



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

REGULACION ISOVOLUMICA
EN EL HIPOCAMPO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
B I O L O G O
P R E S E N T A :
RODRIGO FRANCO CRUZ

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. HERMINIA PASANTES MORALES



MEXICO, D. F.

281130

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

➤ REGULACION ISOVOLUMICA EN EL HIPOCAMPO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BIOLOGO
PRESENTA
RODRIGO FRANCO CRUZ

DIRECTOR DE TESIS
DRA. HERMINIA PASANTES MORALES



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Regulación Isovolumica en el Hipocampo
realizado por Rodrigo Franco Cruz

con número de cuenta 9650412-1, pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario	Dra. Herminia Pasantes Morales
Propietario	Dr. Julio Morán Andrade
Propietario	Dr. Octavio Quesada García
Suplente	Dra. Lourdes Massieu Trigo
Suplente	Q. Silvestre Alavez Espidio

[Handwritten signatures of the members of the Departmental Council]

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

[Handwritten signature of Edna Ma. Suárez Díaz]

Dra. Edna Ma. Suárez Díaz



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

A mi hija Cristal, y a la ciencia

Porque en ellas he encontrado mi razón para vivir

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Herminia Pasantes Morales por la dirección de este trabajo de tesis.

A mis sinodales, el Dr. Julio Morán Andrade, el Dr. Octavio Quesada García, la Dra. Lourdes Massieu Trigo y el Q. Silvestre Alavez Espidio, por la revisión y valiosos comentarios sobre el presente trabajo.

A la B. Claudia Peña Segura y a la B. Claudia Rodríguez Rangel por su asistencia técnica en el laboratorio.

Al Dr. Rafael Moreno por su asesoría en las mediciones de K^+ .

De manera muy especial quiero agradecer:

A mi padre, por sus consejos y enseñanzas, por mostrarme su forma de vivir y compartirla conmigo.

A mi madre, por su comprensión, paciencia y apoyo, por todo el amor que me ha brindado.

A Gabriela, por todo lo que has significado en mi vida y porque a pesar de todo y de todos siempre formarás parte de ella.

A Sandra, por ser tu misma, por haber estado en el momento y lugar indicado cuando más te necesitaba.

A mis amigos Jose Luis y Carmina, por su tiempo y cariño; por todo lo que hemos compartido y, sobre todo, porque han sido como hermanos para mí.

A mi hermano, porque a pesar de todas nuestras diferencias, se que siempre puedo contar contigo.

A mis compañeros del laboratorio por los momentos compartidos

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biofísica del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, en el laboratorio 202-Sur a cargo de la Dra. Herminia Pasantes Morales y con el subsidio IN-201297 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) y el 2262-P del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

INDICE

INDICE	1
INTRODUCCION	2
Regulación del Volumen Celular	2
Importancia y Mecanismos	2
Osmolitos Involucrados en la Regulación del Volumen Celular	4
Regulación del Volumen en Medios Anisomóticos	6
Vías de movilización de osmolitos: posible participación de un canal aniónico	9
Regulación Isovolumica	10
Regulación del Volumen en el Cerebro	12
OBJETIVOS	19
METODOLOGIA	20
Materiales	20
Rebanadas de Hipocampo e Incubación	20
Cambios Súbitos de Osmolaridad	20
Cambios Continuos de Osmolaridad	21
Volumen	23
Liberación de Aminoácidos y Rubidio. Sistema de Perfusión	25
Efecto de Inhibidores de Canales de Cl ⁻	26
Aminoácidos y Potasio Endógeno	26
RESULTADOS	28
Cambios en el Volumen	28
Liberación de Aminoácidos	31
Cambios en el Contenido Endógeno de Aminoácidos	37
Efecto de los Bloqueadores de Canales de Cl ⁻	39
Liberación de K ⁺	41
Cambios en el contenido intracelular de K ⁺	43
DISCUSION	45
Decremento Regulatorio del Volumen en el Hipocampo	45
Regulación Isovolumétrica en el Hipocampo	46
Importancia de los aminoácidos como osmolitos en la regulación del volumen	47
Vías de movilización de aminoácidos en respuesta a condiciones hiposmóticas	50
Contribución del K ⁺ como osmolito en la regulación del volumen en los modelos estudiados.	51
Implicaciones Fisiológicas del RIV	54
CONCLUSIONES	57
REFERENCIAS	59

INTRODUCCION

REGULACION DEL VOLUMEN CELULAR

IMPORTANCIA Y MECANISMOS

La capacidad de las células para regular su volumen es uno de los mecanismos homeostáticos más importantes y probablemente uno de los más antiguos, siendo un rasgo característico preservado a escala evolutiva. En el momento en que represento una ventaja para las moléculas primitivas rodearse con una membrana y controlar su medio, fue que cobró importancia el control y mantenimiento del volumen celular (Strange, 1994; Chamberlain y Strange, 1989).

Además de la necesidad de mantener constante la concentración intracelular de solutos, muchos de los cuales son parte de eventos complejos de señalización, se ha propuesto recientemente que el volumen celular participa de manera directa como mensajero en el control del metabolismo, por ejemplo en señales de proliferación y como "disparador" de mecanismos que originen la inserción de proteínas membranales, canales, receptores y transportadores (Pasantes-Morales, 1996).

Las membranas celulares son altamente permeables al agua. Con excepción de plantas y bacterias, en las cuales la rigidez de la pared celular impide cambios en el volumen, alteraciones en la concentración de solutos entre el espacio intracelular y el extracelular (cambios en el contenido de solutos que originan una presión osmótica - condiciones anisomóticas), dan lugar al flujo neto de agua a través de la membrana. Esto debido principalmente a gradientes de presión osmótica con el objetivo de corregir el desbalance originado, modificándose por consiguiente el volumen celular (Macknight, 1988). Sin embargo las células no se comportan siempre como osmómetros perfectos, ya que posterior al cambio en volumen originado por la entrada o salida de agua, existe un proceso regulatorio de volumen que permite a las células recuperar, aunque sea de forma parcial, sus dimensiones normales (Hallow y Knauf, 1994).

Los mecanismos fisiológicos involucrados en la regulación del volumen difieren a lo largo de la escala evolutiva. Aunque existen organismos que pueden eludir condiciones anisomóticas como es el caso de ciertos moluscos, las células animales carecen de paredes celulares rígidas y no pueden soportar gradientes de presión altos a través de sus membranas; por esto, la regulación de su volumen está dada por cambios en el contenido intracelular de solutos en la dirección necesaria para corregir las fluctuaciones en el volumen celular. Estos cambios incluyen transporte de iones y osmolitos orgánicos a través de la membrana así como la acumulación o síntesis de los mismos (Kenneth, 1994; Pasantes-Morales, 1996; Häussinger, 1996)

En condiciones fisiológicas normales el volumen de cada tipo celular se ve alterado por el gradiente osmótico impuesto por la presencia de moléculas no difusibles (necesarias para mantener sus funciones metabólicas) tanto en el espacio intracelular como en el extracelular. Sin embargo, existe una regulación crónica del volumen celular que se realiza de manera constante. Es importante mencionar que en organismos con niveles de organización más complejos, como es el caso de los mamíferos, se han desarrollado mecanismos especializadas (por ejemplo funciones renales) que regulan el fluido intersticial y el plasma circundante de los tejidos en condiciones normales.

La regulación crónica del volumen esta mediada principalmente por modificaciones en los flujos activos y pasivos de iones, y por las permeabilidades transmembranales y gradientes electroquímicos de los mismos. Se ha descrito a este tipo de regulación como un balance entre el transporte activo por la bomba de sodio y fugas pasivas a través de diferentes vías (Tosteson y Hoffmann, 1960). Se han propuesto modelos integrados relacionando al volumen celular, el potencial de membrana, el transporte a través de ésta y la distribución de solutos permeantes para una célula animal genérica, introduciendo la idea de que la regulación crónica del volumen celular depende tanto del bombeo activo de Na^+ como de la permeabilidad pasiva al K^+ (Jakobsson, 1980). Debido a esta acción de la bomba de sodio, el Na^+ que entra a la célula por electrodifusión (a través de canales de Na^+) o por sistemas de transporte secundario (cotransportadores de Na^+/H^+ y de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, cotransportadores de $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{Cl}^-$, o los cotransportadores de Na^+ y aminoácidos), es transportado hacia el

exterior, de tal manera que la membrana se comporta como si fuese impermeable al Na^+ por lo menos en el estado de reposo. La regulación crónica del volumen celular puede involucrar síntesis y degradación de moléculas. Recientemente se ha propuesto que la regulación crónica del volumen celular debe estar bajo control genético. Este tipo de regulación es de vital importancia para la sobrevivencia y buen funcionamiento de la célula.

La regulación aguda del volumen celular es un proceso discontinuo que involucra principalmente la activación de vías de fuga latentes. Este tipo de regulación es muy importante para células expuestas a medios sujetos a amplios rangos de osmolaridad, o cuando la osmolaridad normal se pierde por un proceso patológico, y puede compensar desbalances ocasionales entre flujos de bombeo y fuga (ejemplo: captura de Na^+ dependiente de nutrientes).

Cuando las células animales se exponen agudamente a medios anisomóticos, inicialmente se comportan como osmómetros perfectos, sufriendo cambios en su volumen debido a movimientos pasivos de agua a través de la membrana (Kenneth, 1994); sin embargo; transcurrido un tiempo determinado, se observa que las células son capaces de regular su volumen hasta recuperar de manera parcial sus dimensiones originales. La regulación del volumen celular ha sido estudiada tanto en organismos procariontes (Chamberlain y Strange, 1989) como en organismos eucariontes, desde invertebrados hasta vertebrados así como en las plantas (Morgan, 1984). En mamíferos, el estudio se ha realizado en distintos tipos celulares como son eritrocitos, hepatocitos, linfocitos, fibroblastos, entre otros. (Lang et al., 1998).

OSMOLITOS INVOLUCRADOS EN LA REGULACIÓN DEL VOLUMEN CELULAR

La identidad y concentraciones intracelulares de los principales solutos varía entre los diferentes tipos de células, así como con las condiciones a las cuales las células están expuestas (Kirk, 1997). Las dos principales clases de solutos en las células son: 1) compuestos impermeantes orgánicos como proteínas en su mayoría; y 2) y compuestos permeantes (osmóticamente activos) de dos tipos: compuestos

inorgánicos, iones que contribuyen a determinar la osmolaridad tanto intracelular como extracelular; y compuestos orgánicos (denominados también osmolitos orgánicos o compatibles), como son ciertos compuestos metilados (metilaminas: glicerofosforilcolina y betaina), polyalcoholes (sorbitol o inositol), urea y aminoácidos libres y sus derivados (Yancey, 1994).

Los aminoácidos en particular, son los osmolitos orgánicos que parecen estar más involucrados en la regulación del volumen. Entre ellos, la taurina tiene un papel predominante. La taurina es un aminoácido azufrado metabólicamente inerte (no forma parte de las proteínas y, con excepción de la síntesis del ácido taurocólico en el hígado, no participa en ninguna función en el organismo) que se acumula en las células por un transportador dependiente de Na^+ . Este aminoácido se encuentra presente en todos los tejidos animales y en algunos, particularmente en los tejidos excitables, alcanza concentraciones muy altas. Así, la retina contiene niveles de taurina superiores a 40 mM; en el corazón y el músculo estriado la concentración es del orden de 10-40 mM. Estas características de la taurina, que durante mucho tiempo no tenían ninguna lógica, se explican cuando se piensa en su función como osmolito. De hecho, la taurina puede considerarse como el osmolito ideal, ya que debido a su inercia metabólica puede moverse dentro y fuera de la célula modificando el contenido de agua sin afectar el metabolismo celular. Se ha sugerido que la taurina podría estar actuando como osmolito no sólo a nivel celular sino en el mantenimiento del volumen de espacios intracelulares, tales como los del retículo sarcoplásmico en el músculo, los canaliculos secretores en las glándulas y los espacios discales en los fotorreceptores (Pasantes et al., 1998).

Además de la taurina, otros aminoácidos como glutamina, glutámico, glicina, prolina, serina, treonina, β -alanina, aspártico y GABA pueden también funcionar como osmolitos. Aunque la concentración intracelular de algunos de estos aminoácidos sea baja, la suma de todos ellos contribuye de manera significativa a la respuesta a cambios en el volumen celular, mediante la activación de mecanismos de transporte y/o cambios en las tasas de síntesis y proteólisis, de manera que la concentración intracelular de aminoácidos se incrementa o disminuye en respuesta a encogimiento o

hinchamiento de la célula. Los aminoácidos tienen un papel importante durante la adaptación a pequeños cambios en la osmolaridad extracelular; sin embargo su contribución parece ser menor en la adaptación a osmolaridades excesivas como en el caso de médula del riñón.

REGULACION DEL VOLUMEN EN MEDIOS ANISOSMÓTICOS

Incremento Regulatorio del Volumen

En un medio hiperosmótico se ha observado que ciertos tipos celulares, después de encogerse, incrementan su volumen debido a la captura de solutos del medio, proceso conocido como Incremento Regulatorio del Volumen (IRV), el cual, en vertebrados superiores se caracteriza generalmente por una captura inicial de Na^+ y Cl^- , seguido de un intercambio secundario de Na^+ por K^+ vía la activación de la Na^+-K^+ -ATPasa, resultando eventualmente en ganancia neta de K^+ y Cl^- ; esta captura de solutos es paralela a una inhibición en los mecanismos de liberación (canales de K^+ y Cl^-). Los sistemas de transporte iónico más importantes en la acumulación de electrolitos son: el cotransportador $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ y el intercambiador Na^+/H^+ ; este último alcaliniza la célula originando una activación paralela del intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. En algunas células, la acumulación de electrolitos durante el IRV se lleva a cabo por la activación de canales de Na^+ y/o canales catiónicos no selectivos. La despolarización inducida por la entrada de Na^+ favorece la entrada de Cl^- . Por otra parte se ha visto una participación importante de los osmolitos orgánicos durante el IRV, viéndose involucrados procesos de síntesis y acumulación (a través de transportadores específicos) de osmolitos tales como mioinositol, sorbitol, aminoácidos y sus derivados, glicerofosforilcolina y urea (Ballantyne y Chamberlain, 1994; Yancey, 1994; Lang et al, 1998) (Figura 1).

Decremento Regulatorio del Volumen

En un medio hiposmótico se observa que algunos tipos celulares inicialmente se hinchan, para después llevar a cabo una fase de encogimiento compensatorio,

mediante la pérdida de solutos junto con agua osmóticamente obligada (aquella que se moviliza a favor del gradiente de concentración de solutos). A este proceso se le denomina Decremento Regulatorio del Volumen (DRV).

En células de vertebrados superiores, los iones K^+ , Na^+ , Cl^- y HCO_3^- , comprenden la mayor parte de los solutos osmóticamente activos, siendo el K^+ y el Cl^- los de mayor concentración intracelular, por lo que el DRV se origina por una pérdida neta de K^+ y Cl^- . Esto puede ocurrir mediante la activación del cotransporte de $K^+ - Cl^-$, o la activación independiente de canales de K^+ y Cl^- , (Knauf, 1986; Knoblauch, 1989) que pueden o no, ser interdependientes. En algunos tipos celulares la evidencia experimental en apoyo a esta suposición esta basada en las siguientes observaciones: 1) al inhibirse la salida de K^+ con quinidina se inhibe la recuperación del volumen; sin embargo, si se provee una vía alterna para la salida de K^+ con valinomicina (Hoffmann et al., 1984) o con gramicidina en un medio sin Na^+ (Hofmann et al., 1986; Pasantes-Morales et al., 1994a; 1994c), el volumen disminuye normalmente o se ve acelerado, señalando que el canal de Cl^- se encuentra activo, además de indicar que la salida de K^+ es el paso limitante en la recuperación del volumen; 2) el curso temporal de la inactivación del canal de Cl^- es diferente al del canal de K^+ : el primero se activa abruptamente con el aumento de volumen y se inactiva en aproximadamente 10 min, mientras que el canal de K^+ permanece activado por más tiempo (Sarkadi et al., 1984); 3) la despolarización (de aproximadamente 10 mV) observada durante el hinchamiento, es consistente con un mayor aumento en la permeabilidad de la membrana para el Cl^- que para el K^+ . Esta despolarización aumenta la fuerza electromotriz para la salida de potasio y puede explicar al menos parte de esta salida (Lang et al., 1987).

Los canales aniónicos activados por hinchamiento no son selectivos, permitiendo el paso no sólo de Cl^- sino también de HCO_3^- , así como de aniones orgánicos y osmolitos orgánicos neutros. Adicionalmente el cotransportador Na^+/HCO_3^- puede estar participando en el DRV. Entre otras vías utilizadas para la movilización de K^+ y Cl^- estan el cotransporte electroneutro de K^+/Cl^- , el cual se ha visto preferentemente activado por hinchamiento isotónico en algunas células. Otro mecanismos para liberar KCl, es la activación paralela del intercambiador K^+/H^+ y el intercambiador Cl^-/HCO_3^- , el

H^+ y el HCO_3^- en el interior forman CO_2 , el cual difunde posteriormente al exterior, por lo que no es osmóticamente activo. También se ha reportado la participación del intercambiador Na^+/Ca^{++} de manera inversa, así como la expulsión de Ca^{++} a través de la ATPasa de Ca^{++} , la activación de la ATPasa K^+-H^+ y la ATPasa Na^+-K^+ . Así mismo la entrada de Ca^{++} a través de canales catiónicos no selectivos activa la salida de K^+ a través de canales de K^+ sensibles a Ca^{++} . Los osmolitos orgánicos también participan de manera importante en el DRV; la disminución en el contenido intracelular de estos se lleva a cabo mediante fenómenos de liberación y/o degradación de los mismos. Así, se ha visto que la movilización de aminoácidos (principalmente la taurina) esta involucrada en el DRV en varios tipos celulares de vertebrados, así como la liberación de sorbitol, mio-inositol, betaina. (Ballantyne y Chamberlain, 1994; Yancey, 1994; Lang et al, 1998) (Figura 1).

