

00567

N-1  
2Ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO DE LA  
FACULTAD DE QUIMICA

*Regulación del Volumen Celular de  
Neuronas en Cultivo.*

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS QUIMICAS  
(BIOQUIMICA)

PRESENTA LA ALUMNA

ELIZABETH CHACON BACA.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Agosto 1994.



## **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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA  
DIRECCIÓN.

LIC. ANTONIO DIAZ GARCIA.  
JEFE DE LA UNIDAD DE  
REGISTRO E INFORMACION.  
CIUDAD UNIVERSITARIA.  
P R E S E N T E .

Me es grato informarle que la alumna, **ELIZABETH CHACON BACA**, presentará próximamente su Examen para obtener el grado de Maestra en Ciencias Químicas (Bioquímica), ante el siguiente jurado:

Presidente:	Dra. Victoria Chagoya.
Primer Vocal:	Dr. Julio Morán Andrade.
Secretario:	Dr. Fernando Montiel.
Primer Suplente:	Dra. Elvira Galarraga Palacio.
Segundo Suplente:	Dr. Roberto Sánchez Olea.

A T E N T A M E N T E .  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Ciudad Universitaria, D.F., a 16 de Febrero de 1994.

DR. ANDONI GARRITZ RUIZ.  
DIRECTOR.

C.c.p. Interesado.  
C.c.p. Integrantes del Jurado.  
C.c.p. Coordinador de Area.

# INDICE

## INTRODUCCION

La Membrana Celular.....	5
Transporte a través de la Membrana Celular.....	5
Transporte pasivo.....	6
Difusión Facilitada.....	8
Transporte Activo.....	9
Regulación del Volumen Celular.....	10
Mecanismo Celular de la Regulación del Volumen.....	11
El Decremento Regulatorio del Volumen Celular.....	13
Salida de Osmolitos Inorgánicos.....	15
Participación de Osmolitos Orgánicos.....	17
Cambios del Volumen en el Tejido Cerebral.....	21

## OBJETIVOS.

Objetivo General.....	26
Objetivos Específicos.....	26

## MATERIAL Y METODOS.

Cultivo Celular y Medio de Incubación.....	27
Cuantificación del Volumen Celular.....	29
Soluciones.....	30

RESULTADOS.....	31
-----------------	----

DISCUSION GENERAL.....	41
------------------------	----

CONCLUSIONES.....	51
-------------------	----

BIBLIOGRAFIA.....	52
-------------------	----

# I N T R O D U C C I O N .

## La Membrana Celular.

Todas las células de los organismos están delimitadas en su superficie por una membrana plasmática, mientras que el citosol está surcado por membranas del retículo endoplásmico, de tal manera que el volumen celular total está dividido en el citosol y la fase intersticial o luminal (Scheeler, 1990). La membrana celular participa activamente en el intercambio de material entre el citosol y su medio ambiente.

La imagen actual de la membrana como estructura integral se aproxima a un mosaico fluido de lípidos y proteínas (Mathews, et. al., 1990). De acuerdo a un gran número de estudios bioquímicos y análisis de microscopía electrónica, éste es el modelo más consistente y el que mejor explica la estructura y función de la membrana y fue propuesto por S. J. Singer y G. Nicholson en 1981, según el cual en la bicapa lipídica las proteínas y los lípidos de la membrana están distribuidos asimétricamente en las caras interna y externa de la membrana. En muchos tipos celulares, las proteínas de la cara interna están ancladas por una red del citoesqueleto constituida por microtúbulos y filamentos. Muchas veces, estas proteínas de membrana pueden ser parte de transportadores o constituir complejos macromoleculares formando canales. Por otra parte, en la cara externa de la membrana hay cadenas de carbohidratos asociadas a proteínas y lípidos que juegan un papel importante en una gran diversidad de funciones, entre las cuales destacan el mantenimiento de la organización membranal, el transporte transmembranal y las propiedades antigénicas.

## Transporte a través de la Membrana Celular.

Las células son sistemas termodinámicamente abiertos, es decir, sistemas que intercambian energía y materia con el medio circundante. Las moléculas pueden ser transportadas a través de la membrana celular por varios mecanismos, entre los cuales destacan el transporte pasivo, la difusión facilitada, el transporte activo, y el transporte en masa (endocitosis). El comportamiento de una membrana celular en este aspecto

particular se ve influido por diversos factores, como son el que un determinado compuesto pueda preferentemente unirse a macromoléculas de una cara de la membrana más que otro; también es fundamental que el potencial eléctrico de la membrana no se altere, por lo que en el caso de transporte de moléculas cargadas, las translocaciones se acompañan de un ión de signo opuesto o de la expulsión de uno de igual carga. Por último, la existencia de procesos termodinámicamente favorables que están acoplados al transporte membranar, provoca que ciertas sustancias puedan ser transportadas hacia adentro de la célula o hacia afuera aún en contra de su gradiente de concentración. Se encuentra, por ejemplo, que la gran mayoría de los tipos celulares acarrearán iones de potasio hacia el interior al mismo tiempo que exportan iones de sodio al exterior, aún cuando la concentración de potasio en el interior es mucho más alta que en el fluido extracelular y que la concentración interna de sodio es mucho menor con respecto al exterior celular.

### **Transporte Pasivo de Sustancias a través de la Membrana.**

El transporte pasivo denota el movimiento de cualquier molécula a través de la membrana no asociado a una actividad metabólica o química. Este tránsito es regulado por el gradiente de concentración del soluto a través de la membrana y por la relación fisicoquímica entre la membrana y la sustancia adentro y afuera de la célula. Este proceso terminará cuando la concentración del soluto sea la misma a ambos lados de la membrana. Las membranas biológicas, en el caso de moléculas no cargadas, son selectivamente permeables. Las moléculas de agua están moviéndose continuamente hacia adentro y hacia afuera de la membrana plasmática sin que exista un movimiento neto de la misma. Cuando existe una diferencia de concentración de solutos entre el interior y el exterior de la célula, el flujo de agua puede ser mayor hacia una dirección, provocando que la célula se hinche o se encoja.

El agua se mueve de una región de baja concentración de solutos a una región de alta concentración de solutos para establecer un equilibrio (Morris, 1982). Este movimiento de agua (o de algún otro solvente) en respuesta a una gradiente de concentración de solutos se denomina ósmosis, mientras que el movimiento de

moléculas de soluto de una región de mayor concentración a una de menor concentración se denomina difusión. La fuerza propulsora que impulsa este volumen de agua, cuando es considerada como resultado de la diferencia de concentraciones de los solutos impermeables, se conoce como la presión osmótica y está dada por la diferencia de concentración de solutos impermeables, y por lo tanto, osmóticamente activos, en ambas caras de la membrana (Stein, 1990). La membrana celular es incapaz de resistir una diferencia de presión hidrostática entre el líquido extracelular y el intracelular (Macknight y Leaf, 1977), por lo que la osmolaridad entre los dos compartimientos debe de ser la misma. Esto ocurre en condiciones isosmóticas, donde el volumen celular permanece constante, lo que indica que tanto la tasa de entrada de solutos como la salida de estos, se encuentran en un equilibrio dinámico. Sin embargo, cuando las células son expuestas a condiciones anisosmóticas, el volumen celular sufre variaciones de acuerdo al gradiente osmótico recién formado. Al inicio de este proceso, la célula se comporta como si fuera un osmómetro perfecto, pero después se activan sistemas de transporte que movilizan solutos a través de la membrana y permiten que la osmolaridad intracelular se vuelva a alejar del equilibrio fisicoquímico al mismo tiempo que se restablece el volumen original.

La cantidad de solutos que se difunden de una región a otra depende del gradiente de concentración existente entre el ambiente celular externo e interno. Si el soluto es permeable a la membrana celular, ocurre la difusión en la dirección del gradiente de concentración. La capacidad de ciertas sustancias de permear a través de la membrana plasmática, está influida por diversos factores fisicoquímicos, como el coeficiente de distribución, el tamaño molecular, la carga, etc. Por ejemplo, los electrolitos entran más lentamente que los no electrolitos del mismo tamaño y los electrolitos fuertes entran más lentamente que los débiles; el pH además, influye en el grado de ionización, por lo que la permeabilidad de los iones es también una función del pH. Los iones monovalentes permearán más rápido que los divalentes. Su carga atrae moléculas de agua vecinas que se alinean alrededor del ión formando esferas de hidratación y entran o salen de la célula por canales específicos de la membrana celular.

La tasa de difusión para un soluto está dada por la ecuación de Fick, que expresa la base cuantitativa de la difusión:

$$dS/dt = DA \frac{C_1 - C_2}{\Delta x}$$

donde:

$dS/dt$  = Número de moles de soluto.

$D$  = Coeficiente de difusión

$A$  = Area transversal a través de la cual ocurre la difusión.

$C_1 - C_2$  = Gradiente de concentración

### Difusión Facilitada.

Para muchas sustancias permeables a la membrana, el movimiento mediado por la simple difusión es insuficiente para las necesidades funcionales y metabólicas de la célula, por lo que existe la necesidad de incrementar su tasa de transporte. Una gran variedad de compuestos como azúcares y aminoácidos, pasan a través de la membrana celular hacia el interior a una tasa más alta de la que sus características fisicoquímicas permitirían suponer; su movilización ocurre por medio de transportadores. Estos son proteínas de membrana o complejos proteicos que se unen específicamente al soluto que transportan cambiando de conformación al transportarlo. Estos transportadores muestran una cinética de saturación, es decir, la tasa del transporte pasivo se incrementa linealmente con la diferencia de concentración hasta alcanzar una concentración limitante, que es aquella en la que todos los sitios activos están ocupados. Exhiben, además, una cinética de inhibición competitiva por compuestos estructuralmente similares, así como una gran dependencia del pH. La función de los transportadores es también sensible a la fluidez de la membrana.

Los transportadores muestran un alto grado de especificidad respecto del soluto que translocan, distinguiendo, por ejemplo entre dos cationes monovalentes. Algunos

transportadores únicamente transfieren el soluto de una a otra cara de la membrana, y son denominados Uniportadores, como en el caso del transportador de glucosa en eritrocitos. Existen otros sistemas de transporte en los cuales la transferencia del soluto depende de la transferencia secuencial o simultánea de un segundo soluto en la misma dirección, lo cual se realiza por medio de simportadores, cotransportadores o acarreadores como es el caso del transporte de metabolitos acoplados a  $H^+$  o a  $Na^+$  en bacterias y en células animales. Estos cotransportadores o acarreadores transportan dos tipos de sustrato, generalmente un ión y otra molécula o ión que se unen simultáneamente al transportador antes de que ocurra el cambio conformacional. Cuando el sustrato impulsor es transportado en la dirección de su gradiente de concentración, arrastra consigo a otro sustrato que acarrea en contra de su gradiente de concentración (Harold, 1986).

Por otra parte, cuando ocurre un transporte acoplado de dos solutos en dirección opuesta, el mecanismo involucrado se realiza a través de antiportadores. Un ejemplo clásico de este tipo de transportadores es el intercambiador de  $Cl^-$  y  $HCO_3^-$ , esencial para la función del eritrocito. Esta proteína transportadora es altamente selectiva. Otro ejemplo de antiportadores es el caso de la bomba  $Na^+/K^+$ .

Cuando el soluto que va a ser transportado conlleva una carga neta, tanto el gradiente de concentración como el gradiente eléctrico total a través de la membrana (el potencial de membrana) participan en su movimiento de tal modo que éste es influenciado por el gradiente eléctrico.

### Transporte Activo.

En ciertas circunstancias, es imprescindible que la célula sea capaz de transportar sustancias aún en contra de su gradiente de concentración. Este tipo de movimiento se conoce como transporte activo. El transporte en contra de un gradiente requiere de una fuente de energía, generalmente proveniente de la hidrólisis del ATP, por medio de un acoplamiento transporte-hidrólisis. Un ejemplo de este tipo de transporte es la bomba de sodio-potasio, que es capaz de movilizar estos iones en condiciones de

gradiente muy desfavorables.

Hay otros tipos de transporte activo que no dependen directamente del ATP como fuente de energía, sino que emplean su hidrólisis indirectamente. En estos casos se aprovecha la energía libre almacenada en un gradiente electroquímico alejado de su equilibrio. Tal es el caso del sistema de cotransporte sodio-glucosa en el intestino delgado, y del cotransporte de sodio-aminoácidos, en los que el gradiente de sodio aporta la energía necesaria para el transporte. La gran mayoría de transportadores utiliza este sistema para la movilización de nutrientes.

### Regulación del Volumen Celular.

El mantenimiento del volumen celular es una propiedad vital en células animales, especialmente para especies acuáticas que están expuestas en forma natural a cambios bruscos en la osmolaridad externa (Pasantes-Morales, et. al., 1993). En contraste con los animales acuáticos, en los vertebrados terrestres las variaciones en el fluido extracelular y contenido de solutos son controlados por el sistema de regulación renal. La osmolaridad de los fluidos corporales de mamíferos es de aproximadamente 285 mOsm/l y se mantiene constante, mostrando sólo ligeras fluctuaciones que no exceden a un 3% de este valor (Hoffman y Simonsen, 1990).

Sin embargo, en todos los vertebrados terrestres estudiados y bajo condiciones fisiológicas, se sabe que ocurren pequeños cambios en el volumen celular por la acumulación intracelular de solutos, ya sea atraídos por moléculas cargadas en el citoplasma o durante el transporte de nutrientes. También existen ligeras variaciones en el volumen celular durante algunas otras funciones celulares, como son el crecimiento y la proliferación celular, y los procesos de secreción y de migración.

