

03062

15

2e)

---

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MEXICO

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

“SEÑALES DE TRANSDUCCION DEL CAMBIO EN EL VOLUMEN  
CELULAR EN NEURONAS DE RATA EN CULTIVO: EL PAPEL DEL  
CALCIO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

PRESENTA  
SANDRA MARGARITA MORALES MULIA

267084

DIRECTOR DE TESIS: DRA. HERMINIA PASANTES ORDOÑEZ

1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## AGRADECIMIENTOS

La investigación que se presenta en esta tesis se realizó en el laboratorio 202-sur del Departamento de Biofísica del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Herminia Pasantes Ordoñez, a quien agradezco profundamente su apoyo e interés en mi formación académica durante los últimos años.

Agradezco a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM, por otorgarme una beca nacional durante el período de estudios de Maestría. Así mismo como a su apoyo económico al proyecto IN 202094 ya que sin éste, el presente trabajo no hubiera sido posible.

Agradezco a los miembros del H. Jurado

Dra. Herminia Pasantes Ordoñez  
Dr. Mauricio Díaz Muñoz  
Dr. Carlos Rosales Ledezma  
Dr. Edmundo Chávez Cosío  
Dr. David García Díaz

Por sus atinadas sugerencias y críticos comentarios

## INDICE

IMPORTANCIA DEL VOLUMEN CELULAR.....	1
MANTENIMIENTO Y REGULACION DEL VOLUMEN CELULAR.....	4
Regulación crónica del volumen celular.....	4
Regulación aguda del volumen celular.....	7
MECANISMOS DE TRANSPORTE EN LA REGULACION DEL VOLUMEN.....	8
Decremento Regulator del Volumen (DRV).....	8
Osmolitos inorgánicos.....	9
Osmolitos orgánicos.....	10
IDENTIDAD MOLECULAR DE LAS VIAS DE MOVILIZACION DE LOS OSMOLITOS.....	11
SEÑALES QUE ACTIVAN LA LIBERACION DE OSMOLITOS.....	12
Participación del calcio como señal de transducción del cambio en el volumen celular.....	15
Participación del calcio en la regulación del volumen celular en células nerviosas.....	18
OBJETIVO GENERAL.....	20
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	20
MEDIDA DE $[Ca^{2+}]_i$ EN NEURONAS EN SUSPENSION.....	21
RESULTADOS (Células en suspensión).....	22
Cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por hiposmolaridad.....	22
Contribución de la liberación de $Ca^{2+}$ a partir de pozas endógenas.....	22
Artículo publicado	
DISCUSION.....	23
Participación del $Ca^{2+}$ extracelular.....	25
Liberación de $Ca^{2+}$ de almacenes intracelulares.....	28
CONCLUSIONES.....	32
REFERENCIAS.....	33

## RESUMEN

Las células granulares en cultivo tienen la capacidad de regular su volumen incrementado en condiciones hiposmóticas, mediante la activación de mecanismos de transporte transmembranal para la salida de osmolitos. En este trabajo se determinó que en las neuronas granulares de cerebelo de rata en cultivo, se presenta un incremento en la concentración de calcio citosólico (utilizando fura-2/AM) asociado con el aumento en volumen. Este incremento es el resultado tanto de la liberación de calcio a partir de almacenes intracelulares como de la entrada de calcio extracelular. Para investigar la posible participación del calcio como una señal de transducción en la regulación del volumen y la salida de  $^3\text{H}$ -taurina y  $^{125}\text{I}$ , se examinó el efecto de la omisión de calcio extracelular, de bloqueadores de canales de calcio ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$ , verapamil, diltiazem, dihidropiridinas) y de fármacos que inhiben la liberación de calcio de almacenes intracelulares (TMB-8, rianodina, dantroleno, BAPTA-AM), así como estrategias para depletar de calcio los almacenes intracelulares (ionomicina y tapsigargina). La regulación del volumen y los flujos de  $^3\text{H}$ -taurina y  $^{125}\text{I}$  no se afectaron con la omisión de calcio con EGTA. De los bloqueadores de canales de calcio sólo las dihidropiridinas: nimodipina y nitrendipina tuvieron efecto inhibitor importante que es independiente de calcio, tanto en la regulación del volumen como la liberación de ambos osmolitos. La depleción de almacenes intracelulares, así como los inhibidores de la liberación de calcio y el BAPTA-AM, no afectaron ni el proceso regulador ni los flujos de ambos osmolitos. Lo anterior indica que el calcio no tiene un papel importante como señal activadora de los mecanismos que subyacen a la regulación del volumen en células granulares de rata en cultivo.

## ABSTRACT

To investigate a possible role for  $\text{Ca}^{2+}$  as a transduction signal for regulatory volume decrease (RVD), the effects of external  $\text{Ca}^{2+}$  removal,  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockers ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$ , verapamil, diltiazem, dihydropyridines) and inhibitors of endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  release (dantrolene, ryanodine, TMB-8) were examined on RVD and on the swelling-activated efflux of two main osmolytes: Cl (traced by  $^{125}\text{I}$ ) and  $^3\text{H}$ -taurine. Omission of  $\text{Ca}^{2+}$  plus EGTA did not affect RVD or osmolyte release but when BAPTA was the chelator, RVD decreased 20%,  $^{25}\text{I}$  fluxes were unaffected and taurine stimulated efflux decreased (20%) while the basal efflux slightly increased (<10%). Verapamil, diltiazem,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{La}^{3+}$  and  $\text{Gd}^{3+}$  did not affect RVD or osmolyte fluxes. Nimodipine and nitrendipine (25-50  $\mu\text{M}$ ) markedly decreased RVD and osmolyte fluxes (>90%) through a mechanism independent of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . Swelling, elicited an increase in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  measured by fura-2, which was notably variable ranging 50-350 nM. However, RVD and osmolyte fluxes were not affected by the blockers of endogenous  $\text{Ca}^{2+}$  release dantrolene, ryanodine and TMB-8 or by the permeable  $\text{Ca}^{2+}$  chelator BAPTA-AM, even when the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  increase was abolished by the chelator. These results indicate that 1) RVD and osmolyte fluxes are independent of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  2) RVD, osmolyte release and cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  raise are only coincident events. Consequently,  $\text{Ca}^{2+}$  is unlikely to be a transducing signal for RVD in neurons.

---

---

## IMPORTANCIA DEL VOLUMEN CELULAR

La capacidad que tienen las células de mantener su volumen constante es una propiedad adaptativa fundamental para su sobrevivencia. La mayoría de las células están dotadas de mecanismos de transporte transmembranal de agua y solutos que les permiten mantener su volumen constante.

Simultáneamente a la evolución de las células se ha incrementado el requerimiento de la osmorregulación. Cualquier desbalance osmótico que no sea corregido podría ocasionar alteraciones en el volumen celular como resultado de la libre permeabilidad de la membrana plasmática al agua. La disminución o incremento en el volumen celular traerían como consecuencia alteraciones en la morfología celular, en el estado metabólico, en el contenido de agua y por lo tanto, en el estado de hidratación de macromoléculas, así como en la concentración de moléculas que forman parte de los mecanismos de señalización celular y comunicación intercelular (Foskett, 1994; Hallows y Knauf, 1994; Alvarez-Leefmman y Reuss, 1996).

Las células pueden hacer uso de varias estrategias para manejar el estrés osmótico: 1) los cambios osmóticos pueden ser ignorados por la presencia de una pared celular rígida como en las células vegetales, 2) pueden ser eludidos, como en el caso de ciertos moluscos al cerrar su concha ó 3) pueden ser regulados, por la modificación de la concentración intracelular de iones inorgánicos, compuestos orgánicos y el contenido de agua. Los organismos con paredes celulares, como las plantas y las bacterias, pueden ignorar cambios osmóticos dentro de cierto límite ya que la rigidez de la pared previene cambios en el volumen celular. Las paredes de celulosa de las células vegetales llegan a tolerar turgencias internas tan altas como 50 atmósferas. En cambio, las membranas de las células animales son frágiles y no pueden soportar una diferencia significativa en la presión hidrostática, por lo que, tienen que activar mecanismos de transporte de solutos intracelulares osmóticamente activos, que ayudan a contrarrestar los cambios en el volumen celular ocasionados por alteraciones en la osmolaridad del medio externo (Chamberlin y Strange, 1989; Pasantes-Morales *et al.*, 1990; Sarkadi y Parker, 1991).

---

---

Por otra parte, se ha considerado recientemente que el volumen celular tiene un papel importante como señal para el crecimiento y proliferación celular; en procesos de transporte de sustancias nutritivas como azúcares y aminoácidos, en funciones de secreción, en el movimiento de organelos intracelulares, y como una señal en mecanismos de inserción de proteínas membranales, canales, receptores y transportadores (McManus y Churchwell, 1994). En todas estas situaciones se generan microgradientes osmóticos que dan lugar a cambios locales y transitorios en el volumen celular.

En la clínica, el estudio de los procesos que intervienen en la regulación del volumen contribuye a la comprensión y mejor manejo de estados patológicos, por ejemplo, severas diarreas, deficiencias renales, diabetes mellitus e insipidus, diuresis osmótica con deshidratación, privación de agua y ciertos envenenamientos (como por etanol). La hipotonicidad del plasma, usualmente debido a hiponatremia, es clínicamente más frecuente que la hipertonicidad. La hiponatremia se presenta en circunstancias de malnutrición y cirrosis hepática. En el cerebro, el aumento en el volumen celular, particularmente de células gliales está asociado a numerosas neuropatologías, como son epilepsia, isquemia, traumatismos craneanos y encefalopatía hepática. El edema cerebral como circunstancia clínica, es una muy frecuente si se considera el número de patologías asociadas causalmente con él. El edema cerebral se presenta como complicación de una amplia variedad de padecimientos crónicos, principalmente en las insuficiencias renales, debido a las críticas funciones de absorción y excreción de agua y electrolitos de ese sistema. Otras causas son la diabetes insípida, en donde la ingesta de agua puede ser muy elevada y las insuficiencias hepática y cardíaca. Esta última al propiciar entre otros, episodios de hipoglucemia e hipoxia de documentadas propiedades edematogénicas. A estas causas de edema cerebral han de añadirse otras, que él mismo agrava y retroalimenta. Entre ellas están principalmente la anoxia, que puede presentarse como entidad aislada (p.e. en la asfixia), o lo que es más frecuente, como parte de la isquemia, como en las embolias o los accidentes vasculares cerebrales y aneurismas de causas diversas. Otros grupos de entidades clínicas con un componente edematogénico cerebral incluyen los traumatismos y diversas causas de muerte celular, como las infecciones y los tumores. Dada la restricción que impone la caja del cráneo a la



---

expansión del tejido cerebral, el edema que resulta de esta alteración en el volumen celular es en muchos casos, una complicación aún más grave que la propia patología que le dio origen. La causa directa de gravedad clínica es el incremento del volumen cerebral, lo cual, provoca un incremento casi inmediato de la presión interna. La compresión del tejido cerebral compromete a su vez la eficiencia de la irrigación sanguínea, dando lugar entre otros episodios de isquemia, luego muerte neuronal y daño permanente. Si el edema es generalizado y/o persistente puede sobrevenir la herniación del cerebro a través del *foramen magnum*, y la muerte por paro respiratorio cardíaco, por compresión y falla de los correspondientes centros autonómicos en el tallo cerebral (Quesada y Morales-Mulia, en proceso).

En el cerebro, el aumento del volumen celular puede representar un importante componente en la hiperexcitabilidad debido a la reducción del espacio extracelular como consecuencia del hinchamiento de los astrocitos causado por la actividad neuronal, promoviendo la excitación a través de efectos de campo (Saly y Andrew, 1993).

También en el cerebro, bajo condiciones isosmóticas las células pueden incrementar o disminuir su volumen por situaciones que modifiquen la concentración intracelular o extracelular de solutos. El primer caso, se da por ejemplo como consecuencia de la acumulación de  $K^+$  en los astrocitos o de iones inorgánicos a través de las membranas afectadas por lipoperoxidación en neuronas y en otros tipos celulares, o durante la acumulación de sorbitol en animales hiperglicémicos. El hinchamiento en ambos tipos celulares, neuronas y glia, durante la isquemia ocurre como consecuencia de la acción citotóxica del glutamato, lo cual conlleva a la acumulación de  $Na^+$ ,  $Cl^-$  y agua osmóticamente obligada (Goldberg y Choi, 1993). Bajo estas circunstancias, la muerte celular no se debe al hinchamiento *per se*, sino al incremento en los niveles de calcio citosólico asociado al efecto citotóxico del glutamato. La reducción en el volumen celular se observa en cuadros de deshidratación, en modificaciones en sangre de los niveles de hormona antidiurética, lo cual puede provocar cuadros clínicos de hipo o hipernatremia.

Es obvio, entonces, que un mejor conocimiento de los mecanismos responsables del mantenimiento del volumen celular del cerebro, puede llevar a un

---

manejo más racional de este tipo de secuelas e idealmente, al diseño de fármacos y procedimientos para prevenir dichas alteraciones en el volumen celular (Foskett, 1994).

## MANTENIMIENTO Y REGULACION DEL VOLUMEN CELULAR

*Regulación crónica del volumen celular.* El mantenimiento de un equilibrio dinámico en el volumen celular es crítico para la sobrevivencia y funcionamiento de todas las células ya que la dilución de moléculas importantes en el metabolismo y mecanismos de señalización celular puede llevar a alteraciones graves en su homeostasis. Las dos principales clases de solutos en una célula incluyen: 1) compuestos orgánicos (proteínas solubles) generalmente sintetizados dentro de la célula y que constituyen la mayor parte de las moléculas impermeables; y 2) pequeños solutos, orgánicos e inorgánicos, que pueden potencialmente permear a través de la membrana plasmática. Dado que el pH intracelular se mantiene a niveles ligeramente alcalinos (7.2-7.4) con respecto al punto isoeléctrico de la mayoría de las proteínas, éstas se encuentran como aniones polivalentes. Esto trae como consecuencia que la presión coloidosmótica intracelular sea mayor que la del líquido extracelular y como la membrana es permeable al agua y a pequeños solutos tales como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , si los iones y el agua se distribuyesen tal y como lo predice la teoría de Gibbs-Donnan, las células se hincharían en condiciones isosmóticas. De acuerdo a esta teoría, en el estado de equilibrio, la concentración total de solutos intracelulares debería ser mayor que la de los extracelulares, lo cual resultaría en una menor concentración de agua (o más exactamente en una disminución de su potencial químico) en el interior, con respecto al exterior celular. Este gradiente de concentración (o de potencial químico) del agua causaría un flujo osmótico neto de este solvente hacia el interior celular. Como la membrana de las células animales es distensible, cede ante pequeñas presiones hidrostáticas, por lo que el flujo osmótico neto de agua causaría un aumento de volumen y eventual lisis celular. Sin embargo, normalmente este aumento de volumen celular coloidosmótico no ocurre y las células mantienen niveles constantes de agua y solutos. Esto indica que aunque las células animales contienen aniones orgánicos impermeables, los iones inorgánicos permeables no están distribuidos de acuerdo con

---

manejo más racional de este tipo de secuelas e idealmente, al diseño de fármacos y procedimientos para prevenir dichas alteraciones en el volumen celular (Foskett, 1994).

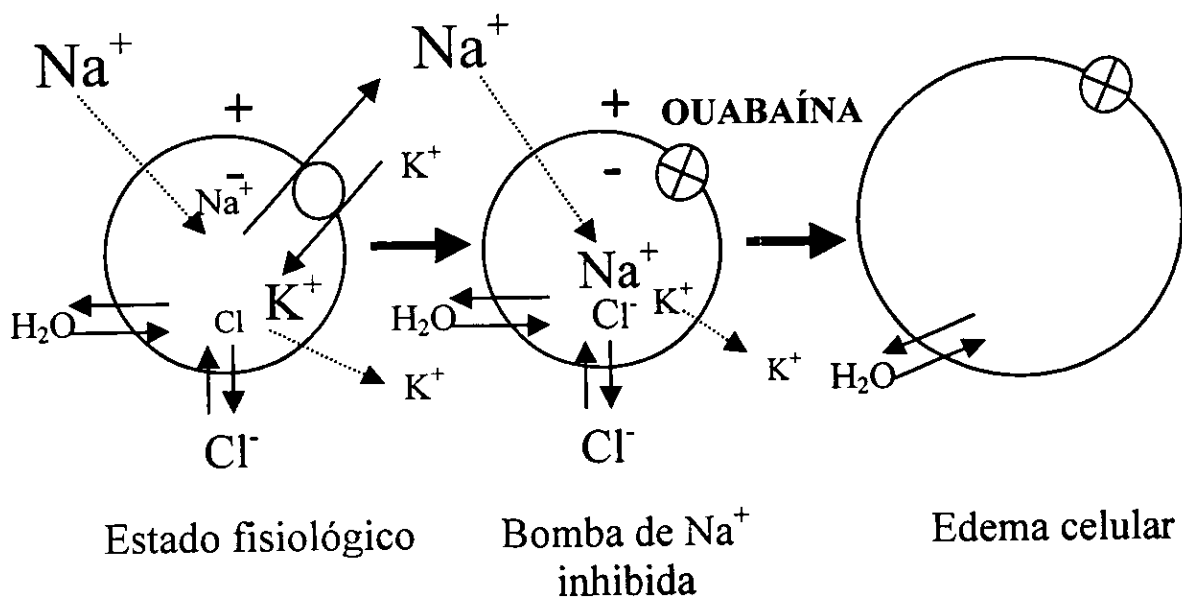
## MANTENIMIENTO Y REGULACION DEL VOLUMEN CELULAR

*Regulación crónica del volumen celular.* El mantenimiento de un equilibrio dinámico en el volumen celular es crítico para la sobrevivencia y funcionamiento de todas las células ya que la dilución de moléculas importantes en el metabolismo y mecanismos de señalización celular puede llevar a alteraciones graves en su homeostasis. Las dos principales clases de solutos en una célula incluyen: 1) compuestos orgánicos (proteínas solubles) generalmente sintetizados dentro de la célula y que constituyen la mayor parte de las moléculas impermeables; y 2) pequeños solutos, orgánicos e inorgánicos, que pueden potencialmente permear a través de la membrana plasmática. Dado que el pH intracelular se mantiene a niveles ligeramente alcalinos (7.2-7.4) con respecto al punto isoeléctrico de la mayoría de las proteínas, éstas se encuentran como aniones polivalentes. Esto trae como consecuencia que la presión coloidosmótica intracelular sea mayor que la del líquido extracelular y como la membrana es permeable al agua y a pequeños solutos tales como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , si los iones y el agua se distribuyesen tal y como lo predice la teoría de Gibbs-Donnan, las células se hincharían en condiciones isosmóticas. De acuerdo a esta teoría, en el estado de equilibrio, la concentración total de solutos intracelulares debería ser mayor que la de los extracelulares, lo cual resultaría en una menor concentración de agua (o más exactamente en una disminución de su potencial químico) en el interior, con respecto al exterior celular. Este gradiente de concentración (o de potencial químico) del agua causaría un flujo osmótico neto de este solvente hacia el interior celular. Como la membrana de las células animales es distensible, cede ante pequeñas presiones hidrostáticas, por lo que el flujo osmótico neto de agua causaría un aumento de volumen y eventual lisis celular. Sin embargo, normalmente este aumento de volumen celular coloidosmótico no ocurre y las células mantienen niveles constantes de agua y solutos. Esto indica que aunque las células animales contienen aniones orgánicos impermeables, los iones inorgánicos permeables no están distribuidos de acuerdo con

la teoría de Gibbs-Donnan. Si hubiese equilibrio de Gibbs-Donnan a través de la membrana celular, la osmolaridad de la fase acuosa intracelular excedería a la de la fase acuosa extracelular por 25 a 30 mosmoles/l, lo cual equivale a una diferencia de presión hidrostática a través de la membrana de 6587 a 7904 mm de H<sub>2</sub>O a 37° C (Alvarez-Leefmans y Reuss, 1996).

Los eritrocitos se utilizan frecuentemente como modelo para el estudio de las propiedades osmóticas de las células animales. En ellos, se ha demostrado que la presión hidrostática es sólo 2 ó 3 mm de H<sub>2</sub>O más alta en el interior con respecto al exterior celular (Rand y Burton, 1964). Esta diferencia de presión hidrostática a través de la membrana corresponde a una concentración total de solutos intracelulares de aproximadamente 0.01 mosmoles/l, más alta que la del medio extracelular. En conclusión, no existe gradiente de presión hidrostática a través de la membrana. Esto indica que los eritrocitos, al igual que otras células, no se encuentran en equilibrio de Gibbs-Donnan. Si esto es así ¿qué es lo que evita el edema y la lisis celular en condiciones isosmóticas?. Una respuesta a esta pregunta, basada en evidencia experimental, es que las células animales mantienen su volumen constante a través de mecanismos de transporte activo primario, principalmente mediante la operación de la bomba de Na<sup>+</sup>. De acuerdo con esta hipótesis, el volumen celular estaría determinado por un balance entre el eflujo neto de iones mediado por sistemas de transporte activo primario y el influjo neto de iones a través de canales y sistemas de transporte activo secundario. Debido a la acción de la bomba de sodio, el Na<sup>+</sup> que entra a la célula por electrodifusión (canales de Na<sup>+</sup>) o por sistemas de transporte secundario (cotransportadores de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> y de Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>, el cotransportador de Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>, o los cotransportadores de Na<sup>+</sup> y aminoácidos) es transportado hacia el exterior, de tal manera que la membrana se comporta como si fuese impermeable al Na<sup>+</sup> (y al K<sup>+</sup>), por lo menos en el estado de reposo. Esta noción se conoce como la "hipótesis de bombeo y fuga" (the pump-leak hypothesis) (Tosteson y Hoffman, 1960; Alvarez-Leefmans y Reuss, 1996). El corolario de esta hipótesis es que las células animales en equilibrio osmótico se comportan como si fuesen impermeables al Na<sup>+</sup>. La hipótesis predice que si se inhibe la bomba de Na<sup>+</sup>, por ejemplo con el glucósido cardíaco uabaina (estrofantina G) o por agotamiento del ATP celular a consecuencia de anoxia,

las células se cargarán de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{Cl}^-$  con la consecuente entrada de agua. Dado que el gradiente electroquímico del  $\text{Na}^+$  está dirigido hacia el interior celular, este catión se "movilizará" hacia el citosol a través de canales y sistemas de transporte activo secundario (transportadores y cotransportadores). Como el sistema que expelle activamente al  $\text{Na}^+$  está inhibido, éste se acumulará en el interior celular. Paralelamente a la ganancia de  $\text{Na}^+$  se producirá un influjo neto de  $\text{Cl}^-$ , debido a la despolarización de la membrana. La entrada de ambos iones se acompañará de la entrada osmótica de agua, lo cual resultará en un aumento del volumen celular.



