio se realice solamente en condiciones muy drásticas de hiposmolaridad, se explica fácilmente teniendo en cuenta el papel determinante de este ión sobre el potencial de membrana, por lo que su concentración tanto intracelular como extracelular debe ser exquisitamente regulada.

Tomando en cuenta estos resultados y utilizando datos obtenidos en el laboratorio acerca de la concentración intracelular tanto de los principales constituyentes de la poza intracelular de AA como del potasio en astrocitos de cerebelo, es posible calcular la contribución (en mOsm) de estos osmolitos al proceso de regulación de volumen en las condiciones estudiadas.

Datos recientes indican que el aumento de volumen producido por una reducción en la osmolaridad del 50 % (150 mOsm) es restaurado a cerca de un 80 % del volumen normal (Pasantes- Morales et al, 1993). Una respuesta reguladora de esta naturaleza requiere la liberación de unas 120 mOsm de osmolitos intracelulares. Utilizando los porcentajes de liberación obtenidos en los experimentos realizados en este trabajo y las concentraciones intramoleculares que se observan en la Tabla 4, podemos calcular la contribución a la recuperación de la osmolaridad de los AA estudiados sumando las contribuciones individuales de estos. Esta manipulación manifiesta una contribución de 58.3 mOsm por parte de los AA al proceso de regulación de volumen. Por otra parte, se sabe que la concentración intracelular de K^+ en los astrocitos de cerebelo es de 110 mOsm y de acuerdo a los experimentos realizados cerca de la tercera parte de esta (un 29.7 % aproximadamente) se libera en un medio con el 50 % de osmolaridad. Tomando en cuenta que la movilización de K^+ ocurre siempre unida a un anión (muy posiblemente Cl^-) para mantener el potencial de membrana la contribución de estos dos osmolitos inorgánicos a este proceso es de 66 mOsm. Estos resultados muestran que para estas condiciones en particular, los osmolitos considerados se movilizan en cantidades suficientes para compensar los cambios producidos en la osmolaridad del medio en donde un 46 % del proceso es realizado a través de osmolitos orgánicos y un 54 % por la movilización de osmolitos inorgánicos. Manipulaciones similares para el caso de las neuronas estudiadas, no son posibles por el momento debido a la dificultad de medir la concentración intracelular de K^+ en tejido excitable.

Tabla 4. Contribución de los AA al proceso de regulación de volumen provocado por una hiposmolaridad del 50 % en astrocitos.

AMINOACIDO	[AA] (mM)	% LIBERADO	mOsm
D-Aspartato	1.9	57.8	1.1
Glutamato	10.0	40.3	4.0
Taurina	52.0	59.5	30.9
Glicina	5.8	11.0	6.4
Alanina	2.1	7.7	1.6
β-Alanina	16.0	54.0	8.6
Glutamina	38.1	15.0	5.7

Los pequeños cambios de volumen producidos en condiciones fisiológicas producidos por la incorporación de nutrientes, la redistribución de sustancias osmóticamente activas o el recambio de estas, podrían ser compensados de una manera similar a la descrita para reducciones severas de osmolaridad movilizando AA e iones inorgánicos pero en cantidades suficientemente pequeñas como para no ser detectadas con las técnicas utilizadas en este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