En algunas patologías, sin embargo, la osmolaridad del plasma puede oscilar entre 220 y 350 mOsm/l lo que resultaría, en ausencia de propiedades de regulación activa en un aumento del volumen que se aproxima al 20% o bien, en una disminución cercana al 30% respectivamente (Macknight, 1983, 1985). En el sistema nervioso se

presentan condiciones patológicas en las que hay alteraciones importantes en el volumen celular, como durante hiponatremia e hipernatremia, isquemia y en patologías que conducen al edema cerebral. Estos cambios del volumen, que son una respuesta típicamente osmótica, se ven contrarrestados por procesos activos de regulación que se inician casi inmediatamente después de que ocurre el cambio en el volumen celular.

La regulación del volumen celular por tanto, se define como el proceso por medio del cual la célula es capaz de restaurar su volumen a la normalidad subsecuentemente al hinchamiento o al encogimiento osmótico (Cala, 1990). Estos mecanismos de ajuste involucran la regulación de partículas osmóticamente activas denominadas osmoefectores. La regulación del volumen es una consecuencia del flujo neto de solutos y el flujo de agua osmóticamente obligada. El soluto que sirva como efector osmótico debe encontrarse en cantidades suficientes en la célula y debe de estar disponible para efectuar cambios en el volumen en la magnitud necesaria para restaurar el volumen original.

### **Mecanismo Celular de la Regulación del Volumen.**

Un gran número de tipos celulares en vertebrados son capaces de regular su volumen en un ambiente anisomótico, hinchándose o encogiéndose osmóticamente, pero vuelven a su volumen original aún con la persistencia de la condición anisomótica, es decir, son capaces de adaptarse a la nueva condición. Esta respuesta adaptativa fue caracterizada primeramente en el epitelio de rana, en eritrocitos nucleados y en líneas celulares de mamíferos (Hoffman, 1985). Posteriormente, se ha descrito la regulación del volumen celular en una amplia gama de tipos celulares.

Cuando las células son expuestas a medios de distinta osmolaridad (condiciones anisomóticas) modifican su volumen incrementándolo en soluciones hiposmóticas y reduciéndolo en condiciones hiperosmóticas. Estos cambios de volumen, que son una respuesta osmótica, se ven contrarrestados por procesos de regulación activos que se inician casi inmediatamente después de que ocurre el cambio en el volumen celular.

La regulación del volumen celular es un proceso complejo que involucra diferentes aspectos:

1. La célula debe ser capaz de detectar cambios en el volumen celular, es decir, deben existir sensores que perciban el grado de distensión de la membrana o que detecten cambios en la concentración de solutos o de alguna sustancia en particular.
2. La célula debe iniciar el proceso regulador que modifique el contenido intracelular de solutos, sin alterar otras funciones celulares.
3. Finalmente, la célula debe ser capaz de "recordar" su volumen original de nuevo y detener el proceso regulatorio cuando se alcance este volumen (Montrose, et. al., 1990).

Cuando las células son expuestas a condiciones hiperosmóticas, ocurre una disminución en el volumen celular, directamente relacionada con la magnitud del gradiente osmótico generado. Así, cuando las células sufren un choque hiperosmótico, el agua osmóticamente obligada sale de la célula, provocando una disminución en su volumen. Correspondientemente, ciertas células también tienen la habilidad de contrarrestar estos cambios en su osmolaridad para poder recuperar su volumen original, activando otros mecanismos de transporte que tienden a impulsar osmolitos hacia el interior celular y ésta capacidad de regulación en condiciones hiperosmóticas es lo que se conoce como *Incremento Regulador del Volumen (IRV)*.

Bajo condiciones hiposmóticas, por otra parte, las células sufren inicialmente un aumento rápido en el volumen celular debido a la entrada de agua, seguido de una fase de recuperación más lenta, durante la cual las células alcanzan un valor muy cercano al original. Este proceso es lo que se conoce como *Decremento Regulador del Volumen (DRV)*. Por medio de la expulsión de moléculas osmoefectoras se reduce la presión osmótica intracelular, y por consiguiente, el contenido de agua de las células.

Sin embargo, al parecer la recuperación de volumen en soluciones hiperosmóticas es menos frecuente que la regulación celular en condiciones hiposmóticas. La mayoría de las células animales expuestas a soluciones hiperosmóticas, se comportan como osmómetros perfectos, disminuyen rápidamente su volumen y no muestran un proceso de recuperación mientras permanezcan en condiciones de hiperosmolaridad.

La recuperación del volumen original después de un hinchamiento causado por la exposición a un medio hiposmótico, ha sido descrita en un gran número de tipos celulares de organismos terrestres: células epiteliales (Beck, et. al., 1988), células ascíticas de Ehrlich (Hoffmann, et. al., 1978), astrocitos en cultivo (Olson y Holtzman, 1982, Kimelberg, 1985, Pasantes-Morales, et. al., 1993), eritrocitos (Kregenow, 1981, Cala, 1983), células MDCK (Roy y Sauvé, 1987) y linfocitos humanos (Grinstein, et. al., 1982). A pesar de que hay ciertos tipos de células que no tienen esta capacidad de regulación al ser expuestas a un choque hiposmótico como las células del túbulo distal de ri n de *Amphiuma* (Guggino, et. al., 1985), en la mayoría de los linajes celulares estudiados hasta la fecha, se observa la existencia de este proceso. Por consiguiente, esta capacidad de regulación del volumen parece ser una característica que se ha conservado a todo lo largo de la escala filogenética sin importar el alto grado de especialización que ciertos tipos celulares han alcanzado, y que ciertamente en condiciones fisiológicas no estarán expuestos a cambios tan bruscos en su osmolaridad externa.

### El Decremento Regulador del Volumen Celular.

La respuesta se puede dividir en dos fases:

- A) Una fase inicial de hinchamiento osmótico, en la que las células se comportan como un osmómetro perfecto e incrementan su volumen en función del gradiente osmótico al que son sometidas.
- B) Una segunda fase, más prolongada de disminución del volumen celular o DRV,

cuya duración varía con el tipo de célula de que se trate.

Por los numerosos estudios realizados sobre el DRV, se ha puesto en evidencia que los osmoefectores involucrados pertenecen a dos grupos claramente discernibles: osmolitos inorgánicos y osmolitos orgánicos. Entre los primeros, los osmolitos de mayor importancia son los iones cloruro y potasio, que se expulsan con la subsecuente salida de agua (Everloff y Warnock, 1987), mientras que entre los osmolitos orgánicos de mayor importancia se encuentran la urea, los aminoácidos libres (Fincham, et. al., 1987, Pierce y Greenberg, 1972), los polialcoholes como el sorbitol (Siebens, y Spring, 1989) y el mio-inositol (Nakanishi, et. al., 1988), algunos azúcares y compuestos cuaternarios de amonio (Fugelli y Thoroed, 1986).

En la figura 1 se esquematizan los diferentes mecanismos de transporte que pueden ser activados durante el proceso de regulación del volumen en respuesta a un choque hiposmótico.

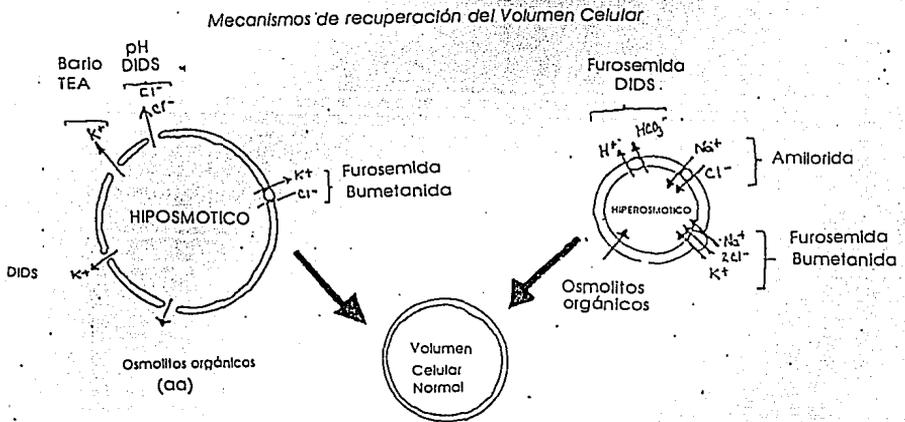


Figura 1. Mecanismos de transporte involucrados para la movilización de diferentes solutos y algunos fármacos que inhiben el funcionamiento de éstos durante la exposición a soluciones hiposmóticas e hiperosmóticas en una célula hipotética.

\* Tomada de Hoffmann, et. al., 1988.

## Salida de osmolitos inorgánicos durante el DRV.

La disminución en el contenido de potasio y de cloro intracelulares que se observa en células durante el DRV, implica que estos iones se liberan de la célula con agua osmótica. El mecanismo de expulsión depende del tipo celular. Por ejemplo, en eritrocitos de varias especies se ha descrito un sistema de cotransporte electroneutro  $K^+/Cl^-$  (Mayer, 1985) así como la activación acoplada de los intercambiadores  $K^+/H^+$  y  $Cl^-/HCO_3^-$ , como en el caso de los eritrocitos de Amphiuma, donde se ha observado que la salida de cloro y de potasio está mediada por la activación acoplada de los intercambiadores  $K^+/H^+$  y  $Cl^-/HCO_3^-$  (Cala, 1980; Kregenow, 1981). En túbulos proximales de riñón de ratón y de conejo, la salida de potasio está asociada con la expulsión de  $HCO_3^-$  y no de  $Cl^-$  durante el proceso de DRV (Volk y Lang, 1988). Las conductancias para cloro y potasio durante el DRV ocurren en diversos tipos celulares como en plaquetas, ascitos de Ehrlich, linfocitos, etc. El evento responsable de la pérdida de  $KCl$  y  $H_2O$ , es un aumento en la conductancia del  $Cl^-$  en la membrana.

En cuanto al cotransporte  $Cl^-/K^+$ , se ha implicado en la pérdida de  $KCl$  y  $H_2O$  de eritrocitos (Lauf, 1983) y esta vía es sensible al volumen. En el caso de eritrocitos de pato (Mayer, 1985; Lytle y Mamarios, 1987), cuando se hinchan, estas células exhiben movimientos netos de  $K^+$  y  $Cl^-$  mutuamente interdependientes y en una proporción fija uno a uno. Durante el proceso de DRV también están involucrados otros sistemas de cotransporte sensibles al SITS, a amilorida a bumetanida y a furosemida (Kimelberg y Frangakis, 1986).

La participación de vías electroconductoras (canales iónicos) en la salida de osmolitos inorgánicos es probablemente el mecanismo más generalizado para la expulsión de estos iones durante el DRV. Los canales iónicos son glicoproteínas que atraviesan la membrana gobernando el flujo iónico a través de ésta. La dirección y equilibrio eventual de este flujo está determinado no por el canal, sino por la fuerza electroquímica impulsora a través de la membrana. Algunos canales iónicos son altamente específicos, permitiendo el paso de determinados cationes únicamente, ya sea de sodio o de potasio, mientras que otros canales muestran una amplia

especificidad, permitiendo el paso de todos los cationes. El flujo de iones a través de los canales es pasivo, sin requerir de energía metabólica. Los canales están relativamente fijos en la membrana formando un poro hidrofílico que es estereoespecífico para su sustrato transportable.

Ciertos canales tienen la propiedad de poderse abrir y cerrar espontáneamente, mientras que otros se abren en respuesta a una señal eléctrica, química o mecánica; estos últimos son todas proteínas alostéricas, que tienen dos estados conformacionales relativamente estables y cada uno de ellos representa un estado funcional en la célula (Kandel, 1991). La apertura de este tipo de canales es transitoria en respuesta al reconocimiento del sustrato adecuado. Los canales se distinguen unos de otros de acuerdo a su selectividad iónica y a los factores que controlan su apertura. La selectividad iónica depende de la interacción fisicoquímica entre el ión y varios residuos de aminoácidos que delimitan la pared del canal iónico, mientras que la apertura de un canal depende de un cambio conformacional del canal en respuesta a un estímulo externo, incluyendo voltaje, unión de un ligando, estiramiento o presión. Esta propiedad de apertura que presentan algunos canales con una capacidad para transportar iones es la base de muchas interacciones neurona-neurona, neurona-músculo o neurona-glándula, y estas acciones dependen del potencial eléctrico de la membrana, donde la distribución adecuada de los iones es mantenida por la acción de bombas iónicas.

En condiciones hiposmóticas se ha demostrado en células de Ehrlich, que se produce la activación de canales iónicos selectivos para potasio y cloro en linfocitos humanos (Grinstein, et. al., 1984) y en la vejiga urinaria de Necturus (Larson y Spring, 1984).

En general, el mecanismo utilizado para expulsar  $Cl^-$  o  $K^+$  determina el curso temporal del DRV, que será más rápido cuando participan canales que cuando lo hacen los cotransportadores.

## Participación de los Osmolitos Orgánicos en el DRV.

Las células con propiedades de DRV poseen sistemas de movilización tanto de osmolitos orgánicos como inorgánicos, cuya actividad conjunta permiten la respuesta regulatoria. Sin embargo dependiendo del habitat del organismo o de la estirpe celular, uno u otro mecanismo puede ser preferencialmente utilizado. En las especies marinas por ejemplo, parece ser que los aminoácidos libres son los osmoefectores de mayor importancia, mientras que en células de mamíferos, la regulación inicial de volumen se logra predominantemente por la regulación de flujos iónicos a través de la membrana, aunque también hay una contribución de osmolitos orgánicos que complementan la respuesta regulatoria. En invertebrados, por el contrario, el DRV depende más de la salida de osmolitos orgánicos, aunque por supuesto los flujos iónicos complementan el proceso de DRV. Los aminoácidos como la glicina, taurina y alanina son los principales osmolitos liberados en este proceso en algunos moluscos. Quizás la mayor diferencia entre vertebrados e invertebrados en el DRV radique en el curso temporal de movilización de los osmolitos orgánicos e inorgánicos más que en la contribución relativa de cada uno de ellos.