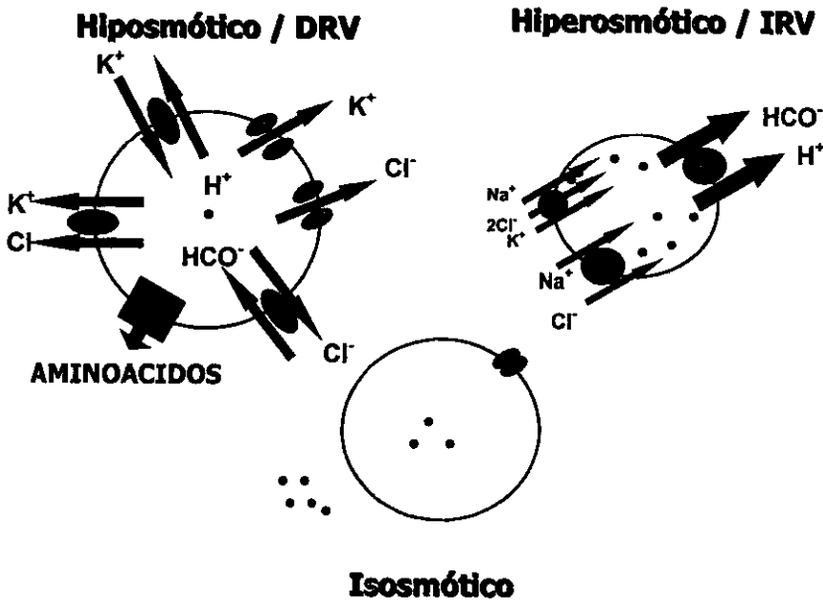


Figura 1. Mecanismos involucrados en la regulación del volumen en condiciones anisomóticas. DRV - Decremento Regulatorio del Volumen. IRV Incremento Regulatorio del Volumen

VIAS DE MOVILIZACIÓN DE LOS OSMOLITOS ORGANICOS: POSIBLE PARTICIPACIÓN DE UN CANAL ANIÓNICO

La translocación de osmolitos subsecuente a hinchamiento hiposmótico ha sido investigada en diferentes preparaciones (Kirk, 1997; Nilius et al., 1997). 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 Na^+ como mecanismo de liberación inducida por hiposmolaridad. En realidad, el movimiento de taurina en respuesta al aumento en el volumen celular, se origina a través de vías difusionales en las 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., 1993; Sánchez-Olea et al., 1996; Pasantes-Morales et al., 1994). Esto ha llevado a sugerir 1) 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, 2) de una señal de activación común a las dos vías que se afecta con los fármacos empleados; o bien, 3) que existe una interrelación de manera muy estrecha, de modo que la supresión de uno de los flujos lleva al bloqueo del otro. Estas interrogantes no son fáciles de aclarar, ya que por una parte, los inhibidores existentes hasta la fecha no permiten discriminar entre los distintos tipos de canales de Cl^- y por otra, los canales de Cl^- no se han identificado plenamente a nivel molecular.

Las distintas proteínas que pueden funcionar como canales aniónicos -y de osmolitos orgánicos- activados por volumen, se describen a continuación: 1) CLC-2 (Canal de Cloro Tipo 2). Esta proteína está ampliamente distribuida en células de mamífero y en líneas celulares. La evidencia disponible sugiere que el CLC-2 responde a cambios en la osmolaridad externa (Grüder et al., 1992). 2) Glicoproteína P. Esta proteína es una molécula transportadora cuya principal función es la expulsión de drogas citotóxicas en células cancerosas; pero además se ha sugerido que puede

funcionar como un canal aniónico activado por hinchamiento y/o como proteína reguladora del canal. (McEwan et al., 1992; Rasola et al., 1994; Wang et al., 1994; Dong et al., 1994; Tominaga et al., 1995; Viana et al., 1995). 3) pl_{cln} . La expresión de esta proteína en ovocitos de *Xenopus* genera una corriente de Cl^- constitutivamente activa con características similares a las del canal aniónico activado por hinchamiento (Strange et al., 1996; Paulmichl et al., 1992; Gschwenter et al., 1995) han realizado trabajos que apoyan que esta proteína podría estar participando en el proceso de regulación del volumen. 4) Banda 3. La evidencia de que esta proteína podría estar funcionando como el canal aniónico activado por hiposmolaridad se basa en que muchos de los inhibidores de la banda 3 también inhiben los flujos de Cl^- y osmolitos sensibles a volumen (Goldstein et al., 1990; Goldstein y Bill, 1991; García Romeu et al., 1991; Motais et al., 1991; 1992). 5) Fosfoleman. Es una pequeña proteína de 72 aminoácidos que cuando es reconstituída en bicapas lipídicas forma canales aniónicos con una permeabilidad a la forma aniónica de la taurina 70 veces mayor a la del Cl^- , lo cual sugiere que esta proteína puede estar relacionada con los flujos de taurina activados por hinchamiento (Moorman et al., 1995). 6) VDAC (Canal Aniónico Dependiente de Voltaje). Esta proteína es un canal aniónico dependiente de voltaje parecido a una porina y se localiza en la membrana externa de las mitocondrias en eucariontes. Recientemente se ha descrito que VDAC se encuentra también en la membrana plasmática de ovocitos de *Xenopus* y además se reportó que el anticuerpo anti-VDAC de linfocitos humanos inhibe los flujos iónicos activados por hiposmolaridad en estas células (Reyman et al, 1995).

REGULACIÓN ISOVOLUMICA

En un estudio realizado por Lohr y Grantham (1986) en células renales se observó que estas células tenían la capacidad de mantener su volumen constante en medios anisosmóticos, siempre que el cambio en osmolaridad se diera en forma gradual. Este fenómeno se denominó Regulación Isovolumétrica (RIV). Esta regulación, si los cambios osmóticos son crecientes (el medio se hace hiperosmótico), se lleva a cabo mediante la captura de solutos y acumulación de electrolitos como resultado de alteraciones en los mecanismos de intercambio iónico en la membrana o

mediante la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ y el cotransportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ (Lohr et al., 1989; Mountian y Van Driessche, 1997). Si los cambios en la osmolaridad son decrecientes (el medio se hace hiposmótico) la regulación se consigue mediante la pérdida aparente de solutos intracelulares por mecanismos que no están totalmente esclarecidos (Lohr, 1990; Van Driessche et al., 1997) (Figura 2). Sin embargo, no todas las células expuestas a cambios graduales de osmolaridad tienen la capacidad de llevar a cabo RIV. En un estudio reciente se demostró que los eritrocitos expuestos a cambios graduales de osmolaridad no son capaces de regular su volumen de manera eficiente debido a que la pérdida intracelular de osmolitos (K^+ y taurina), no es suficiente para contrarrestar el flujo neto de agua originado por el gradiente osmótico impuesto (Godart, 1999). Aunque en el DRV y el IRV se tiene bien caracterizado los principales mecanismos de regulación del volumen, en la RIV no se han caracterizado a fondo. De hecho actualmente solo existen estudios en una línea celular de nefrona (A6) y en túbulos renales proximales (Lohr et al., 1990; Van Driessche et al., 1997).

Regulación Isovolumétrica

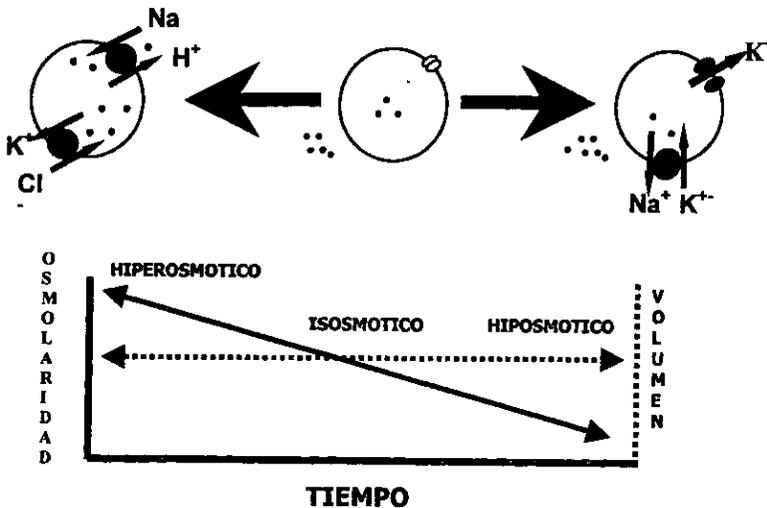


Figura 2. Mecanismo involucrados en la Regulación Isovolumétrica (RIV). Como se aprecia en la figura, las células son capaces de mantener constante su volumen en respuesta a cambios graduales de osmolaridad (gradiente osmótico) mediante la activación de distintos mecanismos.

REGULACION DEL VOLUMEN EN EL CEREBRO

IMPORTANCIA

Los procesos fisiológicos involucrados en el control del volumen celular en el cerebro tienen implicaciones clínicas importantes, ya que cambios pequeños en el volumen pueden producir profundas secuelas clínicas. Por ello, la regulación de volumen en este órgano ha sido ampliamente estudiada. Los cambios en el volumen celular del cerebro pueden ser consecuencia de alteraciones en la osmolaridad de los fluidos externos o debido a cambios en la distribución de iones y agua durante condiciones isomóticas (Ballanyi y Grafe, 1988). Los efectos más obvios de cambios muy pequeños en el contenido de agua son mecánicos, debido a que la función de las neuronas depende de su arquitectura, su estratificación y la localización especializada de las sinapsis. A nivel celular, el aumento o disminución del volumen puede alterar el metabolismo debido al cambio en las concentraciones de enzimas y sustratos, y modificar los niveles de moléculas que sirven como señales de transducción (O'Neill, 1999)

Los cambios patológicos que conllevan a una disminución en el volumen cerebral están asociados principalmente a cambios en la osmolaridad del medio que originan estados hipertónicos tales como la hipernatremia, hiperglicemia, diarrea severa, falla renal, diabetes mellitus e insipidus, diuresis osmótica con deshidratación, etc. Sin embargo existen reportes en los que se observa un encogimiento de las células en condiciones isosmóticas durante la estimulación rápida por agonistas, lo que origina la pérdida intracelular de K^+ y Cl^- (O'Neill, 1999).

Cuando la hipernatremia se desarrolla dentro de 4 a 8 horas (hipernatremia aguda), no se observa la activación de mecanismos de regulación del volumen. Bajo estas circunstancias, el cerebro actúa como un osmómetro perfecto, exhibiendo el decremento en el volumen esperado debido al flujo neto de agua a favor del gradiente osmótico (McManus y Churchwell, 1994). Sin embargo, es más común que esta patología se desarrolle después de un periodo de 24 a 72 horas, manteniéndose el volumen relativamente constante. Durante la hipernatremia crónica el volumen

cerebral se mantiene cerca de los niveles normales debido a la acumulación de electrolitos y moléculas orgánicas tales como mio-inositol, taurina, glutamina y betaina. El incremento en las concentraciones de iones se lleva a cabo principalmente a través de sistemas de transporte dependientes de Na^+ , mientras que la acumulación de osmolitos orgánicos se da a través de mecanismos de transporte o por el aumento en la síntesis. La hiperglicemia activa procesos de regulación del volumen similares a los que se observan durante la hipernatremia, ya que se ha reportado una acumulación de electrolitos y osmolitos orgánicos dentro de las primeras 12 horas del desarrollo de un cuadro diabético (Trachtman, 1992).

Edema Cerebral

El edema cerebral representa un cuadro clínico muy severo. Se ha reportado que un incremento por arriba del 5% del volumen cerebral puede originar mortalidad y morbilidad substancial (Trachtman, 1992). Dada la restricción que impone la caja craneana a la expansión del tejido cerebral, el edema celular es en muchos casos una complicación aún más grave que la propia patología que le dio origen (Pasantes-Morales, 1996). Mientras la presión intracraneal se eleva rápidamente, el desplazamiento caudal del parénquima del cerebro a través del foramen magnum puede causar la muerte por paro cardíaco o respiratorio debido a la opresión de los núcleos del tallo cerebral. El volumen intracraneal se encuentra distribuido en un modelo de cuatro compartimentos: el sanguíneo, el espacio intracelular y el extracelular, y el líquido cerebroespinal, por lo que el incremento en el volumen de un compartimento debe estar acompañada por un decremento recíproco en el volumen total de los tres compartimentos restantes. Aunque el líquido cerebroespinal, puede disminuir de forma significativa sin detrimento, la pérdida de volumen sanguíneo conllevaría finalmente a daño cerebral y profundas secuelas clínicas. Por otra parte, un cambio en el volumen citosólico puede provocar alteraciones en la función de organelos como resultado de fluctuaciones en el pH intracelular y las concentraciones de enzimas, cofactores, calcio y fuerza iónica.

Los cambios patológicos en el edema cerebral pueden ser agrupados en dos categorías: Citotóxicos (Isosmóticos) y Anisosmóticos. Las alteraciones citotóxicas que conllevan a edema cerebral involucran patologías como isquemia, encefalopatía hepática, excitotoxicidad, hipoxia/anoxia, y situaciones de estrés oxidativo. El edema celular anisosmótico ocasionado por alteraciones en la tonicidad del plasma está asociado a patologías como hiponatremia, síndrome de secreción inapropiada de hormona antidiurética, intoxicación por agua, uso inapropiado de diuréticos, deshidratación, diabetes mellitus, diabetes insípida, y un componente hiposmótico en la isquemia.

La hiponatremia puede ser definida como una baja anormal en la concentración de sales de Na^+ en el fluido extracelular. Aunque el riñón es un órgano importante en la patogénesis, el órgano blanco de los cambios que producen morbilidad y mortalidad es el cerebro. El edema cerebral asociado con la hiponatremia puede originar severas secuelas clínicas de manera secundaria como edema pulmonar, infarto cerebral, ceguera cortical, estado vegetativo persistente, paro respiratorio y coma. La hiponatremia se atribuye principalmente a la inapropiada secreción de la hormona antidiurética, falla renal que conlleva a una pérdida de sales en el fluido cerebral y una disminución en el fluido extracelular (Harrigan, 1996; Zafonte, 1997). También puede ocurrir cuando la ingestión de agua excede la habilidad del riñón de excretarla o cuando hay una pérdida urinaria de cationes monovalentes (Na^+ y K^+) en concentraciones que exceden su ingestión. La hipotonicidad del plasma, asociada a hiponatremia, es observada más frecuentemente a nivel clínico que la hipertonicidad. La hiponatremia debida a una baja en el volumen circulante de sangre se observa en individuos con desnutrición, falla cardíaca congestiva, síndrome nefrótico y cirrosis hepática (donde la cantidad de sal y agua retenida provoca la formación de edema). La hiponatremia con volúmenes de sangre circulante normales y expandidos ocurre debido a intoxicación por agua como ocurre en cuadros psicóticos y por síndromes de secreción inapropiada de hormona antidiurética. En pacientes en periodo postoperacional se pueden presentar cuadros de hiponatremia debido a las altas concentraciones (5%) de dextrosa que se administra en el suero y en los que los niveles de vasopresina se aumentan debido a estrés.

Bajo las condiciones arriba mencionadas, las células cerebrales han desarrollado mecanismos de respuesta adaptativos, diseñados para modular el contenido citosólico de los solutos osmóticamente activos en respuesta a alteraciones en la osmolaridad del fluido extracelular. Este proceso se ha visto regulado por hormonas incluyendo la arginina vasopresina y las hormonas sexuales. Cuando la hiponatremia dura menos de 12 horas, hay un incremento osmométrico en el contenido de agua intracelular en el cerebro con una reducción paralela en la concentración de Na^+ , K^+ y Cl^- ; esta reducción en el contenido de electrolitos se debe de manera parcial a una transferencia directa de la célula al plasma así como a través de una vía adicional por el líquido cefaloraquídeo (Melton et al., 1987; Silver et al., 1999).

La hiponatremia crónica se desarrolla de manera incidental en un periodo indefinido de tiempo y con frecuencia los pacientes permanecen asintomáticos. En la hiponatremia aguda se produce edema cerebral y severas alteraciones neurológicas, sin embargo, en la hiponatremia prolongada el edema no es tan severo debido a profundas reducciones en el contenido de electrolitos y osmolitos celulares con lo que el volumen celular cerebral regresa a la normalidad (Trachtman, 1992). Sin embargo, este cambio sustancial en el contenido de osmolitos, puede llevar a situaciones de riesgo si se corrige la hiponatremia en forma aguda (Verbalis y Gullans 1993).

Las células del cerebro reaccionan ante diversas patologías asociadas a hinchamiento celular como la hiponatremia, activando vías de salida de electrolitos y osmolitos orgánicos como son taurina, glutámico, aspártico, glutamina y GABA dentro de los aminoácidos, así como también myo-inositol, creatinina y N-acetil aspártico, siendo la contribución de los electrolitos de un 60%-70% y la de los osmolitos orgánicos de un 30%-40% para el DRV (Thurnston et al., 1987; Lien et al., 1991; Trachtman et al., 1990).