En efecto, en algunos tipos celulares se ha demostrado que el bloqueo de la bomba de  $\text{Na}^+$  con uabaina resulta en un incremento del volumen celular, como lo predice la hipótesis de la bomba. Sin embargo, existen células en las que no se ha podido detectar este fenómeno. Más aún, hay casos en los que la inhibición de la bomba de  $\text{Na}^+$  produce disminución del volumen celular (Alvarez-Leefmans et al., 1992).

Estas observaciones sugieren que los mecanismos de mantenimiento del volumen celular varían de célula a célula, o que involucran sistemas de transporte de salida adicionales a los considerados originalmente dentro de la hipótesis de bomba y fuga. En apoyo a esta última idea hay observaciones que muestran que algunas

células, en presencia de uabaina, aumentan inicialmente de volumen pero subsecuentemente lo disminuyen. Este decremento del volumen, implica la activación de sistemas de transporte de agua y solutos distintos de la bomba de  $\text{Na}^+$ . Lo que parece suceder en estos casos es que la inhibición de la bomba de  $\text{Na}^+$  resulta no sólo en la acumulación intracelular de  $\text{Na}^+$ , sino también en un aumento en la concentración de calcio intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) que produce la activación de canales de  $\text{K}^+$  con el consiguiente eflujo de éste acompañado de aniones (Alvarez-Leefmans *et al.*, 1994). Si el eflujo de solutos inducido por el  $\text{Ca}^{2+}$  es mayor que el influjo neto de solutos que queda sin ser contrarrestado al inhibir a la bomba de  $\text{Na}^+$ , el resultado final será una disminución del volumen celular. Si inicialmente el influjo neto sobrepasa al eflujo neto de solutos, pero tiempo después esta tendencia se invierte, el patrón de cambios en el volumen celular será bifásico, es decir, habrá un incremento transitorio del volumen celular seguido de una disminución del mismo. Si al inhibir la bomba de  $\text{Na}^+$  el influjo neto de solutos es igual al eflujo neto de los mismos, el volumen celular no cambiará, como también se ha observado experimentalmente (Alvarez-Leefmans *et al.*, 1992).

*Regulación aguda del volumen celular.* Además de poseer la capacidad de mantener su volumen constante, las células animales están dotadas de mecanismos que les permiten ajustar su volumen en medios anisomóticos. Cuando una célula se expone a un medio anisomótico, la alteración en la osmolaridad extracelular causa la entrada o salida de agua a través de la membrana plasmática, con los consecuentes cambios en el volumen celular. La mayoría de las células están dotadas de mecanismos que les permiten retornar a su volumen inicial, aún cuando persistan las condiciones anisomóticas. Esto se debe a la activación de mecanismos de transporte de solutos intracelulares osmóticamente activos, que al movilizarse van acompañados de agua. La activación de estos mecanismos trae como consecuencia, la corrección del volumen celular. En el caso particular en el que una célula animal es expuesta a una solución hiposmótica, inicialmente el volumen celular aumenta debido a la entrada de agua, debido al cambio de presión osmótica extracelular. Generalmente, el volumen celular aumenta alcanzando un máximo en un tiempo variable, que depende de: 1) la velocidad del cambio en la osmolaridad extracelular en el plano inmediatamente adyacente a la membrana plasmática, 2) la permeabilidad de la membrana plasmática

al agua, 3) la relación entre el área de la membrana y el volumen de la célula (Hoffmann y Simonsen, 1989 ; Lang *et al.*, 1993; Hallows y Knauf, 1994). Después de este máximo, que frecuentemente corresponde al volumen predicho para una respuesta osmométrica, el volumen celular disminuye, aún cuando la osmolaridad extracelular se mantenga por debajo del valor control inicial. Este proceso compensatorio del volumen, que generalmente ocurre en un período de varios minutos, se conoce como Decremento Regulador del Volumen (DRV). En la mayoría de los casos, las células no retornan totalmente a su volumen inicial, sino que alcanzan un nivel estable ligeramente superior. Análogamente, cuando las células se mantienen en una solución hiperosmótica, su volumen disminuye y en la mayoría de los casos, tienden a recuperarlo mediante el proceso conocido como Incremento Regulador del Volumen (IRV).

## MECANISMOS DE TRANSPORTE EN LA REGULACION DEL VOLUMEN

### *Decremento Regulador del Volumen (DRV).*

La recuperación del volumen celular después de un incremento producido por soluciones hiposmóticas se ha descrito en una gran variedad de células animales, incluyendo células epiteliales (Davis y Finn, 1985; Kirk y Kirk, 1987; Welling *et al.*, 1983), eritrocitos (Kregenow, 1981; Cala, 1983), células ascíticas de Ehrlich (Hoffmann *et al.*, 1978), astrocitos en cultivo (Olson y Holtzman, 1986; Kimelberg, 1985; Pasantes-Morales, *et al.*, 1994 a y b) células granulares en cultivo (Pasantes-Morales *et al.*, 1993), linfocitos humanos (Grinstein *et al.*, 1982), células MDCK (Roy y Sauve, 1982), células COS-7 (Ishii *et al.*, 1996), glioma C6 (Strange y Morrison, 1992), neuroblastoma N1E115 (Falke y Mislser, 1989), fibroblastos humanos (Bibby y McCulloch, 1994), células IMCD (Tinel *et al.*, 1994) entre otras.

Las diversas investigaciones indican que el DRV esta mediado por la activación de mecanismos de transporte de iones como el  $K^+$  y el  $Cl^-$  (Grinstein *et al.*, 1982; Eveloff y Warnock, 1987), que normalmente (en condiciones isosmóticas) están inactivos y/o a la liberación de compuestos orgánicos osmóticamente activos como polialcoholes,

al agua, 3) la relación entre el área de la membrana y el volumen de la célula (Hoffmann y Simonsen, 1989 ; Lang *et al.*, 1993; Hallows y Knauf, 1994). Después de este máximo, que frecuentemente corresponde al volumen predicho para una respuesta osmométrica, el volumen celular disminuye, aún cuando la osmolaridad extracelular se mantenga por debajo del valor control inicial. Este proceso compensatorio del volumen, que generalmente ocurre en un período de varios minutos, se conoce como Decremento Regulador del Volumen (DRV). En la mayoría de los casos, las células no retornan totalmente a su volumen inicial, sino que alcanzan un nivel estable ligeramente superior. Análogamente, cuando las células se mantienen en una solución hiperosmótica, su volumen disminuye y en la mayoría de los casos, tienden a recuperarlo mediante el proceso conocido como Incremento Regulador del Volumen (IRV).

## MECANISMOS DE TRANSPORTE EN LA REGULACION DEL VOLUMEN

### *Decremento Regulador del Volumen (DRV).*

La recuperación del volumen celular después de un incremento producido por soluciones hiposmóticas se ha descrito en una gran variedad de células animales, incluyendo células epiteliales (Davis y Finn, 1985; Kirk y Kirk, 1987; Welling *et al.*, 1983), eritrocitos (Kregenow, 1981; Cala, 1983), células ascíticas de Ehrlich (Hoffmann *et al.*, 1978), astrocitos en cultivo (Olson y Holtzman, 1986; Kimelberg, 1985; Pasantes-Morales, *et al.*, 1994 a y b) células granulares en cultivo (Pasantes-Morales *et al.*, 1993), linfocitos humanos (Grinstein *et al.*, 1982), células MDCK (Roy y Sauve, 1982), células COS-7 (Ishii *et al.*, 1996), glioma C6 (Strange y Morrison, 1992), neuroblastoma N1E115 (Falke y Mislser, 1989), fibroblastos humanos (Bibby y McCulloch, 1994), células IMCD (Tinel *et al.*, 1994) entre otras.

Las diversas investigaciones indican que el DRV esta mediado por la activación de mecanismos de transporte de iones como el  $K^+$  y el  $Cl^-$  (Grinstein *et al.*, 1982; Eveloff y Warnock, 1987), que normalmente (en condiciones isosmóticas) están inactivos y/o a la liberación de compuestos orgánicos osmóticamente activos como polialcoholes,



---

azúcares, aminas y aminoácidos como la taurina (Pierce y Greenberg, 1972; Fugelli y Thoroed, 1986; Fincham *et al.*, 1987). El movimiento de estos solutos es la consecuencia de un cambio en la permeabilidad de la membrana plasmática, ya sea por la activación de transportadores o por la activación de canales. Se sabe que el mecanismo más generalizado para los movimientos de  $K^+$  y  $Cl^-$  ocurren a través de vías electrogénicas y que el flujo de los osmolitos orgánicos es mediante un proceso difusional, dirigido solo por el gradiente de concentración.

#### *Osmolitos inorgánicos.*

El mecanismo de salida del  $K^+$  y  $Cl^-$  depende del tipo celular de que se trate. Un sistema de cotransporte  $K^+/Cl^-$  activado por un incremento de volumen participa en la expulsión de estos iones en eritrocitos de distintas especies, incluyendo el paro (Mayer, 1985), el borrego (Lauf, 1985) y algunos peces (Bourne y Cossins, 1984; Borgese *et al.*, 1987). La activación acoplada de los intercambiadores  $K^+/H^+$  y  $Cl^-/HCO_3^-$  parece mediar la salida de cloro y potasio en eritrocitos de *Amphiuma* (Kregenow, 1981; Siebens, 1985; Cala, 1985 a y b). En túbulos proximales de riñón de conejo y de ratón la salida de potasio durante la regulación de volumen se encuentra asociada con la salida de  $HCO_3^-$  y no de  $Cl^-$  (Volkl y Lang, 1988).

A pesar de la existencia de estos sistemas de cotransporte electroneutro para la salida de cloro y potasio, el mecanismo más generalizado para expulsar estos iones es la activación de vías electrogénicas constituidas por canales iónicos presentes en la membrana celular. El mecanismo utilizado para disminuir los niveles intracelulares de cloro y potasio determina el curso temporal de la recuperación del volumen. Cuando se encuentran involucrados los sistemas de cotransporte  $K^+/Cl^-$  y de intercambio  $Cl^-/HCO_3^-$  y  $K^+/H^+$ , el proceso es muy lento y tarda alrededor de una hora y si se activan los canales de potasio y cloro, el volumen se recupera en un tiempo menor a los 10 min (Lauf, 1985).

Se ha postulado que la salida de  $Cl^-$  y  $K^+$  ocurre a través de canales separados, pero interdependientes. En las células de Ehrlich la evidencia experimental en apoyo a esta suposición esta basada en las siguientes observaciones: 1) al inhibirse la salida de potasio con quinidina se inhibe la recuperación del volumen, sin embargo, si se provee

una vía alterna para la salida de potasio con valinomicina (Hoffmann *et al.*, 1984) o con gramicidina en un medio sin sodio (Hofmann *et al.*, 1986) el volumen disminuye normalmente, señalando que el canal de cloro se encuentra activo, además de indicar que la salida de potasio es el paso limitante en la recuperación del volumen; 2) el curso temporal de la inactivación del canal de cloro es diferente al del canal de potasio: el primero se activa abruptamente con el aumento de volumen y se inactiva en aproximadamente 10 min, mientras que el canal de potasio permanece activado por más tiempo (Sarkadi *et al.*, 1984); 3) la despolarización (de aproximadamente 10 mV) observada durante la fase reguladora de volumen, es consistente con un mayor aumento en la permeabilidad de la membrana para el cloro que para el potasio. Esta despolarización aumenta la fuerza electromotriz para la salida de potasio y puede explicar al menos parte de esta salida (Lang *et al.*, 1987).

#### *Osmolitos orgánicos.*

En animales que se encuentran expuestos en forma natural a variaciones amplias en la osmolaridad del medio externo, como los animales marinos y estuarinos, los elementos que funcionan como osmoefectores determinantes son los compuestos orgánicos. Entre estas moléculas se encuentran la urea, los aminoácidos, compuestos cuaternarios de amonio (Fugelli y Thoroed, 1986), polialcoholes como el sorbitol (Siebens y Spring, 1989) y el mio-inositol y metilaminas como la glicerofosforilcolina y la betaína (Nakanishi *et al.*, 1988).

Dentro de los aminoácidos libres con función osmorreguladora la taurina es el más importante en la mayoría de las células, debido a que se encuentra presente en concentraciones muy elevadas constituyendo hasta el 70 % de la poza total de aminoácidos libres (80 mM en la retina, 28 mM en linfocitos y 60 mM en músculo esquelético y cardíaco). La taurina es un aminoácido inerte desde el punto de vista fisiológico, no participa en la estructura primaria de proteínas ni en ninguna reacción del metabolismo primario de la célula (Jacobsen y Smith, 1968; Pasantés-Morales *et al.*, 1991). Esto permite que los niveles celulares de la taurina puedan modificarse, con el fin de ajustar la presión osmótica interna sin que las variaciones en la concentración intra o extracelular alteren otras funciones celulares.

## IDENTIDAD MOLECULAR DE LAS VIAS DE MOVILIZACION DE LOS OSMOLITOS

La identidad molecular de las proteínas responsables del movimiento de osmolitos asociados a la regulación del volumen celular en condiciones hiposmóticas no es del todo conocida. Hasta el momento no se ha identificado un canal de potasio regulado por volumen y sólo tres proteínas, la glicoproteína-P (Valverde *et al.*, 1992); el CLC-2 (Grüder *et al.*, 1992) y el fosfoleman (Moorman, *et al.*, 1995) han sido propuestas para ser los canales de cloro activados por un aumento en el volumen celular. Una cuarta proteína que podría estar involucrada en la regulación del volumen es la  $pI_{Cl}$  (Paulmich *et al.*, 1992), ya que cuando es expresada en ovocitos de *Xenopus*, produce una prominente corriente de  $Cl^-$  con características semejantes a las corrientes de cloro inducidas por hiposmolaridad observadas en células epiteliales.

Los mecanismos de liberación de los osmolitos orgánicos están aún menos caracterizados. Se ha demostrado que la liberación de taurina en respuesta al cambio de volumen, es independiente de la presencia de  $Na^+$  en el medio extracelular y de la temperatura, lo cual descarta la participación del transportador del aminoácido dependiente de sodio durante su liberación inducida por hiposmolaridad. En cambio, el movimiento de taurina en respuesta al aumento en el volumen celular, se da a través de vías difusionales en los que el movimiento de este aminoácido está dirigido por su gradiente de concentración (Sánchez-Olea *et al.*, 1991). Una característica de los mecanismos de movilización de la taurina asociada a cambios en el volumen celular es que se inhibe por bloqueadores de canales de  $Cl^-$  como el DIDS, el dipiridamol, el NPPB, la DDF, los ácidos grasos poliinsaturados y el ácido niflúmico (Sánchez-Olea *et al.*, 1991; Pasantes-Morales *et al.*, 1994). Esto ha llevado a sugerir que el transporte de este osmolito se realiza a través de un canal aniónico con características tales que permitan el paso de osmolitos zwitteriones como son los aminoácidos.

## SEÑALES QUE ACTIVAN LA LIBERACION DE OSMOLITOS

La formulación de preguntas acerca de cómo una célula percibe su volumen y cómo la señal del volumen es amplificada y transducida al efector (mecanismos para la movilización de osmolitos), son necesarias e importantes para entender el fenómeno de regulación. El hecho de que las células regulen su volumen en soluciones anisomóticas, o de que lo mantengan constante en condiciones isomóticas, supone que deben estar dotadas de "sensores" que les permiten detectar cambios en su propio volumen. Los mecanismos mediante los cuales una célula sensa cambios en su propio volumen y, traduce la señal detectada en una activación de los sistemas de transporte de los solutos responsables de la respuesta reguladora, constituyen uno de los temas más estudiados en la actualidad. El mediador o los mediadores de estos mecanismos no están aún identificados.

En cuanto al mecanismo sensor o detector de cambios de volumen celular, se han postulado dos grupos de teorías que incluyen mecanismos químicos y físicos. De acuerdo con la teoría química, un cambio del volumen celular conduciría a un cambio en la actividad química del agua intracelular, lo que a su vez llevaría a una modificación en la concentración de uno o varios "factores citosólicos" (iones o moléculas), cuya naturaleza aún no ha sido determinada. La dilución o la concentración de estos "factores", llevaría a la activación de los mecanismos de transporte de solutos osmóticamente activos a través de la membrana, dando lugar a la respuesta reguladora. Existen dos variantes de la teoría química: la hipótesis que podría llamarse del "factor químico específico" y la del "apiñamiento de macromoléculas" (macromolecular crowding). La primera hipótesis postula que los cambios en la concentración del  $Mg^{2+}$  libre intracelular, constituyen la señal detonante de los mecanismos efectores de la respuesta reguladora. Esta hipótesis carece de evidencia experimental sólida y actualmente es controvertida, ya que no se ha demostrado que los cambios en el volumen celular se correlacionen causalmente con modificaciones en la concentración de  $Mg^{2+}$  y que las respuestas efectoras sean moduladas por el  $Mg^{2+}$ .

En la hipótesis del apiñamiento de macromoléculas intracelulares, se postula que la concentración de macromoléculas citoplásmicas es la señal intracelular que inicia el proceso regulador, esto es, que un cambio en la concentración de

macromoléculas modifica la actividad funcional de los transportadores efectores, mediante el fenómeno de "macromolecular crowding". El argumento se basa en el hecho de que pequeños cambios en la concentración total de macromoléculas intracelulares produce grandes cambios en la reactividad (o en el coeficiente de actividad) de otras macromoléculas. El efecto se caracteriza por tener un poder amplificador de 10 a 1000 veces. Los cambios en la actividad funcional de los transportadores de soluto serían consecuencia de la reactividad de solutos citoplásmicos, por ejemplo, enzimas que modulan la fosforilación de proteínas reguladoras o de los mismos transportadores. La hipótesis se derivó inicialmente de estudios realizados en fantasmas de eritrocitos en los que se demostró que la regulación del volumen celular no depende del valor absoluto del volumen, sino de la concentración de proteínas intracelulares. El efecto es inespecífico puesto que puede reproducirse con albúmina o hemoglobina. Aunque muy interesante, la posibilidad de que el fenómeno de apiñamiento macromolecular juegue un papel determinante en la regulación de volumen celular carece de evidencia definitiva (Alvarez-Leefmans y Reuss, 1996). El tema ha sido estudiado y tratado por Sarkadi y Parker (1991) y por Allen Minton (1994).

La teoría física del sensor de volumen comprende la hipótesis mecánica con sus variantes. De acuerdo con dicha hipótesis, el sensor del volumen está localizado en la membrana plasmática o en el citoesqueleto adyacente a la misma y su activación pone en marcha los mecanismos de transporte de solutos que subyacen a las respuestas reguladoras. Existe evidencia en favor de que algunos canales mecanosensibles conocidos como "cation-nonspecific stretch-activated channels" (SACS), presentes en la membrana plasmática, constituyen la parte central del sensor de volumen, y en algunos casos de los mecanismos efectores. La evidencia proviene de experimentos realizados en células en las que se ha logrado detectar, con técnicas electrofisiológicas, un aumento en la probabilidad de apertura de estos canales en respuesta a la distensión de la membrana cuando la célula aumenta de volumen. Existen por lo menos dos modelos basados en datos experimentales, que implican a este tipo de canales en el mecanismo sensor de volumen. En el primer modelo, postulado por Christensen (1987), la distensión de la membrana como consecuencia

---

del aumento en el volumen celular, activa canales catiónicos no selectivos permeables a cationes monovalentes ( $K^+$  y  $Na^+$ ) y divalentes ( $Ca^{2+}$ ). La entrada de  $Ca^{2+}$  produce un aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$ , lo cual causa la activación de canales de  $K^+$  y/o  $Cl^-$  con la consecuente pérdida de agua osmóticamente obligada, produciéndose el DRV. En el segundo modelo, representado por los trabajos de Falke y Mislner (1989), así como los de Grinstein y colaboradores (1990 y 1992), el DRV puede producirse en ausencia de  $Ca^{2+}$  extracelular, por lo que se ha postulado que el estiramiento de la membrana abre canales catiónicos no selectivos que dan como resultado una despolarización de la membrana y causa la apertura de canales de  $K^+$  sensibles a voltaje y canales permeables a aniones. La activación de este conjunto de canales permite que la célula recupere su volumen.