Los tejidos excitables representan al parecer un caso particular, debido a que en estos los gradientes iónicos de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , juegan un papel crítico tanto en el mantenimiento del potencial eléctrico como durante la generación de señales propagadas, por lo que su movilización como osmolitos podría interferir con dichas propiedades. Es probablemente por ello, que en estos tejidos la movilización de osmolitos orgánicos como son los aminoácidos libres se vea favorecida.

La utilización de osmolitos orgánicos durante el DRV se encuentra ampliamente documentada en un gran número de preparaciones, incluyendo células de organismos acuáticos (Pierce y Politis, 1987) y terrestres (Pasantes-Morales y Schousboe, 1988). Entre estos osmolitos se encuentran aminoácidos libres principalmente, (Gulles, 1979) poliaminas (Yamauchi, et. al., 1992) y polialcoholes como el sorbitol (Siebens y Spring, 1989) y el inositol (Jackson y Strange, 1993). Los niveles intracelulares tanto de aminoácidos libres como de sorbitol e inositol se ven disminuidos en soluciones

hiposmóticas y se incrementan en condiciones de hiperosmolaridad. Esta disminución causada por un aumento en el volumen celular se acompaña de una liberación de estos compuestos en el medio de incubación (Pasantes-Morales, et. al., 1991), lo que demuestra que los aminoácidos no son metabolizados, sino que son movillizados hacia el exterior celular por algún sistema de transporte presente en la membrana que se activa en respuesta a la hiposmolaridad. También en células de la médula renal de conejo y de rata se han identificado cuatro osmolitos orgánicos: sorbitol, glicerofosfocolina (GPC), betaína y myo-inositol, que son liberados durante el proceso de DRV.

Una proporción alta de la poza intracelular de aminoácidos libres está compuesta de aminoácidos no esenciales como alanina, glicina y taurina y se ha visto que contribuyen al proceso de DRV, tanto en vertebrados como en invertebrados. Estudios realizados en células MDCK (línea derivada del riñón canino) sobre la regulación del volumen, han demostrado que los aminoácidos constituyen una poza de osmolitos muy importante en estas células, siendo su concentración total de aproximadamente 65 mOsm. Después de un choque hiposmótico, se encontró que este contenido de aminoácidos se redujo en un 50% en un periodo de diez minutos (Banderall y Roy, 1992). En células MDCK la liberación de aminoácidos endógenos sensible a volumen se inhibe en presencia de DIDS y quinidina (Sánchez-Olea, et. al., 1991); asimismo, la liberación de sorbitol e inositol también se inhibe al usar estos mismos fármacos (Siebens y Spring, 1992), lo que implica que el mecanismo de transporte puede ser una vía común a los diferentes tipos de osmolitos orgánicos (Sánchez-Olea, 1993). Cuando los linfocitos son incubados en soluciones hiposmóticas la concentración celular de aminoácidos libres se reduce drásticamente. La mayoría de los aminoácidos se libera en respuesta a soluciones hiposmóticas en relación directa con el grado de hiposmolaridad del medio de incubación si bien existen diferencias en cuanto a la sensibilidad del proceso para los diferentes aminoácidos.

Entre los aminoácidos que participan en el proceso regulador del volumen, la taurina presenta características de un osmoefector ideal (Pasantes-Morales, et. al., 1990a). La taurina no constituye parte de macromoléculas, es decir, siempre se le

encuentra en su forma libre. Con excepción de su conjugación con las sales biliares en el hígado, la taurina no es transformada químicamente ni participa en ninguna ruta metabólica (Jacobsen y Smith, 1968); es en este sentido inerte. Se presenta además en altas concentraciones en los tejidos, en el orden milimolar, y posee una distribución prácticamente ubicua en la escala zoológica. Su carácter de zwitterión la hace altamente impermeable a través de la membrana celular.

En todos los tipos celulares estudiados hasta ahora, la taurina junto con otros aminoácidos osmoefectores, es acumulada al interior celular por medio de un transportador saturable dependiente de sodio. No obstante, la participación de este acarreador en la liberación de taurina sensible a volumen parece improbable ya que la liberación de aminoácidos sensible al volumen es independiente de sodio y de temperatura, mientras que el transportador dejaría de ser funcional en estas condiciones (Pasantes-Morales, et. al., 1990). Por otra parte, al analizar la cinética de este transporte sobre la captura de taurina en astrocitos, se observó que el transportador no se activa cuando hay un aumento del volumen celular, sino que sólo hay una ligera reducción (Sánchez-Olea, et. al., 1991), resultante quizá de la depolarización que se ha reportado asociada al cambio de volumen en condiciones hiposmóticas (Kimelberg y Kettenmann, 1990). Los estudios encaminados al análisis de la cinética de transporte en neuronas, señalan que las características cinéticas ( $K_m$  y  $V_{max}$ ) del componente saturable de la captura que corresponde al que se lleva a cabo por el transportador, no se afectaron al exponer a las células a condiciones hiposmóticas y por consiguiente, a un hinchamiento celular pronunciado (Pasantes-Morales y Schousboe, 1988; Schousboe et. al., 1990). Estos resultados sugieren que el hinchamiento celular que induce la liberación de taurina no está mediado por el transporte de alta afinidad trabajando en dirección opuesta (de salida), lo cual es consistente con resultados derivados de experimentos realizados en astrocitos, donde el hinchamiento que induce la liberación de taurina es independiente de la presencia de sodio en el medio de incubación, mientras que el transportador de taurina y de otros aminoácidos es fuertemente dependiente de sodio. (Schousboe, et. al., 1982). También se ha observado que la liberación de taurina es insensible a ouabaina y a la temperatura (Pasantes-Morales, et. al., 1990b), condiciones ambas que inhiben el

transportador (Schousboe, et. al., 1976).

Además del transportador saturable de taurina, existe otro mecanismo que participa en la acumulación intracelular de este aminoácido, que es un componente difusional independiente de sodio y que ha sido descrito en diversas preparaciones, incluyendo neuronas (Schousboe, et. al., 1991) y astrocitos en cultivo (Schousboe, et. al., 1976; Larson et. al., 1986; Sánchez-Olea, et. al., 1991). A diferencia de lo observado para el componente saturable, un incremento en el volumen celular aumentó marcadamente la magnitud de este componente difusional. La demostración directa del carácter difusional del transporte de taurina durante el DRV proviene de experimentos en los que las células se exponen a concentraciones extracelulares crecientes de taurina, que en un momento excede la concentración intracelular, tanto en condiciones isosmóticas como hiposmóticas, y en un medio libre de sodio para inactivar al transportador saturable. Al activarse la vía de transporte en condiciones hiposmóticas se observa que la dirección y la magnitud de los flujos de taurina producidos por un aumento de volumen, se encuentran determinados por el gradiente de concentración para este aminoácido, ya que la célula libera o acumula taurina según la dirección del gradiente de concentración, lo cual es consistente con la presencia de un canal durante el DRV (Sánchez-Olea, et. al., 1991, 1993). La evidencia que sugiere la participación de una proteína en la liberación de aminoácidos sensible a volumen es que tanto en hepatocitos (Ballatory y Boyer, 1992) como en astrocitos, la salida de taurina se ve inhibida en presencia de N-etil-maleimida, compuesto que reacciona específicamente con los grupos sulfihídricos de las proteínas.

Respecto al papel del calcio durante el proceso de DRV, existen numerosos estudios a la fecha en los que se ha descrito que uno de los fenómenos primarios asociados con el incremento de volumen producido por condiciones hiposmóticas, es un aumento en los niveles de calcio intracelular (Cala, et. al., 1986). Para ciertos tipos celulares, ya ha quedado establecido el papel que juega el calcio directa ó indirectamente en el proceso de regulación del volumen celular (Pierce, et. al., 1990) donde las alteraciones en la concentración intracelular de calcio pueden cambiar los eflujos de  $K^+$  y de  $Cl^-$ . En muchos tipos celulares, las conductancias iónicas están

directamente reguladas por calcio (McCarty, et. al., 1992). No obstante, el mecanismo de la función de calcio puede diferir de un tipo celular a otro.

Hay sistemas que no dependen en absoluto de calcio extracelular durante el proceso de DRV, como es en el caso de las células MDCK (Banderali y Roy, 1992), y en astrocitos de rata en cultivo (Pasantes-Morales, et. al., 1993), mientras que en otros tipos celulares el estímulo hiposmótico induce incrementos en el calcio intracelular que a su vez pueden o no ser dependientes del calcio extracelular.

En algunas preparaciones celulares, la regulación del volumen se inhibe en un medio libre de calcio (Suzuki, et. al., 1990). También se ha encontrado la dependencia de calcio extracelular en los ascitos de Ehrlich (Christensen y Hoffmann, 1992), en las células del túbulo renal (Kanli, et. al., 1992) y en células epiteliales no pigmentarias (Civan, et. al., 1992). El sitio de acción del calcio, puede ser directamente los canales de potasio activados por calcio (Hazama y Okada, 1988), o bien mediante el sistema calcio-calmodulina (Pierce, et. al., 1989). En esta dirección, la participación de sistemas de segundos mensajeros durante el proceso de DRV apenas está siendo explorada. Los resultados realizados en esta dirección indican que la exposición a soluciones hiposmóticas induce un aumento en los niveles intracelulares de AMPc (Watson, 1990).

Recientes evidencias experimentales también señalan cambios en la estructura del citoesqueleto (Lechene, 1985) así como la participación de alguna proteína G en este proceso de regulación de volumen (Ziyadeh, et. al., 1992; Mills, et. al., 1994). Aunque se conoce muy poco sobre los sistemas de segundos mensajeros durante el proceso de DRV, es muy probable la participación de estos en la activación de las cascadas de transducción conocidas también se activen durante este proceso.

#### Antecedentes de la Regulación del Volumen Celular en el Tejido Cerebral.

Como ya se mencionó, la capacidad de responder activamente a los cambios en el volumen celular parece ser una característica generalizada de células animales

(Chamberline, 1989). A la fecha, existe suficiente evidencia experimental proveniente de estudios *in vivo* e *in vitro* para afirmar que en el tejido cerebral esta capacidad también está presente.

Actualmente se puede afirmar que hay una contribución importante de osmolitos orgánicos durante la regulación del volumen celular en el tejido nervioso. Entre éstos se encuentran diversos aminoácidos como la taurina y la glicina, por ejemplo. También hay movilización de ciertos polialcoholes como el inositol, el sorbitol y el manitol; aminas terciarias y azúcares (glucosa, manosa, sacarosa, etc). Lo que no se ha establecido con claridad es la contribución relativa de cada uno de estos osmolitos en el proceso integral de regulación, aunque puede variar dependiendo el tipo celular del que se trate.

La respuesta de células del tejido nervioso a hiposmolaridad por la liberación masiva de taurina se ha descrito en un gran variedad de preparaciones en estudios realizados *in vivo* e *in vitro*. También existe evidencia de que esta respuesta adaptativa en el cerebro involucra el aumento en las concentraciones intracelulares de aminoácidos libres, taurina principalmente.

Las primeras observaciones acerca de posibles alteraciones en el volumen celular en el tejido cerebral fueron realizadas por el grupo de Chan y Fishman, (1989). Los estudios realizados *in vivo* en cerebro de rata y ratón expuestos experimentalmente a cambios en la osmolaridad del plasma, han mostrado que ocurren cambios adaptativos en el tejido cerebral respecto al contenido de iones y de otros osmoefectores orgánicos, como ciertos aminoácidos libres.

En cerebro de mamíferos ha sido descrito que una condición de hiperosmolaridad produce una acumulación intracelular de diversos osmolitos orgánicos como inositol, betaina, glicerofosforilcolina y varios aminoácidos libres (Lohr, et. al., 1988; Lien, et. al., 1990).

Dentro de los estudios realizados *in vitro*, se ha demostrado que las altas concentraciones de KCl producen hinchamiento en un gran número de preparaciones, incluyendo rebanadas de cerebro (Moller, et. al., 1974), en retina (Pasantes-Morales, et. al., 1988), en terminales nerviosas aisladas (Kamino, et. al., 1973) y en astrocitos en cultivo (Waltz, 1987; Pasantes-Morales, et. al., 1993), lo cual desencadena una respuesta regulatoria del volumen. En esta misma dirección, se ha demostrado muy recientemente la existencia del proceso de DRV en astrocitos y neuronas (Pasantes, et. al., 1993).

Los estudios realizados en células cerebrales en cultivo han abierto una línea de investigación respecto al proceso de DRV en el tejido cerebral. Los resultados de éstas fueron derivados de experimentos realizados con alto potasio extracelular en medios hiposmóticos y con una concentración baja de cloro, en las que se ha demostrado que las células se hinchan y se depolarizan, que el alto potasio provoca la liberación de ciertos aminoácidos libres y que esta liberación de aminoácidos no depende de la despolarización y más bien obedece al hinchamiento (Pasantes-Morales, et. al., 1989, 1990, 1992). Estos estudios han enfatizado el papel de los aminoácidos libres en el DRV y representan la primera descripción del proceso en células del tejido cerebral aisladas.

Varias líneas de evidencia experimental han sugerido que la taurina juega un papel importante como osmoefector en el tejido cerebral (Pasantes-Morales y Schousboe, 1988, 1989; Wade, et. al., 1988; Martin, et. al., 1990; Kimelberg, et. al. 1990). Thurston, et. al. (1980), han demostrado que en el cerebro de ratón una condición de hipenatremia, que es un aumento en la concentración extracelular de NaCl, produce un aumento en la concentración de ciertos aminoácidos libres, principalmente de taurina. Las condiciones que provocan un aumento en el volumen celular en células granulares y en astrocitos provocan una notable liberación de taurina que bajo condiciones extremas pueden ser considerables ya que contribuyen hasta una pérdida del 80% de taurina endógena (Pasantes-Morales y Schousbe, 1989) sugiriendo que la poza de taurina es más sensible a la liberación que la de otros

aminoácidos libres.