Mecanismos celulares

En el cerebro, el IRV ha sido estudiado principalmente en líneas celulares de glioma C6, neuroblastomas, terminaciones nerviosas aisladas y astrocitos en cultivo de

rata y ratón, así como en sistemas in vivo (Bedford y Leader, 1993; Pasantes-Morales 1994b). A partir de estos trabajos se ha identificado al myo-inositol y a los amino ácidos libres como glutamato, glutamina y taurina como los principales compuestos con función osmoreguladora y al sistema de cotransporte de $\text{Na}^+\text{K}^+\text{Cl}^-$ como mecanismo involucrado en la movilización de osmolitos inorgánicos (Isaaks et al., 1994; Strange et al., 1991; Babila et al., 1990). Los astrocitos en cultivo expuestos a soluciones hiperosmóticas responden con un rápido decremento en el volumen celular de una magnitud proporcional al incremento en la osmolaridad. In vivo se ha visto en los primeros minutos de hipernatremia aguda, una acumulación activa de Na^+ , K^+ y Cl^- en el líquido cerebroespinal (Na^+Cl^-) y el plasma (K^+Cl^-), así como una síntesis y acumulación de solutos orgánicos en respuesta a los cambios en volumen originados durante una fase más lenta de respuesta, lo que hace posible que durante el desarrollo lento de hipernatremia, el contenido de agua y el tamaño celular se mantengan casi normales (Pollock y Arieff, 1980). Durante la fase inicial de IRV la acumulación intracelular de Na^+ , Cl^- y K^+ es preferente y subsecuentemente la contribución de los osmolitos orgánicos se vuelve progresivamente más importante llegando a ser responsable del 50 o 40% del agua recuperada. La acumulación de osmolitos empieza aproximadamente de 10 a 24 horas después del estímulo hiperosmótico y alcanza un nivel estable una semana después. Cuando las condiciones de hipertonicidad duran varios días, los electrolitos acumulados en la fase inicial de la corrección del volumen son progresivamente remplazados por osmolitos orgánicos.

El DRV ha sido estudiado principalmente en células en cultivo, líneas celulares, neuronas y células gliales (Kimelberg y Ranson, 1986; Pasantes-Morales y Schousboe, 1988; Pasantes-Morales et al., 1993b, 1994c; Mountain et al., 1996; Pasantes-Morales et al., 1997). En neuronas y astrocitos, el DRV es un proceso rápido que se completa en un periodo de 15-30 min. Las células expuestas a condiciones hiposmóticas se hinchan rápidamente para posteriormente recuperar su volumen aún persistiendo estas condiciones. La eficiencia del DRV se relaciona de manera inversa con la magnitud del cambio osmótico del medio. Se ha visto que el DRV es dependiente de Na^+ y temperatura, así como sensible a bloqueadores de canales de Cl^- como el ácido 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoico (NPPB), la 1,9,dideoxyforskolina (DDF), el

dipiridamol y el ácido niflúmico. Se ha observado también que el DRV es dependiente de Cl^- en células C6, pero no en astrocitos y neuronas (Pasantes-Morales et al., 1993a, 1994b; 1994a). Los principales osmolitos involucrados en el DRV en neuronas y células gliales en cultivo son el K^+ y el Cl^- , los aminoácidos osmóticamente activos y el myo-inositol (Kimmelberg et al., 1990; Pasantes-Morales, 1996).

Aunque el estudio de los mecanismos de regulación del volumen celular han sido ampliamente estudiados en células en cultivo y líneas celulares, poco se ha hecho por conocer las respuestas originadas por cambios osmóticos en sistemas más complejos como serían rebanadas de tejido nervioso o sistemas in vivo. En rebanadas de corteza la exposición a condiciones hiposmóticas determinan hinchamiento medido como la reducción del espacio extracelular al final del experimento (Oja y Saransaari, 1992; Law, 1994a, 1996a), pero ninguna evidencia de DRV se ha presentado aún. En el hipocampo de rata se han hecho diferentes estudios (líneas celulares, in vivo y rebanadas) en los cuales se presentan datos controversiales sobre la existencia de regulación de volumen (Andrew y MacVicar, 1994; Andrew, 1997; Chebabo et al., 1995a; Aitken et al., 1999). Se ha propuesto de manera hipotética que el hinchamiento en neuronas hipocampales es prevenido en condiciones anisomóticas por una reducción en la permeabilidad al agua en la membrana debido a un cierre de canales como respuesta uniforme del soma neuronal y de las dendritas proximales a distintos ambientes adversos (Somjen et al., 1993; Somjen, 1999). En cuanto a la movilización de osmolitos en respuesta a condiciones hiposmóticas en rebanadas de corteza de rata, se ha observado que la liberación de taurina debido al hinchamiento está asociada a un mecanismo dependiente de Cl^- y pH y sensible a ácido niflúmico, TMB-8 y trifluoperazina (estos dos últimos conocidos bloqueadores de la liberación intracelular de calcio) (Law, 1994c), y a la liberación de otros aminoácidos como son L-aspartico, GABA, glicina y L-glutámico, que es sensible a DIDS, NEM, TFP y taspigargina (Law, 1994b; 1996a; 1996b). En preparaciones in vivo e in vitro de corteza cerebral ocurre también una liberación de taurina y GABA en respuesta a concentraciones bajas de Na^+ (Saransaari y Oja, 1992; Oja y Saransaari, 1996; Haugstad et al., 1997). También se ha visto la liberación de otros aminoácidos como glutámico, aspártico, glicina y fosfoetanolamina, siendo la liberación de taurina la más sensible a bloqueadores de

canales aniónicos (DIDS, SITS, tamoxifén, ácido niflúmico, ácido araquidónico y NPPB). El mecanismo de liberación parece estar modulado por PKC y PKA (Estevez et al., 1999a; 1999b). En estudios en el hipocampo, en respuesta a medios hiposmóticos se observa un aumento en la concentración extracelular de taurina (sensible a furosemida), glutámico, aspártico, fosfoetanolamina, GABA, alanina y N-acetylaspartato (Solis et al., 1988; Wade et al., 1988; Lehmann, 1989; Lehmann et al., 1991; Haugstad et al., 1995; Haugstad y Langmoen 1996; Davies et al., 1998). En estudios in vivo en hipocampo de rata se observa también un incremento en la liberación de taurina en medio hiposmótico 50% (Bruhn et al., 1996)

Estos mecanismos pueden estar actuando in vivo, y ser responsables de los cambios en los niveles de osmolitos observados. Se ha visto que en respuesta a condiciones hiponatémicas, las células nerviosas reaccionan activando el flujo de osmolitos orgánicos e inorgánicos. Existe una fase dentro de las primeras 3-24 h en la que se observa una disminución del 10-30% en las concentraciones de Na^+ , K^+ y Cl^- (Melton, 1987); en una segunda fase (aproximadamente de 2 días) se origina una disminución (50-80%) en el contenido de osmolitos orgánicos, principalmente aminoácidos (taurina, glutámico, aspártico, glutamina y GABA), myo-inositol, creatinina y N-actyl aspartato (Thurston et al., 1980; Verbalis et al., 1991, Sterns et al., 1993; Bedford et al., 1993). Debido a que el contenido de osmolitos inorgánicos es superior al de los orgánicos, su contribución al DRV es mayor (60%-70%) que la de los orgánicos (30-40%) (Lien et al., 1991).

En tejido nervioso, la regulación isovolúmica solo se ha estudiado en células de glioma de rata C6 en condiciones hipertónicas (Mountian y Van Driessche, 1997), donde se ha encontrado que el aumento gradual en la osmolaridad del medio conlleva a una captura de electrolitos por la bomba de Na^+/K^+ y el cotransportador $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$. La contribución de los osmolitos a la RIV en células nerviosas no se conoce.

Los mecanismos involucrados en la regulación del volumen se han estudiado principalmente en respuesta a cambios súbitos de osmolaridad, lo que no refleja condiciones fisio-patológicas reales debido a que tales cambios en la osmolaridad

externa del medio no suceden en la realidad ni en magnitud ni en rapidez, aún en condiciones de hiponatremia aguda. Por otra parte, la mayoría de los estudios de regulación del volumen se han realizado en células en cultivo o aisladas, lo que limita el estudio de este proceso a un solo tipo celular, mientras que in vivo existe un gran número de interacciones celulares, para el caso del tejido nervioso, entre las células neuronales y las gliales principalmente

En el presente trabajo se escogió como preparación experimental a la rebanada de hipocampo. La rebanada de hipocampo de rata es un sistema integrado y complejo donde la relación neurona-glia y su función sináptica se mantiene relativamente intacta, lo que permite estudiar los mecanismos celulares de respuesta que presenta un tejido de manera compuesta con todos sus componentes celulares. Cuando es cortado en forma transversal a su eje longitudinal (septal - temporal), el hipocampo exhibe un arreglo aferente de tres vías conectadas conocidas como circuito trisináptico o asa que permanece relativamente intacto, permitiendo estudiar la respuesta integral del tejido. Esta preparación es vulnerable particularmente a distintos procesos patológicos incluyendo isquemia, enfermedad de Alzheimer y epilepsia, los cuales tienen un componente de edema asociado (Amaral, 1978, Amaral et al., 1989, Kandel et al., 2000).

OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo fue estudiar los mecanismos de regulación de volumen en respuesta a decrementos en la osmolaridad del medio en el hipocampo de rata. En este estudio se caracterizó el grado de hinchamiento y la movilización de osmolitos orgánicos (aminoácidos osmóticamente activos) e inorgánicos (iones como el K^+) originados en respuesta a cambios súbitos y cambios graduales de osmolaridad comparándose ambos paradigmas experimentales diferentes.

externa del medio no suceden en la realidad ni en magnitud ni en rapidez, aún en condiciones de hiponatremia aguda. Por otra parte, la mayoría de los estudios de regulación del volumen se han realizado en células en cultivo o aisladas, lo que limita el estudio de este proceso a un solo tipo celular, mientras que in vivo existe un gran número de interacciones celulares, para el caso del tejido nervioso, entre las células neuronales y las gliales principalmente

En el presente trabajo se escogió como preparación experimental a la rebanada de hipocampo. La rebanada de hipocampo de rata es un sistema integrado y complejo donde la relación neurona-glia y su función sináptica se mantiene relativamente intacta, lo que permite estudiar los mecanismos celulares de respuesta que presenta un tejido de manera compuesta con todos sus componentes celulares. Cuando es cortado en forma transversal a su eje longitudinal (septal - temporal), el hipocampo exhibe un arreglo aferente de tres vías conectadas conocidas como circuito trisináptico o asa que permanece relativamente intacto, permitiendo estudiar la respuesta integral del tejido. Esta preparación es vulnerable particularmente a distintos procesos patológicos incluyendo isquemia, enfermedad de Alzheimer y epilepsia, los cuales tienen un componente de edema asociado (Amaral, 1978, Amaral et al., 1989, Kandel et al., 2000).

OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo fue estudiar los mecanismos de regulación de volumen en respuesta a decrementos en la osmolaridad del medio en el hipocampo de rata. En este estudio se caracterizó el grado de hinchamiento y la movilización de osmolitos orgánicos (aminoácidos osmóticamente activos) e inorgánicos (iones como el K^+) originados en respuesta a cambios súbitos y cambios graduales de osmolaridad comparándose ambos paradigmas experimentales diferentes.

METODOLOGIA

MATERIALES

Los compuestos radioactivos (^{86}Rb , ^3H -taurina, ^3H -Daspartato, ^3H -GABA) fueron adquiridos en New England Nuclear, Boston MA. Las diferentes sales (NaCl , CaCl_2 , MgCl_2 , KH_2PO_4 , KCl), Glucosa y HEPES fueron adquiridas en Sigma St. Louis MO., mientras que los distintos inhibidores de canales aniónicos (NPPB, DDFK y ácido niflúmico) fueron adquiridos en (Research Biochemical International).

REBANADAS DE HIPOCAMPO E INCUBACION

Se utilizaron ratas Wistar (machos) de 200-250 g de las cuales se disectó el cerebro para obtener los hipocampos. Estos se sumergieron en medio isosmótico (300 mOsm), con la siguiente composición (en mM): 135 NaCl , 1.0 CaCl_2 , 1.17 MgCl_2 , 1.7 KH_2PO_4 , 5 KCl , 5 Glucosa y 10 HEPES (pH 7.4) (el tiempo aproximado de disección hasta que fueron sumergidos fue el menor posible, aprox. 40 seg, tratando de evitar el daño producido por anoxia en el tejido). De ambos hipocampos se sacaron rebanadas transversales de 400 micras utilizando una rebanadora de tejido Chopper McIlwain, procurando solamente sacar las rebanadas de la parte media de cada hipocampo; esto debido a que aunque longitudinalmente los componentes celulares son los mismos, las capas celulares varían en espesor y por lo tanto los tipos celulares varían en abundancia. Se sacaron solamente 10 rebanadas por hipocampo (Figura 3). Posteriormente, las rebanadas se sumergieron en medio isosmótico a 37°C (temperatura a la cual se realizaron todos los experimentos), durante 5 minutos aproximadamente para su estabilización.

CAMBIOS SUBITOS DE OSMOLARIDAD

Las rebanadas se perfunden inicialmente con un medio isosmótico durante el tiempo indicado en cada experimento. Posteriormente se cambió el medio de perfusión

de forma súbita a medio hiposmótico 150, 225 ó 270 mOsm, según sea el caso (la hiposmolaridad se alcanzó reduciendo solamente la concentración de NaCl). Las osmolaridades finales de los distintos medios fueron checadas en un osmometro de punto de congelación (Osmette A, Precision Systems Inc.).

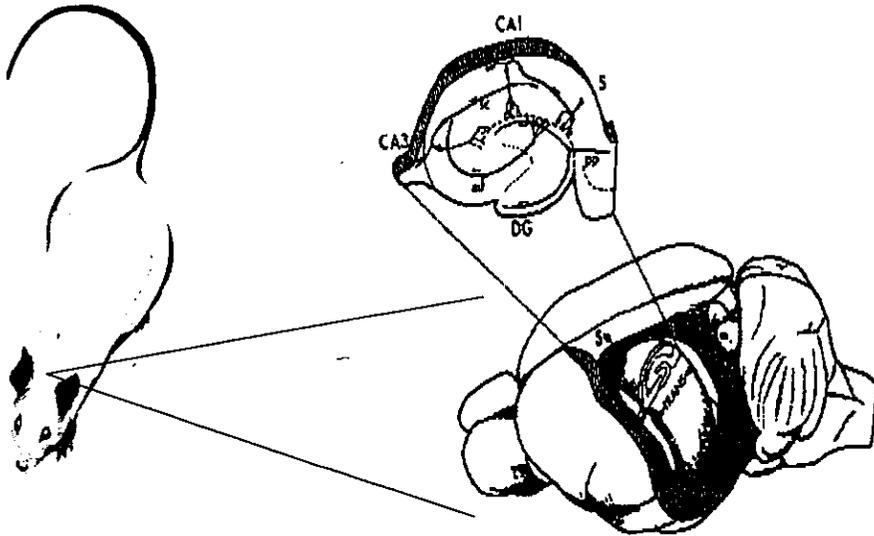


Figura 3. Ubicación del hipocampo en el cerebro de rata. Como se observa en la figura, el corte longitudinal mantiene intacta la circuitería del tejido.

CAMBIOS CONTINUOS DE OSMOLARIDAD

Para generar un gradiente osmótico (cambio gradual de osmolaridad a una tasa determinada), se utilizó un sistema de vasos comunicantes similar al descrito por Lohr y Grantham (1986) (Fig. 4). Este sistema consta de dos vasos de vidrio intercomunicados entre si; en uno de los cuales se pone el medio isosmótico con la osmolaridad a partir de la cual comenzará la reducción continua en la osmolaridad al irse mezclando gradualmente con el medio hiposmótico que se coloca en el otro vaso, alcanzando al final del tiempo de perfusión la osmolaridad de este (150mOsm).

Para probar éste sistema se corrió una curva contra osmolaridad, recolectándose fracciones cada minuto del medio perfundido (Fig 5). Posteriormente, se midió la osmolaridad de las muestras recolectadas y se calculó la tasa de cambio o de reducción de la osmolaridad del medio en nuestro sistema. Utilizando la formula establecida por Van Driessche y colaboradores (1997) se determinó la tasa de cambio teórica para el sistema:

$$\pi_b = \pi_2 = -(\pi^{\circ}2 - \pi_1) \times (D/2V_o)t + \pi^{\circ}2$$

donde π_b es la osmolaridad de la muestra del medio recolectada para determinado tiempo (t); π_2 es la osmolaridad del vaso 2 siendo igual a π_b ; $\pi^{\circ}2$ es la osmolaridad inicial del vaso 2 (isosmótico 300mOsm); π_1 es la osmolaridad del vaso 1 que no cambia (hiposmótico 150 mOsm.); D es la velocidad de perfusión de la bomba peristáltica (en la figura, $d = D/2$); y V_o es el volumen inicial tanto del vaso 1 como del 2 (250 ml). Como se observa en la figura 5, la tasa de cambio experimental fue de 2.47 mOsm/min, similar a la esperada de 2.5 mOsm/min (teórica) con una r^2 de 0.9971. En la figura se observa como, después de 60 min de perfusión, el medio alcanza una osmolaridad de 150 mOsm (50% hiposmótico).