Diversa es la evidencia, en diferentes tipos celulares, que indica que uno de los fenómenos primarios asociados con el aumento en el volumen celular producido por soluciones hiposmóticas, es un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ , por ello, resulta obvio pensar que el  $Ca^{2+}$  puede estar participando como señal transductora del cambio de volumen en la activación de las vías de permeabilidad de los osmolitos, ya que las acciones biológicas del calcio son variadas y pueden estar mediadas por vías bioquímicas, como la activación de proteínas cinasas y fosfatasa, que a su vez pueden activar o desactivar canales iónicos y elementos del citoesqueleto.

## Cuál es la señal de transducción del cambio en el volumen a la activación de las vías de liberación de los osmolitos?



### *Participación del calcio como señal de transducción del cambio en el volumen*

En la mayoría de las células que son expuestas a soluciones hiposmóticas, se presenta un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  asociado al aumento en el volumen celular; esto ha llevado a postular que el  $Ca^{2+}$  puede estar participando en el DRV probablemente como señal activadora de los sistemas de transporte para la salida de los osmolitos durante la regulación del volumen. Sin embargo, la evidencia al respecto, es controvertida. El incremento en  $Ca^{2+}$  inducido por hiposmolaridad es una respuesta bifásica, muy similar entre los diferentes tipos celulares; esta respuesta consiste en un incremento inmediato en la  $[Ca^{2+}]_i$  debido a la liberación de  $Ca^{2+}$  a partir de almacenes intracelulares, seguido de una fase sostenida que representa la entrada de calcio extracelular. Pocos son las investigaciones en las que se ha realizado un estudio paralelo del incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  y el DRV en la misma preparación y bajo las mismas condiciones experimentales, por lo que existe una gran controversia con

respecto a la participación de este catión como una señal de transducción en el proceso regulador.

En general, parece que en las células epiteliales el proceso regulador del volumen en soluciones hiposmóticas requiere la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio extracelular, y generalmente se supone que durante el aumento en el volumen celular hay una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo cual conlleva a un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y la activación del DRV (ver revisión en McCarty y O'Neil, 1992). Por ejemplo, en células MDCK, el incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducido por hiposmolaridad es proporcional a la  $[\text{Ca}^{2+}]_e$  extracelular (Rothstein y Mack, 1992). En células epiteliales de intestino de la línea 407, la omisión de  $\text{Ca}^{2+}$  y la adición de EGTA ocasiona la completa inhibición del DRV (Hazama y Okada, 1988). En fibroblastos el incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  es bloqueado por completo cuando las células se mantienen en un medio sin  $\text{Ca}^{2+}$  y en presencia de EGTA o bien, en un medio con  $\text{Ca}^{2+}$  y la adición de  $\text{Gd}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ , nifedipina o verapamil, todos ellos conocidos bloqueadores de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula (Bibby y McCulloch 1994). Estos estudios proponen que la hiposmolaridad induce la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula, probablemente, a través de canales catiónicos activados por distensión de la membrana plasmática (SACS) y/o por canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, incrementando así, los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico.

Por otra parte, en estudios realizados en otros tipos celulares se establece que el incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  asociado al aumento en volumen, no sólo se debe a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , sino que está relacionado con la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de almacenes intracelulares. Estas investigaciones han demostrado que la omisión de  $\text{Ca}^{2+}$  del medio extracelular no tiene ningún efecto sobre el DRV (Hoffmann *et al.*, 1984).

En otros estudios en los que el incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  fué cuantificado utilizando colorantes fluorescentes, se ha determinado la persistencia de un componente temporal de la respuesta en  $\text{Ca}^{2+}$  aún en un medio libre de éste, lo cual enfatiza la intervención de pozas endógenas de  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, existe también cierta discrepancia entre los estudios que proponen el mecanismo mediante el cual el  $\text{Ca}^{2+}$  es liberado a partir de dichos almacenes. En algunos tipos celulares, el vaciamiento del retículo endoplásmico con tapsigargina, impide el incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducido por hiposmolaridad (Ishii *et al.*, 1996), o bien cuando las en células se



---

tratan con TMB-8, un bloqueador de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico Tinel *et al.*, 1994).

Otro tipo de evidencia propone la reducción en la osmolaridad externa induce la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  de compartimentos intracelulares no mitocondriales a través de vías de fuga pasiva, una propiedad inherente de estos organelos. Es decir, que posiblemente el retículo endoplásmico esté funcionando como un osmosensor capaz de detectar la dilución del citosol cuando las células se encuentran en un medio hiposmótico. Entonces, el  $\text{Ca}^{2+}$  es liberado de estos compartimentos mediante canales que normalmente dejan fugar  $\text{Ca}^{2+}$ , pero que además son sensibles a la distensión de su membrana.

La dependencia de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la activación de conductancias de  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  involucradas en el DRV, también ha sido un tema de controversia. Se ha reportado que la activación de la corriente de  $\text{K}^+$  asociada al aumento en el volumen celular en soluciones hiposmóticas es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Hoffman, *et al.*, 1984 ; Ling, *et al.*, 1992 ; Perry, *et al.*, 1992). No obstante, también se ha descrito que el  $\text{Ca}^{2+}$  no es necesario para que esta corriente se active (Beck, *et al.*, 1991; Azouz, *et al.*, 1997).

Las soluciones hiposmóticas también conllevan a la activación de corrientes de  $\text{Cl}^-$  en muchos tipos celulares. Aunque el estudio sobre la naturaleza molecular de estos canales ha progresado notablemente, el conocimiento sobre el o los factores que pueden estar activando y/o modulando esta corriente, aún permanece poco claro. Pocos son los estudios en los que se ha determinado que el  $\text{Ca}^{2+}$  tiene un papel clave en la activación de corrientes de  $\text{Cl}^-$  asociadas a la hiposmolaridad (Ohtsuyama, *et al.*, 1993 ; Szücs, *et al.*, 1996 ; Nilius, *et al.*, 1997), ya que en general se sabe que los canales de  $\text{Cl}^-$  sensibles a volumen son modulados por nucleótidos.

---

---

***Participación del calcio en la regulación del volumen celular en células nerviosas.***

Con respecto a las células nerviosas, la mayoría de los estudios sobre la dependencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en el DRV se han realizado en astrocitos. Sin embargo, la intervención del  $\text{Ca}^{2+}$  en este proceso es poco clara debido a la gran controversia de los resultados mostrados por diferentes grupos de investigación. Se ha reportado que el DRV es parcialmente dependiente de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Vitarella *et al.*, 1994), o bien que es un proceso totalmente independiente (Sánchez-Olea *et al.*, 1995) o totalmente dependiente (O'Connor y Kimelberg, 1993) de este catión. En el glioma C6, la regulación del volumen se ha reportado como independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, pero sólo en condiciones en las que se emplean concentraciones muy altas (2.5 mM) de EGTA (Lhor y Yohe, 1994). Existen inconsistencias aún mayores entre los resultados sobre la liberación de osmolitos activada por hiposmolaridad. Se ha reportado que la salida de  $\text{Cl}^-$  es dependiente (O'Connor y Kimelberg, 1993) o independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Sánchez-Olea *et al.*, 1995), la salida de  $\text{K}^+$  se describe como incrementada (Bender y Norenberg, 1994; Sánchez-Olea *et al.*, 1993; Vitarella *et al.*, 1994) o inhibida (O'Connor y Kimelberg, 1993) en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular.

Con respecto a la participación del  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente de pozas endógenas existe evidencia que sustenta la intervención de receptores activados por 1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) en la respuesta en  $\text{Ca}^{2+}$  a hiposmolaridad. Bender y colaboradores (1993) reportaron un incremento en la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato ( $\text{PIP}_2$ ) asociado al aumento en el volumen celular bajo condiciones hiposmóticas y, que el DRV es bloqueado cuando la hidrólisis de  $\text{PIP}_2$  es prevenida con U-73122, un inhibidor de la fosfolipasa C (PLC). Por otra parte, se ha demostrado que este mismo inhibidor no tiene ningún efecto sobre el incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducido por hiposmolaridad (Fisher, *et al.*, 1997; Sinning, *et al.*, 1997).

En el caso particular de las neuronas, las investigaciones acerca del papel del  $\text{Ca}^{2+}$  en el DRV son escasas. Falke y Misler (1989) trabajando en la línea celular de neuroblastoma N1E115 y utilizando la técnica de patch-clamp, mostraron la actividad de canales SACS asociada al aumento en el volumen celular inducido por la reducción de la osmolaridad externa; esta actividad fué bloqueada en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$

extracelular, lo cual indica una vez más la probable intervención de estos canales en la regulación del volumen celular.

En un trabajo con neuroblastoma de humano CHP-100 Basavappa y colaboradores (1995) estudiaron una corriente de  $\text{Cl}^-$  activada por hiposmolaridad asociada al incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ; la omisión de  $\text{Ca}^{2+}$  y la presencia de 2.5 mM de EGTA inhibieron ambos eventos. De los diferentes antagonistas de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a voltaje utilizados en este trabajo, sólo la  $\omega$ -conotoxina MVIIC, un bloqueador de canales de calcio tipo Q y R, bloqueó tanto la corriente de  $\text{Cl}^-$  como el incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducidos por hiposmolaridad. Es importante mencionar que la concentración del fármaco utilizado en este trabajo fué diez veces mayor a la requerida para inhibir este tipo de canales.

En un estudio previo (Sánchez-Olea, *et al.*, 1993), se investigó el efecto de condiciones hiposmóticas sobre la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en células granulares de cerebelo y neuronas de corteza de cerebro de rata en cultivo, utilizando el colorante fluorescente fluo-3. Se determinó que el incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  es proporcional a la reducción de la osmolaridad externa en ambos tipos de neuronas y que este incremento no ocurre si el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular es omitido; este mismo incremento es bloqueado parcialmente por  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{La}^{3+}$ . El dantroleno, que previene la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de almacenes intracelulares, no mostró ningún efecto sobre la respuesta en  $\text{Ca}^{2+}$ . Estos resultados sugieren, nuevamente, que el aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  parcialmente inducido por hiposmolaridad se debe principalmente al  $\text{Ca}^{2+}$  procedente del medio extracelular.

Teniendo en cuenta que los antecedentes acerca del papel del  $\text{Ca}^{2+}$  como señal de activación del DRV indican que aunque en diferentes tipos celulares existe muy frecuentemente un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  cuando son expuestos a soluciones hiposmóticas, la implicación de este evento no siempre es la misma. En algunos casos, la activación de los mecanismos correctores del volumen parece depender de este incremento en  $\text{Ca}^{2+}$  pero en muchos otros, esto no es así. Hay asimismo, diferencias en cuanto a la fuente de aporte de  $\text{Ca}^{2+}$  que parece no ser siempre la misma ya que en algunas células, el  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente del medio extracelular es el requisito indispensable

y no su liberación de pozas endógenas, que en algunos casos probablemente se da por la activación de receptores a  $IP_3$ .

## OBJETIVO GENERAL

El presente trabajo tuvo como objetivo principal estudiar el papel del  $Ca^{2+}$  como señal de transducción del cambio en el volumen celular a la activación de las vías de movilización de los osmolitos responsables de la regulación del volumen en células granulares de cerebelo de rata en cultivo.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

Con tal finalidad se establecieron como objetivos específicos los siguientes:

1. Corroborar si en las células granulares de cerebelo de rata en cultivo expuestas a un medio hiposmótico en el que la concentración de NaCl se redujo el 50%, se presenta un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ .
2. Investigar si el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  inducida por hiposmolaridad en las células granulares, se debe a la entrada de  $Ca^{2+}$  extracelular y/o a la liberación de  $Ca^{2+}$  a de almacenes intracelulares.
3. Determinar si la entrada de  $Ca^{2+}$  y/o la liberación de  $Ca^{2+}$  de almacenes intracelulares asociadas al aumento en el volumen celular, son eventos indispensables para que las células granulares de rata en cultivo regulen su volumen en un medio hiposmótico.
4. Determinar si la salida de  $^{125}I$  (como trazador de Cl<sup>-</sup>) y de  $^3H$ -taurina (como representante de los aminoácidos) en células granulares de rata en cultivo bajo condiciones hiposmóticas, dependen de la entrada de  $Ca^{2+}$  y/o la liberación de  $Ca^{2+}$  de almacenes intracelulares asociadas al aumento en el volumen celular.

y no su liberación de pozas endógenas, que en algunos casos probablemente se da por la activación de receptores a  $IP_3$ .

## OBJETIVO GENERAL

El presente trabajo tuvo como objetivo principal estudiar el papel del  $Ca^{2+}$  como señal de transducción del cambio en el volumen celular a la activación de las vías de movilización de los osmolitos responsables de la regulación del volumen en células granulares de cerebelo de rata en cultivo.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

Con tal finalidad se establecieron como objetivos específicos los siguientes:

1. Corroborar si en las células granulares de cerebelo de rata en cultivo expuestas a un medio hiposmótico en el que la concentración de NaCl se redujo el 50%, se presenta un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ .
2. Investigar si el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  inducida por hiposmolaridad en las células granulares, se debe a la entrada de  $Ca^{2+}$  extracelular y/o a la liberación de  $Ca^{2+}$  a de almacenes intracelulares.
3. Determinar si la entrada de  $Ca^{2+}$  y/o la liberación de  $Ca^{2+}$  de almacenes intracelulares asociadas al aumento en el volumen celular, son eventos indispensables para que las células granulares de rata en cultivo regulen su volumen en un medio hiposmótico.
4. Determinar si la salida de  $I^{125}$  (como trazador de Cl<sup>-</sup>) y de  $^3H$ -taurina (como representante de los aminoácidos) en células granulares de rata en cultivo bajo condiciones hiposmóticas, dependen de la entrada de  $Ca^{2+}$  y/o la liberación de  $Ca^{2+}$  de almacenes intracelulares asociadas al aumento en el volumen celular.

La metodología y los resultados de esta investigación se encuentran en el artículo anexo publicado en la revista *Journal of Neuroscience Research* 47: 144-154 (1997).

De manera complementaria, los niveles de calcio también se midieron en una población de células granulares en suspensión, con el fin de correlacionar los resultados obtenidos con los incrementos reales en  $[Ca^{2+}]_i$ .

### MEDIDA DE $[Ca^{2+}]_i$ EN NEURONAS EN SUSPENSION

Los cultivos celulares se realizaron como se describe en el artículo anexo, en cajas plásticas de 100 mm, a una densidad de  $265 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>.

Las células fueron despegadas de las cajas de cultivo mediante el tratamiento con un buffer de fosfatos libre de calcio conteniendo 1 mM EDTA y 0.01% de tripsina durante 2 minutos; posteriormente se preincubaron con una concentración final de 5  $\mu$ M de Fura-2/AM en 5 ml de medio Eagle's, a 37°C durante 1 hr. Después del período de incubación, las células fueron centrifugadas y resuspendidas en un volumen igual de medio Eagle's y mantenidas durante 30 min más a 37°C, con el fin de equilibrar el colorante. Antes de comenzar el registro, las células se lavaron dos veces con medio isosmótico HEPES pH 7.4 conteniendo (en mM): 135 NaCl, 1.0 CaCl<sub>2</sub>, 1.17 MgCl<sub>2</sub>, 1.7 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 KCl, 10 HEPES y 5 glucosa. Cada experimento se realizó en una población de aproximadamente 2000 células/1.5 ml y el estímulo hiposmótico se llevó a cabo mediante la dilución (50%) del medio isosmótico, con un medio HEPES pH 7.4 en el cual, se omitió el NaCl.

La señal fluorescente se midió en un espectrofluorómetro Aminco-Bowman (series 2), SLM-AMINCO® (Rochester, NY). La longitud de onda de excitación fue alternada entre 340 y 380 nm y la fluorescencia se monitoreo a 510 nm. Cada experimento se calibró individualmente registrando la fluorescencia máxima después de romper las células con 0.1% de tritón X-100 y la fluorescencia mínima después de quelar el calcio total con 20 mM EGTA. Con los valores obtenidos en cada experimento, se calculó la concentración de calcio intracelular de acuerdo a la ecuación previamente publicada por Grynkiewicz, *et al.*, 1985.

La metodología y los resultados de esta investigación se encuentran en el artículo anexo publicado en la revista *Journal of Neuroscience Research* 47: 144-154 (1997).

De manera complementaria, los niveles de calcio también se midieron en una población de células granulares en suspensión, con el fin de correlacionar los resultados obtenidos con los incrementos reales en  $[Ca^{2+}]_i$ .

### MEDIDA DE $[Ca^{2+}]_i$ EN NEURONAS EN SUSPENSION

Los cultivos celulares se realizaron como se describe en el artículo anexo, en cajas plásticas de 100 mm, a una densidad de  $265 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>.

Las células fueron despegadas de las cajas de cultivo mediante el tratamiento con un buffer de fosfatos libre de calcio conteniendo 1 mM EDTA y 0.01% de tripsina durante 2 minutos; posteriormente se preincubaron con una concentración final de 5  $\mu$ M de Fura-2/AM en 5 ml de medio Eagle's, a 37°C durante 1 hr. Después del período de incubación, las células fueron centrifugadas y resuspendidas en un volumen igual de medio Eagle's y mantenidas durante 30 min más a 37°C, con el fin de equilibrar el colorante. Antes de comenzar el registro, las células se lavaron dos veces con medio isosmótico HEPES pH 7.4 conteniendo (en mM): 135 NaCl, 1.0 CaCl<sub>2</sub>, 1.17 MgCl<sub>2</sub>, 1.7 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 KCl, 10 HEPES y 5 glucosa. Cada experimento se realizó en una población de aproximadamente 2000 células/1.5 ml y el estímulo hiposmótico se llevó a cabo mediante la dilución (50%) del medio isosmótico, con un medio HEPES pH 7.4 en el cual, se omitió el NaCl.

La señal fluorescente se midió en un espectrofluorómetro Aminco-Bowman (series 2), SLM-AMINCO® (Rochester, NY). La longitud de onda de excitación fue alternada entre 340 y 380 nm y la fluorescencia se monitoreo a 510 nm. Cada experimento se calibró individualmente registrando la fluorescencia máxima después de romper las células con 0.1% de tritón X-100 y la fluorescencia mínima después de quelar el calcio total con 20 mM EGTA. Con los valores obtenidos en cada experimento, se calculó la concentración de calcio intracelular de acuerdo a la ecuación previamente publicada por Grynkiewicz, *et al.*, 1985.

# Regulatory Volume Decrease and Associated Osmolyte Fluxes in Cerebellar Granule Neurons Are Calcium Independent

J. Morán,<sup>1\*</sup> S. Morales-Mulia,<sup>2</sup> A. Hernández-Cruz,<sup>2</sup> and H. Pasantes-Morales<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Neuroscience, Institute of Cell Physiology, National University of Mexico, Mexico City

<sup>2</sup>Department of Biophysics, Institute of Cell Physiology, National University of Mexico, Mexico City

To investigate a possible role for Ca as a transduction signal for regulatory volume decrease (RVD), the effects of external Ca removal, Ca channel blockers (Cd, Co, La, Gd, verapamil, diltiazem, dihydropyridines) and inhibitors of endoplasmic reticulum Ca release (dantrolene, ryanodine, TMB-8) were examined on RVD and on the swelling-activated efflux of two main osmolytes: Cl (traced by <sup>125</sup>I) and [<sup>3</sup>H]taurine. Omission of Ca plus EGTA did not affect RVD or osmolyte release but when BAPTA was the chelator, RVD decreased 20%, <sup>125</sup>I fluxes were unaffected and taurine stimulated efflux decreased (20%) while the basal efflux slightly increased (<10%). Verapamil, diltiazem, Co, Cd, La and Gd did not affect RVD or osmolyte fluxes. Nimodipine and nitrendipine (25–50 μM) markedly decreased RVD and osmolyte fluxes (>90%) through a mechanism independent of extracellular Ca. Swelling elicited an increase in cytosolic Ca measured by fura-2, which was notably variable ranging 50–350 nM. However, RVD and osmolyte fluxes were not affected by the blockers of endogenous Ca release dantrolene, ryanodine and TMB-8 or by the permeable Ca chelator BAPTA-AM, even when the cytosolic Ca increase was abolished by the chelator. These results indicate that 1) RVD and osmolyte fluxes are independent of extracellular Ca 2) RVD, osmolyte release and cytosolic Ca raise are only coincident events. Consequently, Ca is unlikely to be a transducing signal for RVD in neurons. *J. Neurosci. Res.* 47:144–154, 1997.

© 1997 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** intracellular Ca; taurine; swelling; Cl

## INTRODUCTION

Cerebellar granule neurons exhibit regulatory volume decrease (RVD) subsequent to swelling in hyposmotic solutions (Pasantes-Morales et al., 1993). As in many other cell types, RVD in neurons is an active process accomplished by the extrusion of intracellular

osmotic solutes, i.e., K, Cl, and a number of organic molecules (Pasantes-Morales et al., 1994). Outcoming evidence indicates that in neurons, the efflux of both organic and inorganic osmolytes occurs through channel-like molecules (Schousboe et al., 1991). Less is known about the signals and messengers that link the change in cell volume with the activation of the osmolyte efflux pathways. Calcium (Ca) has been repeatedly suggested as a likely candidate to play this role in numerous cell types, including brain astrocytes (McCarthy and O'Neil, 1992). Evidence on this respect is somewhat confusing, as RVD has been reported as completely independent or dependent on extracellular Ca, or dependent only on changes in intracellular Ca which in turn may or may not be dependent of extracellular Ca. The same apparent variability exists about the Ca dependence of the osmolytes involved in RVD (Bender and Norenberg, 1994; O'Connor and Kimelberg, 1993; Olson et al., 1990; Vitarella et al., 1994). Part of the difficulty in solving these questions is that the Ca dependence of the various components of cell volume regulation such as cell volume changes, efflux of osmolytes, changes in cell Ca levels, etc., has not always been examined in the same cell type. This is important because, in contrast to the similarities in the basic features of RVD such as time course, handled osmolytes and nature of the efflux pathways observed in various cell types, the transduction mechanisms appear different, and therefore the response of one cell type in this respect cannot be inferred from observations made in other cells.