Los astrocitos liberan taurina así como otros aminoácidos durante el proceso de DRV y esta movilización de osmolitos orgánicos internos tiene un curso temporal paralelo al proceso de regulación. También se ha demostrado que la liberación de taurina es muy sensible al cambio de volumen celular inducido por un choque hiposmótico. Por el contrario, la liberación de potasio se observa sólo cuando la osmolaridad externa es reducida en un 50% y se obtiene solo un 30% de liberación de la poza total de potasio. Cuando los astrocitos en cultivo son crecidos en condiciones de hiposmolaridad también responden a una acumulación intracelular de taurina. Por otra parte, los astrocitos no sólo acumulan taurina sino también otros aminoácidos libres cuando son crecidos en con un exceso de NaCl en el medio de cultivo; esta acumulación podría deberse al incremento en la osmolaridad como responsable de este proceso (Sanchez-Olea, et. al., 1992).

Otros estudios han demostrado que los astrocitos en cultivo crecidos en condiciones de hiperosmolaridad también responden con una acumulación intracelular de taurina (Olson y Goldfinger, 1990). En los astrocitos por lo tanto, los osmolitos orgánicos son se utilizan preferentemente a los osmolitos inorgánicos bajo condiciones hiposmóticas. Al estimular la liberación de aminoácidos por un aumento en el volumen celular se induce también la salida de sorbitol (Siebens y Springs, 1989) y de inositol (Jackson y Strange, 1993) lo que demuestra que existe una vía de transporte para estos osmolitos que se activa en condiciones de hiposmolaridad.

Por otra parte, estudios preliminares realizados in vitro en células granulares de cerebelo (Schousboe, et. al., 1990) han reportado que el contenido celular de aminoácidos es rico en glutamina, taurina, glicina y glutamato, y que el choque hiposmótico reduce el contenido intracelular de estas moléculas considerablemente. Así mismo, existe suficiente evidencia experimental que señala que la poza intracelular de taurina también disminuye al exponer a las neuronas a un choque hiposmótico y cuyo curso temporal de liberación es igual al curso temporal del proceso de DRV

(Pasantes-Morales, et. al., 1993). Durante la liberación de taurina se observa que reducciones en la osmolaridad del medio (15, 30 y 50%), producen incrementos progresivamente mayores en la liberación de taurina. Es importante notar, además, que el aminoácido es movilizado claramente con decrementos de sólo el 15% de la osmolaridad normal. En neuronas granulares en cultivo, los movimientos transmembranales de taurina sensibles a volumen se encuentran dirigidos únicamente por el gradiente de concentración del aminoácido y no parece involucrar el transportador dependiente de sodio.

Lo anterior sugiere que en el tejido nervioso podría favorecerse la utilización de osmolitos orgánicos sobre los inorgánicos durante el DRV. Esto encuentra un sustento lógico si se considera la participación crítica que los gradientes de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  juegan en el mantenimiento de la excitabilidad neuronal. La expulsión masiva de potasio o de cloro como osmolitos por una neurona hinchada alteraría ostensiblemente su potencial de membrana y el de sus células vecinas.

## OBJETIVOS.

### OBJETIVO GENERAL:

Caracterización de las vías de permeabilidad a través de las cuales ocurre el flujo de osmolitos durante el Decremento Regulatorio de Volumen (DRV) en neuronas en cultivo.

### Objetivos Específicos:

I Caracterización de algunas propiedades básicas del proceso de DRV en neuronas en cultivo:

- a) Dependencia del pH
- b) Dependencia de la temperatura
- c) Dependencia del calcio extracelular

II Caracterización farmacológica de las vías que movilizan a los osmolitos involucrados en el DRV.

- A) Osmolitos Inorgánicos.
- B) Osmolitos Orgánicos.

III Caracterización de las propiedades de permeabilidad de los osmolitos orgánicos e inorgánicos a través de las vías que se activan en condiciones hiposmóticas.

## MATERIAL Y METODOS.

### Cultivo celular y Medio de incubación.

Los experimentos se llevaron a cabo en cultivos primarios de neuronas de cerebelo de ratón, siguiendo la técnica descrita por Morán y Patel, (1990), y que brevemente se describe a continuación. Las suspensiones celulares se obtuvieron por disociación enzimática a partir del cerebelo de ratas Wistar de ocho días de edad. Estas células fueron sembradas a una densidad de 700 000 a 1000 000 células/ml de medio, en cajas de 60 mm de diámetro. El medio de cultivo estaba compuesto de medio basal Eagle suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco), glutamina [2 mM], 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin. Los cultivos se incubaron a 37°C en una atmósfera compuesta por 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire. La composición celular de los cultivos, se analizó inmunocitoquímicamente utilizando anticuerpos policlonales como marcadores específicos de neuronas, así como contra la proteína fibrilar glial como control negativo para valorar la población de astrocitos. Aproximadamente 20 horas después del sembrado, los cultivos se trataron con poli-L-lisina (5µg/ml) que se incubaron con citosina arabinosa (10 µg ) para inhibir la proliferación de células no neuronales (Morán, et. al., 1992).

Las células granulares fueron utilizadas de uno a tres días de edad in vitro para la medición de su volumen. Las neuronas estudiadas en éste trabajo son células granulares del cerebelo. Estas neuronas pueden ser mantenidas después de disociar el cerebelo, en un cultivo monocapa y puede lograrse que sean el tipo celular predominante. El cerebelo de rata contiene cerca de  $1.1 \times 10^8$  células granulares, cuyos cuerpos celulares de 5-6 µm de diámetro están empacadas en la capa granular (Burgoyne y Cambray-Deakin, 1988). En la rata, la mayoría de células granulares se desarrollan postnatalmente al dividirse las células de la capa externa germinal (EGL) la cual persiste hasta el día 21 después de nacidas.

Bajo estas condiciones, se obtienen cultivos compuestos aproximadamente en un 90% por neuronas granulares, cuya apariencia general se muestra en la figura 2.

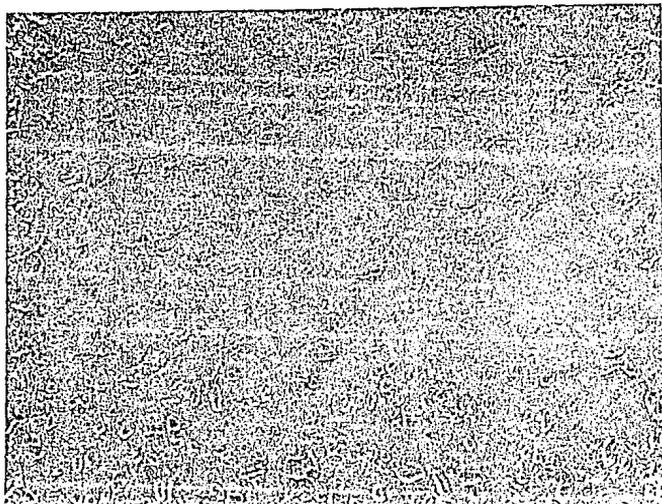


Figura 2. Aspecto morfológico de las células granulares en cultivo de 2-4 días de edad, después que han sido tratadas como se especifica en la Metodología.

## Cuantificación del Volumen Celular.

Las medidas del volumen celular fueron llevadas a cabo utilizando un contador electrónico. El equipo utilizado consiste de un contador de células Coulter Counter modelo ZF acoplado a un analizador de partículas Coulter Chanalyzer 256. Esta técnica consiste en hacer pasar a través de un orificio de  $100\mu\text{m}$  de diámetro, una suspensión de células junto con una corriente eléctrica. De este modo, se produce un cambio en la impedancia determinado por el volumen de las células. Este equipo proporciona información acerca de la distribución del espectro de volúmenes en una población celular y puede ser utilizado para estudios sobre la dinámica de cambios en el volumen inducidos osmóticamente.

Una alícuota de la suspensión fue diluída 500 veces con medio para dar una densidad final de 85 000 a 95 000 células/ml . El volumen celular promedio (en unidades arbitrarias) se calculó como la mediana de las curvas de distribución de volumen celular. El volumen celular absoluto se obtuvo utilizando microesferas de latex de poliestireno de  $19.64\mu\text{m}$  y  $12.9\mu\text{m}$  como estándares. Las partículas a medir son suspendidas en una solución electrolítica y son conducidas a través de una apertura de 100 micrómetros de diámetro en una barrera aislante que separa dos electrodos, entre los cuales existe una corriente eléctrica . Cuando una célula ó cualquier otra partícula pasa por ésta apertura, se incrementa la impedancia momentáneamente entre los electrodos y este cambio es detectado como un pulso de voltaje proporcional en amplitud al volumen de la partícula . Una bomba de vacío y un manómetro de mercurio proveen la diferencia de presión a través de la apertura. Las variaciones en el patrón de pulsos dan información acerca del tamaño y la abundancia de partículas. Unido al contador de partículas se encuentra el analizador (C256) que recibe y analiza los pulsos provenientes del contador. Estos pulsos son digitalizados. Para medir el volumen, las células son lavadas dos veces con un buffer de fosfatos salino (PBS) y se tripsinizaron con una solución de tripsina al 0.1 %. Después de éste procedimiento, la suspensión es centrifugada durante tres minutos a 15 000 rpm.

## Soluciones.

El medio KREBS-Hepes normal isosmótico (320 mOsm/l) tiene la composición siguiente (en mM): NaCl: 135; KCl: 5; CaCl<sub>2</sub>: 1; MgSO<sub>4</sub>: 1.17; HEPES: 10; glucosa: 1; pH = 7.4. La osmolaridad se verificó rutinariamente con un osmómetro de punto de congelación. El pH de las soluciones y condiciones experimentales fue de 7.4 en todos los casos (excepto cuando la variable a examinar fue ésta). El medio hiposmótico utilizado fue al 50% de la osmolaridad normal, i. e., de 150 mOsm.

Las soluciones hiposmóticas fueron preparadas reduciendo la concentración de NaCl. Para los experimentos de remplazamiento de cationes, se sustituyeron 60 mM de NaCl por concentraciones equimolares de sales de cloro a evaluar. En el caso de remplazamiento de aniones, el NaCl se sustituyó por distintas sales de sodio.

En los experimentos diseñados para valorar la dependencia de calcio, se omitió el CaCl<sub>2</sub> y el medio fue suplementado con 0.5 mM de EGTA. En los experimentos en los que se examinó el efecto de furosemida, bumetamida, DIDS (4,4-diisotiocianostilbenceno-2,2 -disulfonato), quinidina y dipiridamol, las células fueron preincubadas cinco minutos en medio isosmótico con la droga y los cambios en el volumen se midieron en presencia de ésta. Las células control se trataron en paralelo.

Para los experimentos del efecto de aminoácidos sobre el DRV, el NaCl fue sustituido por concentraciones equimolares de los diferentes aminoácidos utilizados.

# RESULTADOS.

## 4.1 Efecto del choque hiposmótico en el proceso de DRV de neuronas en cultivo.

### 4.1.1 Curso Temporal del proceso de DRV.

El volumen celular promedio de las neuronas en cultivo en un medio isosmótico fue aproximadamente de  $0.23 \text{ pl} + 0.012$  ( $n = 20$ ). En la figura 3 se aprecia el curso temporal del proceso de DRV en neuronas en cultivo, cuando éstas fueron sometidas a un estímulo hiposmótico de 50%, 70% y 85% por la reducción en la concentración de NaCl extracelular, equivalente a una osmolaridad externa de [160 mOsm], [220 mOsm] y [272 mOsm], respectivamente.

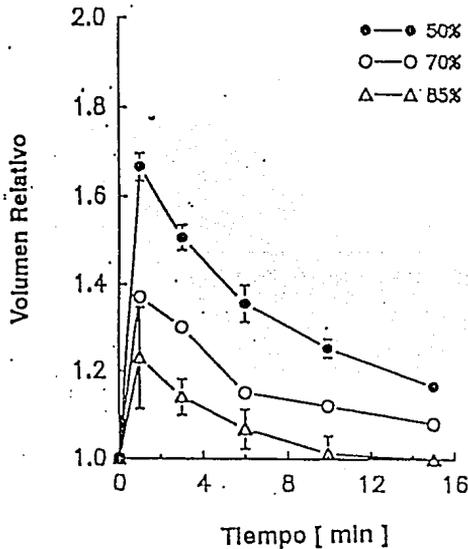


Figura 3. Regulación de volumen en neuronas mantenidas en condiciones hiposmóticas. Las neuronas granulares de cerebelo se cultivaron en cajas de Petri de 60 mm de diámetro como se indica en la sección de Métodos. Después de 2-4 días in vitro, las células se separaron enzimáticamente en un medio sin calcio y se resuspendieron en medio Krebs-HEPES isosmótico (320 mOsm). Inmediatamente después la suspensión se diluyó 100 veces con medio isosmótico ó hiposmótico y se midió el volumen celular a los tiempos indicados. Los resultados se expresan como volumen relativo considerando al volumen celular en condiciones isosmóticas como 1. Los valores son el promedio de 4-8 experimentos + E.E. Cuando el error estándar no se muestra es menor que el tamaño de los símbolos.

Como se puede observar, en el primer minuto se observa un claro incremento del volumen celular de un 25% respecto al volumen en condiciones isosmóticas, que es máximo entre los 30 y los 60 segundos después de la exposición al medio hiposmótico. Inmediatamente después se inicia el proceso de regulación en el que esta rápida fase de hinchamiento es seguida por una respuesta regulatoria activa que tiende a restablecer el volumen original.