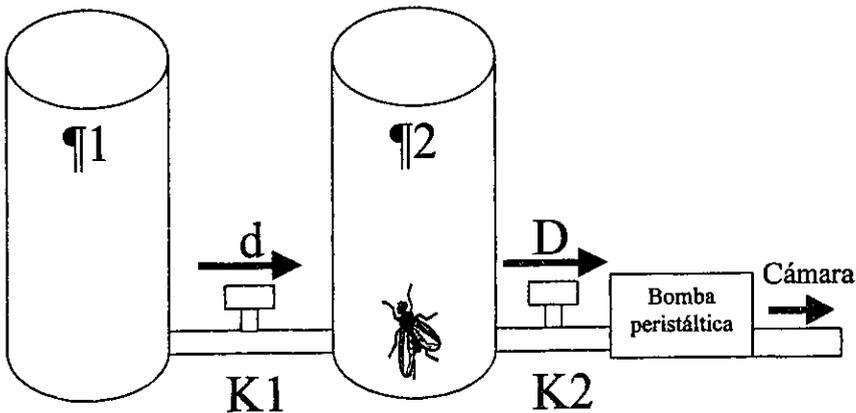


Figura 4. Sistema de vasos comunicantes (Lohr y Grantham 1986)

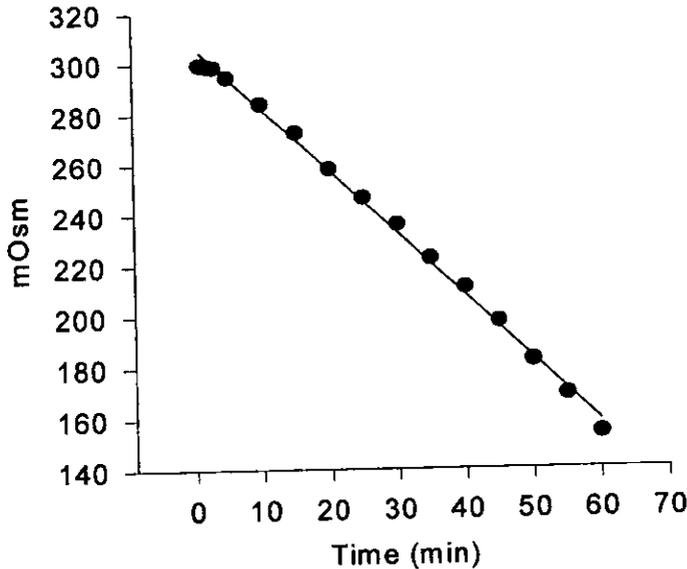


Figura 5. Cambio de la osmolaridad del medio en relación al tiempo en el sistema de vasos comunicantes (Fig 4). La tasa de cambio en nuestro sistema fue de 2.47 ± 0.06 mOsm por minuto, a una velocidad de perfusión de 1ml por min, mientras que la obtenida de manera teórica fue de 2.5 mOsm por min. Al final del tiempo de perfusión (60 min) la osmolaridad del medio alcanza las 150 mOsm. $r^2 = 0.99$

VOLUMEN

Los cambios en el volumen de la rebanada se cuantificaron a partir de los cambios en el contenido de agua intracelular del tejido, determinados de la siguiente forma:

ESPACIO EXTRACELULAR O INULÍNICO

Se utilizó la técnica de la determinación del espacio inulínico que ha sido empleada para determinar cambios en el espacio extracelular en diferentes preparaciones (Steenbergen et al., 1985; Law, 1987; 1992; Vom Dahl y Haussinger, 1996). Las rebanadas de hipocampo son incubadas individualmente durante 1 hr. en medio isosmótico con $1\mu\text{Ci/ml}$ de ^{14}C -Inulina. Posteriormente son expuestas a los

cambios de osmolaridad correspondientes (súbitos o graduales). Después del tiempo indicado, las rebanadas son escurridas determinándose el peso húmedo del tejido (peso final). Luego se digieren en NaOH 0.4N y la radioactividad remanente del tejido así como la liberada en el medio en el que son sumergidas se contabilizan en un Contador de Centelleo Líquido agregándose previamente (Tritosol).

El espacio extracelular o inulínico se determina mediante la siguiente fórmula (Chan et al., 1979). Los datos se expresan en % de espacio inulínico en la rebanada

$$[(d.p.m./g \text{ de peso húmedo final}) / (d.p.m./ ml \text{ del medio})] \times 100$$

CONTENIDO DE AGUA INTRACELULAR

Las rebanadas son sumergidas en MKH (150, 225 o 270 mOsm) y MKN (control) durante diferentes tiempos ó expuestas a cambios continuos de osmolaridad. Posteriormente se extraen los tejidos, se escurren y se pesan individualmente obteniendo el peso húmedo del tejido después del tratamiento (PHT). Luego, las rebanadas son secadas en un horno a 80 °C durante 24 hr para obtener el peso seco (PS) del tejido. El contenido de agua total de la rebanada se determina mediante la siguiente fórmula:

$$PHT-PS = \text{contenido de H}_2\text{O total}$$

al cual se le resta el % de espacio extracelular o inulínico del tejido obteniendo el contenido de agua intracelular en la rebanada para cada condición. Los datos se expresan en μl de H_2O por mg de peso seco (ps)

$$\text{contenido de H}_2\text{O total} - \% \text{ espacio inulínico} = \mu\text{l de H}_2\text{O/mg ps}$$

En este caso el espacio inulínico de las rebanadas de hipocampo fue de $17\% \pm 0.61$ y no varió en ninguna de nuestras condiciones. Este valor cae dentro de los resultados obtenidos por McBain y colaboradores (1988)

LIBERACION DE AMINO ACIDOS Y RUBIDIO. SISTEMA DE PERFUSION

Las rebanadas son incubadas en el mismo medio, con diferentes aminoácidos marcados radioactivamente: $3\mu\text{Ci/ml}$ de ^3H -taurina durante 1 hr, $1\mu\text{Ci/ml}$ de ^3H -D-aspartico y ^3H -GABA durante 30 min, o con $1\mu\text{Ci/ml}$ ^{86}Rb como trazador de K^+ durante 30 min.

Las rebanadas son colocadas en cámaras (3 rebanadas por cámara), a cada una de las cuales se perfunde medio a una velocidad de 1 ± 0.1 ml por min por medio de una bomba peristáltica (Figura 6). Durante los primeros 15 min se lavó continuamente el tejido con medio isosmótico para eliminar la radioactividad remanente ó adherida al tejido (sin recolectar muestras). Posteriormente se empieza a recolectar muestras cada min. Primero se recolectó una basal (5 min para cambios súbitos de osmolaridad y 10 min para cambios graduales de osmolaridad) y después, se cambió la osmolaridad del medio de perfusión (de manera súbita o continua) recolectándose muestras durante 20 min (cambio súbito) y 60 min (gradiente osmótico). A los viales se s agregó Tritosol y posteriormente, en un Contador de Centelleo Líquido Beckman se obtuvieron las CPM (cuentas por minuto) o DPM (deseintegraciones por minuto) correspondientes.

Los resultados de los experimentos anteriores son expresados en tasa de liberación (i.e. el porcentaje de radioactividad en la rebanada al inicio de cada periodo de recolecta de muestra). La tasa de liberación (f) es calculada de acuerdo a la ecuación:

$$f = A/(t+At)$$

donde A representa la radioactividad perdida en el intervalo t y At representa la diferencia entre el total de la radioactividad acumulada por las células durante la

incubación y la radioactividad liberada al tiempo de perfusión dado. (Sánchez-Olea R et al., 1991).

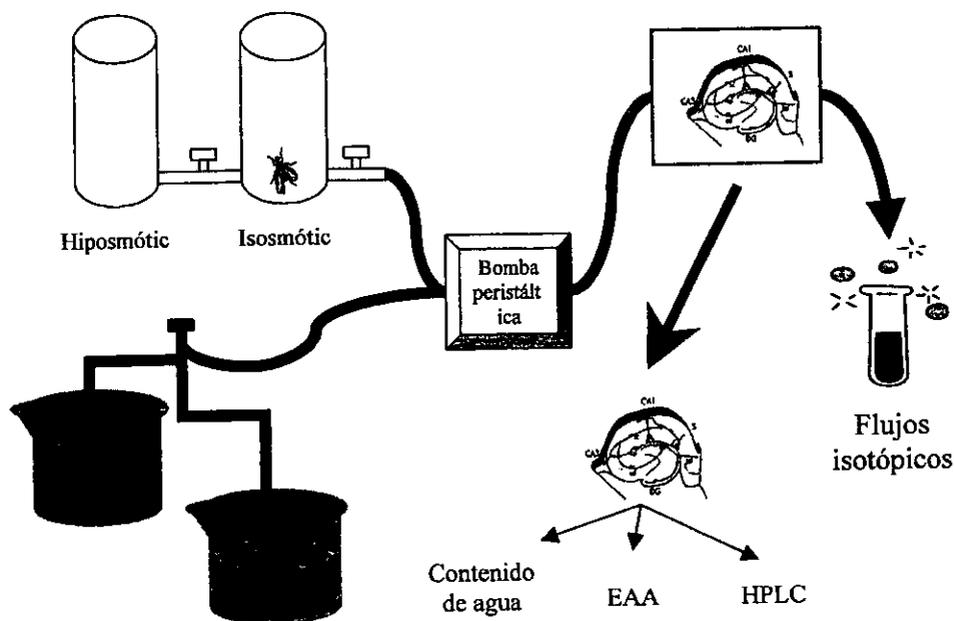


Figura 6. Sistema de perfusión para cambio súbito y gradual de osmolaridad.

EFFECTO DE INHIBIDORES DE CANALES DE Cl^-

El efecto de conocidos inhibidores de canales de Cl^- como son el DDFK ($100\mu M$), NPPB ($600\mu M$) y ácido niflúmico ($600\mu M$) sobre la liberación de aminoácidos (3H -D-aspartico, 3H -GABA y 3H -taurina) estimulada por cambios de osmolaridad se estudio en el presente trabajo. Estos farmacos se preincubaban 15 min antes de la recolecta de la basal y se encuentran presentes a lo largo de todo el experimento.

AMINOÁCIDOS Y POTASIO ENDÓGENO

Se utilizaron rebanadas de hipocampo obtenidas de la misma manera que en los experimentos anteriores, que no fueron incubadas con ningún tipo de marca

radioactiva. Posteriormente, se realizaron experimentos de cambio súbito y cambio continuo de osmolaridad en estas rebanadas de la manera descrita previamente, sin recolectar muestras del medio perfundido. Se recuperaron los tejidos de las cámaras de perfusión y se trataron de la manera en que se especifica más adelante para cuantificar el potasio y los aminoácidos endógenos remanentes en el tejido comparándolos con controles perfundidos durante el mismo tiempo con medio isosmótico y tratados de la misma forma.

Para cuantificar la cantidad de aminoácidos remanente en las rebanadas, se realizó el siguiente procedimiento. Las muestras fueron homogeneizadas y sonicadas en alcohol al 70%; posteriormente, son centrifugadas a 5000 rpm durante 5 min, recuperando el sobrenadante para después filtrarlo. Los aminoácidos contenidos en la muestra filtrada son cuantificados por HPLC y los resultados son expresados como nmolas de aminoácido por mg de peso húmedo.

Para cuantificar el contenido endógeno de potasio en el tejido, las muestras son homogeneizadas y sonicadas en agua bidestilada (1ml); luego se les agrega HCl 0.1N (4ml) y son hervidas durante 15 min para lisar todas las membranas celulares. Después, las muestras son centrifugadas a 6000 rpm durante 5 min. El potasio contenido en la muestra es cuantificado por Espectrometría de Absorción de Atómica, y los resultados son expresados en mmolas de K^+ por mg de peso seco.

RESULTADOS

CAMBIOS EN EL VOLUMEN

Esta etapa del trabajo incluyó el estudio de los cambios en volumen originados por reducciones en la osmolaridad del medio de manera gradual o súbita, caracterizando el grado de hinchamiento o aumento en volumen y la existencia de una regulación dinámica del mismo. Como ya se mencionó en la metodología, en todos estos experimentos el cambio en el volumen en el tejido, se evaluó haciendo la sustracción del espacio inulinico previamente determinado (17.1%).

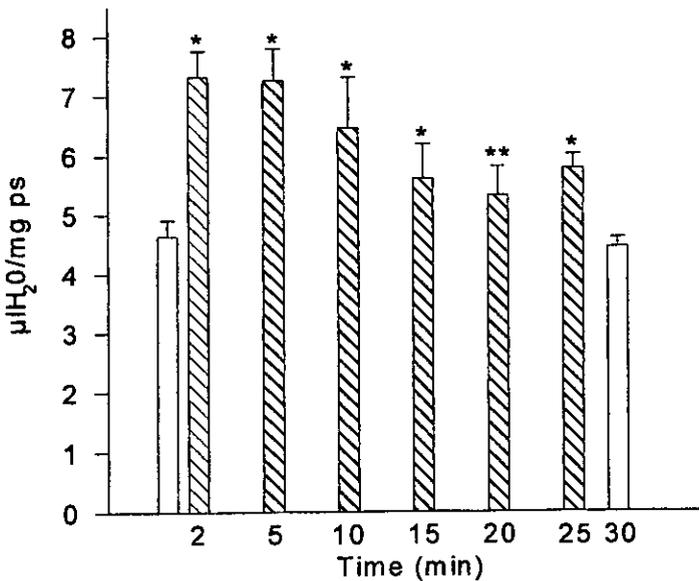


Figura 7. Curso temporal del cambio en el contenido de agua de las rebanadas de hipocampo expuestas a cambios súbitos de osmolaridad. Después de 10 min en medio isosmótico las rebanadas fueron expuestas a un medio 50% hiposmótico durante el tiempo indicado (barras en diagonal). Los controles (barras en blanco) muestran el contenido de agua de los tejidos en medios isosmóticos antes del experimento y después de regresarse durante 5 min a medio isosmótico posterior a 25 min. en medio hiposmótico 50%. Los datos se expresan como μl de H_2O por mg de peso seco (ps) y son promedios ($n=4-8$) \pm ES. Los asteriscos significan diferencias significativas con respecto al control (isos) * $p<0.005$, ** $p<0.05$

En la figura 7 se observa el curso temporal del cambio en el contenido de agua de las rebanadas de hipocampo expuestas a un medio 50% hiposmótico. El contenido de agua aumentó alcanzando su máximo a los 2 min con un 58% de incremento, manteniéndose este pico hasta los 10 minutos posteriores al estímulo. A partir de este momento, se observó una disminución en el contenido de agua, recuperando el 74.5% de su volumen original sin alcanzar completamente el nivel basal registrado en el control. Sin embargo, en el momento en el que el tejido se regresa a un medio isosmótico, éste recupera el contenido de agua inicial. Estos resultados indican la existencia del proceso de regulación del volumen (DRV), en rebanadas de hipocampo.

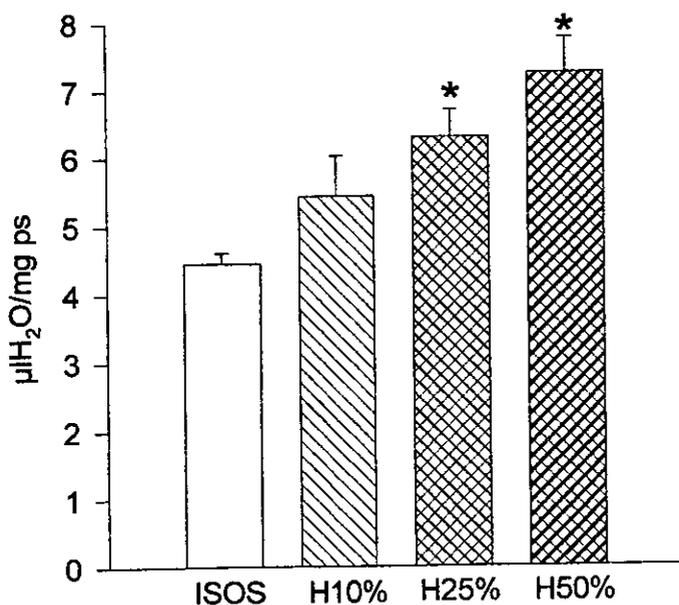


Figura 8. Cambios en el contenido de agua de las rebanadas de hipocampo expuestas a cambios súbitos en la osmolaridad del medio. Las rebanadas fueron expuestas durante 5 min. al medio con la osmolaridad indicada (isos - 300mOsm, H10% - 270mOsm, H25% - 225mOsm H50%-150mOsm). Los datos se expresan como µl de H₂O por mg de peso seco (ps) y son promedios (n=8-10) ± ES. Los asteriscos significan diferencias significativas con respecto al control (isos) *p<0.005

La figura 8 muestra el contenido de agua en las rebanadas de hipocampo expuestas de manera súbita a medios hiposmóticos durante 5 min. El contenido de agua aumenta de manera proporcional a la reducción en la osmolaridad del medio. El incremento en el contenido de agua fue de 22.1, 41.6 y 63.1 % en medios hiposmóticos de 270 (10%), 225 (25%) y 150 (50%) mOsm respectivamente

El protocolo de cambio súbito y decremento importante en la osmolaridad es usado muy frecuentemente para estudios sobre los mecanismos de regulación del volumen sin embargo, como ya se mencionó en la introducción, es poco probable que

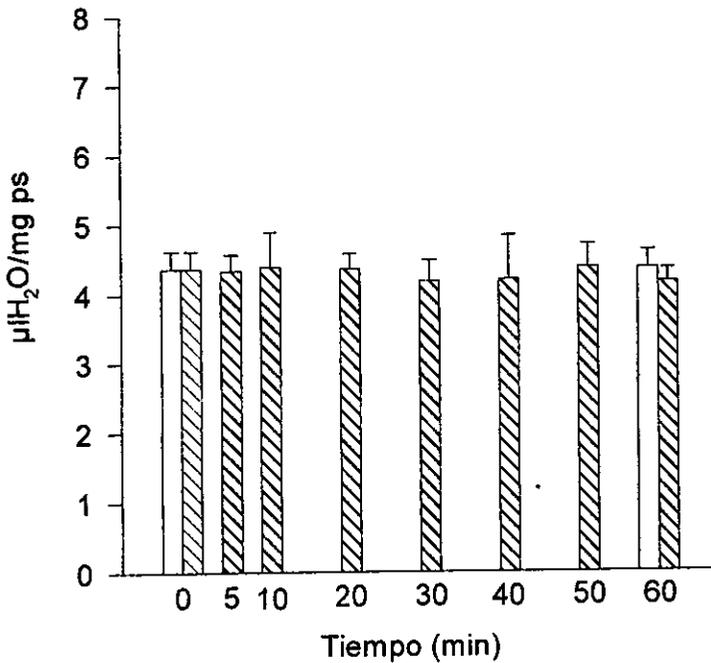


Figura 9. Cambios en el contenido de agua de las rebanadas de hipocampo expuestas a cambios graduales de osmolaridad durante el tiempo indicado (barras en diagonal). Las rebanadas fueron perfundidas con un gradiente osmótico a una tasa de -2.5 mOsm por min. Los controles (barras en blanco) muestran el contenido de agua de tejidos en medio isosmótico durante el tiempo indicado. Los datos se expresan como µl de H₂O por mg de peso seco (ps) y son promedios (n=4-8) ± ES.

estos cambios reflejen los cambios en la osmolaridad que se originan en condiciones patológicas, fisiológicas y aún en las situaciones asociadas a edema celular. Por lo tanto, se implementó un paradigma experimental en el que la reducción en la osmolaridad del medio es gradual a partir de un medio isosmótico (300 mOsm) de modo que a una tasa de cambio de 2.5 mOsm/min se alcanza una osmolaridad final de 150 mOsm después de 60 min. Este protocolo se ha empleado anteriormente en células renales (Lohr y Grantham, 1986). En las rebanadas de hipocampo sometidas a estas condiciones no se observó ningún cambio significativo en el volumen reflejado en cambios en el contenido de agua (figura 9), lo que indica que las células de hipocampo tienen la capacidad de desarrollar el proceso de RIV que se describió en la introducción.