- Armende LH, Pierce SK (1980):Cellular volume regulation in salinity stressed molluscs:the response of Noetia ponderosa (Arcidae) red blood cells to osmotic variation. *J Comp Physiol* 138:283-289.
- Ballanyi K, Graffe A (1988):Cell volume regulation in the nervous system. *Renal Physiol Biochem* 3-5:142-157.
- Bourke RS, Waldman JB, Kimelberg HK, Barron KD, San Filippo BD, Popp AJ, Nelson LR (1981):Adenosine-stimulated astroglial swelling in cat cerebral cortex in vivo whit total inhibition by a nondiuretic acylaryloxyacid derivate. *J Neurosug* 55:364-370
- Bourke RS, Kimelberg HK, Dazé M, Church G (1983):Swelling and ion uptake in cat cerebrocortical slides: control by neurotransmitters and ion transport mechanism. *Neurochem Res* 8:232-248.
- Chan PH, Fishman RA (1985):Brain edema.En Lajtha A (ed):Handbook of Neurochemistry, New York, Plenum Press,pp 153-174.
- Chassande O, Frelin C, Farahifar D, Jean T, Lazdunski M (1988):The Na⁺/K⁺/Cl⁻ cotransport in C₆ glioma cells. *Eur J Biochem* 171:425-433.
- Christensen O (1987):Mediation of cell volume regulation by Ca²⁺ influx through strech-activated channels. *Nature* 330:66-68.
- Dick DAT (1970):Water movements in cell. En Bitar EE (ed):"Membranes and Ion Transport." John Willey, vol 3.
- Domínguez L, Montenegro J, Pasantes-Morales H (1989):A volume-dependent chloride sensitive component of taurine release stimulated by potassium from retina. *J Neuroci Res* 22:356-361.
- Eveloff SL, Warnock DG (1987):Activation of ion transport systems during cell volume regulation. *Am J Physiol* 252:F1-F10.
- Fettiplace R, Haydon DA (1980):Water permeability of lipids membranes. *Physiol Rev* 60:510-550.

- Fincham DA, Wolowyk MW, Young JD (1987):Volume sensitive taurine transport in fish erythrocytes. *J Memb Biol* 96:45-56.
- Fugelli K, Throeed SM (1986):Taurine transport associated with cell volume regulation in flounder erythrocytes under anisomotic conditions. *J Physiol* 374:245-261.
- García-Pérez A, Burg MB (1991):Role of organic osmolites in adaptation of renal cells to high osmolarity. *J Membrane Biol* 119:1-13.
- Geddes JW, Wood JD (1984):Changes in amino acid content of nerve endings induced by drugs that alter the metabolism of glutamate and p-aminobutyric acid. *J Neurochem* 42:16-24.
- Gilles R (1979):Intracellular organic osmotic effector. In Gilles R (ed):"Mechanisms of Osmoregulation in animals:Maintenance of Cell Volume." New York: John Wiley, pp 111-154.
- Gristein S, Rothstein A, Gelfand EW (1984):Responses of lymphocytes to anisomotic media. Volume regulation behavior. *Amer J Physiol* 246:204-215.
- Hertz L(1982):Astrocytes. In Lajtha A (ed):"Handbook of Neurochemistry". New York, Plenum Press, pp 319-355.
- Hertz L (1978):An intense potassium uptake into astrocytes, its further enhancement by high concentrations of potassium and its possible involvement in potassium homeostasis at the cellular level. *Brain Res* 145:202-208.
- Hoffmann EK, Lambert IH (1983):Amino acid transport and cell volume regulation in Erlich ascites tumor cells. *J Physiol* 338:613-625.
- Hoffmann EK, Hendel KB (1976):The role of amino acids and taurine in isosmotic intracellular regulation in Erlich ascites mouse tumor cells. *J Comp Physiol* B108:279-286.
- Hoffmann EK, Simonsen LO (1989):Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells. *Physiol Rev* 69:315-382.
- Hoffmann EK (1977):Control of cell volume. IN Gupta et al (eds):"Transport of ions and water in animals." London, Academic Press, pp 285-322.
- Hoffmann EK (1985):Role of separate K⁺ and Cl⁻ channels and of Na⁺/Cl⁻ cotransport in volume regulation in Erlich cells. *Fed Proc.* 44:2513-2519.

House C (1974):Water transport in cells and tissues. Physiol Soc Monographs . London:Arnold, No 24.

Kettenmann H (1987):K⁺ and Cl⁻ uptake by cultured oligodendrocytes.Canad J Physiol Pharmacol 65:1033-1037.

Kimelberg HK, Ransom BR (1986):Physiological and pathological aspects of astrocytic swelling. In Fedoroff F and Vernadakis A (eds):"Astrocytes" Academic Press, vol. 3, pp 129-166.