Una reducción del 15% en la osmolaridad externa produce un aumento de aproximadamente el 23% en el volumen celular en condiciones isosmóticas y después de 15 minutos la célula recupera su volumen a un valor cercano al original. Después de este tiempo, no se observó ninguna reducción significativa en el volumen celular.

Cuando la osmolaridad externa fue de un 70%, lo que se observa es que el curso temporal del proceso de DRV es más pronunciado, provocando un aumento del 40% aproximadamente en el volumen celular, y después de 15 minutos el volumen celular se recupera gradualmente hasta en un 30%.

Finalmente, cuando la osmolaridad externa es del 50% con respecto al isosmótico la respuesta se amplifica aún más, provocando un aumento mayor al 65% con respecto al volumen celular en condiciones isosmóticas. Es decir, la activación del proceso de regulación es directamente proporcional al estímulo hiposmótico infringido. Un análisis más detallado permite observar que la fase regulatoria muestra dos componentes, una tasa rápida de pérdida de agua y luego una fase más lenta en la cual el volumen disminuye aproximadamente hasta un 40% a partir del minuto 5. Sin embargo, el proceso de DRV no restaura al 100% el volumen celular original.

#### 4.1.2 Regulación del volumen celular a diferentes valores de pH.

En la figura 4 se aprecia la regulación del volumen celular a diferentes valores de pH extracelular. El proceso de DRV se modificó sólo ligeramente al cambiar el pH del medio externo, con una tendencia a ser más eficiente en pHs básicos. Al disminuir el pH de la solución hiposmótica de 7.4 a 6.0 se redujo ligeramente la eficiencia del proceso de DRV. A pHs más básicos, se puede observar que el proceso de regulación muestra una aceleración.

También se ha descrito en diversos tipos celulares de vertebrados esta tendencia hacia la alcalinidad, excepto para eritrocitos (Hoffman, 1988). Por otra parte, hay estudios recientes que también describen mecanismos reguladores para regresar a pHs básicos.

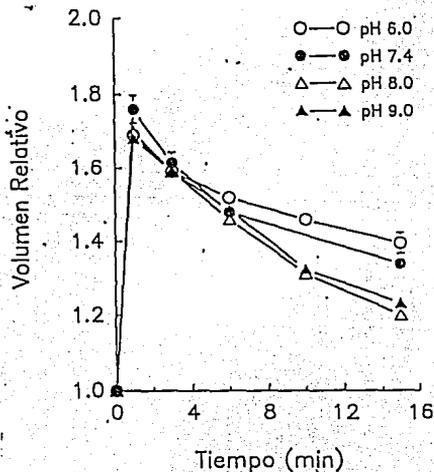


Figura 4. Efecto del pH sobre el DRV en células granulares. La regulación del volumen se midió en un medio hiposmótico 50% en los pHs indicados. Los resultados se expresan como volumen relativo considerando al volumen celular en condiciones isosmóticas como 1. Los valores son el promedio de 4/8 experimentos + E.E. Cuando el error estándar no se muestra es menor que el tamaño de los símbolos.

### 4.1.3 Regulación del Volumen Celular como función de la temperatura.

El efecto de la temperatura sobre el proceso de DRV en células granulares fue bifásico. Dentro del intervalo estudiado, se puede identificar que hay una marcada inhibición de la regulación de volumen entre los 10°- 18°C, con un incremento entre los 18°- 20°C, seguidos de una meseta entre los 20 y 30°C y un segundo incremento de los 30°- 40°C.

El proceso de regulación del volumen celular fue dependiente de la temperatura sólo en un intervalo que va de los 20 a los 30°C como se muestra en la figura 5.

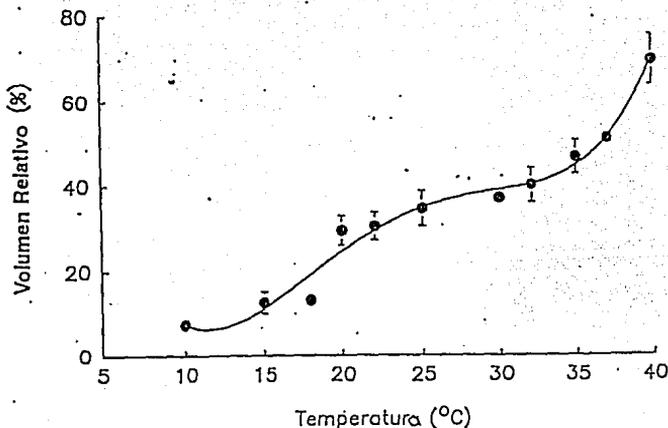


Figura 5. Efecto de la temperatura sobre el DRV en células granulares. La regulación del volumen se midió en un medio hiposmótico 50% a las temperaturas indicadas. Los resultados se expresan como volumen relativo considerando al volumen celular en condiciones isosmóticas como 1. Los valores son el promedio de 4/8 experimentos + E.E. Cuando el error estándar no se muestra es menor que el tamaño de los símbolos.

## **Flujos transmembranales de osmolitos inorgánicos: $K^+$ y $Cl^-$ durante el proceso de DRV.**

Los flujos transmembranales de los iones que participan en la regulación del volumen pueden tener lugar a través de dos mecanismos generales:

- i) Por medio de transportadores electroneutros
- ii) Por medio de canales electroconductores.

Para dilucidar si los flujos transmembranales activados por hinchamiento están mediados por un transportador o por un canal, tanto la selectividad iónica como la sensibilidad farmacológica a inhibidores específicos de transportadores y canales, fueron utilizadas como herramientas para discriminar entre ambas posibilidades.

### **Participación de los transportadores electroneutros en la movilización de $K^+$ y el $Cl^-$ .**

Para el  $K^+$  y el  $Cl^-$  han sido descritos esencialmente dos tipos de transportadores: los cotransportadores de  $K^+$ - $Cl^-$  sensibles a furosemida y a bumetanida y asociados a los mecanismos de regulación de volumen en algunas células (Hoffman y Simonsen, 1989), y el cotransportador de  $Na^+$ - $K^+$ - $Cl^-$ .

En general, estos transportadores comparten propiedades similares en cualquier tipo celular y se caracterizan principalmente por ser notablemente dependientes de la temperatura, del cloro y de energía. Las diferencias en la cinética del transporte de solutos y el efecto de los inhibidores con cierta especificidad permite discriminar entre un mecanismo de liberación de osmolitos mediado por transportadores y uno mediado por canales iónicos.

## Selectividad Iónica.

Los transportadores, como ya se mencionó, muestran una alta especificidad para el cloro, al contrario de lo que ocurre en los canales, cuya selectividad por el cloro puede ser comparativamente baja. Siguiendo este razonamiento, si durante el choque osmótico se expone a las células en un medio sin cloro extracelular, la modificación en el proceso de regulación será una medida de la función de los transportadores como mecanismo de movilización de potasio y cloro durante el DRV.

Los resultados de este estudio ilustrados en la Figura 6 mostraron claramente que en ausencia de cloro extracelular, no se afectó el proceso DRV en células granulares.

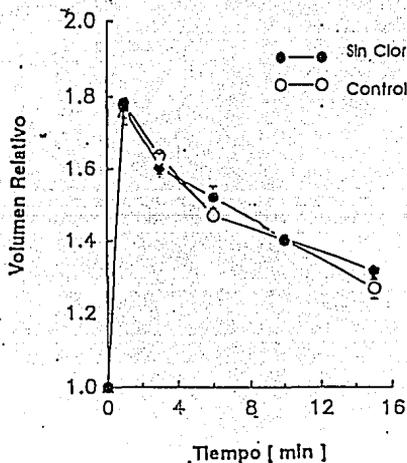


Figura 6. Efecto de la ausencia de cloro extracelular en la regulación de volumen en células granulares. La regulación de volumen se midió en un medio hiposmótico 50% en el que se reemplazó NaCl 60 mM por una concentración equimolar de NaCl 60 mM. Los resultados se expresan como volumen relativo considerando al volumen celular en condiciones isosmóticas como 1. Los valores son el promedio de 4-8 experimentos + E.E. Cuando el error estándar no se muestra es menor que el tamaño de los símbolos.

## Farmacología.

Otro enfoque experimental utilizado para examinar la participación de transportadores durante el DRV es el uso de inhibidores específicos. La bumetanida, que es un inhibidor muy selectivo del cotransportador, tampoco afectó el DRV a una concentración mayor de 50  $\mu\text{M}$  como puede observarse en la figura 7.

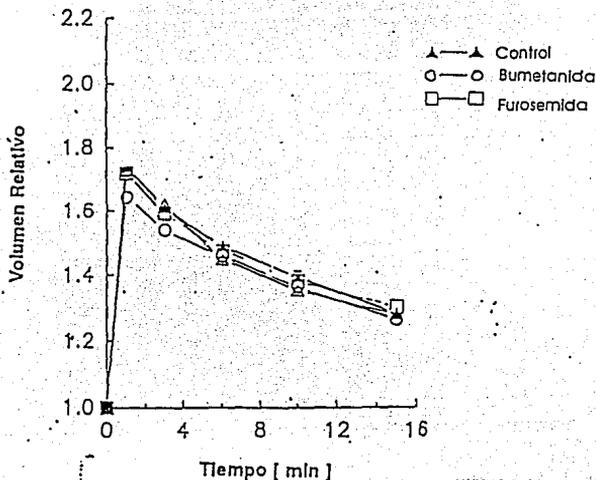


Figura 7. Efecto de la bumetanida y la furosemida en la regulación de volumen en células granulares. La regulación de volumen se midió como se describió en Material y Métodos. Los resultados se expresan como el porcentaje de recuperación del volumen celular entre el minuto 1 (volumen máximo) y el minuto 15. Los valores son el promedio  $\pm$  E.E. de 4-8 experimentos. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al control: \* $P < 0.01$ ; \*\* $P < 0.001$  (t de Student).

Estos resultados tampoco favorecen la participación del cotransportador durante el proceso de DRV. Por lo tanto, se consideró la posibilidad de que sea un tipo de canal iónico el que esté implicado en este proceso, para lo cual se examinó el efecto de inhibidores de estos canales sobre la regulación del volumen celular y el efecto de la gramicidina.

## Efecto de la Gramicidina.

La posibilidad de que los flujos de  $K^+$  y  $Cl^-$  activados durante la regulación del volumen ocurran a través de vías electrodifusivas independientes fue investigada utilizando el ionóforo catiónico gramicidina.

La gramicidina es un antibiótico que forma un canal a través de las membranas biológicas, específico para el transporte de cationes monovalentes como el  $Na^+$  y el  $K^+$ . Estos experimentos fueron llevados a cabo en medio hiposmótico que contenía colina, que es un catión impermeable, en vez de sodio extracelular, de modo que la gramicidina en estas condiciones incrementaría selectivamente los flujos de  $K^+$  en la dirección del gradiente de concentración.

La gráfica 8 muestra el efecto de la gramicidina en condiciones isosmóticas e hiposmóticas.

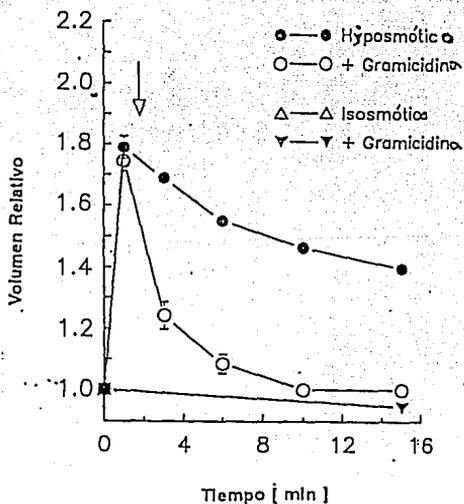


Figura 8. Efecto de la gramicidina sobre el DRV en células granulares. La regulación del volumen se midió en un medio hiposmótico 50% en el cual se agregó gramicidina. Los resultados se expresan como volumen relativo considerando al volumen celular en condiciones isosmóticas como 1. Los valores son el promedio de 4/8 experimentos + E.E. Cuando el error estándar no se muestra es menor que el tamaño de los símbolos.

Este experimento permite sacar varias conclusiones. Primeramente, se puede apreciar que en condiciones isosmóticas prácticamente no hubo modificación alguna en el volumen celular, es decir, cuando se abre una vía selectiva para el potasio, aparentemente no hay un aumento en el flujo del potasio. Este resultado puede interpretarse considerando que el eflujo de cloro está restringido en estas condiciones y aunque se provea una vía de expulsión específica para el potasio, no hay un movimiento neto en la dirección de su gradiente de concentración, ya que no puede movilizarse si no hay un flujo paralelo de cloro. Es posible que aún en presencia de la gramicidina el volumen celular no se modifique notablemente dado que el potasio tendería a salir sólo ligeramente ya que se encuentra muy cerca del equilibrio respecto al potencial de membrana.

Cuando las células son expuestas a un choque hiposmótico con gramicidina, lo que se observa es una marcada aceleración en el proceso de regulación del volumen celular, que va mucho más allá del control y que restaura el volumen celular en un 100%. Esta observación indica que a través de la vía catiónica abierta por la gramicidina en condiciones hiposmóticas hay una salida importante de potasio junto con el cloro, cuya permeabilidad ya no está limitada en estas condiciones.

Este efecto acelerador de la gramicidina en condiciones hiposmóticas sugiere que la vía abierta por hiposmolaridad produce un cambio notable en la permeabilidad de la membrana al cloro, lo cual, junto con lo observado en condiciones isosmóticas lleva a suponer que la permeabilidad al cloro en estas condiciones es relativamente baja y se ve drásticamente incrementada como consecuencia del hinchamiento celular, de tal forma que ahora el proceso de regulación depende de la velocidad con la que sale el potasio y el cloro sigue pasivamente al potasio.