In neurons, evidence relating Ca to RVD is scarce and controverted. In cultured cortical and cerebellar neurons and in neuroblastoma NIE115 cells, swelling elicits an increase in intracellular Ca which is dependent of

Contract grant number: DGAPA-UNAM IN-202093; Contract grant number: CONACUT 2262P-N.

\*Correspondence to: Dr. Julio Morán, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apartado Postal 70–253, México D.F., 04510, Mexico.

Received 26 July 1996; Revised 14 August 1996; Accepted 15 August 1996.



external Ca whereas RVD has been found independent of external Ca in NIE115 cells and in cerebellar granule neurons (Falke and Mislter, 1989; Sánchez-Olea et al., 1993). In order to clarify the influence of Ca during RVD in neurons, in the present study we examined in the same type of cells, namely cultured cerebellar granule neurons: 1) the change in intracellular Ca elicited by swelling in individual neurons, 2) the influence of removal of external Ca on RVD and on the efflux of the osmolytes taurine and  $^{125}\text{I}$  (as tracer for Cl), and 3) the effect of conditions and drugs that potentially modify extracellular Ca fluxes and intracellular Ca levels on RVD and osmolyte fluxes.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Fetal calf serum and penicillin/streptomycin were obtained from GIBCO (Grand Island, NY). Poly-L-lysine (molecular weight  $>300,000$ ), trypsin, soybean trypsin inhibitor, DNase, diltiazem, dantrolene, TMB-8 and verapamil were obtained from Sigma Chemical Corp. (St. Louis, MO). Nitrendipine and nimodipine were purchased from RBI (Natick, MD), BAPTA-AM, A23187 and ryanodine from Calbiochem (San Diego, CA) and  $\infty$ -Conotoxin MVIIC from Peptide Int. Inc. (Louisville, KY). Fura-2 AM and fura-2 pentapotassium salt were purchased from Molecular Probes (Eugene, OR). All other chemicals were of the purest grade available from regular commercial sources.

### Cell Cultures

Cultures of cerebellar granule neurons were prepared as previously described by Morán and Patel (1988). Briefly, the dissociated cell suspensions from the cerebellum of 8-day-old rats were plated at a density of  $265 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> in plastic dishes previously coated with poly-L-lysine (5  $\mu\text{g/ml}$ ). The culture medium contained basal Eagle's medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 2 mM glutamine, 50 U/ml penicillin, and 50  $\mu\text{g/ml}$  streptomycin. The culture dishes were incubated at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>/95% air atmosphere. When cultures were maintained for more than 2 days in vitro (DIV), they were added with both cytosine arabinoside (10  $\mu\text{M}$ ) at about 20 hr after seeding and 150  $\mu\text{M}$  NMDA to increase cell survival (Balázs et al., 1988). The enrichment of cultures with neurons was assessed by counting cells immunostained with polyclonal antibodies against neuron-specific enolase (Dakopatts, Carpinteria, CA). Cells stained with antibodies against glial fibrillar acidic protein (Dakopatts) were identified as glial cells. Our cultures contained about 95% neurons, from which 90% correspond to glutamatergic granule cells and the remaining 5% neurons

represent GABAergic non granule cells, most likely stellate and basket neurons (Gallo et al., 1986).

### Cell Volume

Cell volume measurements were made as described in Pasantes-Morales et al. (1993). Briefly, neurons cultured for 1–2 days were detached by treatment for 2–3 min with phosphate-buffered saline without calcium and containing 1 mM EDTA and 0.01% trypsin. Detached cells were mixed with the same volume of serum-containing medium, and then centrifuged and resuspended in isosmotic Krebs-HEPES medium. Then, an aliquot of the cell suspension was diluted approximately 100-fold with media. Exactly 1 min later, cell volume was measured at the indicated times using a Coulter cell counter (model ZF) associated to a Coulter channelizer (model 256). Cell volumes were measured in picoliters but results were routinely expressed as relative volume, i.e. the change with time over the initial volume recorded in isosmotic medium. HEPES-buffered isosmotic medium contained (in mM) NaCl, 135; KCl, 5; MgSO<sub>4</sub>, 0.6; CaCl<sub>2</sub>, 1; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.7; glucose, 10; HEPES, 10; pH 7.4. The osmolarity calculated was 320 mOsm/kg medium and was verified in a freezing point osmometer. Hyposmotic solutions were always prepared by reducing the concentration of NaCl.

### Release

For osmolyte release experiments (Pasantes-Morales et al., 1993; Sánchez-Olea et al., 1996), cultured cells were loaded by incubation at 37°C with either [<sup>3</sup>H]-taurine (20–40 Ci/mmol; 2.5  $\mu\text{Ci/ml}$ ) for 1 hr or  $^{125}\text{I}$  (17 Ci/mg; 1  $\mu\text{Ci/ml}$ ) for 15 min in the culture medium. After loading, cells were washed three times (5 min each) with isosmotic medium. For [<sup>3</sup>H]-taurine release experiments, cells were first incubated for 5 min in isosmotic medium and then for 5 min in 50% hypotonic medium. The efflux of  $^{125}\text{I}$  was measured by collecting fractions every 20 sec during 2.5 min in isosmotic medium and 2.5 min in hypotonic media. At the end of the experiment, radioactivity in the collected fractions and that remaining in cells was measured by scintillation spectrometry. Results are expressed as the percent of radioactivity released at each incubation period of the total radioactivity accumulated by cells during loading, excluding the washing period. In some experiments on  $^{125}\text{I}$  release, results are expressed as efflux rate coefficients as previously described (Venglarik et al., 1990; Sánchez-Olea et al., 1996). In all parallel experiments control cells were treated with the vehicle used to prepare solutions containing the tested compounds.

### Intracellular Ca Measurements

Methods are described in detail elsewhere (Hernández-Cruz et al., 1995). Briefly, a glass coverslip con-

taining cultured cerebellar neurons was transferred to a recording chamber (Warner Instruments, Mod. RC-25, Hamden, CT) on an inverted microscope (Nikon Diaphot TMD, Nikon Corp., Japan). Cells were loaded with fura-2 by incubation with the acetoxymethyl (AM) ester form of the dye fura-2/AM (Molecular Probes), at a final concentration of 1  $\mu$ M, with no dispersing agents added. Cells were allowed to load for 30 min at room temperature and then rinsed for another 15 min before the beginning of the experiments. Ca levels were determined by recording pairs of images using alternating illumination with 340 nm and 380 nm excitation. Dual wavelength excitation was provided by two nitrogen pulsed lasers (3 ns pulse duration), one emitting at its natural wavelength of 337 nm and the second one dye-tuned at 380 nm. These lasers were triggered alternatively at frequencies ranging from 2 to 15 Hz under computer control. (Biolase Imaging System, Newton, MA). Background images at 340 and 380 nm illumination were obtained from an area of the coverslip free of cells. These images were stored separately and used for on-line background subtraction. We found that a correction for cell autofluorescence was not essential for calibration purposes. The key elements of the fluorescence Ca imaging system were a high numerical aperture UV objective (Nikon UV-F 100 $\times$ , 1.3 N.A.), an intensified charge coupled device camera (c2400-87, Hamamatsu, Bridgewater, NJ) and the Biolase Imaging System running under their FL-2 software. The system allows real-time simultaneous acquisition of fluorescence measurements from multiple areas of interest placed on individual cells. Ca concentrations were calculated from fluorescence measurements at 340 and 380 nm excitation wavelengths using the formula:

$$[\text{Ca}] = \text{KD} (\text{Ff}/\text{Fb}) (\text{R} - \text{Rmin})/(\text{Rmax} - \text{R}),$$

where the calculated dissociation constant (KD) for fura-2 is 300 nM, Ff/Fb is the ratio of fluorescence values for Ca-free/Ca-bound indicator at 380 nm excitation, R is the ratio of fluorescence at 340/380 nm for the unknown [Ca], and Rmin and Rmax are the ratio of fura-2 fluorescences at 340/380 nm of Ca-free and Ca-bound fura-2. The values of Ff/Fb, Rmin, and Rmax were determined by measuring under identical conditions the fluorescence of a glass capillary 100  $\mu$ m in diameter containing calibration solutions with 100  $\mu$ M fura-2 pentapotassium salt (Molecular Probes), and known Ca concentrations in the range from 10 nM to 40  $\mu$ M. Although in situ calibrations were attempted in initial experiments, we found very difficult to manipulate [Ca] over the required range. Our Ca measurements, based exclusively in the in vitro calibrations, could be underestimated to some extent because of effects of viscosity and dye binding to cytoplasmic constituents (Konishi et al., 1988).

Cells were continuously superfused with a recording solution containing (in mM) NaCl 130, KCl 3, CaCl<sub>2</sub> 2, MgCl<sub>2</sub> 2, NaHCO<sub>3</sub> 1, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5, HEPES-Na 5, and glucose 5 (pH 7.4). Hyposmotic test solutions were pressure-applied (10 psi) via a puffer pipette located within 100  $\mu$ m from the cells under examination, or by superfusing the whole recording chamber. Puffer application of the hyposmotic solution was controlled by the solenoid valve of a Picospritzer II device (General Valve, Fairfield, NJ). Control experiments showed that with this procedure, the external medium surrounding the cell(s) was replaced within less than 150 msec. Fura-2 experiments were carried out at 22–23°C.

## RESULTS

### Effect of Changes of External Ca

**Regulatory volume decrease.** Figure 1A shows the time course of RVD in cerebellar neurons exposed to 50% hyposmotic medium which is similar to that previously described (Pasantes-Morales et al., 1994). At the time of the experiment, volume recovery is not complete and the efficiency of the regulatory process is about 60%. When RVD was measured in Ca-free medium containing 0.5 mM EGTA (preincubated during 10 min), the extent and time course of RVD was not significantly changed (Fig. 1A). No difference was observed when cells were preincubated up to 20 min with the EGTA, Ca-free media (not shown). When cells were preincubated with 0.5 mM BAPTA and RVD measured in the presence of the chelator, there was an inhibition of 20%–25% in the volume recovery at 10–16 min as compared to control (Fig. 1A). The same reduction in RVD efficiency was observed at lower concentrations of BAPTA (0.1–0.2 mM). This inhibitory effect of BAPTA was not observed when the medium contained 0.2 mM BAPTA and 1.5 mM Ca (not shown) excluding a direct pharmacological effect of BAPTA. RVD was unaffected by the addition of divalent cations Co and Cd (0.5 mM) or by the trivalent cations Gd (30  $\mu$ M) and La (0.5 mM), which are potent antagonists of voltage-gated transmembrane Ca transport (Table I). The DHPs nitrendipine and nimodipine, specific blockers of the voltage-dependent L-type Ca channels, exhibited an inhibitory effect on RVD (Table I). This effect, however, was independent of the presence of extracellular Ca, as the observed inhibition of RVD was the same in nominally Ca-free medium containing 0.5 mM EGTA (not shown). Other blockers of L-type Ca channels, verapamil and diltiazem did not affect RVD (Table I).

**<sup>125</sup>I release.** Cerebellar granule neurons responded to cell swelling elicited by 50% hyposmotic solutions with an increase in <sup>125</sup>I efflux which is rapid in onset and offset. During the activation of <sup>125</sup>I fluxes

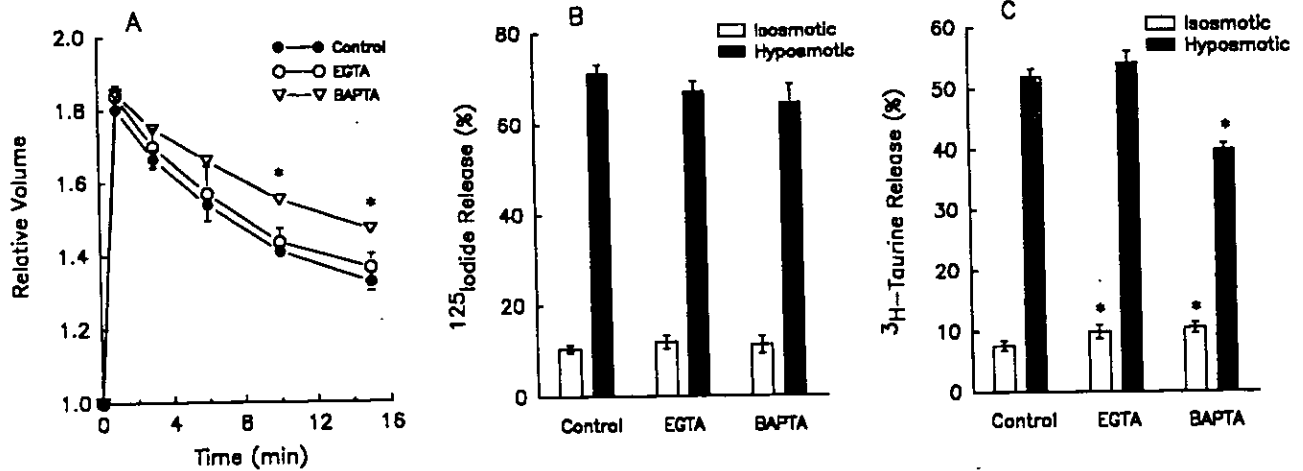


Fig. 1. Effect of calcium chelators on RVD (A) and the release of  $^{125}\text{I}$  (B) and  $^3\text{H}$ -taurine (C) induced by hyposmolarity in cultured neurons. Cell volume was measured in cerebellar granule neurons after 1–2 days in culture, detached by treatment with trypsin. Cells were preincubated during 5–10 min with 0.5 mM EGTA or BAPTA before cell volume assay. Results are expressed as relative volume considering cell volume in isosmotic conditions as 1. For release experiments cells loaded with  $^3\text{H}$ -taurine were incubated for 5 min with isos-

motomic medium and 5 min with 50% hyposmotic medium.  $^{125}\text{I}$  release was measured by collecting fractions every 20 sec during 2.5 min in isosmotic and 50% hyposmotic media. Results are expressed as radioactivity released under isosmotic and hyposmotic conditions as the percent of total radioactivity in cells after washing. Results are means of 6–18 experiments with SEM values shown as vertical bars if they extend beyond the symbols. Asterisk indicates statistically significant difference from control ( $P < 0.001$ ) using Student's *t*-test.

TABLE I. Effect of  $\text{Ca}^{2+}$  Channel Blockers on Hyposmolarity Stimulated  $^{125}\text{I}$  Release and RVD in Cultured Cerebellar Granule Cells

Inhibitor	$\mu\text{M}$	RVD (%)	$^{125}\text{I}$ Efflux (%)	
			Basal	Stimulated
None		$52.7 \pm 2.2$	$7.5 \pm 0.4$	$78.9 \pm 1.6$
Verapamil	100	$51.4 \pm 1.6$	$8.5 \pm 1.4$	$77.8 \pm 0.0$
Diltiazem	50	$52.9 \pm 2.5$	$8.6 \pm 0.1$	$77.6 \pm 0.1$
$\omega$ -ctx-MVIIIC	0.5	—	$8.3 \pm 1.2$	$74.6 \pm 0.1$
$\text{La}^{3+}$	500	—	$8.0 \pm 1.0$	$76.8 \pm 3.0$
$\text{Cd}^{2+}$	500	$41.6 \pm 0.8^*$	$8.3 \pm 0.5$	$78.4 \pm 0.3$
$\text{Co}^{2+}$	500	$50.7 \pm 1.1$	$6.7 \pm 0.7$	$79.1 \pm 0.4$
$\text{Gd}^{3+}$	30	$49.3 \pm 1.5$	$7.3 \pm 0.2$	$71.4 \pm 3.7$
Nitrendipine	10	$33.5 \pm 3.0^*$		
	25	$20.4 \pm 4.0^*$		
Nimodipine	10	$44.6 \pm 3.5^*$		
	25	$31.9 \pm 2.5^*$		

Cells were loaded with  $^{125}\text{I}$  and preincubated 10 min with the indicated concentrations of drugs. Cells were washed and release was measured. Cells were exposed to isosmotic and then to 50% hyposmotic medium, and five fractions of each medium were collected at 20 sec intervals during 5 min. For RVD cells were resuspended in isosmotic medium and then the volume regulation was measured in 50% hyposmotic media containing the indicated concentrations of the drugs. Results are expressed as percentage of RVD, i.e., the percentage of recovery of cell volume between min 1 (maximal volume) and min 15. Values are means  $\pm$  SE of 6–10 experiments. Asterisk indicates statistically significant difference from control ( $P < 0.001$ ) using Student's *t*-test.

evoked by cell swelling (50% hyposmotic medium), about 80% of the total  $^{125}\text{I}$  accumulated during loading was released (Fig. 1B). This release pattern of  $^{125}\text{I}$  is

essentially similar to that previously described (Sánchez-Olea et al., 1996). Removal of external Ca, using the chelators EGTA (0.5 mM) and BAPTA (0.5 mM), did not significantly modify the amount of  $^{125}\text{I}$  release, although a tendency to decrease  $^{125}\text{I}$  efflux in the presence of BAPTA was observed (Fig. 1B). The efflux of  $^{125}\text{I}$  elicited by 15% and 30% hyposmotic solutions was similarly unaffected by removal of extracellular Ca (not shown). Table I shows that Co, Cd, Gd and La did not affect significantly the  $^{125}\text{I}$  efflux associated to cell volume regulation. Diltiazem and verapamil were also ineffective (Table I). None of these compounds affected the basal release of  $^{125}\text{I}$  in isosmotic conditions. The DHPs nitrendipine and nimodipine exerted a significant inhibitory effect of  $^{125}\text{I}$  efflux activated by hyposmolarity. At 50  $\mu\text{M}$   $^{125}\text{I}$  release was inhibited by more than 90% (Fig. 2). The inhibitory effect of DHP was essentially identical in Ca-free media containing 0.5 mM EGTA (Fig. 2).

**$^3\text{H}$ Taurine release.** In accordance with previous observations (Pañantes-Morales et al., 1993), cerebellar granule neurons preloaded with  $^3\text{H}$ taurine and then exposed to 50% hyposmotic solutions responded with a rapid and marked release of the amino acid following the time course of RVD. About 54% of the taurine pool was released during the first 5 min of exposure to the hyposmotic medium and up to 80% was lost at the end of the volume regulatory process (Fig. 1C). Removal of external Ca by addition of the chelator EGTA (0.5 mM) did

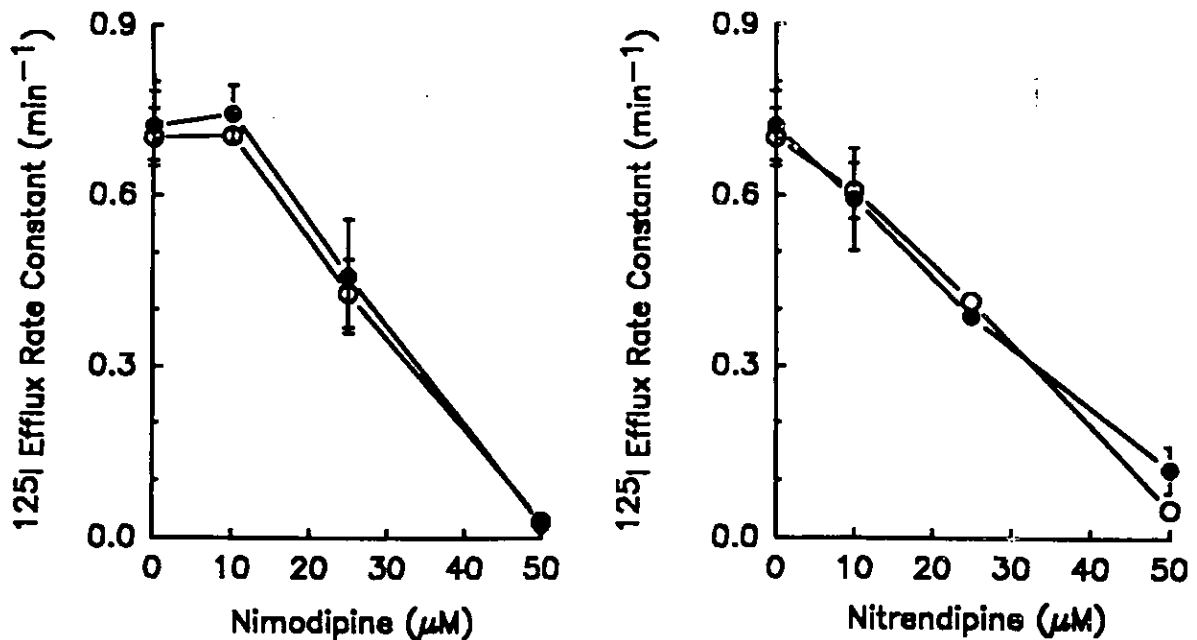


Fig. 2. Effect of nimodipine and nitrendipine on the release of  $^{125}\text{I}$  stimulated by hyposmolarity in cultured neurons. Cells loaded with  $^{125}\text{I}$  for 15 min were preincubated with nimodipine or nitrendipine for 5 min at the indicated concentrations. After washing cells, fractions were collected every 20 sec during 2.5 min in isosmotic and 50% hyposmotic media containing the

same drug concentration. Results are expressed as efflux rate coefficients as described in Materials and Methods. Results are means of six experiments with SEM values shown as vertical bars if they extend beyond the symbols. ●, solutions with 1 mM Ca; ○, solutions with no Ca plus 0.5 mM EGTA.

not significantly affect [ $^3\text{H}$ ]taurine release (Fig. 1C). Similarly, no effects were observed when the cells were preincubated in the presence of the chelator in Ca free media during 10–30 min (not shown). Both BAPTA and EGTA induced a small increase in the basal (isosmotic) release of [ $^3\text{H}$ ]taurine (Fig. 1C) and BAPTA, but not EGTA, inhibited by 20% the efflux of [ $^3\text{H}$ ]taurine (Fig. 1C). As for RVD and  $^{125}\text{I}$  efflux, Co, Cd (0.5 mM) and Gd (30  $\mu\text{M}$ ) did not reduce [ $^3\text{H}$ ]taurine release associated to cell swelling (Table II). Lanthanum at a concentration of 0.1 mM was ineffective and at 0.5 mM reduced [ $^3\text{H}$ ]taurine release by 30% (Table II). Diltiazem and verapamil had no effect on [ $^3\text{H}$ ]taurine release (Table II). DHPs exhibited a marked concentration-dependent inhibition of the volume sensitive [ $^3\text{H}$ ]taurine release, with maximal inhibition (>95%) at 50  $\mu\text{M}$  (Fig. 3). At any given concentration, DHPs affected the release of [ $^3\text{H}$ ]taurine in isosmotic conditions (Fig. 3). In media with no Ca added and containing 0.5 mM EGTA, the effect of DHPs was essentially the same as in media with Ca (Fig. 3).