Kimelberg HK, Frangakis MV (1985):Furosemide and Bumetanide-sensitive ion transport and volume control in primary astrocyte cultures from rat brain. Brain Res 361:125-134.

Kimelberg HK (1987):Anisotonic media and glutamate-induced ion transport and volume responses in primary astrocyte cultures. J Physiol (Paris) 82:294-303.

Kimelberg HK, Frangakis MV (1986):Volume regulation in primary astrocyte cultures. Adv Biosci 61:177-186.

Kregenow FM (1981):Osmoregulatory salt transporting mechanism:control of cell volume in anisotonic media. Ann Rev Physiol 43:493-505.

Lauf PK (1985):K⁺Cl⁻ cotransport:sulphydryls, divalent cations and the mechanism of volume activation in a red cell. J Membr Biol 88:1-13.

Lauf PK (1985):On the relationship between volume and thiol-stimulated K⁺/Cl⁻ fluxes in red cells membranes. Mol Physiol 8:215-234.

Law RO, Burg MB (1991):The role of organic osmolytes in the regulation of mammalian cell volume. En Gilles R (ed):"Avances in comparative Physiology."Springer-Verlag, Berlin. Vol 9, pp 189-225.

Leaf A (1959):Maintenance of concentration gradient and regulation of cell volume. Ann NY Acad Sci 72:396-404.

Levine SD, Jakobi M, Finkestain A (1984):The water permeability of toad urinary bladder. II. The value of P_f/P_a(w) for the antidiuretic hormone-induced water permeation pathway. J Gen Physiol 83:543-561.

Macey RI, Brahm J (1989):Osmotic and diffusional water permeability in red cells:methods and interpretations. En Benga G (ed):"Water Transport in Biological Membranes." Florida, CRC Press, pp 25-39.

Macnight ADC (1988):Principles of cell volume regulation. Renal Physio Biochem 5:114-141.

Moran J, Patel A (1989):Stimulation of NMDA receptor promotes the biochemical differentiation of cerebellar granule neurons and not astrocytes. *Brain Res* 468:15-25.

Morfis JG (1980):Fisicoquímica para biólogos. Reverté, España. pp 389.

Morris CE, Sirdguson WJ (1989):Strech-inactivated ion channels coexist. *Science* 243:807-809.

Nieminen ML, Tuomisto L, Solatunturi E, Eriksson L, Paasonen MK (1988):Taurine in the osmoregulation of the Brattleboro rat.*Life Sci* 42:2137-2143.

Olson J, Holtzman D (1982):Respiration and cell volume of primary cultered cerebral astrocytes in media of various osmolarities. *Brain Res* 246:273-279.

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

Parker JC (1983):Hemolytic action of potassium salts on dog red blood ceels. *J Gen Physiol* 78:141-150.

Pasantes-Morales H, Schousboe A (1988):Volume regulation in astrocytes:a role for taurine as an osmoeffector. *J Neurosci Res* 20:505-509.

Pasantes-Morales H, Alavez S, Sánchez-Olea R, Morán J (1993):Contribution of organic and inorganic osmolites to volume regulation in rat brain cells in culture. *Neurochem Res* 18:445-452.

Pasantes-Morales H, García JJ, Sánchez-Olea R (1991):Hyposmolarity sensitive release of taurine and free amino acids from human lymphocytes. *Biochem Pharmacol* 41:307-309.

Pasantes-Morales H, Martin del Rio M (1990):Taurine and mechanisms of cell volume regulation. En Pasantes-Morales et al (eds):"Tarine:Function and Neurochemistry, Physiology and Cardiology."Wiley-Liss, New York, pp 317-328.

Pierce SK, Greenberg MJ (1972):The nature of cellular volume regulation in marine bivalves. *J Exp Biol* 57:681-692.

Pierce SK (1982):Invertebrate cell volume control mechanism:a cordinate use of amino acid and inorganic ions as osmotic solutes. *Biol Bull . Woods Hole*, 1163:405-419.

Roy G, Sauvé R (1987):Effec of anisotonic media on volume, ion and amino acid content and membrane potencial of kidney

cells (MDCK) in culture. *J Membr Biol* 100:83-96.