Finalmente, es de notarse que esta observación también apoya la idea de que efectivamente los flujos correctores de los osmolitos  $K^+$  y  $Cl^-$  activados por hiposmolaridad ocurren a través de dos vías separadas pero interdependientes.

## Participación de vías electroconductoras en la movilización de $K^+$ y $Cl^-$ .

Los experimentos descritos a continuación estuvieron encaminados a examinar el efecto de inhibidores de canales de potasio y cloro, en vista de que los resultados anteriores apoyan la participación de vías electrodifusivas en la liberación de estos osmolitos inorgánicos.

### Efecto de inhibidores de canales de $K^+$ durante el proceso DVR.

Para examinar la participación de canales de potasio, se investigó la acción de antagonistas de estos canales durante el DRV. Estos fueron el TEA (tetraetilamonio), la 4AP (4-aminopiridina), y la quinidina, fármacos que inhiben canales de potasio activados por despolarización. También se investigó el efecto de los iones cesio y bario. En la figura 9 se puede observar que el TEA, el Cs, y el Ba no tuvieron ningún efecto inhibitorio sobre la regulación del volumen celular, mientras que la quinidina inhibió sólo ligeramente el proceso de DRV cuando fue utilizada a una concentración de  $600\mu M$ . La 4AP tuvo un efecto irregular incrementando ligeramente la eficacia del proceso de regulación.

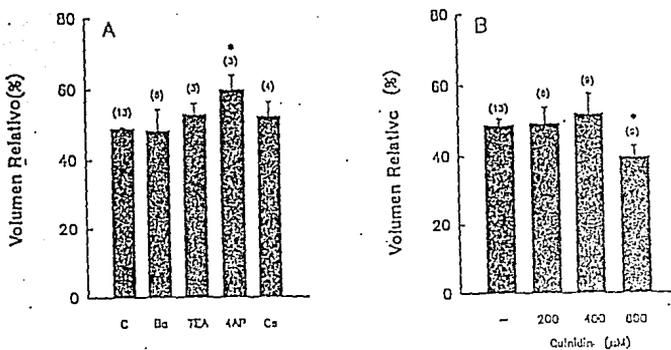


Figura 9. Efecto del bario, TEA, 4AP (A) y quinidina (B) en la regulación de volumen en células granulares. La regulación de volumen se midió en presencia de Ba  $[5mM]$ , TEA  $[1mM]$ , 4AP  $[1mM]$ , y quinidina a las concentraciones indicadas. Los resultados se expresan como volumen relativo considerando al volumen celular en condiciones isosmóticas como 1. Los valores son el promedio de 4-8 experimentos + E.E. Cuando el error estándar no se muestra es menor que el tamaño de los símbolos.

## Efecto de inhibidores de canales de Cl<sup>-</sup> durante el proceso de DRV.

El efecto de bloqueadores de canales de cloro sobre el proceso de DRV fue evaluado utilizando los siguientes inhibidores: DIDS, dipiridamol, ácido niflúmico, DPC y 9AC. En la figura 10 se observa el efecto de cada uno de estos inhibidores.

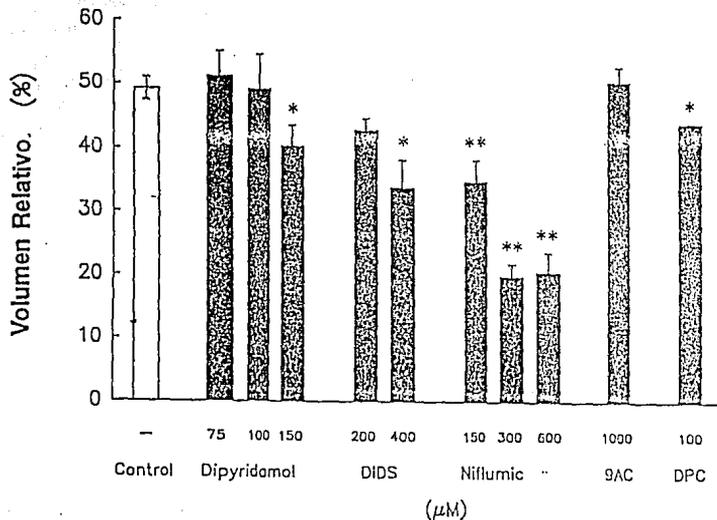


Figura 10. Efecto del dipiridamol, DIDS y ácido niflúmico en la regulación de volumen en células granulares. Los resultados se expresan como el porcentaje de recuperación del volumen celular entre el minuto 1 (volumen máximo) y el minuto 15. Los valores son el promedio + E.E. de 4-8 experimentos. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al control: \*P< 0.01; \*\*P<0.001 (t de Student).

El ácido niflúmico, el DIDS y el dipiridamol mostraron un efecto inhibitorio sobre el DRV. El ácido niflúmico fue el inhibidor más potente. La regulación del volumen celular se inhibió hasta en un 60% a una concentración de 300 μM. Los inhibidores 9AC y DPC no tuvieron efecto sobre la regulación.

## **Selectividad de las vías que movilizan a los osmolitos.**

### **Paradigma Experimental.**

Para estudiar el DRV en neuronas en cultivo, el paradigma experimental utilizado en el presente trabajo se basa en el carácter difusional de la liberación de osmolitos, en la que la dirección de flujos transmembranales activados durante el proceso regulador, está condicionada únicamente por el gradiente de concentración. Bajo estas condiciones, el paradigma experimental utilizado contiene las siguientes hipótesis de trabajo:

- A) Sustituyendo al potasio por diferentes cationes y al cloro por diferentes aniones, se puede investigar la especificidad de las vías de permeación del potasio y del cloro y su interdependencia durante el proceso de DRV.
- B) Si se aumenta la concentración de un ión permeable a esta vía por encima de la concentración intracelular en el momento de la activación de la vía por el aumento en el volumen celular, la entrada del compuesto permeable puede ser suficientemente rápida para compensar la salida de osmolitos y se observará una inhibición de la regulación. Si el soluto no es movilizado por esta vía entonces el DRV ocurrirá normalmente. La eficacia como inhibidor puede ser una medida de la permeabilidad del soluto examinado.
- C) Bajo las mismas premisas, es decir, considerando que los flujos de aminoácidos a través de la vía activada por un aumento en el volumen celular están determinados únicamente por el gradiente de concentración, se examinó el efecto de incrementar las concentraciones extracelulares de aminoácidos por encima de los niveles intracelulares sobre la recuperación del volumen a fin de determinar la selectividad del mecanismo de transporte activado por el cambio en volumen. Si el soluto de interés es capaz de utilizar esta vía activada por hiposmolaridad, entonces la pérdida de osmolitos internos se verá compensada por la entrada de este soluto y el DRV resultará inhibido.

## Selectividad de las vías que movilizan al $K^+$ y al $Cl^-$ .

Con objeto de investigar la selectividad de las vías electrodifusivas activadas por hiposmolaridad en la liberación de los osmólitos inorgánicos  $K^+$  y  $Cl^-$ , se estudió la permeabilidad a cationes y a aniones analizando el efecto de la sustitución de  $Na^+$  y  $Cl^-$  por diferentes cationes y aniones respectivamente, en medios hiposmóticos, sobre el DRV. Al reemplazar el sodio y el cloro por aniones y cationes que sean capaces de permear a través de esta vía activada por hiposmolaridad, la eficiencia del proceso regulador del volumen (DRV) disminuirá como consecuencia de la entrada de los iones que sean permeables al interior celular y que por lo tanto, contrarrestarán el eflujo de osmoefectores y de agua osmóticamente obligada.

### Permeabilidad a Cationes.

Para investigar la permeabilidad a cationes, todos los cationes examinados se utilizaron como sales de cloruro reemplazando al NaCl. La figura 11 muestra los resultados de estos experimentos.

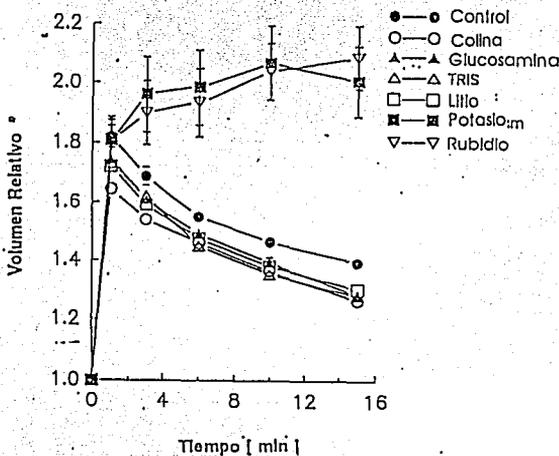


Figura 11. Efecto del reemplazo de cationes en la regulación de volumen en células granuláreas. La regulación de volumen se midió en un medio hiposmótico 50% en el que se reemplazó NaCl (60 mM) por una concentración equimolar de sales de cloruro de colina, glucosamina, TRIS, lilito, potasio o rubidio. Los resultados se expresan como volumen relativo considerando al volumen celular en condiciones isosmóticas como 1. Los valores son el promedio de 4-8 experimentos + E.E. Cuando el error estándar no se muestra es menor que el tamaño de los símbolos.

Como se puede observar, no hubo ningún efecto significativo sobre el proceso de DRV al remplazar el sodio por colina, glucosamina, TRIS ó litio. Sin embargo, cuando el sodio fue remplazado por potasio, se observa claramente una inhibición del proceso DVR al igual que con su análogo estructural, el rubidio (Rb). Estos resultados indican que los únicos cationes que son permeables a través de la vía dependiente de inositol son el K<sup>+</sup> y el Rb. Así, se puede decir que la vía es altamente específica para potasio.

### Permeabilidad a Aniones.

Los experimentos que se describen a continuación fueron realizados para evaluar la capacidad de otros aniones, además del cloro, de servir como los acompañantes del potasio durante la regulación del volumen celular. La permeabilidad de los diferentes aniones en esta vía se ilustra en la figura 12, cuyos resultados muestran que casi todos los aniones probados son permeables, (a excepción del gluconato y el tiocianato), y por lo tanto, son capaces de bloquear el proceso de DRV. El cloro parece ser el más permeable ya que no sólo bloquea el DRV sino que aún se observa un hinchamiento secundario.

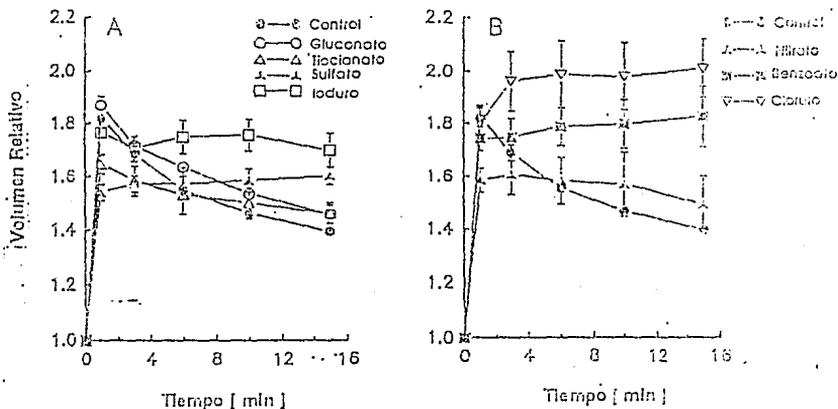


Figura 12. Efecto del remplazo de aniones en la regulación de volumen en células granulosas. La regulación de volumen se midió en un medio hiposmótico 50% en el que se remplazó NaCl (60 mM) por una concentración equimolar de sales de potasio de (A) gluconato, yoduro, benzoato ó cloruro (B). Los resultados se expresan como volumen relativo considerando al volumen celular en condiciones isosmóticas como 1. Los valores son el promedio de 4-6 experimentos  $\pm$  E.E. Cuando el error estándar no se muestra es menor que el tamaño de los símbolos.

## Selectividad de las vías que movilizan a los aminoácidos.

En esta serie de experimentos, también se investigó la permeabilidad de diversos aminoácidos a la vía activada por hinchamiento bajo el mismo modelo experimental utilizado para aniones y cationes. Esto se hizo analizando el efecto de concentraciones extracelulares crecientes de tres grupos de aminoácidos (neutros, ácidos y básicos) sobre el DRV cuando en un medio hiposmótico se abre la vía de permeabilidad a estos aminoácidos.

Los aminoácidos investigados fueron aminoácidos básicos: lisina y arginina; aminoácidos ácidos: ácido glutámico y ácido aspártico tanto como sales de potasio como de sodio, y aminoácidos neutros: glicina, alanina, taurina, glutamina y GABA a diferentes concentraciones extracelulares: 30 mM, 60 mM, 90 mM y 120 mM. En la figura 13 se resume el efecto de estos osmolitos sobre la regulación del volumen celular en este tipo celular, a una concentración de 90 mM.

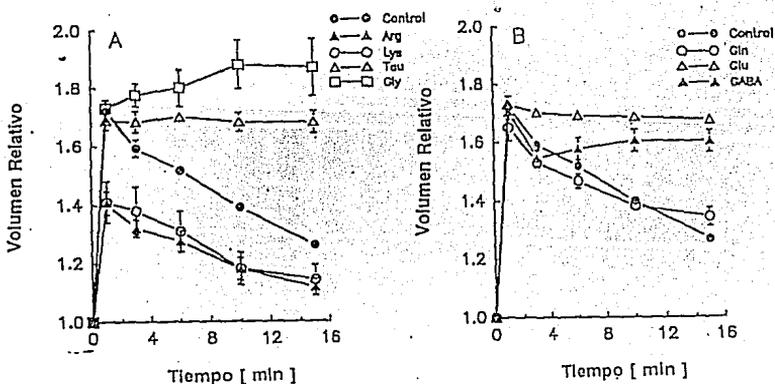


Figura 13. Efecto de los aminoácidos en la regulación de volumen en células granulares: La regulación de volumen se midió en un medio hiposmótico 50% conteniendo taurina, glicina, lisina, arginina (A), GABA, glutamina ó glutamato (B) en una concentración de 90 mM. Los medios isosmótico o hiposmótico se prepararon reemplazando el NaCl por concentraciones equimolares de los aminoácidos indicados. Los resultados se expresan como volumen relativo considerando al volumen celular en condiciones isosmóticas como 1. Los valores son el promedio de 4-8 experimentos + E.E. Cuando el error estandar no se muestra es menor que el tamaño de los símbolos.