All the above results were obtained from neurons of 1–2 days in culture. No difference regarding the effect of the examined conditions and drugs was observed in neurons of 7–8 days in culture (not shown).

#### Changes in Intracellular Ca

The effect of an hyposmotic solution on cell swelling and intracellular Ca levels of granular neurons was examined using the fluorescent probe fura-2 (Figs. 4 and 5). Typically, fluorescence measurements at 340 and 380 nm excitation were collected simultaneously at intervals ranging from 0.2 to 0.5 sec from several cells selected by drawing areas of interest on the phase contrast image. The selected cells were first challenged with a 1 sec puff of a high K<sup>+</sup> depolarizing solution (140 mM KCl, 10 mM HEPES and 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4) delivered from a nearby pipette. Figure 4C shows the simultaneous recording of [Ca]<sub>i</sub> changes in 12 individual cells morphologically identified as granular neurons. All cells responded to the application of a high K<sup>+</sup> solution, suggesting that they possess functional voltage-gated Ca channels, and therefore are likely to be cerebellar neurons. These changes were absent in cells morphologically identified as glial cells. They were also absent in nerve cells if Ca was omitted from the depolarizing solution (data not shown). Spontaneous fluctuations of [Ca]<sub>i</sub> were not observed in these cultures. As shown in Figure 4A, when a 50% hyposmotic solution was applied with a second puffer pipette, a moderate cell swelling was produced (judged by the decrease in fluorescence

TABLE II. Effect of  $\text{Ca}^{2+}$  Channel Blockers on the Hyposmolarity Stimulated [ $^3\text{H}$ ]-Taurine Release in Cultured Granule Cells

Inhibitor	$\mu\text{M}$	[ $^3\text{H}$ ]-Taurine efflux (%)			
		With $\text{Ca}^{2+}$ external		Without $\text{Ca}^{2+}$ external	
		Basal	Stimulated	Basal	Stimulated
None		$7.7 \pm 0.1$	$54.1 \pm 0.4$	$10.3 \pm 0.2$	$53.8 \pm 0.2$
Verapamil	100	$8.5 \pm 1.5$	$63.0 \pm 2.0$	$10.3 \pm 1.1$	$58.7 \pm 2.2$
	250	$8.0 \pm 1.0$	$59.0 \pm 1.8$	$9.4 \pm 1.0$	$59.8 \pm 1.5$
Diltiazem	50	$8.7 \pm 0.5$	$54.6 \pm 2.0$	$10.6 \pm 0.7$	$53.3 \pm 1.4$
$\omega$ -ctx-MVIIIC	0.5	$6.7 \pm 0.3$	$58.2 \pm 1.0$		
$\text{La}^{3+}$	500	$5.6 \pm 0.6$	$38.1 \pm 2.0^*$		
$\text{Cd}^{2+}$	500	$6.0 \pm 0.7$	$61.6 \pm 1.5$		
$\text{Co}^{2+}$	500	$6.5 \pm 0.7$	$63.4 \pm 1.7$		
$\text{Gd}^{3+}$	30	$8.3 \pm 0.6$	$54.9 \pm 1.4$		

Cells were preloaded with [ $^3\text{H}$ ]-taurine and then preincubated during 10 min with the indicated concentrations of the drugs and subsequently a 5 min period in isosmotic or 50% hyposmotic medium was collected; results are expressed as % [ $^3\text{H}$ ]-taurine released. Values are averages  $\pm$  SE of 6–10 different experiments. Asterisk indicates statistically significant difference from control ( $P < 0.001$ ) using Student's t-test.

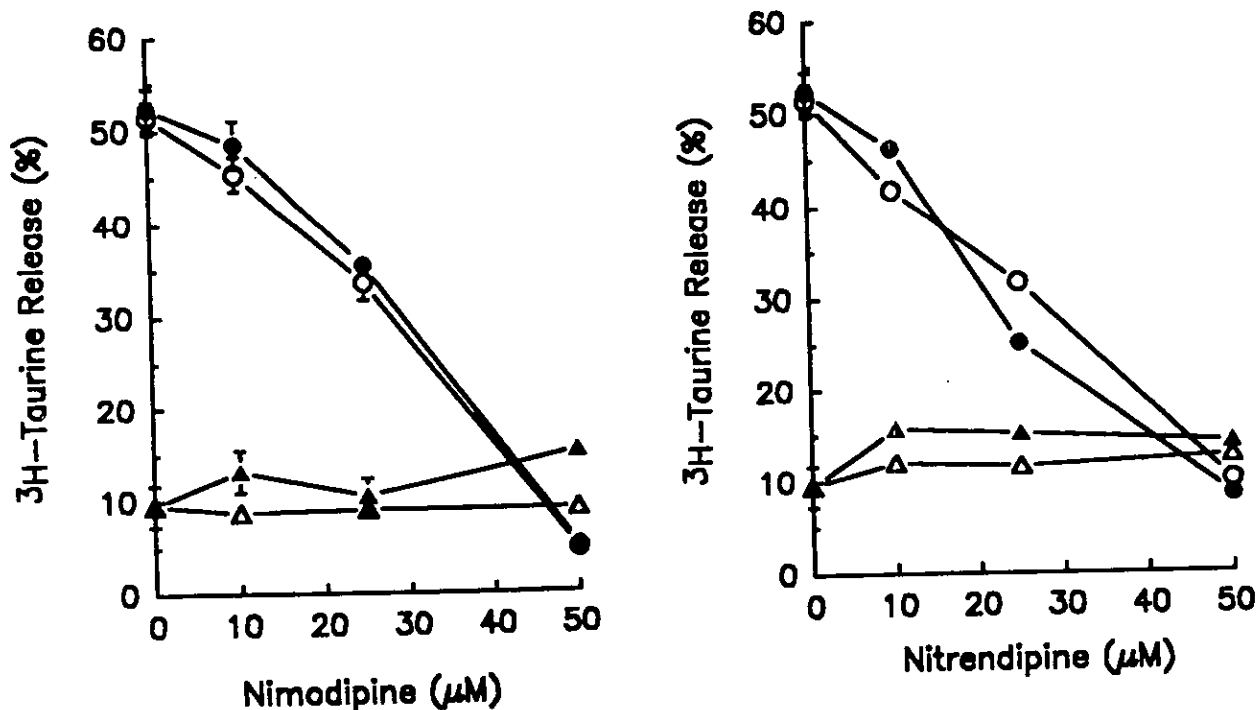


Fig. 3. Effect of nimodipine and nitrendipine on the release of [ $^3\text{H}$ ]-taurine stimulated by hyposmolarity in cultured neurons. Cells loaded with [ $^3\text{H}$ ]-taurine for 1 hr were preincubated during 5 min with nimodipine or nitrendipine at the indicated concentrations. After washing with isosmotic medium cells were incubated for 5 min with isosmotic medium and 5 min with 50% hyposmotic medium in the presence of the same concentrations of the drugs. Results are expressed as radioac-

tivity released under isosmotic (triangles) and hyposmotic (circles) conditions as the percent of total radioactivity in cells after the washing period. Results are means of eight experiments with SEM values shown as vertical bars if they extend beyond the symbols. ●, hyposmotic, 1 mM Ca; ○, hyposmotic, no Ca plus 0.5 mM EGTA; ▲, isosmotic, 1 mM Ca; △, isosmotic, no Ca plus 0.5 mM EGTA.

recorded at the 380 nm excitation), but no detectable changes in  $[\text{Ca}]_i$  were observed. To ensure a complete replacement of the external medium with the hyposmotic

solution, the entire recording chamber was then rapidly superfused (flow rate, 3 ml/min) with the same hyposmotic solution. This produced a more severe cell swell-

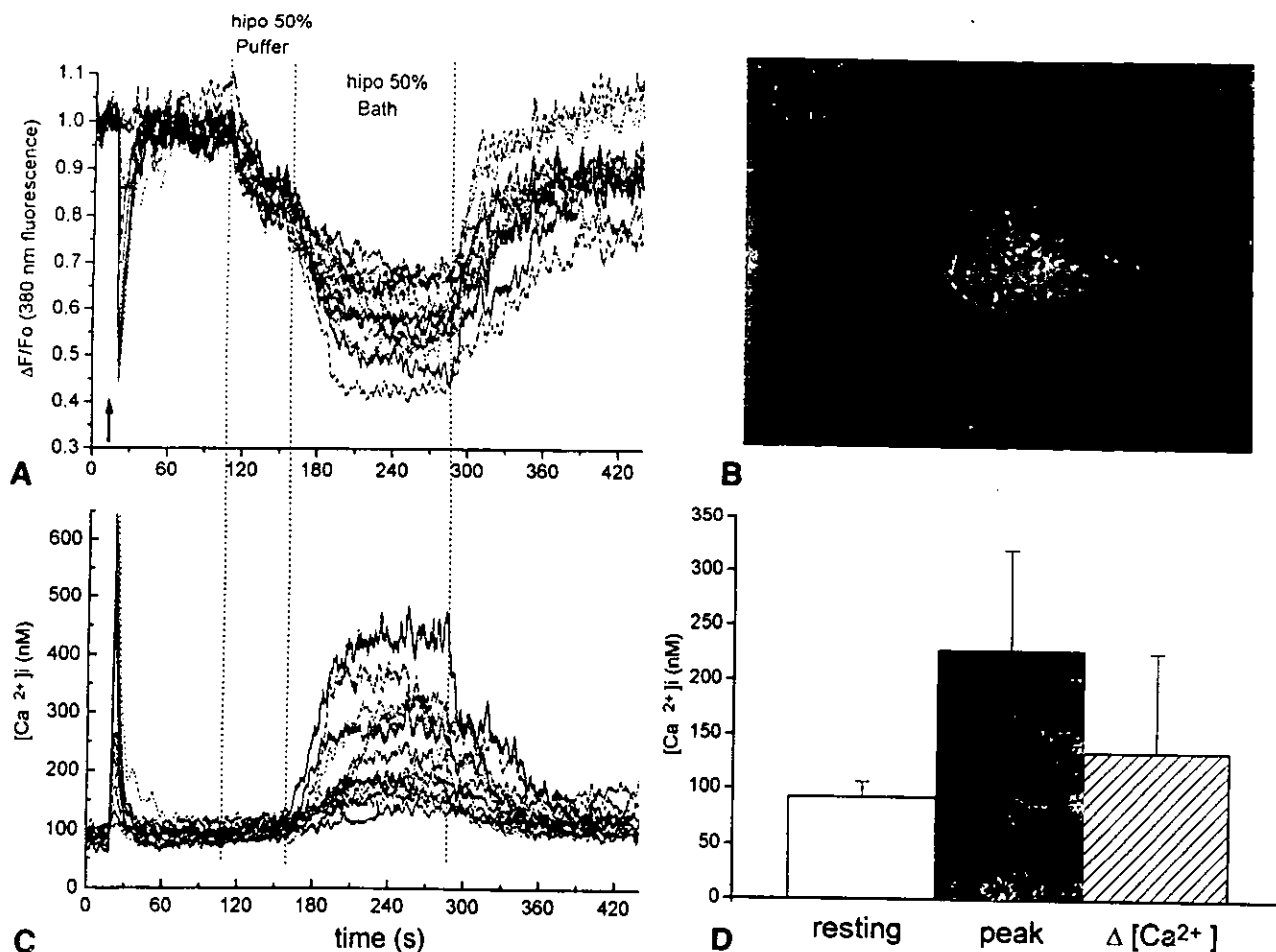


Fig. 4. Hyposmotic-induced changes in intracellular Ca concentration in cultured cerebellar granule neurons. Fluorescence changes (340/380 nm excitation) were simultaneously recorded in 12 individual cerebellar granule cells chosen from the field whose micrograph is shown in B. A: Normalized fluorescence changes (380 nm excitation) obtained from areas of interest centered on individual cells. C: Ca concentration changes occurring at each individual cell, calculated from the 340/380 nm fluorescence ratio (see Materials and Methods). The cells were

first challenged with a 1 sec puff of a high K solution delivered by pressure from a nearby micropipette (arrow). Later, a puff of 50% hyposmotic saline was delivered with a second pipette and then the entire recording chamber was perfused with hyposmotic solution. This produced the changes in Ca concentration shown in C. D: Mean Ca concentration values obtained from granular cells at rest and at the peak of the swelling-induced Ca rise ( $n = 22$ ).

ing, followed by  $[Ca]_i$  increases in most, but not all neurons (Fig. 4C). The increase in intracellular Ca ranged from 20 nM to about 350 nM. In all cases the increase in intracellular Ca levels induced by hyposmolarity was abolished when cells were preincubated 10 min with 10  $\mu$ M BAPTA-AM (Fig. 5). The following experiments were carried out to determine if the increase in  $[Ca]_i$  observed in granular neurons upon cell swelling is important for osmotic regulation.

**Effect of drugs affecting intracellular Ca on RVD and  $^{125}I$  and  $[^3H]$ taurine fluxes.** The effects of compounds known to modify intracellular Ca pools on RVD and osmolyte fluxes were examined. The com-

pounds used were the permeable Ca chelator BAPTA-AM (30  $\mu$ M) and the blockers of Ca release from endoplasmic reticulum dantrolene (30  $\mu$ M), TMB-8 (100  $\mu$ M), and ryanodine (1  $\mu$ M). RVD was not significantly affected by BAPTA-AM (Table III), which completely blocks intracellular Ca increases induced by hyposmolarity (Fig. 5) without affecting cell swelling (Fig. 5D). This chelator marginally (11%) reduced the swelling-stimulated efflux of taurine without affecting the basal release (Table III). BAPTA-AM also inhibited by 16% the volume-activated efflux of  $^{125}I$  and increased about twofold the basal efflux (Table III). None of the blockers of endogenous Ca release, dantrolene, TMB-8, and ry-

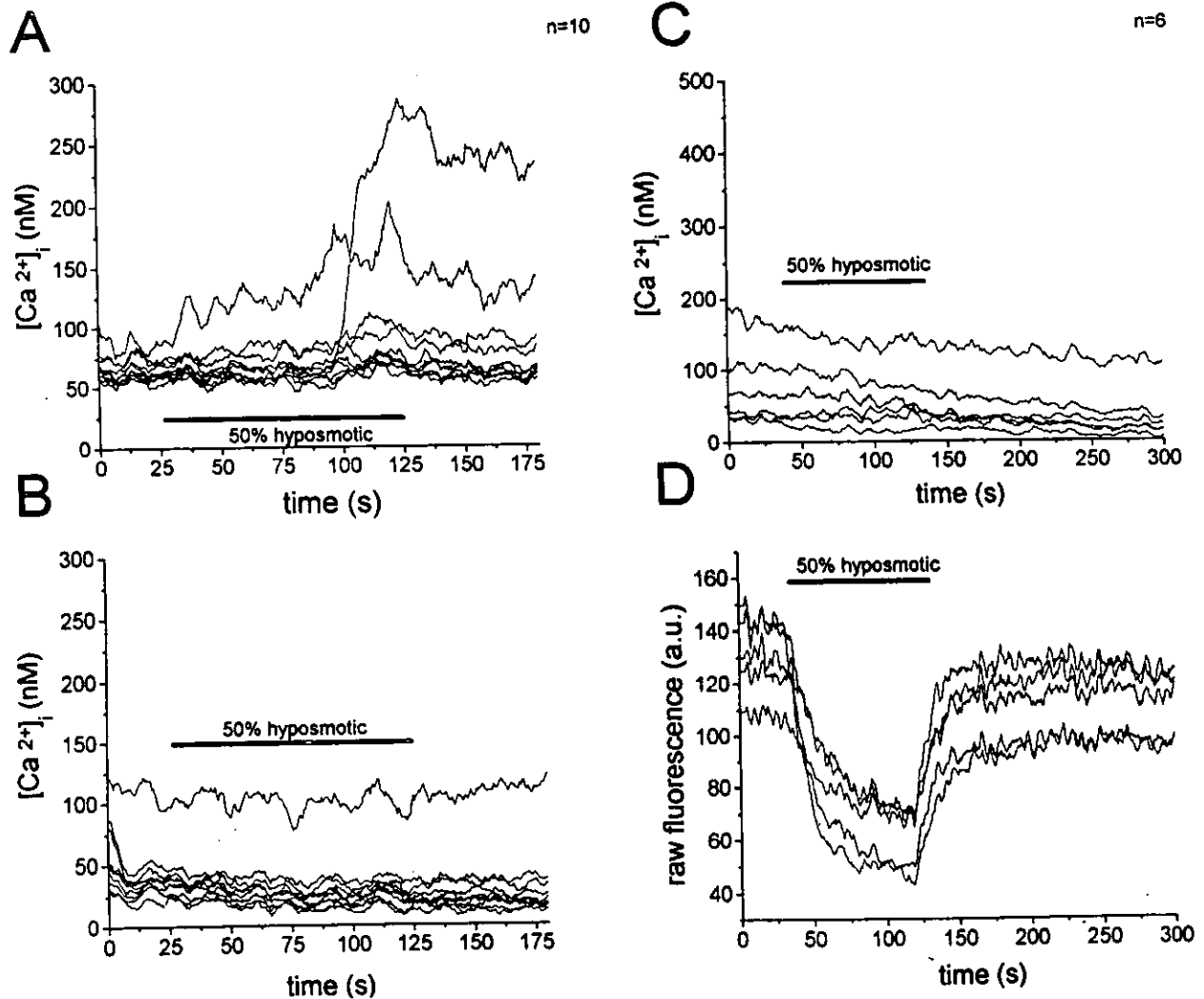


Fig. 5. Effect of BAPTA-AM on the swelling-induced Ca rises in cultured cerebellar neurons. **A:** Ca concentration changes elicited by a 90 sec exposure to an hyposmotic solution were recorded from 10 individual granule neurons. The responses were small and became more apparent towards the end of the pulse. **B:** Responses from the same group of cells after 10 min incubation with 10  $\mu$ M BAPTA-AM. Notice that except for one cell that responded with a Ca increase in A, all

remaining cells reduced their resting Ca concentration. In addition, swelling-induced Ca rises were completely abolished by the Ca chelator. **C:** In a different group of six cells from the same dish (after BAPTA-AM incubation), the complete absence of Ca rises upon exposure to the hyposmotic challenge, in spite of the significant volume changes recorded as fluorescence decreases (380 nm excitation) due to fura-2 dilution (**D**).

anodine, significantly affected RVD or osmolyte fluxes (Table III).

The effect of the Ca ionophore A23187 on taurine and  $^{125}I$  release in isosmotic conditions was examined to investigate whether an increase in intracellular Ca by itself was able to activate the efflux of osmolytes associated to RVD. The ionophore elicited a small increase in taurine efflux, from 0.2% to 0.35%. Nevertheless, this efflux was negligible as compared to that observed during cell swelling induced by hyposmotic conditions

(9.5% at the peak release).  $^{125}I$  efflux was unaffected by the ionophore (results not shown).