Mientras que en el DRV se conocen con cierta precisión los osmolitos involucrados en el proceso compensatorio del volumen, existe muy poca información acerca de los mecanismos que subyacen en el RIV. Por ello, en este trabajo se realizó un estudio comparativo de la movilización de algunos de los osmolitos en respuesta a condiciones hiposmóticas en los dos sistemas. Se estudió en particular la participación de los aminoácidos y el K^+ .

LIBERACION DE AMINO ACIDOS

CAMBIOS SÚBITOS DE OSMOLARIDAD.

La figura 10 muestra la liberación de aminoácidos marcados radioactivamente (3H -taurina, 3H -D-aspartato y 3H -GABA) en rebanadas de hipocampo expuestas a un medio 50% hiposmótico. La liberación de los tres aminoácidos presenta una activación rápida, seguida de un curso temporal con una cinética y magnitud diferentes entre los tres. Para el 3H -D-aspartato y el 3H -GABA, la cinética de liberación muestra dos componentes. El primero consiste en una respuesta rápida y transitoria, que alcanza la tasa máxima de liberación al primer minuto después del estímulo con una magnitud de 0.164 min^{-1} y 0.56 min^{-1} para 3H -D-aspartato y 3H -GABA respectivamente (Fig 10A, B.

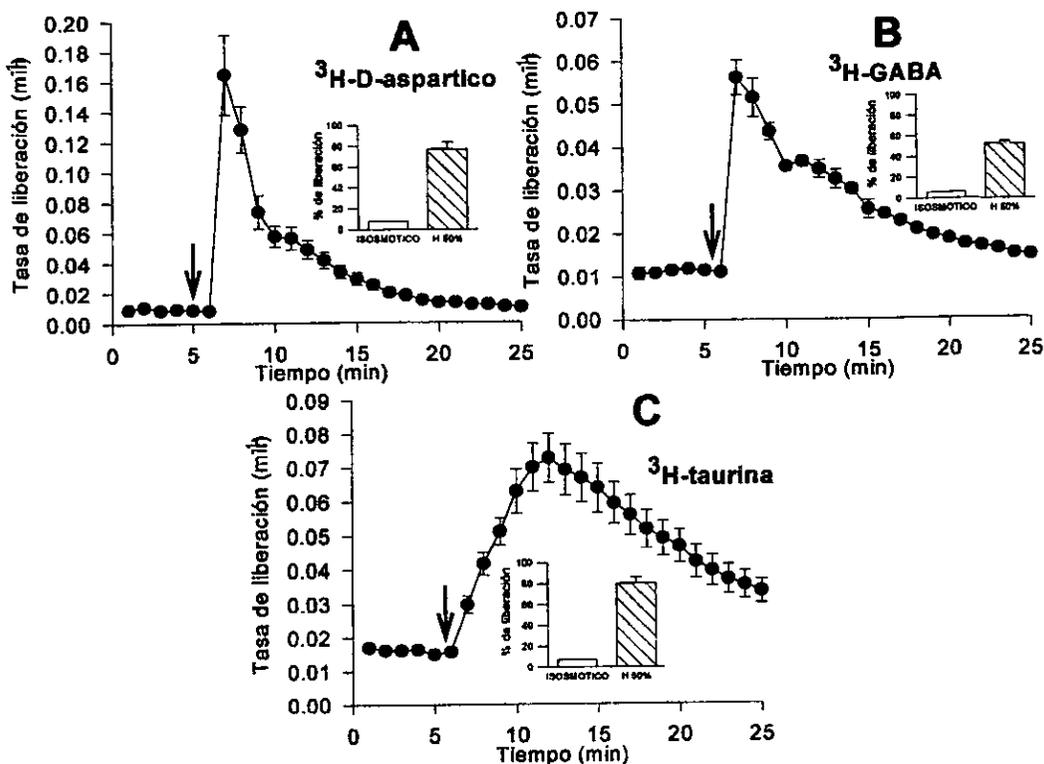


Figura 10. Liberación de aminoácidos de rebanadas de hipocampo de rata expuestas a cambios súbitos de osmolaridad. Las rebanadas incubadas con $^3\text{H-D-aspartico}$ (A), $^3\text{H-GABA}$ (B) y $^3\text{H-aurina}$ (C) fueron perfundidas durante 5 min con medio isosmótico. En el tiempo indicado por la flecha el medio fue cambiado de manera súbita a un medio 50% hiposmótico durante 20 min. Los datos se expresan como tasas de liberación (min^{-1}) y son promedios \pm ES ($n=10$). Los insertos muestran el porcentaje de liberación \pm ES de los aminoácidos correspondientes durante el tiempo de exposición al medio 50% hiposmótico comparado con un control en isosmótico continuo

Tabla 1). El segundo componente tiene una cinética de respuesta más lenta, alcanzando la tasa máxima de liberación a los 4-5 minutos después del estímulo. Este valor fue de 0.056 min^{-1} y 0.036 min^{-1} para el $^3\text{H-D-aspartato}$ y el $^3\text{H-GABA}$ respectivamente (Tabla 1). Al final del tiempo de perfusion, la liberación total en % (con respecto al total de la marca radioactiva incorporada en el tejido durante la incubación) de $^3\text{H-D-aspartico}$ y $^3\text{H-GABA}$ aumentó de 7.7% y de 5.5% (condición control en medio isosmótico continuo) a 77% y 52% respectivamente (en medio 50% hiposmótico). Por otra parte, la liberación de $^3\text{H-aurina}$ presenta un solo componente similar al segundo que presentan los otros dos aminoácidos, alcanzando la tasa

máxima de liberación (0.073 min^{-1}) a los 4-5 minutos (Tabla 1, Fig 10C). En este caso, la liberación total en % de la marca incorporada se incrementó de 7.22% (condición control) a 80% (en medio 50% hiposmótico).

Tabla 1. Tasas máximas de liberación de los aminoácidos en relación al decremento en la osmolaridad del medio obtenidas a partir de los experimentos de la figura 10 y 11. Los datos representan las tasas máximas para cada aminoácido en los tiempos correspondientes: 1 min para el primer componente (A), y 5-6 min para el segundo componente (B).

		Tasas máximas de liberación $\text{min}^{-1} \times 10^2$							
		Isosmótico		Hiposmótico					
				10%		25 %		50 %	
				A	B	A	B	A	B
3H-D-aspartico	1.0	2.3*	1.8	2.9	1.6	16.4	5.6		
3H-GABA	1.1	1.2	1.4	2.1	1.7	5.6	3.6		
3H-aurina	1.5	-	2.0	-	2.9	-	7.2		

Los asteriscos indican ninguna diferencia significativa con respecto al control (isosmótico).

La liberación de taurina, D-aspartico y GABA en la rebanada de hipocampo en respuesta a hipotonicidad no fué proporcional al decremento en la osmolaridad del medio. En el medio 25% hiposmótico, la liberación de los tres aminoácidos es menor con respecto a la observada en el medio 50% hiposmótico; sin embargo aún son apreciables los distintos componentes de las cinéticas de liberación de los tres aminoácidos (Fig 11A, B y C). Para el primer componente, la liberación de D-aspartico fué la más alta con una tasa máxima de 0.029 min^{-1} . En cuanto al segundo componente (o primero para la taurina) la taurina presenta la tasa máxima de liberación (0.029 min^{-1}). En el medio 10% hiposmótico la liberación de aminoácidos solo es significativa para el segundo componente en los tres aminoácidos, siendo mayor para la taurina (0.02 min^{-1}), seguida por el D-aspartico (0.018 min^{-1}) y el GABA (0.014 min^{-1}).

Aunque no se puede descartar un factor difusional a través de la rebanada, lo que podría alterar las cinéticas de liberación de los aminoácidos observadas en medios hiposmóticos, al realizar experimentos a una velocidad de perfusión de 2 ml por minuto (el doble de la utilizada en los experimentos anteriores) con el objeto de optimizar la liberación, no se observaron cambios en las cinéticas de liberación para ninguno de los tres aminoácidos (Fig 12)

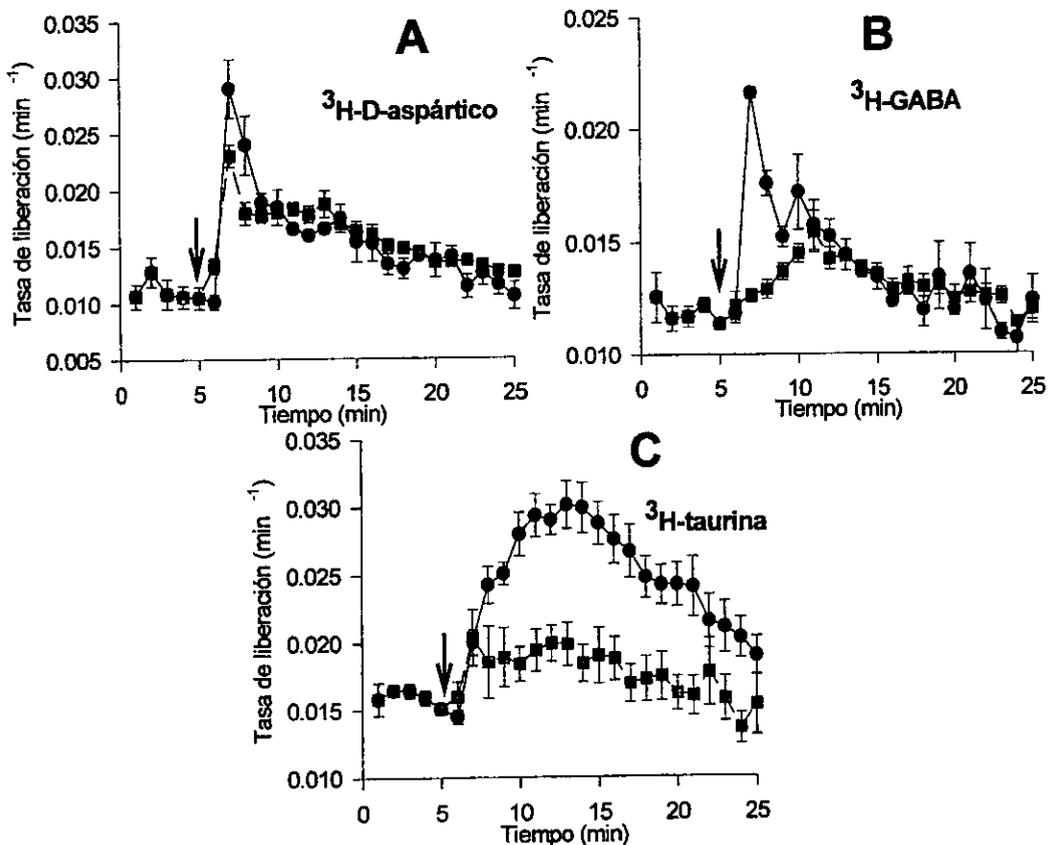


Figura 11. Liberación de aminoácidos de rebanadas de hipocampo de rata expuestas a cambios súbitos de osmolaridad. Las rebanadas incubadas con $^3\text{H-D-aspartato}$ (A), $^3\text{H-GABA}$ (B) y $^3\text{H-aurina}$ (C) fueron perfundidas durante 5 min con medio isosmótico. En el tiempo indicado por la flecha el medio fue cambiado de manera súbita a medios 25% (●) y 10% (■) hiposmóticos durante 20 min. Los datos se expresan como tasas de liberación (min^{-1}) y son promedios \pm ES ($n=4-8$).

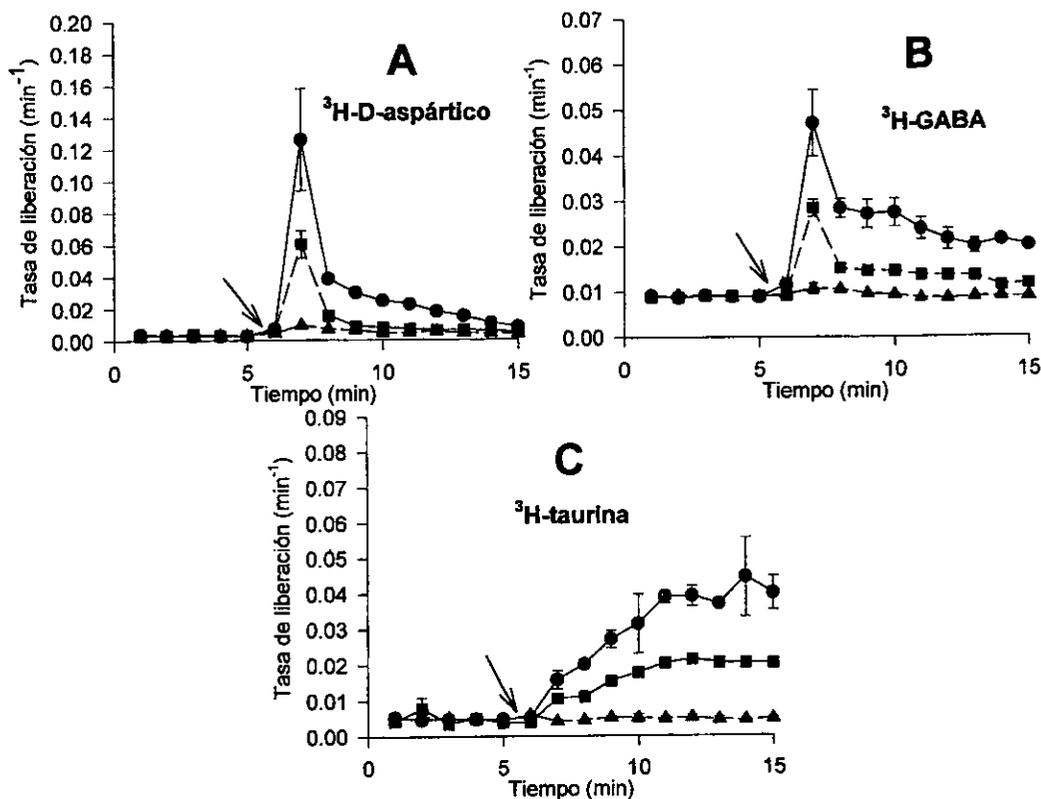


Figura 12. Liberación de aminoácidos de rebanadas de hipocampo de rata expuestas a cambios súbitos de osmolaridad. Las rebanadas incubadas con $^3\text{H-D-aspartico}$ (A), $^3\text{H-GABA}$ (B) y $^3\text{H-aurina}$ (C) fueron perfundidas durante 5 min a una velocidad de 2ml/min con medio isosmótico. En el tiempo indicado por la flecha el medio fue cambiado de manera súbita a medios 50% (●), 25% (■) y 10% (▲) hiposmóticos durante 20 min. Los datos se expresan como tasas de liberación (min^{-1}) y son promedios \pm ES ($n=4$).