La naturaleza difusional de los flujos de aminoácidos activados por hiposmolaridad se confirmó en esta serie de experimentos. Las características de permeabilidad de esta vía se pudieron determinar analizando su eficacia para bloquear la regulación del volumen celular. De este modo, las diferencias encontradas en la habilidad de cada aminoácido para bloquear el DRV reflejan su facilidad para entrar a la célula por esta vía abierta por hiposmolaridad.

Con objeto de evaluar la permeabilidad relativa de los aminoácidos, los experimentos se hicieron en presencia de cuatro concentraciones de estos: a 30 mM, 60 mM, 90 mM y 120 mM. Se considera que existe una relación indirectamente proporcional en la que una mayor regulación del volumen celular indicará una menor permeabilidad del aminoácido a la vía activada por hiposmolaridad. En el caso de los aminoácidos neutros los resultados obtenidos muestran que tanto la glicina como la taurina, seguidos de alanina, son los osmolitos más permeables en tanto que inhiben más el proceso DRV. Por otra parte, la glutamina fue la menos eficiente en bloquear la regulación del volumen celular. El curso temporal del DRV en presencia del GABA indica que este aminoácido no es muy eficiente para inhibir la regulación ya que la primera parte del proceso que es la más importante, no se afectó en presencia del GABA. No obstante, sí inhibió marcadamente en la segunda fase del proceso regulador. Estos resultados indican que en principio todos los aminoácidos neutros examinados son permeables por esta vía, y que el orden de permeabilidad es Gly > Tau > Ala > GABA.

Por otra parte, los aminoácidos básicos, lisina y arginina, no disminuyeron la eficiencia del proceso de DRV sino por el contrario, tuvieron un efecto notorio sobre el aumento del volumen celular, acelerando la respuesta regulatoria. Como se aprecia en la figura 13, cuando las células son expuestas a estos aminoácidos básicos no se hinchan igual que el control, lo cual podría indicar que posiblemente los aminoácidos son permeables en condiciones isosmóticas.

Finalmente, los aminoácidos ácidos bloquearon el proceso de DRV sólo cuando fueron utilizados como sales de potasio pero no tuvieron efecto como sales de sodio, resultado que confirma las observaciones de la figura 11, es decir, que la vía sólo es permeable al potasio y que en presencia de un ión impermeable como el sodio como catión acompañante, los aminoácidos ácidos (aniones) no pueden permear a través de la vía.

FALTA

PAGINA

47

## DISCUSION GENERAL.

Los resultados de este trabajo muestran que la regulación del volumen celular es una característica que se presenta en neuronas al igual que en la gran mayoría de tipos celulares estudiados hasta la fecha. Los procesos involucrados en el proceso de DRV en las neuronas, implican la activación de vías de permeabilidad transmembranal por medio de las cuales hay un flujo pasivo de osmolitos intracelulares tanto orgánicos como inorgánicos. Dentro de los osmolitos inorgánicos, el potasio y el cloro participan activamente, movilizándose en respuesta al incremento en el volumen celular, movilización que puede efectuarse a través de dos vías básicamente: a través de cotransportadores electroneutros o intercambiadores, o bien, a través de vías electrodifusivas o canales específicos para cada ión.

Las evidencias obtenidas en este trabajo en contra de la participación de los cotransportadores en el DRV incluye por una parte su insensibilidad a bumetanida y furosemida, que son dos inhibidores muy potentes del cotransportador  $K^+-Cl^-$ , y por otra, su independencia de cloro, una observación contraria a la rigurosa dependencia de este anión que caracteriza a los cotransportadores. Los resultados de este trabajo en conjunto señalan que los mecanismos básicos en el transporte transmembranal de iones asociados al proceso de DRV en neuronas implican la activación de canales. Los resultados experimentales que apuntan en esta dirección son esencialmente el curso temporal del proceso regulatorio, el efecto de la gramicidina y la sensibilidad farmacológica del fenómeno de regulación.

Se sabe que, en general, cuando los canales son los que están involucrados en el proceso regulatorio, su curso temporal es relativamente rápido, del orden de minutos, mientras que cuando los cotransportadores son los responsables de la regulación del volumen celular, el curso temporal dura varias horas (Cala, 1990). De acuerdo con esto, la duración del proceso de regulación del volumen es las neuronas observado en este trabajo, sugiere la participación de canales como mecanismo de movilización de los osmolitos.

La ausencia de un cambio en el volumen celular en presencia de gramicidina en condiciones isosmóticas indica que la permeabilidad al cloro esta restringida, ya que al inducirse la formación de un canal artificial con el ionóforo que provoca un flujo masivo de potasio, se esperaría una reducción en el volumen celular. Como esto no ocurre, se puede considerar que la permeabilidad al cloro es muy baja, lo que restringe la salida de potasio por ausencia de un ión acompañante. En cambio, en condiciones hiposmóticas el proceso de regulación de volumen se acelera muy notablemente en presencia de gramicidina lo que indica que en esta situación, la permeabilidad al cloro ha aumentado considerablemente, de tal manera que ahora la permeabilidad al potasio como catión acompañante, es el paso limitante de la velocidad de regulación de volumen celular. Al abrirse una vía alterna de permeabilidad al potasio con la gramicidina, el proceso de regulación se acelera.

En este trabajo se obtuvieron también resultados acerca de las características de permeabilidad de las vías catiónicas y aniónicas que se activan durante el DRV. Los datos muestran que la vía catiónica es altamente específica para el potasio (y el rubidio, aunque éste último es irrelevante fisiológicamente). Esto indica que la vía activada por hiposmolaridad es permeable exclusivamente al potasio, si bien es insensible a varios bloqueadores de canales de potasio utilizados. En otros tipos celulares, se sabe que el uso de inhibidores de canales de potasio tiene un notable efecto inhibitorio en la regulación del volumen celular (Hoffmann y Simonsen, 1990; Sánchez-Olea, et. al., 1993). Sin embargo, en células granulares el efecto de estos fármacos fue mucho menos potente sobre el proceso de DRV, aún cuando las concentraciones utilizadas fueron relativamente altas. Sólo la quinidina tuvo un ligero efecto inhibitorio sobre la regulación, hecho que haría suponer que los flujos de potasio ocurren a través de un canal insensible a las drogas utilizadas o que podría tratarse de un canal distinto a los ya caracterizados. También podría estar indicando que la permeabilidad al potasio no se activa ni cambia en este proceso, sino que el potasio sigue al cloro pasivamente. En este sentido, como ya se mencionó, el cambio en la permeabilidad membranal al cloro, sería un evento fundamental o primario en la regulación del volumen celular.

La vía aniónica resultó ser poco selectiva, contrastando con las características de la vía catiónica, ya que un gran número de aniones pueden pasar por esta vía y servir de ion acompañante del potasio. Los experimentos del remplazo de varios

aniones que sirvieron como ion acompañante del potasio, muestran que el orden de permeabilidad es el siguiente: Cloruro > Benzoato > Ioduro > Nitrato > Tiocionato = Sulfato. El gluconato es prácticamente impermeable, lo que confirma estudios anteriores en el sistema nervioso.

La vía aniónica, por otra parte, fue sensible a varios fármacos como el ácido niflúmico, el dipiridamol y el DIDS. Se sabe que éstos bloquean el intercambiador aniónico (Falke y Chan, 1986a-c). Es posible entonces que estas drogas estén actuando a nivel del componente de canal de cloro de algún tipo de intercambiador. No obstante, la participación de un intercambiador parece poco probable ya que en experimentos en los que se analiza el DRV reemplazando el cloro extracelular por otro anión impermeable, no se modifica el proceso regulatorio ni en magnitud ni en el curso temporal. La magnitud de la inhibición observada sugiere la participación de canales neuronales menos sensibles a las drogas comúnmente usadas como inhibidores de canales aniónicos o que hay otros mecanismos responsables del proceso DRV, ya que el efecto de estos fármacos no inhibió la regulación al 100%.

En cuanto al estudio de las características de la vía a través de la cual se movilizan ciertos osmolitos orgánicos como los aminoácidos, se confirmaron observaciones preliminares sobre el eflujo de aminoácidos durante DRV, donde se había señalado que esta respuesta de liberación de aminoácidos en condiciones hiposmóticas es por medio de una vía difusional en que la fuerza impulsora es únicamente el gradiente de concentración. La vía activada por hinchamiento presenta un amplio espectro de permeabilidad a los aminoácidos neutros y ácidos, pero que excluye a aminoácidos básicos. Los aminoácidos neutros con grupos R pequeños tienen mayor permeabilidad que los de grupo R mayores con el siguiente orden de permeabilidad: Gly > Tau > Ala > GABA. La inhibición por el ácido niflúmico, el DIDS, etc., sugiere que la vía de permeabilidad puede ser un canal de cloro. Estos aminoácidos son posiblemente los que se movilizan durante el proceso regulador del volumen y son los más permeables a través de la vía que se activa durante la regulación.

Es importante señalar que estos resultados se correlacionan directamente con los derivados de experimentos de liberación *in vitro* en los que se demuestra que existe un incremento en la salida de los aminoácidos en respuesta a hiposmolaridad, con un umbral de liberación correspondiente a las características de permeabilidad observadas en este estudio. Es decir, los aminoácidos que se liberan más fácilmente son los que

mostraron mayor permeabilidad a través de la vía que se abre durante el hinchamiento.

Igualmente se observa esta correlación en experimentos realizados in vivo, en los que una condición de hiponatremia induce la disminución de los niveles de los aminoácidos que son más permeables como la taurina el glutamato (Verbalis y Gullans, 1991; Sterns, et. al., 1993), en tanto que la glutamina, poco permeable, es menos reactiva como osmolito en esta condición a pesar de que esta presente en altas concentraciones.

Entre los osmolitos orgánicos, los aminoácidos pueden tener un papel muy importante en la regulación del volumen celular en las neuronas. En las neuronas granulares del cerebelo los aminoácidos libres que están presentes en concentraciones elevadas son el ácido glutámico, el ácido aspártico, la glutamina, la taurina, la glicina y la alanina, y en conjunto constituyen aproximadamente un 82-85% de la poza intracelular de aminoácidos libres totales, representando una concentración intracelular de 109 mM.

La función de los aminoácidos libres como osmolitos puede ser de particular importancia en las neuronas. Dado el papel fundamental que juegan ciertos iones inorgánicos como el potasio y el cloro en estas células, si las neuronas tienen esta capacidad de regular su volumen celular, resulta lógico pensar que la realicen a través de mecanismos que involucren la participación de osmolitos orgánicos preferentemente. Por ello, los aminoácidos libres cuya poza intracelular es relativamente alta, resultan ser buenos candidatos para ser considerados como moléculas osmoefectoras en células del tejido cerebral.

## CONCLUSIONES.

- 1) Las neuronas granulares del cerebelo en cultivo presentan un decremento regulador de volumen después de que su volumen ha aumentado por exposición a soluciones hiposmóticas.
- 2) En condiciones isosmóticas la permeabilidad al cloro de las neuronas es baja. Durante el DRV se incrementa notablemente y la permeabilidad al potasio se vuelve el factor limitante del proceso regulador.
- 3) Durante el proceso de DRV que exhiben las neuronas en cultivo, los flujos activados de potasio y cloro parecen ocurrir a través de canales iónicos y no de transportadores.
- 4) La vía catiónica que se activa durante el DRV es específica para el potasio. La vía aniónica es mucho menos específica, permitiendo el paso de aniones con el siguiente orden de permeabilidad: Cloruro > Benzoato > Ioduro > Nitrato > Tiocionato = Sulfato.
- 5) El movimiento transmembranal de aminoácidos sensible a volumen se encuentra dirigido por el gradiente de concentración únicamente del aminoácido que sirva como osmoefector.
- 6) El mecanismo de transporte que es activado por un aumento en el volumen celular permite la movilización de aminoácidos neutros y de aminoácidos ácidos. Esta vía no reconoce a aminoácidos básicos.
- 7) Los inhibidores de canales de cloro tienen un potente efecto inhibitor sobre el DRV.