## DISCUSSION

RVD in cerebellar granule neurons from primary cultures was found independent of extracellular Ca as the time course and efficiency of volume regulation remained essentially unchanged in Ca-free medium containing EGTA as chelator as a nonsignificant decrease of

TABLE III. Effect of Drugs Influencing Cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  on Hyposmolarity Induced [ $^3\text{H}$ ]-Taurine and  $^{125}\text{I}$  Efflux and RVD, Using Cultured Granule Cells

Condition	$\mu\text{M}$	[ $^3\text{H}$ ]-Taurine efflux (%)		$^{125}\text{I}$ Efflux (%)		RVD(%)
		Basal	Stimulated	Basal	Stimulated	
None		6.9 $\pm$ 0.5	53.5 $\pm$ 0.4	7.2 $\pm$ 0.8	77.0 $\pm$ 2.1	58.4 $\pm$ 2.3
BAPTA-AM	30	6.4 $\pm$ 0.2	47.9 $\pm$ 1.2*	16.0 $\pm$ 1.0*	73.9 $\pm$ 0.5	58.2 $\pm$ 1.8
Dantrolene	50	6.6 $\pm$ 0.8	49.0 $\pm$ 4.5	4.9 $\pm$ 0.1	82.0 $\pm$ 0.3	50.2 $\pm$ 1.4
TMB-8	100	7.9 $\pm$ 0.1	55.2 $\pm$ 1.6	14.9 $\pm$ 0.3*	74.7 $\pm$ 3.7	51.8 $\pm$ 2.5
Ryanodine	1	6.6 $\pm$ 0.5	54.5 $\pm$ 0.7	6.8 $\pm$ 0.6	67.3 $\pm$ 3.5	60.9 $\pm$ 1.8

Cells were loaded with  $^{125}\text{I}$  or [ $^3\text{H}$ ]-taurine and preincubated 10 min with the indicated concentrations of drugs. Cells were washed and release was measured. Cells were exposed to isosmotic and then to 50% hyposmotic medium, and five fractions of each medium were collected at 20 sec intervals during 5 min for  $^{125}\text{I}$  and a 5 min period in isosmotic or hyposmotic medium for [ $^3\text{H}$ ]-taurine; results are expressed as % tracer released. Values are means  $\pm$  SE of 6–16 experiments. Asterisk indicates statistically significant difference from control ( $P < 0.001$ ) using Student's *t*-test.

no more than 7–8% on RVD efficiency was observed. However, this decrease was higher (25%) when BAPTA was used as chelator. These effects of the chelators may be related to possible actions on surface charges in the membrane conducting to ion leakage leading to cell swelling which would counteract the cell volume decrease. In fact, small increases in the basal efflux of osmolytes were also observed under these conditions. The lack of effect on RVD or osmolyte fluxes of divalent cations, which are general antagonists of transmembrane Ca transport, further supports the independence of these processes of extracellular Ca. Drugs such as verapamil and diltiazem which block the L-type Ca channels were also without effect on RVD. Only the DHP exhibited a marked, dose-dependent inhibitory effect on RVD. However, this inhibitory action is most likely unrelated to Ca entry via the L-type channels, since 1) the inhibitory concentrations are larger than those required for Ca channel inhibition, 2) as mentioned above, other L-type Ca channel blockers such as verapamil and diltiazem were ineffective, and 3) the DHP inhibition occurs even in the absence of extracellular Ca. Other reports addressed to the Ca dependence of RVD in neurons are that of Falke and Mislis (1989) in N1E115 neuroblastoma cells and ours in cerebellar granule neurons in which the volume regulatory process was found unaffected by removal of extracellular Ca, in agreement with the present results. In accordance with this Ca independence of RVD, the associated fluxes of  $^{125}\text{I}$  and taurine in these cells were also essentially unaffected by all maneuvers directed to decrease extracellular Ca availability for volume regulation, with the exception of the DHP which also exhibited a marked inhibitory effect on osmolyte fluxes, independent of extracellular Ca, in total agreement with results on RVD. A report by Bassavappa et al. (1995) on CHP-100 neuroblastoma cell line describes inhibition of  $^{125}\text{I}$  fluxes in the presence of a very high concentration (2.5 mM) of EGTA. However, no

inhibition by blockers of Ca channels such as Ni, diltiazem, and the  $\omega$ -conotoxin GVIA could be observed. An indirect evidence of the Ca-independence of osmolyte release in cerebellar granule neurons is the lack of effect of increasing cytosolic Ca by the ionophore A23187, which failed to elicit any efflux of [ $^3\text{H}$ ]-taurine and  $^{125}\text{I}$  in isosmotic conditions. This result contrasts with that of Hoffmann et al. (1986) in Ehrlich ascites cells, in which the ionophore markedly activates the efflux of taurine in isosmotic medium, with properties similar to those of the efflux activated by hyposmolarity.

In most cell types, swelling consistently elicits a rise in intracellular Ca levels with increases reported between 35 to 400 nM (McCarthy and O'Neil, 1992). A correlation between RVD and this increase in cytosolic Ca has not been conclusively established, mainly because the features of the two events have not been examined in parallel. This has been done in the present study in cerebellar granule neurons, in which the effects of conditions and drugs affecting changes in intracellular Ca elicited by swelling, have been examined also on the time course and efficiency of RVD, and on the osmolyte fluxes which subserve it. In agreement with our previous work using fluo-3 to measure Ca changes in a population of neurons in monolayer (Sánchez-Olea, et al., 1993), an increase in intracellular Ca associated to cell swelling was observed in the present study, measuring Ca levels with fura-2 in individual neurons. This single-cell measurement approach revealed a marked variability in the response among the different cells, which was not clearly related to the extent and rate of cell swelling but makes difficult accurate quantitative studies on the effect of Ca channel blockers. The origin of this cytosolic Ca increased upon swelling in cerebellar granule neurons is unclear. It may come either from an increased permeability to cytosolic Ca through the membranes stretched by swelling, or from endogenous store sites activated by volume or/and voltage changes associated to cell swell-



ing. In our previous work in cerebellar granule neurons (Sánchez-Olea et al., 1993) it was shown that the increase in intracellular Ca was largely dependent of extracellular Ca, suggesting that swelling induces a change in cell membrane permeability to Ca. The nature of this Ca influx is still not well characterized since it is unaffected by blockers of voltage-dependent Ca channels such as La and verapamil. In neuroblastoma cells CHP-100, the P- and Q-type Ca channel blocker  $\omega$ -conotoxin MVIIC was found to prevent the increase in intracellular Ca raised by swelling (Basavappa et al., 1995) but the high concentration used (10  $\mu$ M), which is many times higher than that required to block these channels, makes it difficult to explain its mechanism with basis on the inhibition of Ca-channels.

In any event, and whatever the source and mechanism of the increased cytosolic Ca might be, it seems not to be a requirement for RVD as revealed by the insensitivity of cell volume regulation and osmolyte fluxes to the numerous drugs tested in the present work directed to block both Ca influx and the raise in intracellular Ca. Moreover, the failure of the permeable Ca chelator BAPTA-AM to modify RVD or osmolyte fluxes, even when it fully prevented the rise in cytosolic Ca, is an indication that this event in neurons is unrelated to the activation of the volume corrective mechanisms and is simply an epiphenomenon, resulting from a passive change in Ca permeability of cell membranes. Therefore, it is unlikely that in cerebellar granule neurons Ca is a signal implicated in the mechanisms transducing the change in cell volume and the activation of the osmolyte efflux pathways by which RVD is accomplished.

An increase in intracellular Ca coincident with Ca independence of RVD has been also reported in cultured rabbit medullary cells (Perry and O'Neill, 1994) and in rat salivary gland acinar cells (Tilly et al., 1994) whereas in other cell types, the two events appear associated. It seems therefore that whereas in most cell types the basic features of RVD such as extent, time course, osmolytes and nature of the corrective fluxes are remarkably similar, the signals and messengers which link the change in cell volume and the activation of osmolyte extrusion may be different in the different cell types.

## ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the excellent technical assistance of Ms. Claudia Peña and Ms. Claudia Rodriguez. This research was supported by grant DGAPA-UNAM IN-202093 and CONACUT 2262P-N.

## REFERENCES

- Balázs R, Jorgensen OS, Hack N (1988): N-methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells in culture. *Neuroscience* 27:437-451.
- Basavappa S, Chartouni V, Kirk K, Prpic V, Ellory JC, Mangel AW (1995): Swelling-induced chloride currents in neuroblastoma cells are calcium dependent. *J Neurosci* 15:3662-3666.
- Bender AS, Norenberg MD (1994): Calcium dependence of hypoosmotically induced potassium release in cultured astrocytes. *J Neurosci* 14:4237-4243.
- Falke LC, Mislis S (1989): Activity of ion channels during volume regulation by clonal N1E115 neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:3919-3923.
- Gallo G, Ciotti MT, Aloisi F, Levi G (1986): Developmental features of rat cerebellar neural cells cultured in a chemically defined medium. *J Neurosci Res* 15:289-301.
- Hernández-Cruz A, Díaz-Muñoz M, Gómez-Chavarrín M, Cañedo-Merino R, Protti DA, Escobar AL, Sierralta J (1995): Properties of the ryanodine-sensitive release channels that underlie caffeine-induced  $Ca^{2+}$  mobilization from intracellular stores in mammalian sympathetic neurons. *Eur J Neurosci* 7:1684-1699.
- Hoffmann EK, Lambert IH, Simonsen LO (1986): Separate  $Ca^{2+}$  activated,  $K^+$  and  $Cl^-$  transport pathways in Ehrlich ascites tumor cells. *J Membr Biol* 91:227-244.
- Konishi M, Olson A, Hollingworth S, Baylor SM (1988): Myoplasmic binding of fura-2 investigated by steady-state fluorescence and absorbance measurements. *Biophys J* 54:1089-1104.
- McCarthy NA, O'Neil RG (1992): Calcium signaling in cell volume regulation. *Physiol Rev* 72:1037-1061.
- Morán J, Patel J (1989): Stimulation of the N-methyl-D-aspartate receptor promotes the biochemical differentiation of cerebellar granule neurons and not astrocytes. *Brain Res* 486:1525.
- O'Connor E, Kimmelberg HK (1993): Role of calcium in astrocyte volume regulation and in the release of ions and amino acids. *J Neurosci* 13:2638-2650.
- Olson JE, Fleischhacker D, Murray WB, Holtzman D (1990): Control of astrocyte volume by intracellular and extracellular  $Ca^{2+}$ . *Glia* 405-412.
- Pasantes-Morales H, Alavéz S, Sánchez-Olea R, Morán J (1993): Contribution of organic osmolytes to volume regulation in rat brain cells in culture. *Neurochem Res* 18:445-452.
- Pasantes-Morales H, Chacón E, Morán J (1994): Properties of osmolyte fluxes activated during regulatory volume decrease in cultured cerebellar granule neurons. *J Neurosci Res* 37:720-727.
- Pasantes-Morales H, Maar T, Morán J (1993): Cell volume regulation in cultured cerebellar granule neurons. *J Neurosci Res* 34:219-224.
- Perry BP, O'Neill C (1994): Swelling-activated  $K^+$  fluxes in vascular endothelial cells: Role of intracellular  $Ca^{2+}$ . *Am J Physiol* 267 (Cell Physiol 39):C1535-C1542.
- Sánchez-Olea R, Morales M, García O, Pasantes-Morales H (1996):  $Cl^-$  channel blockers inhibit the volume-activated efflux of  $Cl^-$  and taurine in cultured neurons. *Am J Physiol* 270 (Cell Physiol 39):C1703-C1708.
- Sánchez-Olea R, Pasantes-Morales H, Schousboe A (1993): Neurons respond to hyposmotic conditions by an increase in intracellular free calcium. *Neurochem Res* 18:147-152.
- Schousboe A, Pasantes-Morales H (1993): Role of taurine in neural cell volume regulation. *Can J Physiol Pharmacol* 70:S356-S361.
- Schousboe A, Sánchez-Olea R, Morán J, Pasantes-Morales H (1991): Hyposmolarity-induced taurine release in cerebellar granule cells is associated with diffusion and not with high-affinity transport. *J Neurosci Res* 30:661-665.
- Tilly CB, Edixhoven MJ, Van Den Berghe N, Bot AGM, de Jonge HR (1994):  $Ca^{2+}$ -mobilizing hormones potentiate hypotonicity-in-

## RESULTADOS

### (células en suspensión)

#### *Cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por hiposmolaridad.*

La  $[Ca^{2+}]_i$  promedio de las neuronas granulares de cerebelo de rata en un medio isosmótico fue de  $90 \pm 7.7$  nM ( $n=12$ ). La dilución del medio al 50%, ocasionó el incremento gradual de esta  $[Ca^{2+}]_i$ , a un máximo de  $148 \pm 9.8$  nM (figura 6). Después de esta respuesta inicial, la  $[Ca^{2+}]_i$  disminuyó lentamente y se mantuvo por arriba de los niveles basales ( $100 \pm 8.7$  nM), hasta 400 segundos después del estímulo.

En un medio libre de  $Ca^{2+}$  y suplementado con 0.5 mM EGTA, se observó una disminución tanto en los niveles basales ( $89 \pm 8.0$  nM) como en el incremento máximo de la  $[Ca^{2+}]_i$ , que fue de  $130 \pm 12$  nM (figura 6). La persistencia de esta respuesta a la ausencia de  $Ca^{2+}$  extracelular sugiere la contribución de  $Ca^{2+}$  proveniente de almacenes intracelulares.

#### *Contribución de la liberación de $Ca^{2+}$ a partir de pozas endógenas.*

Con el propósito de determinar la contribución de las pozas endógenas a la respuesta en  $Ca^{2+}$  asociada al aumento en el volumen celular, se utilizaron estrategias para depletar de  $Ca^{2+}$  los almacenes intracelulares: las células se trataron con ionomicina 1  $\mu$ M durante cinco minutos en un medio isosmótico libre de  $Ca^{2+}$  (0.5 mM EGTA). En la figura 7A se muestra que la dilución del medio al 50% no provocó incremento alguno en la  $[Ca^{2+}]_i$  después de este tratamiento. Se obtuvieron resultados similares cuando las células fueron tratadas con tapsigargina 0.2  $\mu$ M (figura 7B), un inhibidor de la ATPasa de  $Ca^{2+}$  en el retículo endoplásmico, indicando la participación de este organelo como fuente de  $Ca^{2+}$  en el incremento inducido por la hiposmolaridad.

En las condiciones arriba mencionadas, cuando los almacenes intracelulares han sido depletados de  $Ca^{2+}$  y en la ausencia de  $Ca^{2+}$  extracelular; no se observó ninguna alteración sobre el DRV de estas neuronas (figura 7C); ni el curso temporal ni la eficiencia en el proceso, se modificaron con respecto al control.

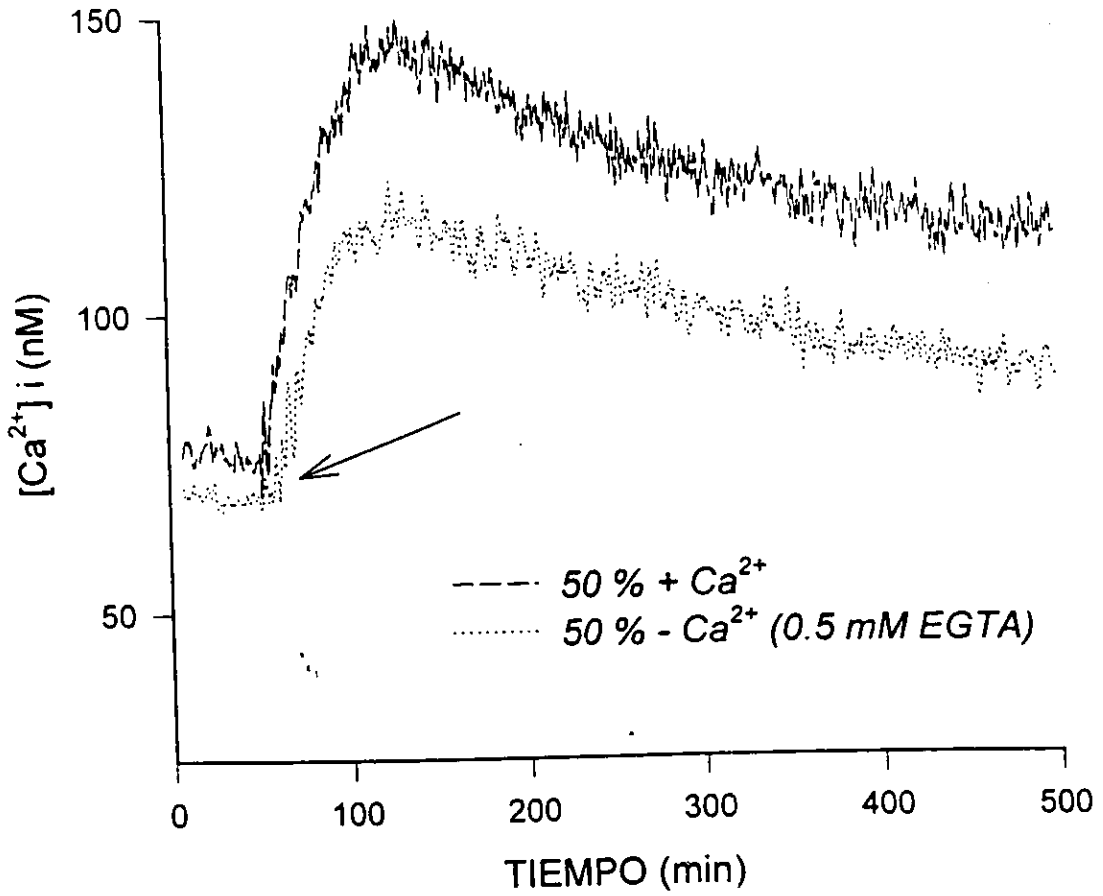


Figura 6. Cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  inducidos por un medio hiposmótico (50%), en presencia o ausencia de  $Ca^{2+}$  extracelular, en células granulares de cerebelo de rata en cultivo. La flecha indica la dilución del medio al 50%

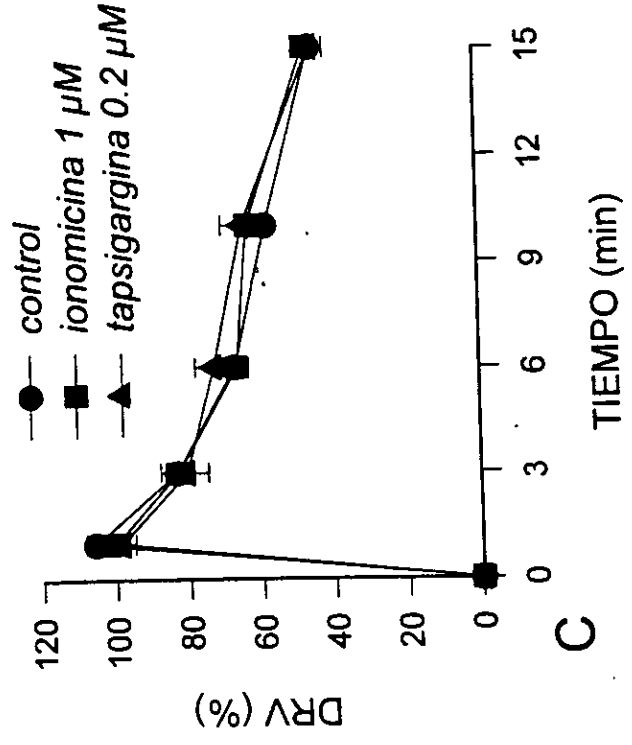
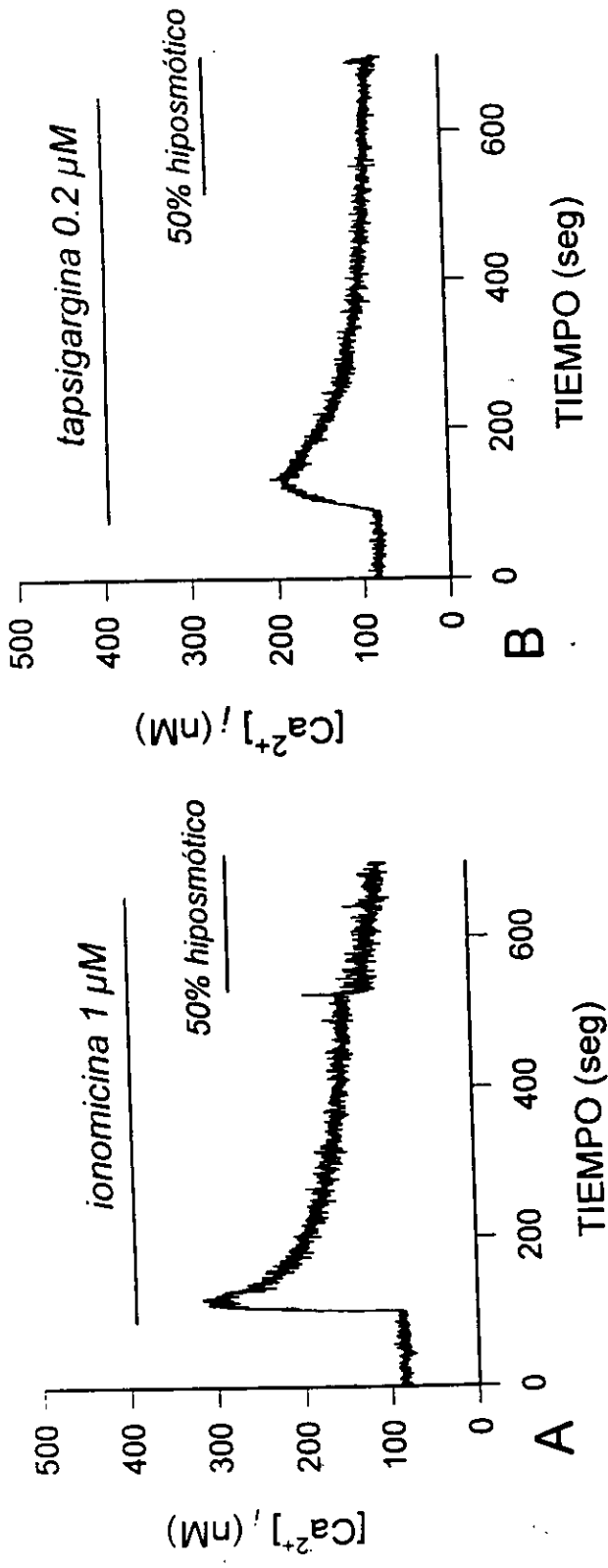


figura 7. Efecto de ionomicina y tapsigargina sobre el DRV y la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en células granulares de cerebello de rata en cultivo.