CAMBIOS CONTINUOS DE OSMOLARIDAD

La figura 13 muestra la liberación de $^3\text{H-aurina}$, $^3\text{H-D-aspartico}$, $^3\text{H-GABA}$ de rebanadas de hipocampo expuestas a cambios graduales en la osmolaridad del medio, a una tasa de cambio de 2.5 mOsm/min. El gradiente osmótico generado estimuló de manera casi inmediata la liberación de aminoácidos, la cual es significativamente más alta a los 2 min de perfusión ($P<0.005$), que corresponde a una disminución de 12.5 mOsm en el medio (Fig 13). La liberación de taurina es 7 veces mayor (comparada con la liberación en medio isosmótico) con respecto a los otros dos aminoácidos, mientras que la del $^3\text{H-D-aspartico}$ y el $^3\text{H-GABA}$ presentan un incremento de 3 y 2 dos veces

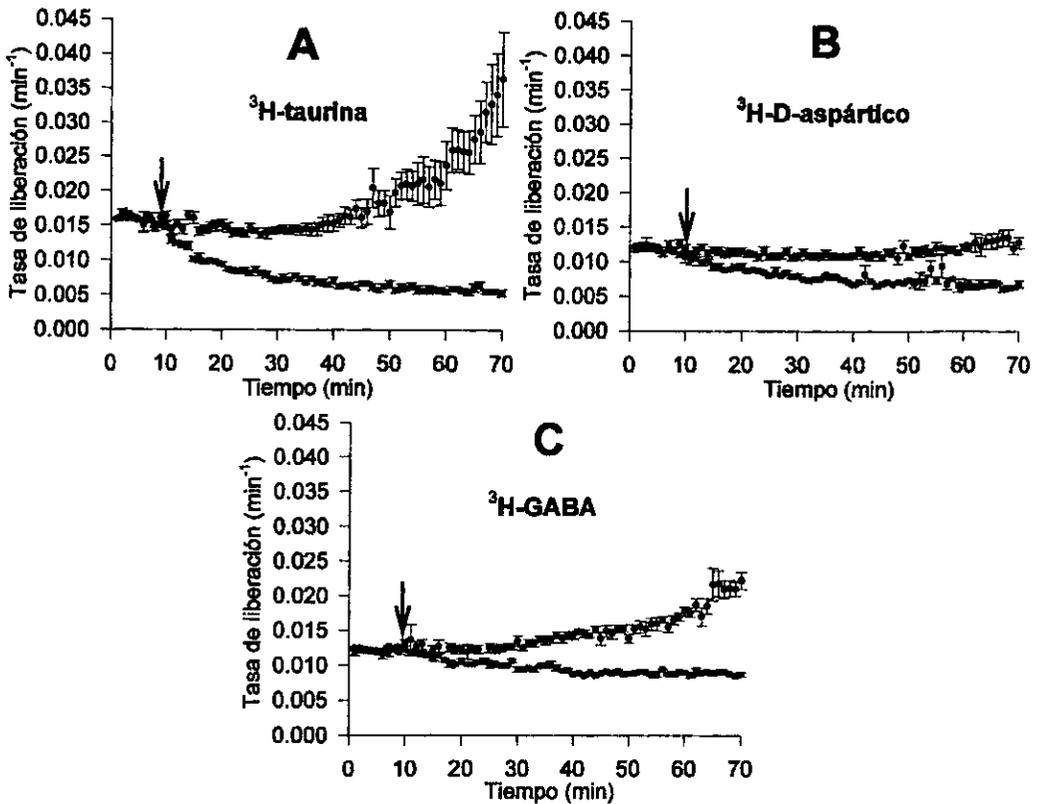


Figura 13. Liberación de aminoácidos de rebanadas de hipocampo de rata expuestas a cambios graduales de osmolaridad. Las rebanadas incubadas con ³H-taurina (A), ³H-D-aspartico (B) y ³H-GABA (C) fueron perfundidas durante 10 min con medio isosmótico. En el tiempo indicado por la flecha e medio fue de forma gradual a una tasa de decremento de 2.5 mOsm/min a medio 50% hiposmótico (●). Después de 60 min de perfusión la osmolaridad alcanza 150mOsm. Los controles (■) son rebanadas perfundidas de manera continua con un medio isosmótico. Los datos se expresan como tasas de liberación (min⁻¹) y son promedios ± ES (n=8-10). Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.005$) entre la liberación en gradiente osmótico y el control a partir del minuto 12 (D-aspartico y GABA) y 18 (taurina) posterior al inicio del cambio en la osmolaridad del medio.

respectivamente, por encima de la liberación basal. La cinética de liberación de ³H-taurina, ³H-D-aspartato y ³H-GABA en estas condiciones, fue analizada ajustando los datos experimentales a una función lineal (regresión lineal) en distintos segmentos de la curva. Las cinéticas de liberación se ajustan a tres constantes (k) (Tabla 2). Los intervalos de tiempo descritos por cada constante fueron muy similares para los tres aminoácidos. k1 describe la liberación desde el inicio del gradiente hasta el minuto 29-

30, cuando la disminución en la osmolaridad del medio alcanzó 250 mOsm (16% hiposmótico); k2 describe la liberación desde ese punto hasta el minuto 58-59, una vez que el medio alcanza 175 mOsm (42% hiposmótico). Finalmente, k3 describe el último intervalo de la curva hasta el min 60-70 (150 mOsm- 50% hiposmótico).

Tabla 2. Constantes de liberación de \cdot H-Taurina, 3H-GABA y 3H-D-aspartico en RIV. La liberación de estos tres aminoácidos en condiciones de RIV fueron analizadas de manera cinética ajustando los datos experimentales de la figura 13 a regresiones lineales en diferentes segmentos de las curvas como se indica (intervalo) Los valores son las pendientes de los datos promedio ajustados.

Intervalo (min)	k1	k2	k3
	10 - 30	31 - 59	60 - 70
3H-aurina	-4.066 \pm 0.542	8.968 \pm 0.502	34.829 \pm 3.733
3H-GABA	0.378 \pm 0.121	2.204 \pm 0.199	8.914 \pm 1.231
3H-D-aspartico	-2.322 \pm 0.111	2.070 \pm 0.219	7.138 \pm 1.070

CAMBIOS EN EL CONTENIDO ENDOGENO DE AMINO ACIDOS CAMBIOS SUBITOS DE OSMOLARIDAD

La concentración endógena de los amino ácidos más abundantes en las rebanadas de hipocampo: glutámico, taurina, glicina, taurina, alanina y GABA, se muestra en la Tabla 3. Estos aminoácidos representan cerca del 80% de la poza libre intracelular en el hipocampo (Banay-Schwartz et al., 1989a; 1989b). Cuando las rebanadas son expuestas a medios hiposmóticos se puede observar una reducción en la concentración de estos aminoácidos (Tabla 3). En el medio 50% hiposmótico, los niveles de aminoácidos disminuyen de 35% a 64%, siendo los más sensibles, el glutámico (52%) y la taurina (64%); el GABA fue el menos sensible al cambio en osmolaridad. La concentración total de aminoácidos en estas condiciones, disminuyó 50.6% con respecto al control. En el medio 25% hiposmótico, la concentración de amino ácidos disminuyó 10-30%, en este caso, la taurina y la alanina fueron los más

sensibles. En el medio 10% hiposmótico no se aprecia ninguna reducción en el contenido de glutamato, glicina y GABA. Por otra parte, la concentración de taurina y de alanina disminuyó considerablemente (26-32%) (Tabla 3).

Tabla 3. Contenido endógeno de aminoácidos en rebanadas de hipocampo de rata expuestas de manera súbita y gradual a cambios graduales en la osmolaridad del medio. Las rebanadas fueron perfundidas con el medio hiposmótico (H10%, H25%, H50%) por 30 min o con un gradiente osmótico (isomótico \Rightarrow hiposmótico; a una tasa de 2.5 mOsm/min) (isovolúmico) por 60 min. Los controles fueron rebanadas perfundidas de manera continua con medio isosmótico (Isos) el tiempo indicado. El contenido de aminoácidos se determinó por HPLC

Condición	Aminoácidos				
	(nmolas / mg peso húmedo)				
	Glutámico	Glicina	Taurina	Alanina	GABA
Isos (30 min)	5.76 ± 0.50	1.88 ± 0.19	4.32 ± 0.28	1.67 ± 0.16	2.52 ± 0.30
H10%	5.52 ± 0.30	1.81 ± 0.18	3.41** ± 0.04	1.12 ± 0.11	2.49 ± 0.39
H25%	4.88 ± 0.36	1.49 ± 0.12	3.01** ± 0.12	1.24*** ± 0.08	2.26 ± 0.08
H50%	2.76* ± 0.28	1.06** ± 0.12	1.55* ± 0.10	1.78* ± 0.07	1.65** ± 0.09
Isos (60 min)	4.82 ± 0.42	1.66 ± 0.16	3.98 ± 0.26	1.59 ± 0.15	2.31 ± 0.27
Isovolúmico	1.06** ± 0.65	1.05** ± 0.13	0.87* ± 0.03	1.09** ± 0.09	1.31** ± 0.08

Los datos representan la media de 8 experimentos \pm E.S. Los asteriscos indican diferencias significativas: * $p < 0.005$, ** $p < 0.02$, *** $p < 0.05$ comparados con su control correspondiente (isos 30 min para H10%, H25% y H50%; isos 60 min para el isovolúmico).

CAMBIOS GRADUALES DE OSMOLARIDAD

La tabla 3 muestra el cambio en la concentración de amino ácidos endógenos al final del experimento con el gradiente osmótico. Todos los aminoácidos disminuyeron de

manera significativa siendo la taurina (78%) y el glutamato (65%), los aminoácidos más sensibles, seguidos por el GABA (43%), la glicina (37%) y la alanina (32%). El contenido total de aminoácidos en condiciones isovolúmicas, disminuyó 63% con respecto al control.

EFFECTO DE LOS BLOQUEADORES DE CANALES DE Cl⁻

Como ya se ha mencionado, existen estudios en los que se ha visto que la liberación de taurina en respuesta a cambios de volumen se inhibe por bloqueadores de canales de Cl⁻ como el DIDS, el dipiridamol, el NPPB, la DDF, el ácido niflúmico o por ácidos grasos polinsaturados (Sánchez-Olea et al., 1993; 1996; Pasantes-Morales et al., 1994; 1999). Con base en esto se decidió probar el efecto de algunos de estos bloqueadores (NPPB, DDF y el ácido niflúmico), sobre la liberación de taurina estimulada por cambios súbitos y graduales de osmolaridad.

CAMBIOS SÚBITOS DE OSMOLARIDAD

En medio 50% hiposmóticos, el NPPB (100 µM) y el ácido niflúmico (600 µM) inhibieron la liberación de taurina activada por hiposmolaridad 58% y 69.6% respectivamente, mientras que la DDF inhibió apenas un 14.6% (Fig 10A). Con base en estos resultados, se decidió probar el efecto del ácido niflúmico sobre la liberación de D-aspartato y GABA en condiciones anisomóticas (figura 14B y 14C respectivamente).

El ácido niflúmico no afectó de manera significativa el primer componente de la liberación de D-aspartato, pero inhibió su inactivación, por lo que el segundo componente de liberación parece haber sido enmascarado (figura 14B)

En presencia del ácido niflúmico la liberación de GABA (figura 14C) en el primer componente aumentó de manera significativa ($p < 0.02$) con respecto a la liberación en ausencia de fármaco. Sin embargo, el segundo componente se vió significativamente disminuido ($p < 0.005$) en su tasa máxima de liberación.

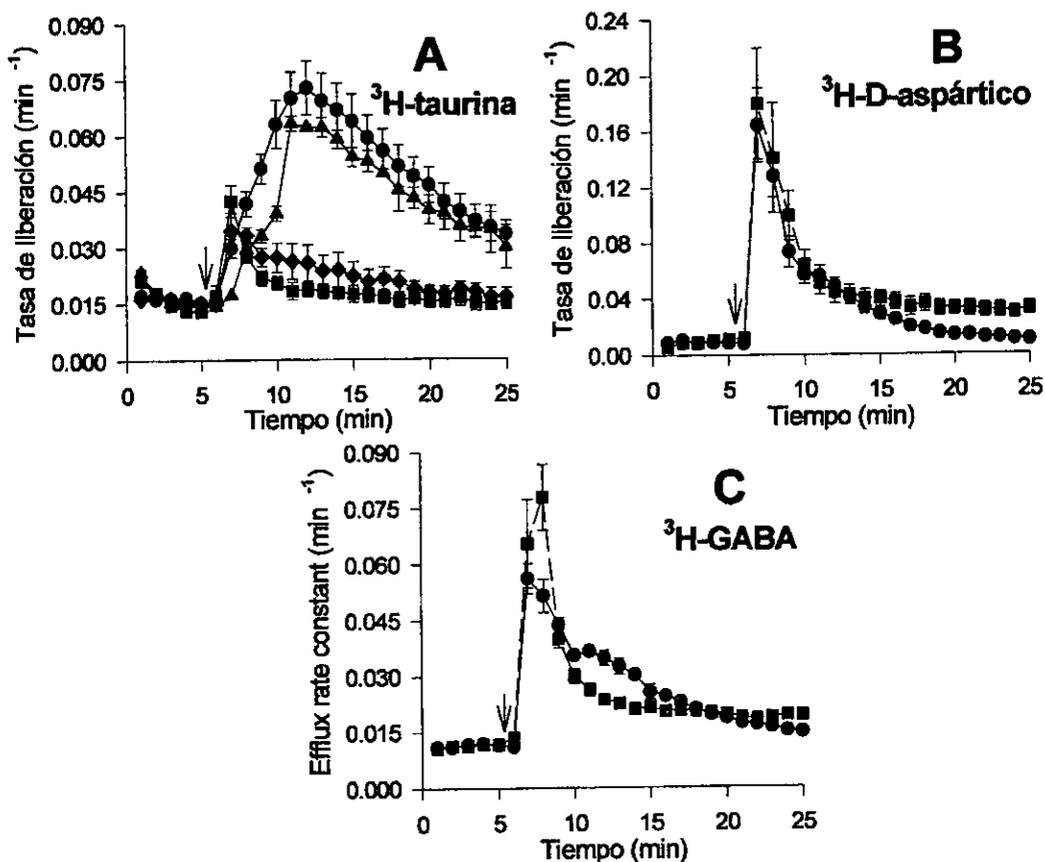


Figura 14. Efecto de los inhibidores de canales de Cl^- sobre la liberación de aminoácidos estimulada por medios 50% hiposmóticos. Las rebanadas fueron incubadas con ^3H -taurina (A), ^3H -D-aspartico (B) y ^3H -GABA (C) fueron perfundidas durante 5 min con medio isosmótico. En el tiempo indicado por la flecha el medio se cambió de forma súbita a un medio 50% hiposmótico (●). Los inhibidores de canales de Cl^- (ácido niflúmico 600 μM (■), NPPB 100 μM (◆) y DDF 100 μM (▲) se incubaron 15 min antes de la basal y estuvieron presentes a lo largo de todo el experimento. Los datos se expresan como tasas de liberación (min^{-1}) y son promedios \pm ES ($n=4-6$).

CAMBIOS GRADUALES DE OSMOLARIDAD.

Posteriormente, se decidió probar el efecto del ácido niflúmico en la liberación de taurina en condiciones isovolumétricas. En la Fig 15, se observó cómo el ácido niflúmico (600 μM), inhibe notablemente la liberación.

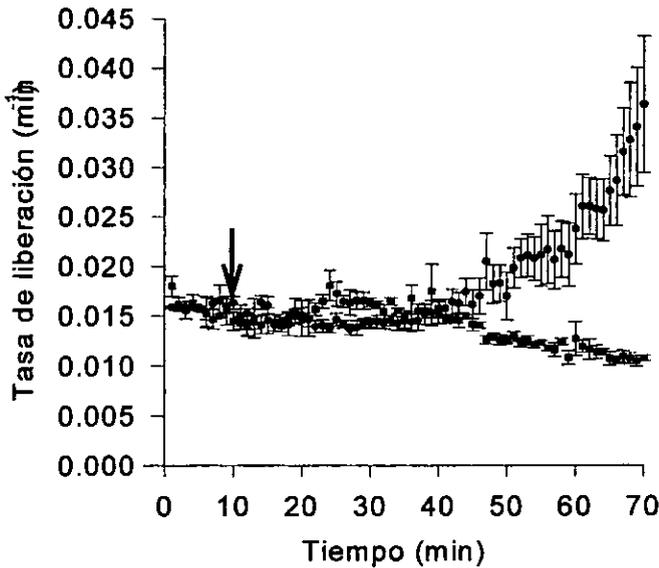


Figura 15. Efecto del ácido niflúmico sobre la liberación de ^3H -taurina en rebanadas de hipocampo en condiciones de RIV. Las rebanadas fueron perfundidas durante 10 min con medio isosmótico. En el tiempo indicado por la flecha la osmolaridad del medio fue reducida de forma gradual a una tasa de decremento de 2.5 mOsm/min a medio 50% hiposmótico (●). Después de 60 min de perfusión la osmolaridad alcanza 150mOsm. El ácido niflúmico 600 μM (■) fue incubado 15 minutos antes de la basal y estuvo presente durante todo el experimento. Los datos se expresan como tasas de liberación (min^{-1}) y son promedios \pm ES ($n=4-8$).

LIBERACION DE K^+

Una vez estudiado el papel de los aminoácidos en la regulación del volumen (DRV o RIV) en las rebanadas de hipocampo, el siguiente objetivo fue estudiar la movilización de osmolitos inorgánicos (iones, en este caso K^+) en condiciones de estimulación con medios hiposmóticos con dos los protocolos de cambio de osmolaridad, es decir, cambio súbito y cambio gradual.

CAMBIOS SUBITOS DE OSMOLARIDAD

Las rebanadas de hipocampo de rata incubadas con ^{86}Rb , al ser expuestas de manera súbita a medios hiposmóticos (50%, 25% y 10%), presentaron una liberación de ^{86}Rb rápida y transitoria, que alcanzó el máximo al segundo minuto posterior al estímulo, con una tasa máxima de 0.0606, 0.0399 y 0.0305 min^{-1} , respectivamente. El

curso temporal de la liberación fue similar en todas las condiciones y la tasa máxima de liberación incrementó conforme al decremento en la osmolaridad del medio (Fig 16A): sin embargo, la liberación solo fue significativa para el caso de medios 25% y 50% hiposmóticos en donde el aumento en el total de marca liberada fue de 26.1% y 16.2% con respecto al control, respectivamente.

CAMBIOS GRADUALES DE OSMOLARIDAD

La exposición a cambios graduales en la osmolaridad no incremento la liberación de Rb^{86} (Fig 16B). Por el contrario, la liberación de Rb^{86} en un medio isosmótico continuo, se superpone con la liberación en condiciones de RIV. Esta liberación decayó de manera exponencial ($r^2 = 009114$), durante los 60 minutos de perfusión.

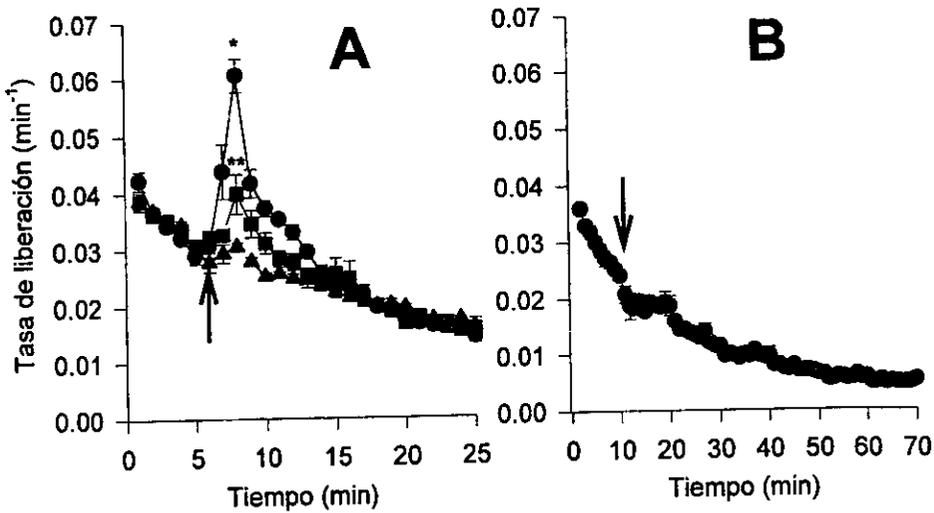


Figura 16. Liberación de Rb^{86} en respuesta a cambios en la osmolaridad del medio. Las rebanadas se incubaron con Rb^{86} durante 30 min. Se recolectaron 5 min de basal. Posteriormente, en el momento indicado por la flecha (A) el medio fue cambiado de manera súbita a medios 50% (●), 25% (■) y 10% (▲) hiposmóticos durante 20 min o (B) fue cambiado de forma gradual a una tasa de decremento de 2.5 mOsm/min a medio 50% hiposmótico (●) alcanzando después de 60 min de perfusión una osmolaridad de 150mOsm. Los datos se expresan como tasas de liberación (min⁻¹) y son promedios \pm ES (n=4). * $p < 0.001$, ** $p < 0.05$ comparadas con la liberación en medio isosmótico durante la misma fracción de recolecta.