**FALTA PAGINA**

**No. 53 a la 52**

## BIBLIOGRAFIA.

- Banderali, U., G. Roy, (1992)., Anion Channels for Aminoacids in MDCK cells., Am. J. Physiol. 32: C1200-C1207
- Ballatory, N., J.L. Boyer, (1992), taurine transport in skate hepatocytes II. Volume activation, energy, and sulfhydryl dependence. Am. J. Physiol.262:G451-G450.
- Bender, A.S., J. T., Neary, J. Blicharska, L.B., L.B. Norenberg, M.D., Norenberg, 1992. Role of calmodulin and Protein kinasa C in Astrocytic Cell Volume Regulation. J. Neurochem 58: 5
- Beck, F.K., A. Dörgue, K. Thurau, (1988)., Renal Physiol.Biochem.
- Cala, (1980), Volume regulation by Amphiuma red blood cells. J. Gen. physiol. 76:683-708.
- Cala, P.M., (1983), Cell volume regulation by Amphiuma red blood cells. J. Gen. Physiol. 76:683-708.
- Cala, P.M., (1986), Volume-sensitive alkali metal-H transport in Amphiuma red blood cells. Curr. Tpo. Membr. Transp. 26:79-99.
- Cala, P.M., 1990. Principles of Cell Volume Regulation, ion flux pathways and the roles of anions., en: Chloride channels and carriers in nerve, muscle, and glial cells. Plenum Press, New York, 67-83 pp.
- Cerr, H., M. De Pasquale, C. Patlak., R. Pullen., (1987), Regulation of Brain water and electrolytes during acute hiperosmolarity in rats. Am. J. Physiol. 253: f522-f529.
- Chamberline, M.E., y K. Strange., (1989), Amer.Physiol. Soc. C159-C172.
- Chann P.H. y R.A. Fishman, (1989), Brain. Res. 161:293-301.
- Christensen, O., (1987), Mediation of cell volume regulation by Ca influx through stretch-activated cannels, Nature 330: 66-68 pp.

Christensen, O., Homann (1992), Mediation of cell volume regulation by Ca influx through stretch-activated channels, *Nature* 330: 66-68

Deutsch, C., S. C. Lee, 1988. Cell volume regulation in lymphocytes. *Renal Physiol. Biochem* 3(5): 260-276 pp.

Everloff S. L., D. G. Warmock, (1987), Activation of ion transport systems during cell volume regulation. *Am. J. Physiol.* 252:F1-F10.

Fincham, D. A., M. W. Wolowyk, J.D. Young, (1987), *J. Membr. Biol.* 96:45-56.

Fugelli, K., S. M. Throed, (1986), Taurine transport associated with cell volume regulation in flounder erythrocytes under anisotonic conditions. *J. Physiol.* 374:245-261.

Gilles, R., (1988), Comparative aspects of Cell Osmoregulation and volume control. *Renal Physiol. Biochem* 3(5): 277-288 pp

Grinstein, S., A. Dupré, A. Rothstein, (1982), *J. Gen. Physiol.* 79:849-868.

Guggino, W.B., H. Oberleithner, G. Giebisch., (1985), *J. Gen. Physiol.* 86:31-58.

Gilles, (1979), Intracellular organic effector. En: Gilles R. (ed). *Mechanisms of osmoregulation in Animals.*, New York, J. Wiley., 111-154 pp.

Hazama, A., Y. Okada, (1988), *J. Physiol.* 402:687-702.

Hoffman, E. K., (1978), Regulation of Cell Volume by selective changes in the leak permeabilities of Ehrlich ascites tumor cells. En: Jørgensen, C.B., E. Skadhauge., (eds). Osmotic and Volume Regulation., Munksgaard, 397-417 pp.

Hoffmann, E.K., I.H. Lambert, (1983), Amino acid transport and cell volume regulation in Ehrlich ascites tumor cells., *J. Physiol.* 338: 613-625.

Hoffmann, E.K., C. Sjöholm, L.O. Simonsen., (1983), Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> cotransport in Ehrlich ascites tumor cells activated during volume regulation (RVI)., *J. Membr. Biol.* 76:269-280.

Hoffmann, E.K., L.O. Simonsen., I.H. Lambert., (1984), Volume-induced increase of K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> transport pathways in Ehrlich ascites tumor cells. *J. Membr. Biol.* 78:211-222.

- Hoffmann, E.K., L.O. Simonsen., I.H. Lambert., (1986), SDeperate, Ca<sup>++</sup> activated K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> transport pathways in Ehrlich ascites tumor cells. *J. membr. biol.* 91: 227-244.
- Hoffmann, E.K., (1990), Cell swelling and volume regulation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 70: 5310-5313.
- Hoffmann, E.K., L.O. Simonsen., (1989), Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells. *Physiol. Rev.* 69:315-382.
- Jacobsen, J. G., L. H. Smith., (1968), Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. *Physiol. Rev.* 48:424-511.
- Jackson, P., K. Strange, (1993), Role of volume-sensitive anion channels as a pathway for swelling-activated inositol and taurine efflux. *Am. J. Physiol.*, (en prensa )
- Kamino, K., K. Inouye, y A. Inouye., (1973), *Biochim. Biophys. Acta* 330:39-52.
- Kimelberg, H.K., H. Kettemann, (1990), Swelling-induced changes in electrophysiological properties of cultured astrocytes and oligodendrocytes. *Brain Res.* 529: 255-261.
- Kimelberg, H.K., M.V. Frangakis., (1985), Furosemide and Bumetanide-sensitive ion transport and volume control in primary astrocyte cultures from rat brain. *Brain Res.* 361:125-134.
- Kregenow, F.M., (1981), Osmoregulatory Salt transporting Mechanisms: Control of Cell Volume in Anisotonic Media. *Annu. Rev. Physiol.* 43:493-505.
- Lang, F., M. Paulmichl., H. Voelkl, E. Grinstein, F. Friedrich, (1987), Electrophysiology of cell volume regulation. En: Molecular Nephrology. Biochemical Aspects of Kidney Function. Kovacevic, Z., W. G. Guder (eds). Berlin de Gruyter, 133-139 pp.
- Larson, M., K.R. Spring, (1984), Volume regulation by Necturus gallbladder: basolateral KCl exit. *J. Membr. Biol.* 81:219-232.
- Larson, M., K.R. Spring, (1987), Volume regulation in epithelia. *Curr. Tpo. Membr Transp.* 30:105-123.

Lauf, P.K., (1982), Evidence for chloride dependent potassium and water transport induced by hyposmotic stress in erythrocytes of the marine teleost, Opsanus tau. J. Comp. Physiol. 146:9-16.

Lauf, P.K., (1983), Thiol-dependent passive K-Cl transport in sheep red cells. J. Membr. Biol. 73:247-256.

Lauf, P.K., (1985), On the relationship between volume and thiol stimulated potassium and cholo fluxes in red cells membranes. Mol. Physiol. 8:215-234.

Lechene, C., (1985), Biol. Cell., 55:177-180.

Lien, Y.H., J.L. Shapiro, L. Chan., (1990), Effects of hypernatremia on organic brain osmoles. J. Clin. Invest. 85: 1427-1435.

Lipton, P., (1973), Effects on membrane depolarization on light scattering by cerebral cortical slices. J. Physiol. 231:365-383.

Lohr, J.W., J. McReynolds, T. Grimaldi, M. Acara., (1988), Effect of acute and chronic hypernatremia on myo-inositol and sorbitol concentration in rat brain and kidney. Life Sci. 43: 271-278.

Lytle C., and T.J. McManus., (1987), Effect of loop diuretics and stilbene derivatives on swelling-induced K-Cl cotransport (Abstract). J. Gen. Physiol. 90:28a-29a.

Macknight, A.D.C. and A. Leaf, 1985, The kidney: Physiology and Pathophysiology, edited D.W. Seldin and G. Giebisch (eds). New York: Raven., 117-132pp.

Macknight, A.D.C., (1983), Volume regulation in mammals kidney cells. Mol. Physiol. 4:17-31.

Macknight, A.D.C., (1985), Cellular responses to extracellular osmolarity., en: Seldin, D.W., G. Giebisch., (eds). The Kidney Physiology and Pathophysiology, New York., Raven, 117-132 pp.

Mayer, M.L., (1985), A calcium-activated chloride current generates the after-depolarization of rat sensory neurones in cultures. J. Physiol. 364:217-239.

McCarthy, N.A. y R.G. O Neil., (1992), Calcium signaling in Cell Volume Regulation. *Physiological Reviews* 72(4): 1037-1061.

Mills, J.W., D. J. Skiest., (1984), Role of cyclic AMP and the cytoskeleton in volume control in MDCK cells. *Mol. Physiol.* 8:247-262.

Mills, J.W., 1987, The cell cytoskeleton: possible role in Volume Control. *Current Topics in membranes and transport*. En: *Cell Volume Control.*, R. Gilles, A. Kleinzeller, and L. Boris., Orlando, FL: Academic, 30:75-101 pp.

Moller, M., K. Mollgard, H. Lund-Andersen, y L. Hertz, (1974), Concordance between morphological and biochemical estimates of fluid spaces in rat brain cortex slides. *Exp. Brain Res.* 22:299-334.

Morán, J., y A.J. Patel, (1990), Stimulation of the N-methyl-D-aspartate receptor promotes biochemical estimates of fluid spaces in rat brain cortex slices. *Exp. Brain Res.* 22: 200-334.

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

Olson, J. E., M.D. Goldfinger, (1990), Amino acid content of rat cerebral astrocytes adapted to hyperosmotic medium in vitro. *J. Neurosci. res.* 27:241-246.

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

Pasantes-Morales, H. J. Morán, A. Schousboe., (1991a): Taurine release associated to cell swelling in the nervous system. En Pasantes-Morales, H., W. Shain, D. Martín, Martín del Río, (eds) *Functional Neurochemistry of Taurine*. New York: Alan R. Liss, Inc. 355-363 pp.

Pasantes-Morales, H., S. Alavez, R. Sánchez-Olea, J. Morán, (1991), *Neurochem. Res.* 18:445-452.

Pasantes-Morales, H., R.A. Murray., R. Sánchez-Olea, J. Morán, J. Neurosci. res. 34:219-224 pp.

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

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

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

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

Pierce, S. K., A. D. Politis, (1987), *Annu. Rev. Physiol.* 52:27-42.

Pierce, S.K., A.D. Politis, Jr.L.H. Smith, L.M. Rowland., (1988). A Ca<sup>++</sup> influx in response to hypo-osmotic stress may alter osmolyte permeability by a phenothiazine-sensitive mechanism. *Cell Calcium* 9:129-140.

Pierce, S. K., A. D. Politis, (1990), Ca<sup>++</sup>- activated cell volume recovery mechanisms. *Annu. Rev. Physiol.* 52:27-42.

Roy, G., R. Sauvé, (1987), Effect of anisosmotic media on volume, ion and amino acid content and membrane potential on kidney cells (MDCK) in culture. *J. Membr. Biol.* 100:83-96.

Sachs, F., (1991), Mechanical transduction by Membrane ion channels: a minireview., *Molec. Cell. Biochem.* 104: 57-60.

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

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

Sánchez-Olea, R., J. Morán, H. Pasantes-Morales, (1991), *J. Neurosci. Res.* 32:86-92.  
Sánchez-Olea, R., J. Morán, A. Martínez, H. Pasantes-Morales, (1993), *Am. J. Physiol.* 33:C836-C842.

Sánchez-Olea, R., H. Pasantes-Morales, A. Schousboe, (1993), *Neurochem. Res.* 18:147-152.

Sánchez-Olea, R., C. Peña, J. Morán, H. Pasantes-Morales, (1993), *Neurosci. Lett.* (en prensa).

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

Siebens, A. W., K. R. Spring, (1992), *Am. J. Physiol.* 257:F937-F946.

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

Schousboe, A., R. Sánchez-Olea, J. Morán, and H. Pasantes-Morales, (1976), *J. Neurosci. Res.* 30:661-665.

Schousboe, A., R. Sánchez-Olea, J. Morán, and H. Pasantes-Morales, (1982), *J. Neurosci. Res.* 30:661-665.

Schousboe, A., R. Sánchez-Olea, J. Morán, and H. Pasantes-Morales, (1990), *J. Neurosci. Res.* 30:661-665.

Schousboe, A., R. Sánchez-Olea, J. Morán, and H. Pasantes-Morales, (1991), Hyposmolarity-Induced Taurine Release in Cerebellar Granular Cells is Associated with Diffusion and Not with High-Affinity Transport. *Neurosci. Res.* 30:661-665.

Schousboe, A., H. Pasantes-Morales., (1992), Role of taurine in Neural Cell Volume Regulation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 70: S356-S361.

Scheeler, P. and D. E. Bianchi, 1990, *The Plasma Membrane.*, en: Cell Biology, Wiley & Sons, Inc., N.Y., 327-350 pp.

Stein, W.D., 1990. *Channel, Carriers and Pumps: An Introduction to Membrane Transport.* Academic Press, San Diego, CA.

Suzuki, M., K. Kawahara, A. Ogawa, T. Morita, Y. Kawaguchi, S. Kurihara, O. Sakai, (1990), *Am. J. Physiol.* 258:F690-F696.

Strange, K., R. Morrison., 1992, Role of intracellular calcium in renal proximal tubule cell volume regulation. *Am. J. Physiol.* 263 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 32): R1086-R1092.

Thurston, H. J., R. E. Hauhart, J.A. Dirco., (1980), Taurine: a role in osmotic regulation of mammalian brain and possible clinical significance. *Life Sci.* 26:1521-1568.

Volkl, H., F. Lang, (1988), Ionic requirements for regulatory cell volume decrease in renal straight proximal tubules. *Pfluegers Arch.* 412: 1-7.

Wade, J.V., J.P. Olson, F.E. Samson, S.R. Nelson, T.L. Pazdernick., (1988), A possible role for taurine in osmoregulation within the brain. *J. Neurochem* 51:740-745.

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

Watson, P.A., (1990), Direct stimulation of adenylate cyclase by mechanical forces in S49 mouse lymphoma cells during hyposmotic swelling. *J. Biol. Chem.* 265: 6569-6575.

Yamauchi, A., S. Uchida, H.M. Kwon, A.S. Preston, R.B. Robey A. García-Pérez., M.B. Burg, J.S. Handler., (1992), Cloning of a Na<sup>+</sup>- and Cl<sup>-</sup>-dependent betaine transporter that is regulated by hypertonicity. *J. Biol. Chem.* 267: 649-652.

Yancey, P.H., M.E. Clark, S.C. Hand, R.D. Bowles Somero., (1982), Living with water stress: Evolution of osmolyte Systems. *Science* 217:1214-1222.