Sakardi B, Parker JC (1991):Activation of ion transport pathways by changes in cell volume. *Biochim Biophys Acta* 12:407-429

Schoffeniels E (1976):Biochemical approaches to osmoregulatory processes in crustacea. En Davies PS (ed):"Perspectives in Experimental Biology." Oxford:Pergamon Press, pp. 107-124.

Schoffeniels E, Gilles R (1970):Osmoregulation in aquatic arthropods. En Flokin M, Scheer BT (eds):"Chemical Zoology." New York:Academic Press Vol. 5, pp 255-286.

Schousboe A (1972):Development of potassium effects on ion concentrations and indicator spaces in rat brain cortex slices during postnatal oncogenesis. *Exp Brain Res* 15:521-531.

Schousboe A, Moran J, Pasantes-Morales H (1990):Potassium-stimulated release of taurin from cultured cerebellar granule neurons in associated with cell swelling. *J Neurosci Res* 27:71-77.

Schultze E, Neuhoff V (1983):Uptake, autoradiography and release of taurine and homotaurine from retinal tissue. *Neuroscience* 18:253-258.

Segel IR (1982):Cálculos de Bioquímica. 2a ed. Acribia, España. pp 564.

Söderfeldt B, Kalimo H, Olson Y, Siesjö B (1981):Pathogenesis of brain lesions caused by experimental epilepsy .Light and electron microscopic changes in the rat cerebral cortex following bicuculline-induced status epilepticus. *Acta Neuropath* 54:219-231.

Solomon AK, Chasan B, Dix JA, Lukacovic MF, Toon MR, Verkman AS (1984):The aqueous pore in the red cell membrane: Band 3 as a channel for anions, cations, nonelectrolytes and water. *Ann NY Acad Sci* 414:79-124.

Spring KR (1985):Determinations of epithelial cell volume. *Fed Proc* 44:2526-2529.

Sztrika L (1986):Time-course of change in water, sodium, potassium and calcium contents of various brain regions in rat after systemic kainic acid administration. *Acta Neuropath* 70:169-176.

Taniguchi J, Guggino WB (1989):Membrane stretch: A physiological stimulator of Ca²⁺-activated K⁺ channels in medullary thick ascending limb cell. *Am J Physiol* 257:1561-1568.

Tas PWL, Massa PT, Kness HG, Naccarato EF (1987):Characterization of an Na/K/Cl cotransport in primary cultures of rat astrocytes. *Biochim Biophys Acta* 903:411-416.

Thurston JH, Hanhart RE, Dirg JA (1980):Taurine:a role in osmotic regulation of mammalian brain and possible clinical significance. *Life Sci* 28:1561-1568.

Thurston JH, Hanhart RE, Naccarato EF (1981):Taurine:a role in osmotic regulation of mammalian heart. *Science* 214:1373-1374.

Tosteson DC, Hoffmann JF (1980):Regulation of cell volume by active cation transport in high and low potassium sheep red cells. *J Gen Physiol* 44:169-194.

Treherne JE (1980):Neuronal adaptation to osmotic and ionic stress. *Comp Biochem Physiol* 673:455-463.

Trubatch J, Lond A, Van Harrevelde A (1977):Quantitative stereological evaluation of KCl-induced ultrastructural changes in frog brain. *Neuroscience* 2:963-974.

Ussing HH (1918):Volume regulation in frog skin epithelium. *Acta Physiol Scand* 114:363-369.

Van Harrevelde A, Khattab F (1967):Changes in cortical extracellular space durin spreadin depression investigated with electron microscope. *J neurophysiol* 30:911-929.

Walz W (1987):Swelling and potassium uptake in cultured astrocytes. *Can J Physiol* 65:1051-1057.

Wong SME, Chase HS (1986):Role of intracellular calcium in cellular volume regulation. *Am J Physiol* 250:C841-C852.

Wong KR, Verkman AS (1987):Huma platelet diffusional water permeability measured by nuclear magnetic resonance. *Am J Physiol* 252:C320-C328.