CAMBIOS EN EL CONTENIDO INTRACELULAR DE K^+

CAMBIOS SÚBITOS DE OSMOLARIDAD

La figura 17A muestra los cambios en el contenido de K^+ de rebanadas expuestas a medios hiposmóticos, de manera súbita (50%, 25% y 10%) durante 15 minutos. En medios 10% y 25% hiposmóticos la concentración de K^+ endógeno disminuyó 5.4% y 8.3% respectivamente, sin embargo este decremento en la concentración no fue significativo. Por el contrario en medio 50% hiposmótico el contenido de K^+ disminuyó 40% de manera significativa.

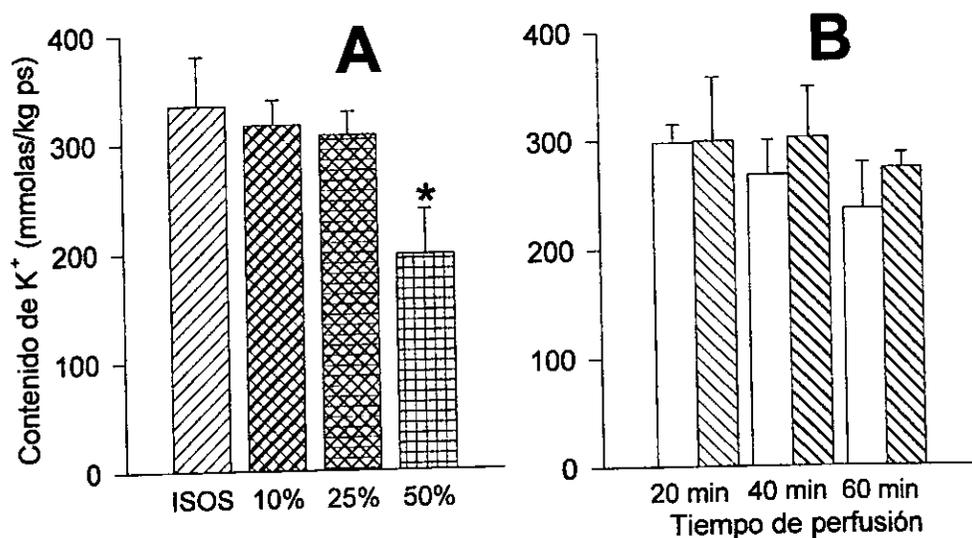


Figura 17. Cambios en el contenido endógeno de K^+ en respuesta a cambios en la osmolaridad del medio en rebanadas de hipocampo de rata. En (A) las rebanadas fueron perfundidas durante 20 min con medios de la osmolaridad indicada (isos - 300 mOsm; 50% - 150 mOsm; 25% - 225 mOsm; y 10% - 270 mOsm). En (B) los tejidos se perfundieron durante el tiempo indicado con el gradiente osmótico, a una tasa de decremento de 2.5 mOsm/min. Una vez transcurrido el tiempo de perfusión, los tejidos se recuperaron y se digirieron con HCl, determinándose posteriormente el contenido de K^+ endógeno mediante espectrometría de absorción atómica. Los datos se expresan como mmolas por Kg de peso seco (ps) y son promedios \pm ES (n=3-4). * $p < 0.05$ comparada con la condición control (isos).

CAMBIOS GRADUALES DE OSMOLARIDAD

La Fig 17B muestra los cambios en el contenido de K^+ endógeno en rebanadas de hipocampo perfundidas durante el tiempo indicado (20, 40 y 60 min) con el gradiente osmótico (cambios graduales de osmolaridad) en comparación con tejidos perfundidos el mismo tiempo en medio isosmótico (control). Ningun cambio significativo en el contenido de K^+ fue detectado en condiciones de RIV, en comparación con los controles.

DISCUSION

DECREMENTO REGULATORIO DEL VOLUMEN EN EL HIPOCAMPO

En este trabajo se demostró la existencia de mecanismos de regulación del volumen en la rebanada de hipocampo. Este aspecto es controversial ya que existen estudios previos en los que no se observa DRV en rebanadas de hipocampo al ser expuestas a medios hiposmóticos (Melzian et al., 1996; Andrew y MacVicar, 1997; Aitken et al., 1998; 1999; Andrew et al., 1999), sino que su comportamiento es de manera osmométrica y el aumento en el volumen es proporcional al decremento en la osmolaridad del medio extracelular. Sin embargo, existe otro reporte en el que al estudiar el cambio en el espacio intersticial o en la resistencia tisular, sí se observa un DRV parcial (Chebabo et al., 1995). Estas diferencias pueden tener su origen en la región del hipocampo estudiada ya que aparentemente es la región dendrítica y no la piramidal en la que ocurre una regulación dinámica del volumen en el hipocampo (Andrew et al., 1997). Asimismo en neuronas piramidales aisladas de esta región, se observa que existen al menos tres poblaciones con distintos comportamientos ante estímulos hiposmóticos. En algunas neuronas se observa un hinchamiento, mientras que otras son más resistentes y el cambio en volumen observado es menor. Por último, existen neuronas que no presentan hinchamiento en condiciones de hipotonicidad (Aitken et al., 1999). De manera similar existen estudios en los que se ha visto como la rebanada de hipocampo responde de manera distinta, tanto en la magnitud como en el curso temporal del cambio en volumen en cada región estudiada, siendo la región CA1 la más sensible al hinchamiento (Kreisman et al., 2000)

Los resultados obtenidos en el presente trabajo en cuanto a la magnitud del hinchamiento en relación con la osmolaridad del medio, se encuentran dentro del rango reportado en rebanadas de corteza de rata, en las cuales se observa que reducciones del 16% en la osmolaridad del medio originan incrementos en el volumen de 9-12% (Law, 1994a; 1996a). Sin embargo, Fishman y colaboradores (1977) determinaron en la misma preparación que una reducción en la osmolaridad del 71% apenas aumenta el

contenido de agua un 3%. Existe también controversia cuando el cambio en volumen se estudia como un cambio en las dimensiones del espacio extracelular. En el trabajo de Fishman y colaboradores, se observa como el espacio extracelular se reduce de manera significativa (14.1%) con disminuciones en la osmolaridad de aproximadamente 71%, mientras que al reducir la osmolaridad del medio extracelular un 35%, el espacio extracelular sólo se reduce 4.2% (Fishman et al., 1977). Por otra parte, en estudios electrofisiológicos (Chebabo et al., 1995), se observa una reducción importante en el espacio extracelular, de manera proporcional al cambio en la osmolaridad del medio (a partir de reducciones de un 13%), alcanzando decrementos en el espacio extracelular hasta de un 75% con un estímulo 30% hiposmótico. En el presente se encontraron cambios de hasta un 63% en el estímulo máximo estudiado (50% de reducción en la osmolaridad).

REGULACIÓN ISOVOLUMÉTRICA EN EL HIPOCAMPO

La capacidad que presentaron las rebanadas de hipocampo de mantener su volumen constante en condiciones de cambios graduales de osmolaridad (para este caso reducciones de 2.5 mOsm por minuto) que se demostró en el presente trabajo, indica la presencia de la llamada regulación isovolumica en esta preparación. Este mecanismo adaptativo sólo ha sido descrito previamente en células renales, sin que se hayan estudiado con detalle los mecanismos responsables de esta respuesta (Lohr y Grantam, 1986; Lohr, et al., 1986; Lohr, 1990; Van Driessche, 1997). Los resultados de nuestro trabajo contribuyen al conocimiento de este fenómeno. Hemos considerado alguna de las siguientes posibilidades en relación con la regulación isovolumétrica: 1) que las células no se hinchen; 2) que se origine la activación de mecanismos aún no esclarecidos de regulación que actúen de manera eficiente y constante; 3) o a la combinación de ambos. En este estudio se considera la tercera posibilidad más factible, debido tanto a la salida temprana de osmolitos (aminoácidos) como a la existencia de tipos celulares resistentes al hinchamiento (Aitken et al., 1999)

IMPORTANCIA DE LOS AMINOÁCIDOS COMO OSMOLITOS EN LA REGULACIÓN DEL VOLUMEN.

DECREMENTO REGULATORIO DEL VOLUMEN

Como ya se ha mencionado en la introducción, los aminoácidos funcionan como osmolitos en células nerviosas. Para el caso del hipocampo, es muy probable que estos compuestos estén participando también como osmolitos en el DRV. La liberación de $^3\text{H-D-aspartato}$ y $^3\text{H-GABA}$ en la rebanada en medios hiposmóticos (cambio súbito de osmolaridad) presentó dos componentes, el primero de activación rápida y transitoria, y el segundo con una activación más lenta y sostenida. Resultados previos en células nerviosas en cultivo y rebanadas de hipocampo y corteza sugieren que la exposición a un medio hiposmótico origina una despolarización de la membrana posiblemente debido a la salida inicial de Cl^- (Kimelberg et al., 1990; Ballyck et al., 1991). Por ello, la liberación inmediata de $^3\text{H-D-aspartato}$ y $^3\text{H-GABA}$ podría ser entonces el resultado de esta despolarización, en tanto que el segundo componente correspondería a la movilización osmosensible propiamente. Esta situación podría iniciar una cadena propagada de hiperexcitabilidad. Por una parte la liberación de aminoácidos excitadores como el ácido glutámico podría ser responsable del incremento en los potenciales excitadores postsinápticos (PEPS) observado en rebanadas de hipocampo expuestas a medios de baja osmolaridad (Huang et al., 1997). Por otra parte, la reducción en el espacio extracelular debido al hinchamiento de las células, podría generar fenómenos de transmisión electrotónica y actividad epileptogénica (Andrew et al., 1989; Roper et al., 1992). Se ha descrito por ejemplo que el hinchamiento de las dendritas favorece la propagación electrotónica originando fenómenos de depresión propagada (SD) (Chebabo et al., 1995b; Baraban et al., 1997). Igualmente en condiciones hiposmóticas se favorece la actividad epileptogénica debido a la disminución en el espacio extracelular, lo que genera la sincronización de los disparos. También se ha visto que un incremento en el volumen celular puede favorecer interacciones efápticas (cuando una disminución en el espacio extracelular origina una interacción membranal entre las neuronas lo que genera fenómenos de propagación eléctrica) durante la transmisión sináptica. (Andrew et al., 1990; Rosen y

Andrew., 1990; Dudek et al., 1990; Ballyk et al., 1991). Todos estos cambios, a su vez, pueden inducir nuevas o mayores despolarizaciones que incrementarían la movilización del ácido glutámico.

A diferencia de lo observado para el aspartico y el GABA, en la liberación de taurina se observó un solo componente cuyas características sugieren que se trata de una liberación osmosensible. En los resultados de este trabajo se pudo observar como la taurina se libera en mayor proporción que el D-aspartico y el GABA.

En apoyo a esta interpretación acerca del significado de los distintos componentes de liberación de los aminoácidos, se encuentra el efecto descrito en este trabajo del ácido niflúmico, un bloqueador de canales de Cl^- , cuyos efectos fueron claramente distintos para la taurina por un lado y para el GABA y el aspártico por el otro. Para el caso de los aminoácidos neurotransmisores se observó que en respuesta a cambios súbitos de osmolaridad, el ácido niflúmico aumenta la liberación asociada a despolarización de D-aspartico y GABA. En relación con el segundo componente (asociado a hinchamiento) sólo para el caso del GABA se observó una disminución. Estevez y colaboradores (1999) observaron que en presencia del ácido niflúmico, la liberación de D-aspartato en corteza de rata in vivo estimulada por medios hiposmóticos, se ve potenciada de manera significativa. Sin embargo la liberación de GABA inducida en condiciones anisomóticas no se ve afectada en presencia del inhibidor (Estevez et al., 1999a). Estos datos indican que la liberación del D-aspártico y del GABA es, en su mayoría, producto de la despolarización generada por reducciones en la osmolaridad del medio.

A diferencia de sus efectos sobre el GABA y el D-aspártico, el ácido niflúmico redujo muy notablemente la salida de taurina, lo que sustenta la propuesta de que esta movilización es una respuesta exclusivamente al cambio en volumen. A semejanza de lo que se observa en el hipocampo, en neuronas en cultivo, la liberación de 3H -D-aspártico y 3H -GABA en medios 50% hiposmóticas presenta un pico máximo a los 2 min y una inactivación inmediata (Pasantes-Morales et al., 1993a). En cambio en astrocitos corticales la liberación de D-aspártico es más lenta alcanzando su máximo

de 4-7 min después del estímulo (Vitarella et al., 1994; Aschner et al., 1994). Esto podría deberse, siguiendo la línea de interpretación discutida, a que en las neuronas, los aminoácidos neurotransmisores son más sensibles a la despolarización producida por el medio hiposmótico, que al cambio en la osmolaridad propiamente.

Para el caso del contenido endógeno de aminoácidos, la taurina fue el aminoácido más sensible a cambios en la osmolaridad del medio seguido de la taurina. En células nerviosas en cultivo (astrocitos y neuronas) el aminoácido más sensible a reducciones subitas en la osmolaridad del medio (30% y 50%) fue la taurina, seguida de glutámico, D-aspartico, beta-alanina (astrocitos) y GABA (neuronas) (Pasantes-Morales et al., 1993a). Sin embargo la cantidad total de aminoácidos movilizada (50-65% en 50% hiposmótico y 13-31% en 30% hiposmótico), concuerda con los porcentajes totales obtenidos en nuestros resultados. En un modelo in vivo de perfusión continua en corteza de rata, una reducción en la osmolaridad del medio de 50 mOsm (15%), provoca una movilización mayor de taurina con respecto a los demás aminoácidos seguida del glutámico, aspártico, glicina, phosphoetanolamina y por último, el GABA (Solís et al., 1988; Estevez et al., 1999a). Estos resultados en conjunto subrayan la importancia de la taurina como osmolito durante el DRV.

REGULACIÓN ISOVOLUMICA

Los resultados del presente trabajo en cuanto a la liberación de taurina, D-aspartico y GABA en respuesta a cambios graduales en la osmolaridad, muestran cinéticas de liberación diferentes para los tres aminoácidos. En condiciones de IVR, la taurina es el aminoácido más sensible, mostrando un umbral más bajo y una velocidad de salida más alta. El aspártico muestra también un bajo umbral, pero la velocidad de liberación es menor que la de la taurina, mientras que el GABA fue el menos sensible. Las diferencias en las tasas de liberación en los tres aminoácidos podrían deberse a varios factores: 1) diferencias en la difusión a través de las capas en la rebanada; 2) diferencias en el coeficiente de permeabilidad a través de la vía de movilización implicada; 3) la disponibilidad relativa de las pozas endógenas de aminoácidos para ser liberados durante la hipotonicidad. El primer punto no es muy factible debido a que la

liberación de los tres aminoácidos en condiciones de cambios graduales de la osmolaridad extracelular, se compara punto a punto con la liberación en condiciones isosmóticas continuas. Por otra parte, en células nerviosas en cultivo (monocapa) donde el componente difusional se elimina, la liberación de taurina sigue siendo mayor a la de los otros dos aminoácidos (datos no publicados). En relación con una mayor permeabilidad a la vía que se activa por hiposmolaridad, los datos de Roy en 1995, indican que en células gliales en cultivo, el coeficiente de permeabilidad de la taurina en relación con la del Cl^- es de 0.36, mientras que la del aspártico (0.077) y el glutámico (0.074) es menor. Aunque esto podría explicar la mayor liberación de taurina con respecto al aspártico, no explica el por qué el GABA con un coeficiente de permeabilidad todavía mayor (0.78) que el de la taurina, se libera menos. En cuanto al tercer punto, es posible que las pozas de taurina tengan una disponibilidad mayor para la liberación en respuesta a hipotonicidad, que las de GABA y aspártico. Como ya se mencionó en la introducción, la taurina es un aminoácido metabólicamente inerte, por lo que puede moverse dentro y fuera de la célula modificando el contenido de agua sin afectar el metabolismo celular, además de estar más concentrado en el espacio intracelular. En cambio, en el caso de los aminoácidos neuroactivos como el GABA y en especial el glutámico, su acumulación en el espacio extracelular en el tejido nervioso puede llevar a profundas alteraciones en la excitabilidad neuronal. Además de su mayor movilidad observada en experimentos usando el trazador radioactivo, la taurina es el aminoácido que durante la RIV presenta un mayor decremento en la concentración endógena en las rebanadas. En conjunto, estos datos apuntan a que, como en el caso del DRV, también en el IVR este aminoácido juega un papel importante como osmolito.