## DISCUSION

La capacidad de las células para responder de manera rápida y eficiente a variaciones en la osmolaridad externa mediante mecanismos de regulación del volumen celular, es una propiedad adaptativa que se ha conservado a lo largo de la evolución (Chamberlin y Strange, 1989). Se ha demostrado que muchas células animales terrestres, que están siempre expuestas a fluidos de osmolaridad muy controlada, poseen también esta capacidad. Como parte de la homeostásis celular, el control y mantenimiento del volumen celular son críticos para la sobrevivencia celular. El requerimiento de un volumen celular estable mantiene constante la concentración de solutos intracelulares, muchos de los cuales son parte de complejos eventos metabólicos.

Como muchas otras células, las neuronas granulares de rata en cultivo (Pasantes-Morales, *et al.*, 1993), poseen la capacidad de regular su volumen cuando han sido expuestas a un medio hiposmótico. Como en muchos otros tipos celulares, el DRV en neuronas es un proceso activo que implica la activación de mecanismos de transporte de solutos intracelulares osmóticamente activos, que al movilizarse van acompañados de agua osmóticamente obligada. La activación de estos mecanismos correctores trae como consecuencia, la corrección del volumen celular.

El proceso regulador en células granulares de rata en cultivo esta acompañado por la movilización de  $K^+$  y  $Cl^-$ , probablemente a través de canales separados e interdependientes. La vía catiónica es selectiva para  $K^+$  y  $Rb^{86}$  mientras que la vía aniónica es permeable a un gran número de aniones (excepto al gluconato), incluyendo moléculas grandes como el benzoato, tiocianato y sulfato (Pasantes-Morales, *et al.*, 1994). El DRV en neuronas granulares es inhibido por bloqueadores de canales de  $Cl^-$  como el ácido niflúmico, DIDS, NPPB, DDFK y dipiridamol (Sánchez-Olea, *et al.*, 1996). Se sabe que la taurina, el glutamato, la glicina, el GABA y la alanina forman parte de la poza de aminoácidos más importante en las células granulares y neuronas corticales en cultivo y que todos ellos responden al aumento en el volumen celular y participan en el DRV (Pasantes-Morales, *et al.*, 1993).

La liberación de taurina estimulada por hiposmolaridad en células granulares es un proceso difusional, dirigido por su gradiente de concentración y en el que no participa el transportador dependiente de  $\text{Na}^+$  (Sánchez-olea, *et al.*, 1991). Además, existe una importante similitud en la sensibilidad de los flujos de taurina activados por un medio hiposmótico, a los bloqueadores de canales de  $\text{Cl}^-$  que inhiben el DRV en estas neuronas, lo cual coincide con otros resultados reportados en astrocitos en cultivo (Sánchez-Olea, *et al.*, 1993), células de ovario de hamster (Sánchez-Olea, *et al.*, 1995) y eritrocitos de lenguado (Kirk, *et al.*, 1994). De estas similitudes surgen las propuestas: que posiblemente tanto la taurina como el  $\text{Cl}^-$  se muevan a través del mismo canal, otra posibilidad es que los flujos de taurina estén mediados por una vía aniónica muy parecida al canal de  $\text{Cl}^-$  o bien, que se trate de vías diferentes pero interconectadas y que la inhibición de los flujos de  $\text{Cl}^-$  tenga como consecuencia la inhibición de la liberación de taurina (Sánchez-Olea, *et al.*, 1993).

Uno de los aspectos importantes relacionados al estudio de los mecanismos que subyacen a la regulación del volumen celular ha sido el conocimiento de cómo las células detectan que ha ocurrido un cambio en su volumen y después de que ha detectado tal cambio, de que señal (o señales) hecha mano para activar las vías mediante las cuales se movilizan los osmolitos. En relación a este punto, se ha propuesto que los canales activados por distensión de la membrana plasmática los cuales se han identificado en varios tipos celulares que tienen la capacidad de regular su volumen (Sackin, 1989), podrían tener la función de "sensor" ya que se activan cuando la membrana se distiende debido al aumento en volumen permitiendo el acceso de iones como el  $\text{Ca}^{2+}$ , del exterior al interior de la célula, los cuales a su vez serían los disparadores de los procesos de regulación del volumen. En este sentido, se sabe que este tipo de canales están relacionados al citoesqueleto basal de membrana (Sokabe *et al.*, 1991) lo cual lleva a suponer que cambios en la organización de este citoesqueleto, y/o el citoesqueleto de actina podrían estar modulando los canales a través de los cuales se mueven los osmolitos.

En algunos tipos celulares se ha demostrado que el aumento en volumen bajo condiciones hiposmóticas trae como consecuencia cambios importantes en la organización del citoesqueleto. No obstante, estos cambios no siempre repercuten de

la misma forma sobre el DRV y la liberación de los osmolitos entre los diferentes tipos celulares. El tratamiento con citocalasinas tiene un efecto dosis dependiente sobre el grado de hinchamiento en células PC12, pero no afecta de manera importante el proceso regulador (Cornet *et al.*, 1993a). En células ascíticas de Ehrlich, las citocalasinas tienen un efecto parcial sobre la regulación del volumen (Cornet *et al.*, 1993b). En una línea celular derivada del ducto colector de conejo, la desorganización del citoesqueleto de F-actina con citocalasinas, activa una corriente de  $\text{Cl}^-$  en condiciones isosmóticas similar a la corriente de  $\text{Cl}^-$  activada por hinchamiento. En estas mismas células la estabilización del citoesqueleto con faloidina, previno el incremento en volumen y la activación de esta corriente en condiciones hiposmóticas (Schwiebert, *et al.* 1994).

En astrocitos de cerebelo en cultivo ni el DRV ni la liberación asociada de taurina y  $^{125}\text{I}$  se modifican cuando el citoesqueleto es desorganizado con citocalasinas (Morán, *et al.*, 1996).

### **Participación del $\text{Ca}^{2+}$ extracelular.**

Como se mencionó, en la mayoría de los tipos celulares incluyendo a las células granulares en cultivo (presente trabajo), se presenta un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  aunado al aumento en volumen inducido por soluciones hiposmóticas; lo cual justifica el interés por estudiar qué repercusiones pueda tener este fenómeno en el DRV. La propuesta más obvia es que el  $\text{Ca}^{2+}$  sea la señal transductora del cambio en el volumen celular y la activación de los mecanismos responsables del DRV. Los resultados de las diversas investigaciones muestran que este incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  es la consecuencia tanto de la entrada de calcio a través de canales en la membrana plasmática como de su liberación de pozas endógenas. Sin embargo, la importancia de este incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  parece no ser la misma en los diferentes tipos celulares. En algunas células el DRV depende estrictamente de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y la respuesta en volumen puede ser inhibida por la omisión de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio extracelular, y/o por la adición de bloqueadores de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . En otros tipos celulares la regulación del volumen no se afecta por la ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y la liberación de este catión a partir de almacenes intracelulares, parece ser el evento clave en el DRV. Más aún, hay células en las que el proceso regulador del volumen es completamente independiente de  $\text{Ca}^{2+}$ .

En esta investigación se demostró que en las células granulares de rata en cultivo, también se presenta un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  con la típica respuesta bifásica, en la que el incremento inmediato se debe a la liberación de  $Ca^{2+}$  de almacenes intracelulares y la fase sostenida se debe a la entrada de  $Ca^{2+}$ . Es importante señalar que (en el caso de las células granulares) esta respuesta es similar en células en monocapa y en células en suspensión. Los resultados de este trabajo indican que la entrada de  $Ca^{2+}$  bajo condiciones hiposmóticas contribuye de manera predominante a la respuesta total del incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ .

Las vías que permiten la entrada de  $Ca^{2+}$  a la célula durante el hinchamiento aún no se han determinado, se ha propuesto que el  $Ca^{2+}$  puede permear al interior celular por los canales tipo SACS, o bien que la hiposmolaridad genera la despolarización de la membrana celular activando canales de  $Ca^{2+}$  sensibles a voltaje, como se ha observado en células ascíticas de Ehrlich (Lambert, 1989 ; Lang, 1987), células MDCK (Paulmichl, 1993), células renales (Uhl, 1988), linfocitos (Grinstein, 1982 ; Sarkadi, 1984), en astrocitos en cultivo (Kimerlberg, 1988) y en la misma línea celular de neuroblastoma utilizada en este estudio (Falke y Mislér, 1989). Sin embargo, no en todas las células se presenta una despolarización por el aumento en volumen sino por el contrario, se ha registrado que la membrana celular de hepatocitos se hiperpolariza en condiciones hiposmóticas (Graf, 1988), mientras que en otros tipos celulares se presenta una hiperpolarización temporal seguida de una despolarización más sostenida cuando las células se exponen a soluciones de baja osmolaridad (Hazama y Okada, 1988 y 1990).

Aunque en células granulares no se ha registrado si existe un cambio en el potencial de membrana asociado al aumento en el volumen, la omisión de  $Ca^{2+}$  extracelular la inhibición de canales tipo SACS con gadolinio, y el bloqueo de canales de  $Ca^{2+}$  activados por voltaje (por la adición de verapamil, diltiazem y  $\omega$ -ctx-MV1IC) no tuvieron efecto sobre el DRV y tampoco modificaron los flujos de  $^3H$ -taurina y  $I^{125}$  sensibles a volumen, descartando así, la posibilidad de que el  $Ca^{2+}$  pueda estar entrando a las células por canales tipo SACS y/o canales activados por voltaje. Estos resultados contrastan con los reportados por Bassavappa en el neuroblastoma CHP-



100, en donde el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  y la salida de  $I^{125}$  inducidos por hiposmolaridad son inhibidos por altas concentraciones de EGTA y  $\omega$ -ctx-MVHC.

Caribdoni y Wojcik (1988), reportaron que la entrada de  $Ca^{45}$  inducida por despolarización y sensible a verapamil, diltiazem y dihidropiridinas, en células granulares de rata en cultivo, incrementa notablemente del 6-8 día *in vitro* (DIV); argumentando un aumento en la densidad de canales de calcio tipo L conforme a la edad. Con este antecedente, en el presente trabajo se realizaron experimentos con células granulares de 7-8 DIV a fin de comparar el efecto de los bloqueadores de canales de  $Ca^{2+}$  sobre la regulación del volumen y los flujos de  $^3H$ -taurina y  $I^{125}$ . Los resultados no mostraron diferencias entre células de 1-2 DIV y células de 7-8 DIV. No obstante, el efecto inhibitorio de las dihidropiridinas persistió aún en células de 7-8 DIV; el cual también es independiente de la presencia de  $Ca^{2+}$  extracelular.

En el caso del neuroblastoma N1E115, Falke y Misler (1989) reportaron que la exposición de las células a una solución hiposmótica, ocasiona la despolarización de la membrana celular lo cual activa canales de  $K^+$  sensibles a voltaje, mediando la salida de este osmolito durante el DRV.

Recientemente O'Neil y Leng (1997), en un trabajo realizado con células renales del túbulo proximal de conejo, determinaron que el hinchamiento aparentemente activa dos vías de entrada para el  $Ca^{2+}$ , una sensible y otra insensible a la dihidropiridina: nifedipina. La activación de estas vías está regulada por la fosfolipasa C (PLC) y la proteína cinasa C (PKC) ya que al inhibir estas proteínas, la fase que corresponde a la entrada de  $Ca^{2+}$ , desapareció completamente. Por el contrario, la activación de PKC con un éster de forbol activa la entrada de  $Ca^{2+}$  en condiciones isosmóticas y potencia la entrada estimulada por hiposmolaridad. El hecho de que en este mismo tipo celular no se halla identificado la presencia de canales de  $Ca^{2+}$  tipo L, lleva a suponer que la entrada de  $Ca^{2+}$  a la célula está mediada por un canal tipo L modificado, en el que la sensibilidad al voltaje y a las dihidropiridinas se encuentra alterada; o bien, que sea el resultado de la activación de una entrada "Capacitiva" la cual es regulada por el estado de relleno del retículo endoplásmico (Putney, 1986).

El efecto inhibitor de las dihidropiridinas sobre el DRV y los flujos de  $I^{125}$  y  $^3H$ -taurina en las células granulares no pudo ser atribuido al bloqueo de canales de  $Ca^{2+}$  tipo L ya que este efecto persistió aún en ausencia de  $Ca^{2+}$  extracelular, lo cual sugiere que podría tratarse de un efecto *per se* de estos fármacos. En células granulares de cerebelo de ratón en cultivo, las dihidropiridinas disminuyen las corrientes de  $K^+$ ; efecto que se atribuye a posibles similitudes en las propiedades de unión electrostática hacia las dihidropiridinas entre los canales de  $Ca^{2+}$  y canales de  $K^+$  (Fagni, 1994).

### ***Liberación de $Ca^{2+}$ de almacenes intracelulares.***

Las evidencias acerca de cuál es el mecanismo mediante el cual el  $Ca^{2+}$  es liberado desde las pozas endógenas también resultan algo contradictorias. Por una parte se propone que la liberación de  $Ca^{2+}$  es el resultado de la activación del receptor a inositol 1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ) en el retículo endoplásmico, esta evidencia es sustentada por el hecho de que en células del túbulo contorneado de conejo (Suzuki, 1990), células COS-7 (Ishii, 1996) y astrocitos de corteza en cultivo (Bender, 1994) se presenta un incremento en la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato ( $PIP_2$ ) bajo condiciones hiposmóticas, generándo la acumulación de  $IP_3$ . Una evidencia que contrasta con estos resultados, es el hecho de que en células hepáticas de rata, también se genera un aumento en los niveles de  $IP_3$  previo al incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  en condiciones hiposmóticas. Teóricamente se esperaba que este incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  pudiera estar activando canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  involucrados en el DRV. Estos eventos no pudieron ser relacionados, ya que la acumulación de  $IP_3$  solo se presenta cuando las células se hinchan por la reducción de la osmolaridad a partir de un medio isomótico, y no cuando la osmolaridad se reduce a partir de un medio hiperosmótico, es decir, cuando las células se encuentran previamente encogidas. En ambas situaciones, los flujos de  $K^+$  que median la regulación del volumen celular son similares; por lo cual se presume que es necesaria una distensión importante de la membrana plasmática para que se estimule la hidrólisis de los  $PIP_2$  y que este evento es sólo un epifenómeno asociado al hinchamiento (Dahl, *et al.*, 1991).

Fisher y colaboradores (1997), reportaron que la inhibición de la fosfolipasa C (PLC) no previno el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por hiposmolaridad en astrocitos de corteza de rata en cultivo. Por otra parte Tilly y colaboradores (1997), proponen que no es el  $IP_3$  sino el ácido araquidónico (AA) el responsable de la liberación de  $Ca^{2+}$  a partir de almacenes intracelulares en células IMCD. En este tipo celular no se detectaron cambios significantes en la concentración de  $IP_3$  en un medio hiposmótico. Además, tanto la regulación del volumen como el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  se inhiben completamente cuando el metabolismo del AA se bloquea con su análogo no hidrolisable ETYA.

Solo un pocas evidencias involucran la participación del receptor a rianodina mediando la liberación de  $Ca^{2+}$  a partir de pozas endógenas. Wu y colaboradores (1997), reportaron que en células transformadas de epitelio, tanto el DRV como el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  son inhibidos por rianodina (100  $\mu M$ ) y por la ausencia de  $Ca^{2+}$  extracelular. Parece ser que en este tipo de células, la hiposmolaridad induce la liberación de  $Ca^{2+}$  mediante la activación del receptor a rianodina y que este evento a su vez, ocasiona la activación de la entrada "Capasitiva" de  $Ca^{2+}$ .

En células de endotelio permeabilizadas (Missiaen, *et al.*, 1996 y Jena, *et al.*, 1997), la hiposmolaridad también afecta los almacenes intracelulares de  $Ca^{2+}$ ; se presume que éstos también aumentan de volumen y que la distensión de sus membranas permite que el  $Ca^{2+}$  se movilize hacia el citosol. En ambos trabajos se postula la idea de que existe una poza de  $Ca^{2+}$  sensible a distensión (mecanosensible), distinto y separado de la poza de  $Ca^{2+}$  sensible a  $IP_3$  ya que la previa estimulación con este mensajero no impide que la  $[Ca^{2+}]_i$  incremente cuando las células son expuestas a un medio hiposmótico. Estos resultados conducen a la posibilidad de que fuerzas físicas actuando sobre los compartimentos intracelulares puedan liberar  $Ca^{2+}$  sin el requerimiento de intermediarios bioquímicos. Es probable que la tensión de la membrana plasmática durante el hinchamiento sea sensada por la membrana de los almacenes intracelulares; en esta situación, los compartimentos de  $Ca^{2+}$  podrían estar asociados a elementos del citoesqueleto que a su vez pueden encontrarse asociados al esqueleto basal de membrana, de tal forma que cualquier alteración de la membrana plasmática sea detectada por éstos con la subsecuente liberación de  $Ca^{2+}$ . Otra

posibilidad es que la mera dilución del citosol por la entrada de agua bajo condiciones hiposmóticas, sea detectada por los almacenes de  $\text{Ca}^{2+}$ , que a su vez actuando como osmómetro, incrementarían su volumen haciendo que su membrana se hiciera más permeable al  $\text{Ca}^{2+}$ .

En las neuronas granulares (presente trabajo), la regulación del volumen no es un proceso que dependa del incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  vía el receptor a rianodina o a  $\text{IP}_3$ , lo cual es sustentado por la ausencia de efecto de la modulación de estos receptores con los fármacos utilizados en esta investigación (dantroleno, cafeína, TMB-8). Con respecto al efecto del AA, en un trabajo previo se demostró que el DRV y la liberación de  $^{125}\text{I}$  y  $^3\text{H}$ -taurina son completamente inhibidos por este ácido graso, probablemente por un efecto directo sobre las vías de movilización de estos osmolitos (Sánchez-Olea, *et al.*, 1995). En este sentido, la propuesta es, que el hinchamiento celular inducido por hiposmolaridad provoca que la membrana plasmática y la membrana de los organelos intracelulares, se hagan más permeables al  $\text{Ca}^{2+}$ ; los efectos del BAPTA-AM y de la depleción de las pozas endógenas con tapsigargina apoyan esta hipótesis pues a pesar de que el incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  fue totalmente prevenido, la regulación del volumen y los flujos de  $^3\text{H}$ -taurina y  $^{125}\text{I}$  no se modificaron de manera significativa. Szücs y colaboradores (1996), plantean la hipótesis de la existencia de una concentración "permisiva" de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (menor de 50 nM) que se presume, es necesaria para la activación de una corriente de  $\text{Cl}^-$  sensible a volumen en células endoteliales. Por arriba de esta concentración "permisiva" la corriente de  $\text{Cl}^-$  es independiente de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Con relación a esta propuesta, es necesario realizar investigaciones más detalladas en otros tipos celulares. No obstante, de este trabajo se concluye que la activación de la corriente de  $\text{Cl}^-$  sensible a hiposmolaridad, no requiere de un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

Los resultados de la presente investigación, indican que en las neuronas, la respuesta en  $\text{Ca}^{2+}$  al medio hiposmótico no esta relacionada con la activación de los mecanismos correctores del volumen celular y que éste evento es simplemente un epifenómeno, como resultado de una mayor permeabilidad de las membranas al  $\text{Ca}^{2+}$  en soluciones hiposmóticas.

---

Otros posibles mecanismos de señalización, tales como fosforilación en tirosina y cambios en el citoesqueleto basal de membrana serán explorados en la continuación de este trabajo.

## CONCLUSIONES

- El aumento en el volumen celular de las neuronas granulares de rata en cultivo, inducido por medio hiposmótico 50%, esta asociado a un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ , el cual presenta dos fases: una respuesta inicial máxima seguida de una fase sostenida.
- El incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por hiposmolaridad, en las células granulares de rata en cultivo, es la consecuencia de la liberación de  $Ca^{2+}$  de almacenes intracelulares y de la entrada de  $Ca^{2+}$  extracelular.
- El Decremento Regulador del Volumen y la salida de taurina y cloro que lo acompañan, no se modifican por la ausencia de  $Ca^{2+}$  extracelular.
- Las dihidropiridinas tienen un efecto inhibitor sobre la regulación del volumen y los flujos asociados de taurina y cloro. Este efecto no esta relacionado con la acción de estos fármacos como bloqueadores de canales de  $Ca^{2+}$  sensibles a voltaje tipo L.
- La liberación de  $Ca^{2+}$  de pozas endógenas inducida por hiposmolaridad, no es un evento necesario para que se activen los flujos de taurina y cloro durante la regulación del volumen de las células granulares de rata en cultivo.
- El incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por un medio hiposmótico 50%, en las neuronas granulares de cerebelo de rata en cultivo, es sólo un epifenómeno asociado al aumento en el volumen y no participa en la activación de los mecanismos que subyacen a la regulación del volumen celular.

---

---

## REFERENCIAS

- Alvarez-Leefmans, F.J., Gamiño, S.M. y Reuss, L. 1992. Cell volume changes in upon sodium pump inhibition in *Helix aspersa* neurones. *J. Physiol.* 458: 603-619.
- Alvarez-Leefmans, F.J., Cuzblanca, H., Gamiño, S.M., Altamirano, J., Nani, A. y Reuss, L. 1994. Transmembrane ion movements elicited by sodium pump inhibition in *Helix aspersa* neurons. *J. Neurophysiol.* 71: 1787-1796.
- Alvarez-Leefmans, F.J. y Reuss, L. 1996. Operación orquestada de los sistemas de transporte a través de la membrana plasmática: regulación y mantenimiento del volumen celular. Capítulo 7 en :
- Basavappa, S., Chartouni, V., Kirk, K., Prpic, V., Ellory, J.C. and Mangel, A.W. 1995. Swelling-induced chloride currents in neuroblastoma cells are calcium dependent. *J. Neurosci.* 15: 3662-3666.
- Beck, F. K., Dörge, A., Thurau, K. 1988. Cellular osmoregulation in renal medulla. *Renal Physiol. Biochem.* 11:174-186.
- Beck, J.S., Breton, S., Mairbaur, H., Laprade, R., and Giebisch, G. 1991. Relationship between sodium transport and intracellular ATP in isolated perfused rabbit proximal convoluted tubule. *Am. J. Physiol.* 261:F634-F639.
- Bender, A.S. and Norenberg, M.D. 1994. Calcium dependence of hypoosmotically induced potassium release in cultured astrocytes. *J. Neurosci.* 14: 4237-4243.
- Bibby, K.J. and McCulloch, C.A.G. 1994. Regulation of cell volume and  $[Ca^{2+}]_i$  in attached human fibroblasts responding to anisosmotic buffers. *Am. J. Physiol.* 266: C1639-C1649.

- Borgese, F., García-Romeu, F., Motais, R. 1987. Control of cell volume and ion transport by  $\beta$ -adrenergic catecholamines in erythrocytes of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. J. Physiol. 382:123-144.
- Bourne, P.K., and Cossins, A.R. 1984. Sodium and potassium transport in trout (*Salmo gairdneri*) erythrocytes. J. Physiol. 347:361-375.
- Cala, P. M. 1983. Cell volume regulation by *Amphiuma* red blood cells. The role of  $Ca^{2+}$  as modulator of alkali metal/ $H^+$  exchange. J. Gen. Physiol. 82: 761-784.
- Cala, P.M. 1985a. Volume regulation by *Amphiuma* red blood cells: Characteristics of volume-sensitive  $K^+ /H^+$  and  $Na^+ /H^+$  exchange. Mol. Physiol. 8:199-214.
- Cala, P.M. 1985b. Volume regulation by *Amphiuma* red blood cells: Strategies for identifying alkali metal/ $H^+$  transport. Federation Proc. 44:2500-2507.
- Carboni, E., and Wojcik, W. 1988. Dihydropyridine binding sites regulate calcium influx through specific voltage-sensitive calcium channels in cerebellar granule cells. J. Neurochem. 50 (4): 1279-1286.
- Chamberlin, M. E. y Strange, K. 1989. Anisosmotic cell volume regulation: a comparative view. Am. J. Physiol. 257: C159-C173.
- Christensen, O. 1987. Mediation of cell volume regulation by  $Ca^{2+}$  influx through stretch-activated channels. Nature 330: 66-68.
- Cornet, M., Ubl, J., and Kolb, H-A. 1993a. Cytoskeleton and ion movements during volume regulation in cultured PC12 cells. J. Membr. Biol. 133:161-170.
- Cornet, M., Lambert, I.H., and Hoffmann, E.K. 1993b. Regulation between cytoskeleton, hypo-osmotic treatment and volume regulation in ehrlich ascites tumor cells. J. Membrane. Biol. 131:55-66.



- Dahl, S., Hallbrucker, C., Lang, F., and Häussinger, D. 1991. Role of eicosanoids, inositol phosphates and extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in cell-volume regulation of rat liver. 1991. *Eur. J. Biochem.* 198:73-83.
- Davis, C.W. and Finn, A.L. 1985. Cell volume regulation in frog urinary bladder. *Fed. Proc.* 44: 2520-2525.
- Eveloff, S.L. and Warnock, D.G. 1987. Activation of ion transport systems during cell volume regulation. *Am. J. Physiol.* 252: F1-F10.
- Falke, L. C., y Mislser, S. 1989. Activity of ion channels dudring volume regulation by clonal N1E115 neuroblastoma cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 86: 3919-3923.
- Fincham, D.A., Wolowyk, M.W., Young, J.D. 1987. J. Volume-sensitive taurine transport in fish erythrocytes. *J. Membr. Biol.* 96: 45-56.
- Fagni, L., Bossu, J.L., and Bockaret, J. 1994. Inhibitory effects of dihydropyridines on macroscopic  $\text{K}^+$  currents and on the large-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel in cultured cerebellar granule cells. *Plügers Arch.* 429:176-182.
- Fisher, R., Schliess, F. and Häussinger, D. 1997. Characterization of the Hypo-Osmolarity-Induced  $\text{Ca}^{2+}$  Response in Cultured Rat Astrocytes. *Glia*, 20: 51-58.
- Foskett, J.K. 1994. The role of calcium in the control of volume-regulatory transport pathways. In : *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation*, Cap. 15. K. Strange, eds. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida., pp. 259-277.
- Fugelli, K., y Thoroed, S. M. 1986. Taurine transport associated with cell volume regulation in flounder erythrocytes under anisosmotic conditions. *J. Physiol.* 374:245-261.

- Graf, J., Haddad, P., Häussinger, D., and Lang, F. 1988. Cell volume regulation in liver. *Renal Physiol. Biochem.* 11:202-220.
- Grinstein, S., Dupré, A., Rothstein, A. 1982. Volume regulation by human lymphocytes: Role of calcium. *J. Gen. Physiol.* 79:849-868.
- Grinstein, S., Rotshein, A., Sarkadi, B., Gelfand, E.W. 1984. Responses of lymphocytes to anisotonic media: Volum-regulating behavior. *Am. J. Physiol.* 246: C204-C215.
- Grinstein, S. and Smith, J. 1990. Calcium-independent cell volume regulation in human lymphocytes. *J. Gen. Physiol.* 95: 97-120.
- Grinstein, S., Woodside, S.M., Sardet, C., Pouysségur, J., and Rotin, D. 1992. Activation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter during cell volume regulation. Evidence for a phosphorylation-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* 267:23823-23828.
- Grüder, S., Thiemann, S., Pusch, M. and Jentsch, T.J. 1992. Regions involved in the opening of ClC-2 chloride channel by voltage and cell volume. *Nature* 360:759-762.
- Hallows, K.R. and Knauf, P.A. 1994. Principles of cell volume regulation. Cap. 1: Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation. K. Strange eds. CRC press. Boca Raton, Florida. pp 3-29.
- Grynkiewicz, G. Poenie M., and Tsien, R.Y. (1985) A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, 260: 3440-3450.
- Hallows, K.R., and Knauf, P.A. Principles of cell volume regulation. En: Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation, by Strange, K. (ed), Boca Raton FL: CRC. Pp 3-29.
- Hazama y Okada 1988. Ca<sup>2+</sup> sensitivity of volume-regulatory K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> channels in cultured human epithelial cells. *J. Physiol. Lond.* 402: 687-702.

- Hazama, A., and Okada, Y. 1990. Involvement of  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release in the volume regulation of human epithelial cells exposed to a hypotonic medium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 167:287-293.
- Hoffman, E.K. 1978. Regulation of cell volume by selective changes in the leak permeabilities of Ehrlich ascites tumor cells. En: *Osmotic and Volume Regulation*. Jorgensen, C.B., and Skadhauge, E. (eds), pp 397-417.
- Hoffman, E.K., Simonsen, L.O., Lambert, I.H. 1984. Volume-induced increase of  $\text{K}^+$  and  $\text{Cl}^-$  permeabilities in Erlich ascites tumor cells. Role of internal  $\text{Ca}^{2+}$ . *J. Membr. Biol.* 78: 211-222.
- Hoffman, E.K., Lambert, I.H., Simonsen, L.O. 1986. Separate,  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  and  $\text{Cl}^-$  transport pathways in Ehrlich ascites tumor cells. *J. Membr. Biol.* 91: 227-244.
- Hoffman, E.K., Simonsen, L.O. 1989. Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells. *Physiol. Rev.* 69:315-382.
- Ishii, T., Hashimoto, T. and Ohmori, H. 1996. Hypotonic stimulation induced  $\text{Ca}^{2+}$  release from  $\text{IP}_3$ -sensitive internal stores in a Green monkey kidney cell line. *J. Physiol. Lond.* 493: 371-384.
- Jacobsen, J.G., and Smith, L.H. 1968. Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. *Physiol. Rev.* 48: 424-511.
- Jena, M., Minore, J.F., and O'Neil, W.C. (1997) A volume-sensitive,  $\text{IP}_3$ -insensitive  $\text{Ca}^{2+}$  store in vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol.*, 42:C316-C322.
- Kimelberg, H.K., and Frangakis, M.V. 1985. Furosemide- and bumetanide- sensitive ion transport and volume control in primary astrocyte cultures from rat brain. *Brain Res.* 361:125-134.

- 
- Kimelberg, H.K., and O'Connor, E.R. 1988. Swelling of astrocytes causes membrane potential depolarization. *Glia* 1:219-224.
- Kirk, K.L., Buku, A., and Eggena, P. 1987. Cell specificity of vasopressin binding in renal collecting duct: computer-enhanced imaging of a fluorescent hormone analog. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:6000-6004.
- Kirk, K.L., and Kirk, K. 1992. Inhibition of volume-activated  $I^-$  and taurine efflux from HeLa cells by P-glycoprotein blockers correlates with calmodulin inhibition. *J. Biol. Chem.* 267:23475-23478.
- Kleinzeller, A. 1985. Cell volume maintenance in isosmotic conditions. En: *Transport Process, Iono-and Osmoregulation* (R. Gilles y M. Guilles-Baillien, eds). Springer Verlag, Berlin. pp. 366-375.
- Kregenow, F.M. 1981. Osmoregulatory salt transporting mechanisms: control of cell volume in anisotonic media. *Annu. Rev. Physiol.* 43:493-505.
- Lang, F., Paulmichl, M., Voelkl, H., Gstrein, E., Friedrich, F. 1987. Electrophysiology of cell volume regulation. En: *Molecular Nephrology. Biochemical Aspects of Kidney Function*. Kovacevic, A., Gruder, W.G. (eds). Berlin, pp 133-179.
- Lang, F., Ritter, M., Völkl, H., and Häussinger, D. 1993. Cell Volume Regulatory Mechanisms-An Overview. *Advances in Comparative and Environmental Physiology.* 14:1-13.
- 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. 1985. On the relationship between volume- and thiol-stimulated  $K^+ Cl^-$  fluxes in red cells membranes. *Mol Physiol.* 8:215-234.

- Lhor, J.W., and Yohe, L.A. 1994. Mechanisms of hyposmotic volume regulation in glioma cells. *Brain Res.* 677:263-268.
- Ling, B.N., Webster, C.I., and Heaton, D.C. 1992. Eicosanoids modulate apical  $Ca^{2+}$  - dependent  $K^+$  channels in cultured rabbit principal cells. *Am. J. Physiol.* 263:F116-F126.
- Lambert, I.H. 1989. Leukotriene D4 induced cell shrinkage in Ehrlich ascites tumor cells. *J. Membr. Biol.* 108:165-176.
- McManus, M.L., and Churchwell, K.B. 1994. Clinical significance of cellular osmoregulation. En: *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation*, by Strange, K. (ed), Boca Raton Fl: CRC, pp 63-77..
- Madhumita, J., Minore, J.F., and O'Neill, W.C. 1997. A volume-sensitive,  $IP_3$ -insensitive  $Ca^{2+}$  store in vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 42:C316-C322.
- Mayer, M.L.A. 1985. A calcium-activated chloride current generates the after-depolarization of rat sensory neurones in culture. *J. Physiol.* 364:217-239.
- McCarty, N. A., and O'Neil, R.G. 1992. Calcium signaling in cell volume regulation. *Physiol. Rev.* 72(4): 1037-1061.
- Minton, A. P. 1994. Influence of macromolecular crowding on intracellular association reactions: possible role in volume regulation. In: *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation* (K. Strange editor), CRC Press. Boca Raton. Florida. pp. 181-190.
- Moorman, J.R., Ackerman, S.J., Kowdley, G.C., Friffin, M.P., Chen, Z., et al. 1995. Unitary anion currents through phospholemman channel molecules. *Nature.* 377:737-740.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 
- Nakanishi, T., Balaban, R.S., Burg, M.B. 1988. Survey of osmolytes in renal cell lines. *Am. J. Physiol.* 255:C181-C191.
- Nilius, B., Prenen, J., Szücs, G., Wei, L., Tanzi, F., Voets, T., and Droogmans, G. 1997. Calcium-activated chloride channels in bovine pulmonary artery endothelial cells. *J. Physiol.* 498:381-396.
- Morán, J., Sabanero, M., Meza, I., and Pasantes-Morales, H. 1996. Changes of actin cytoskeleton during swelling and regulatory volume decrease in cultured astrocytes. *Am. J. Physiol.* 271:C1901-C1907.
- O'Connor, E.R, and Kimelberg, H.K. 1993. Role of Calcium in astrocyte volume regulation and in the release of ions and amino acids. *J. Neurosci.* 13: 2638-2650.
- Ohtsuyama, M., Suzuki, Y., Samman, G., Sato, F., and Sato K. 1993. Cell volume analysis of gramicidin-treated eccrine clear cells to study regulation of Cl channels.
- Olson, J.E., Sankar, R., Holtzman, D., James, A., and Fleischhaker, D. 1986. Energy-dependent volume regulation in primary cultured cerebral astrocytes. *J. Cell. Physiol.* 128:209-215..
- O'Neil, G.R., and Leng, L. (1997) Osmo-mechanically sensitive phosphatidylinositol signalling regulates a  $Ca^{2+}$  influx channel in renal epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 273: F120-F128.
- Pasantes-Morales, H., García, J.J., Sánchez-Olea, R. 1991. Hyposmolarity-sensitive release of taurine and free amino acids from human lymphocytes. *Biochem. Pharmacol.* 41: 303-307.
- Pasantes-Morales, H., Alavez, S., Sánchez-Olea, R., Morán, J. 1993. Contribution of organic and inorganic osmolytes to volume regulation in rat brain cells in culture. *Neurochem. Res.* 18: 445-452.

- 
- Pasantés-Morales, H., Murray, R.A., Lilja, L., and Morán, J. 1994 a. Regulatory volume decrease in cultured astrocytes I. Potassium- and chloride-activated permeability. *Am. J. Physiol.* 266:C165-C171.
- Pasantés-Morales, H., H. Murray, R.A., Sánchez-Olea, R., and Morán, J. 1994 b. Regulatory volume decrease in cultured astrocytes: II. Activated permeability to amino acids and polyalcohols. *Am. J. Physiol.* 266:C172-178.
- Pasantés-Morales, H., Chacón, E. Murray, R.A., and Morán, J. 1994. Properties of osmolyte fluxes activated during regulatory volume decrease in cultured cerebellar granule neurons. *J. Neurosci. Res.* 37:720-727.
- Pasantés-Morales, H., Morán, J. y Schousboe, A. 1990. Volume-sensitive release of taurine from cultured astrocytes: properties and mechanism. *Glia* 3:427-432.
- Paulmich, M., Li, Y., Wickman, K., Ackerman, M. Peralta, E., and Clapman, D. 1992. New mammalian chloride channel identified by expression cloning. *Nature* 356:238-241.
- Paulmich, M., Gschwentner, M., Wöll, E., Schmarda, A., Ritter, M., Kanin, G., et al. 1993. Insight into the structure-function relation of chloride channels. *Cell Physiol. Biochem.* 3:374-387.
- Pierce, S.K., and Greenberg, M.J. 1972. The nature of cellular volume regulation in marine bivalves. *J. Exp. Biol.* 57:681-692.
- Putney, J.W. 1986. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium.* 7:1-12.
- Quesada, O and Morales-Mulia, M. 1998. En proceso.
- Rand, R.P., and Burton, A.C. 1964. Mechanical Properties of Red Cell Membrane. I. Membrane stiffness and intracellular pressure. *Biophys. J.* 4:115-135.

- Rothstein, A., and Mack, E. 1992. Volume-activated calcium uptake: its role in cell volume regulation of Madin-Darby canine kidney cells. *Am. J. Physiol.* 262:C339-C347.
- Roy, G., and Sauve, R. 1982. Effect of an anisotonic medium on volume ion and amino acid content and membrane potential of kidney cells (MDCK) in culture. *J. Membr. Biol.* 100:83-96.
- Sackin, H. 1989. A stretch-activated  $K^+$  channel sensitive to cell volume. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:1731-1735.
- Saly, V., and Andrew, R.D. 1993. CA3 neuron excitation and epileptiform discharge are sensitive to osmolarity. *J. Neurophysiol.* 69:1-9.
- Sánchez-Olea, R., Pasantes-Morales, H., Lázaro, A., Cerejido, M. 1991. Osmolarity-sensitive release of free amino acids from cultured kidney cells (MDCK). *J. Membr. Biol.* 121:1-9.
- Sánchez-Olea, R., Pasantes-Morales, H., and Schousboe, A. 1993. Neurons respond to hyposmotic conditions by an increase in intracellular free calcium. *Neurochem. Res.* 18:147-152.
- Sánchez-Olea, R., Morales-Mulia M., Morán, J., and Pasantes-Morales, H. 1995. Inhibition by dihydropyridines of regulatory volume decrease and osmolyte fluxes in cultured astrocytes is unrelated to extracellular calcium. *Neurosci. Lett.* 20:165-168.
- Sánchez-Olea, R., Morales-Mulia M., García, O., and Pasantes-Morales, H. 1996. Cl channel blockers inhibit the volume-activated efflux of Cl and taurine in cultured neurons. *Am. J. Physiol.* C1703-C1708.
- Sarkadi, B., Mack, E., Rothstein, A. 1984. Ionic events during the volume response of human peripheral blood lymphocytes to hypotonic media. II. Volume- and time-



---

dependent activation and inactivation of ion transport pathways. *J. Gen. Physiol.* 83:513-527.

Sarkadi, B., and Parker, J.C. 1991. Activation of ion transport pathways by changes in cell volume. *Biochem. Biophys. Acta.* 1071:407-427.

Schwiebert, E.M., Mills, J.W., and Stanton, B.A. 1994. Actin-based cytoskeleton regulates a chloride channel and cell volume in a renal cortical collecting duct cell line. *J. Biol. Chem.* 269:7081-7089.

Sinning, R., Schliess, F., Kubitz, R. and Häussinger, D. 1997. Osmosignalling in C6 Glioma cells. *FEBS Lett.* 400:163-167.

Siebens, A.W., and Kregenow, F.M. 1985. Volume-regulatory responses of *Amphiuma* red cells in anisotonic media. The effect of amiloride. *J. Gen. Physiol.* 86:527-564.

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

Sokabe, M., Sachs, M.F., and Jing, Z. 1991. Quantitative video microscopy of patch clamped membranes: stress, strain, capacitance, and stretch channel activation. *Biophys. J.* 59:722-728.

Strange, K., and Morrison, Shrode, L., and Putman, R. 1992. Volume regulation during recovery from chronic hypertonicity in brain glial cells. *Am. J. Physiol.* 263:C412-C419.

Suzuki, M., Kawahara, K., Ogawa, A., Morita, T., Kawaguchi, Y., et al. 1990.  $[Ca^{2+}]_i$  rises via G protein during regulatory volume decrease in rabbit proximal tubule cells. *Am. J. Physiol.* 258:F690-F696.

- Szücs, G., Heinks, S., Droogmans, G., and Nilius, B. (1996) Activation of the volume-sensitive chloride current in vascular endothelial cells requires a permissive intracellular  $Ca^{2+}$  concentration. *Pflügers Archiv.* 431: 467- 469.
- Tinel, H., Wehner, F., and Sauer, H. 1994. Intracellular  $Ca^{2+}$  release and  $Ca^{2+}$  influx during regulatory volume decrease in IMCD cells. *Am. J. Physiol.* 267:F130-F138.
- Tosteson, D.C., and Hoffman, J.F. 1960. Regulation of cell volume by active cation transport in high and low potassium sheep red cells. *J. of Gen. Physiol.* 44:169-194.
- Ubl, J., Murer, H. Kolb, H.A. 1988. Ion channels activated by osmotic and mechanical stress in membranes of opossum kidney cells. *J. Membr. Biol.* 104:223-232.
- Valverde, M.A., Diaz, M., Sepúlveda, F.V., Gill, D.R., Hyde, S.C., and Higgins, C.F. 1992. Volume-regulated chloride channels associated with the human multidrug-resistance P-glycoprotein. *Nature* 355:830-833.
- Vitarella, D., DiRisio, D.J., Kimelberg, H.K., and Aschner, M. 1991. Potassium and taurine release are highly correlated with regulatory volume decrease in neonatal primary rat astrocyte cultures. *J. Neurochem.* 63:1143-1149.
- Volkl, H., and Lang, F. 1988. Ionic requirement for regulatory cell volume decrease in renal straight proximal tubules. *Pfluegers Arch.* 412:1-7.
- Welling, L.W., Welling, D.J., and Ochs, T. 1983. Video measurements of basolateral membrane hydraulic conductivity in the proximal tubule. *Am. J. Physiol.* 245:F123-F129.
- Wu, X., Yang, H., Iserovich, P., Fischbarg, J., and Reinach, P.S. (1997) Regulatory volume decrease by SV40-transformed rabbit corneal epithelial cells requires ryanodine-sensitive  $Ca^{2+}$  release. *J. Membrane Biol.* 158: 127-136.