VÍAS DE MOVILIZACIÓN DE AMINOÁCIDOS EN RESPUESTA A CONDICIONES HIPOSMÓTICAS

Las vías de movilización de los aminoácidos que se activan en respuesta a cambios súbitos de osmolaridad se conocen con cierta precisión sobre todo por estudios en células en cultivo. Se postula que 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, sin la participación del transportador (Sánchez-Olea et al., 1991). En astrocitos y neuronas en cultivo, se observa que la liberación de taurina disminuye notablemente en presencia de los inhibidores de canales de Cl^- , lo que ha llevado a sugerir una posible vía común, que podría ser un canal aniónico poco selectivo. Aunque con distinta potencia, estos inhibidores son todos efectivos para reducir la liberación osmosensible de taurina (Pasantes-Morales et al., 1996; Sanchez-Olea et al., 1996; Pasantes-Morales et al. 1999). De la misma forma, en el presente trabajo se observó que el ácido nítrico es un inhibidor muy potente de la movilización de taurina, tanto durante el DRV como en el RIV. De hecho este agente es mucho más efectivo en esta preparación que en las células en cultivo. Estos resultados sugieren una similitud en el perfil farmacológico de las vías de movilización de la taurina tanto en DRV como en RIV.

CONTRIBUCIÓN DEL K^+ COMO OSMOLITO EN LA REGULACIÓN DEL VOLUMEN EN LOS MODELOS ESTUDIADOS.

Los resultados del presente estudio en la rebanada de hipocampo indican la participación del K^+ en el DRV, lo que concuerda con trabajos previos en células nerviosas en cultivo. En astrocitos se ha visto que la liberación de Rb^{86} aumenta 30 y 11% en medios 50% y 30% hiposmóticos, respectivamente. Sin embargo, reducciones menores en la osmolaridad del medio no originan una liberación significativa por encima del control (Pasantes-Morales et al., 1993; Quesada et al., 1998; 1999). También se ha observado que en astrocitos corticales expuestos a medios hiposmóticos 27%, 37% y 48%, la conductancia del K^+ aumenta 18%, 561% y 1216%. Es interesante mencionar que la osmosensibilidad del K^+ al cambio hiposmótico en estas células es mayor que la del Cl^- (Olson y Li, 1997). En neuronas en cultivo, se observa que la liberación de Rb^{86} aumenta de manera proporcional al decremento en la osmolaridad del medio alcanzando su máximo a los dos minutos posteriores al estímulo (Pasantes-Morales et al., 1993b; Morales-Mulia et al., 1998). Existe evidencia que señala que tanto en neuronas como en astrocitos, la movilización de K^+ se da a través de vías difusionales (canales), descartando la participación de cotransportadores. En astrocitos y neuronas en cultivo la movilización del K^+ es el paso limitante para el RVD,

ya que al abrir una vía alterna de movilización para el K^+ , como es la presencia de ionóforos, la regulación del volumen se acelera (Pasantés-Morales et al., 1994a; 1994c).

En rebanadas de corteza de rata se ha observado que una reducción en la osmolaridad del medio de 71% disminuye la concentración de K^+ apenas de 9-17% (Fishman et al., 1977). En el presente trabajo, la reducción del contenido endógeno de K^+ en un medio 50% hiposmótico fue de 40%. Estudios realizados en rebanadas de hipocampo muestran controversia en cuanto a la modificación de las corrientes de K^+ en hipotonicidad, ya que existen trabajos en los que se observa una disminución en las corrientes de K^+ en neuronas piramidales de CA1, de manera proporcional a la hipotonicidad del medio (Somjen, 1999). Por otra parte, en condiciones hipotónicas, se observa una potenciación significativa de la corriente de K^+ en las interneuronas del hipocampo (las hilares y las de los estratos oriens/alveus y lacunosum/molecular), mientras que las fibras musgosas y las neuronas piramidales del subiculum no se afectan en presencia de medios hiposmóticos (Baraban et al., 1997; Baraban y Schwartzkroin, 1998).

Los datos obtenidos en condiciones de RIV contrastan con lo observado en condiciones de DRV en donde la liberación de K^+ parece jugar un papel importante como osmolito inorgánico en la regulación del volumen. Estudios realizados en células renales (Lohr, 1990; Van Driessche et al., 1997) implican al K^+ como un osmolito activo durante el proceso de RVI, posiblemente mediante su movilización a través de canales y transportadores, siendo un paso limitante para mantener un volumen constante. En estos estudios, se observa una liberación de Rb^{86} en condiciones de RIV con un umbral de activación de 210 mOsm (30% de hiposmolaridad); cuando la osmolaridad del medio alcanza 140 mOsm (50% de hiposmolaridad), las células renales han perdido presumiblemente el 29% del contenido intracelular de K^+ . En neuronas granulares de cerebelo, se observa que en condiciones de RIV el K^+ se empieza a movilizar cuando el gradiente osmótico generado alcanza aproximadamente una reducción del 29% en la osmolaridad del medio. Estos resultados contrastan con los observados en el presente trabajo en donde no se pudo observar un incremento en la liberación de Rb^{86} ni una

disminución en los niveles endógenos de K^+ . Una posible explicación para estas diferencias sería que en la rebanada de hipocampo a diferencia de las células nerviosas en cultivo, se mantiene la citoarquitectura del tejido relativamente intacta, por lo que los mecanismos de amortiguamiento del K^+ que existen en el tejido nervioso íntegro, pueden enmascarar la liberación sensible a cambios graduales en la osmolaridad del medio durante RIV, mediante la redistribución del K^+ liberado. Los mecanismos involucrados en el amortiguamiento del K^+ extracelular son: 1) difusión a través del espacio extracelular; 2) amortiguamiento espacial del K^+ a través de las células gliales; 3) captura neta del K^+ por las células gliales a través de canales de K^+ asociado con una captura de Cl^- por un sistema independiente (Ameder et al., 1997; Laming, 2000; Wolfgang, 2000). Es también posible que la movilización del K^+ en el cerebro se lleve a cabo sólo en situaciones que comprometan seriamente la viabilidad celular.

IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS DEL RIV

Los mecanismos de regulación isovolúmica estudiados en el presente trabajo, podrían representar aquellos que se activan in vivo durante condiciones de hiponatremia crónica. En un estudio de hiponatremia crónica experimental en la rata, el contenido de agua en el cerebro se mantiene constante durante periodos de hiponatremia prolongada (días) (Verbalis y Gullans, 1991; Gullans y Verbalis, 1993). Igualmente en ratas hiponatrémicas, el contenido de agua en rebanadas corticales aparece sin cambio, presumiblemente debido a que la entrada de agua originada por el gradiente osmótico ocurre de manera gradual y es contrarrestada con la pérdida lenta de solutos intracelulares (Law, 1999a; 1999b). Estos resultados difieren de lo observado en casos de hiponatremia aguda, en donde si se presenta un incremento en el contenido de agua en el cerebro. (Trachtman, 1992). Es importante recalcar la importancia del control del volumen en los niveles fisiológicos normales ya que existen trabajos en los que se reportan severas alteraciones neurológicas cuando el volumen se incrementa 10% como son el origen de cuadros epilépticos (Trachtman, 1992; Schwartzkroin, et al 1998).

Durante un estado crónico de hiponatremia existe una reducción sostenida en el contenido cerebral de electrolitos de 10% a 30%, mientras que el contenido de agua sólo aumenta 0.6% (Verbalis y Drutarosky, 1988). Por otra parte, el contenido de osmolitos orgánicos como taurina, inositol, myo-inositol, creatinina y glutamina disminuye 60% a 84% después de dos días de hiponatremia (Verbalis y Gullans, 1990, 1991; Sterns 1993). La participación de los osmolitos orgánicos y en particular de los aminoácidos en el control del contenido de agua cerebral puede ser muy importante. El análisis del cambio en el contenido de osmolitos orgánicos e inorgánicos en los estudios de Verbalis y Gullans(1991) y de Thurston y colaboradores (1980), muestran que la contribución de las moléculas orgánicas (aminoácidos y otros osmolitos) es cuantitativamente mayor que la del K^+ y se mantiene durante un tiempo más prolongado (Verbalis y Gullans, 1991). Proporcionalmente, la taurina es un aminoácido que tiene una mayor contribución ya que sus concentraciones celulares son las más altas y su decremento frente a la hiponatremia es muy importante (67%) (Thurston et al., 1980).

No sólo en éste, sino en otros trabajos acerca de hiponatremia se observa que los aminoácidos que disminuyen en mayor grado su concentración en el cerebro son la taurina (60-85%) y el glutamato (38.5-69%), seguidos del GABA (56%), la glicina (55%) y la alanina (52%) (Thurston y Hauhart, 1987b; Bedford et al., 1993; Verbalis, 1991, 1993; Sterns, 1993). En estos trabajos se reporta que el contenido total de aminoácidos disminuye hasta un 61%.

Estos resultados concuerdan con lo obtenido en nuestro modelo experimental, los cuales sugieren que en condiciones de RIV, el potasio no parece tener un papel importante en el mantenimiento del volumen. Esto puede tener relación con el papel crítico que tiene el K^+ en el mantenimiento de la excitabilidad neuronal normal. Aumentos en los niveles de K^+ extracelular de 5mM por arriba de las concentraciones fisiológicas normales, incrementan la frecuencia en las descargas epilépticas sincronizadas así como la excitabilidad neuronal en el hipocampo (Tancredi y Avoli, 1987; Stringer y Lothman, 1988; Leschinger et al., 1993). Asimismo, cambios pequeños en la concentración de K^+ extracelular alteran la transmisión sináptica en la región CA1

del hipocampo (Lux et al., 1986; Rausche et al., 1990). En estas condiciones, la contribución de los aminoácidos como osmolitos orgánicos puede representar una ventaja clara para contrarrestar el cambio en volumen sin afectar notablemente las condiciones normales de excitabilidad. En este sentido, de nuevo la taurina puede tener una implicación preferente debido en parte a su inercia metabólica y también a sus acciones inhibitoras a nivel sináptico. Se ha descrito que la taurina a concentraciones altas puede tener un efecto inhibitor mediado probablemente a través de la interacción con los receptores postsinápticos del GABA y la glicina (Lopez-Colome y Pasantes-Morales, 1981; Lopez-Colome, 1981; Kontro y Oja, 1983; 1985; 1987). Tal acción podría contrarrestar los efectos del K^+ y de los aminoácidos neurotransmisores como el glutámico, involucrados en la excitabilidad neuronal.

Es claro que el modelo experimental de RIV se asemeja más a las condiciones fisiológicas y aún a las patológicas en las que los cambios en la osmolaridad son pequeños y graduales. Es importante mencionar que en nuestros resultados, la magnitud en la reducción del contenido de aminoácidos no alcanza a contrarrestar los cambios en la osmolaridad del medio, por lo que se requiere necesariamente la implicación, ya sea de otros osmolitos y/o de hipótesis alternativas. En relación con la participación de otros osmolitos orgánicos, se sabe que compuestos como la creatinina, los polialcoholes, el ácido N-acetil aspártico, pueden también participar en el control del volumen en el cerebro (Thurnston et al., 1987; Lien et al., 1991). Otra posible alternativa es la que sugiere que los movimientos de los aminoácidos pueden estar circunscritos a regiones específicas o aún mas, a tipos celulares específicos. En estudios de inmunohistoquímica se ha demostrado que en el cerebelo en condiciones isosmóticas, la taurina se encuentra localizada preferentemente en las neuronas y ausente en los astrocitos. En respuesta a un estímulo hiponatémico hay un cambio dramático en la distribución del aminoácido, que aparece ahora acumulado en los astrocitos y ausente en las neuronas (Nagelhus et al 1993). Es importante enfatizar que, posiblemente a causa de estos movimientos de la taurina, es que no se observa edema celular en las neuronas. Lo mismo sucede con el ácido glutámico durante la isquemia, es decir que hay una transferencia del aminoácido de las neuronas hacia los astrocitos, siendo estos últimos y no las neuronas los que presentan el hinchamiento

característico del edema celular originado en ésta patología (Aas et al., 1993). En estas condiciones, no necesariamente debería observarse una salida de los osmolitos al espacio extracelular, y menos aún al flujo durante la perfusión, sin que esto signifique que los aminoácidos no estén jugando un papel muy importante en la regulación del volumen, en particular en las neuronas. Los astrocitos aquí estarían desempeñando una función protectora importante hacia las neuronas. Por otra parte existen estudios en donde se ha visto que la taurina, a parte de funcionar como osmolito en condiciones hiposmóticas, puede modular la secreción de vasopresina (hormona antidiurética), lo cual ayudaría a regular el balance de líquidos en el organismo en condiciones de hiponatremia (Deleuze et al., 1998; Hussy et al., 1997). Finalmente otros mecanismos de regulación de la osmolaridad intracelular podrían contribuir a explicar la constancia del volumen durante el RIV. Un cambio metabólico, tal como la síntesis de macromoléculas (como el glicógeno) pueden contribuir a reducir la poza intracelular de osmolitos necesaria para alcanzar el equilibrio osmótico (Häussinger et al., 1996).

CONCLUSIONES

- Al exponer la rebanada de hipocampo a condiciones hiposmóticas de manera súbita, se origina un hinchamiento proporcional al decremento en la osmolaridad del medio. Este cambio en volumen es regulado mediante un proceso denominado Decremento Regulador del Volumen (DRV), el cual le permite al tejido alcanzar de manera parcial su volumen normal
- Este proceso involucra la translocación de osmolitos orgánicos (aminoácidos) e inorgánicos (K^+) a través de la membrana para contrarrestar el flujo de agua.
- Los aminoácidos participan de manera activa en el DRV en la rebanada de hipocampo. De manera particular para el caso del GABA y el D-aspartico existe un componente importante de liberación que puede ser originado a partir de la despolarización y cambios en la excitabilidad que ocurren en condiciones hipotónicas.
- Para el caso de la taurina, ésta se transloca a través de una vía difusional sensible a inhibidores de canales de Cl^- , y es el aminoácido más sensible a los cambios en la osmolaridad del medio.
- La rebanada de hipocampo es capaz de mantener su volumen constante en condiciones de cambios graduales de osmolaridad, particularmente a una tasa inferior a 2.5 mOsm de disminución por minuto.
- Este fenómeno denominado Regulación Isovolumétrica (RIV), esta mediado a través de la activación de vías de movilización de osmolitos, las cuales se activan de manera inmediata para contrarrestar el movimiento neto de agua generado a partir del gradiente osmótico impuesto.

- En el presente trabajo se observó la activación temprana de vías de movilización de aminoácidos osmóticamente activos. De manera particular la taurina es principal aminoácido movilizado en condiciones de RIV en el hipocampo.
- Para el caso de la taurina, la vía de traslocación a través de la membrana involucra la participación de canales aniónicos (Cl⁻) sensibles a ácido niflúmico durante la RIV.
- En contraste con lo observado en DRV, en condiciones de RIV, el K⁺ no juega un papel importante como osmolito inorgánico.
- Las condiciones de cambios graduales de osmolaridad utilizados en el presente trabajo podrían representar un paradigma experimental mas cercano a condiciones patológicas de desarrollo crónico tales como la hiponatremia, en donde los cambios en la osmolaridad del medio se originan de manera gradual.

REFERENCIAS

1. Aas J. E., Berg-Johnsen J., Hegstad E., Laake J. H., Langmoen I. A., Ottersen O. P. 1993. Redistribution of glutamate and glutamine in slices of human neocortex exposed to combined hypoxia and glucose deprivation in vitro. *J. Cereb. Blood. Metab.* 13:503-515.
2. Aitken P. G., Borgdorff A. J., Juta A. J. A., Kiehart D. P., Somjen G. G., Wadman W. J. 1998. Volume changes induced by osmotic stress in freshly isolated rat hippocampal neurons. *Pflügers. Arch.* 436: 991-998.
3. Aitken P. G., Fayuk D., Somjen G. G., Turner D. A. 1999. Use of intrinsic Optical signals to monitor physiological changes in brain tissue slices. *Methods.* 16: 91-103.
4. Amaral, D. G. 1978. A golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 182: 851-914.
5. Amaral, D. G., Witter, M. P. 1989. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience.* 31. 571-591.
6. Ameder T., Robert A., Coles J. A. 1997. Potassium homeostasis and glial energy metabolism. *Glia.* 21: 41-55.
7. Andrew R. D., Fagan M., Ballyk A., Rosen A. S. 1989. Seizure susceptibility and the osmotic state. *Brain Res.* 498: 175-180.
8. Andrew R. D., MacVicar B. A., 1994. Imaging cell volume changes and neuronal excitation in the hippocampal slice. *Neuroscience* 62: 371-382.
9. Andrew, R. D., Lobinowich, M. E., Osehobo, E. P. 1997. Evidence against volume regulation by cortical brain cells during acute osmotic stress. *Exp. Neurol.* 143: 300-312.
10. Andrew R. D., Jarvis C. R., Obeidat A. S., 1999. Potential sources of intrinsic optical signals imaged in live brain slices. *Methods.* 18 : 185-196.
11. Aschner M., Mullaney K. J., Fehm M. N., Vitarella D., Wagoner D. E., Kimmelberg H. K. 1994. The role of sulfhydryl groups in D-aspartate and rubidium release from neonatal rat primary astrocyte cultures. *Brain Res.* 648: 16-23.
12. Babila T., Atlan H., Framer I., Schwalb H., Uretzky G., Lichstein D. 1990. Volume regulation of nerve terminals. *J. Neurochem.* 55: 2058-62.
13. Ballanyi K., Grafe P., 1988. Cell Volume Regulation in the Nervous System. *Ren. Physiol. Biochem.* 3-5: 142-157.
14. Ballyk A. B., Quackenbush J. S., Andrew D. R. 1991. Osmotic effects on the CA1 neuronal population in hippocampal slices with special reference to glucose. *J. Neurophysiol.* 65: 1055-1066.
15. Ballantyne J. S., Mary E. C. 1994, en *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation*, Strange K., Eds., CRC Press, Boca Ranton, 111-122
16. Banay-Schwartz M., Lajtha A., Palkovits. 1989a. Changes with aging in the levels of amino acids in rat CNS structural elements I. Glutamate and related amino acids. *Neurochem. Res.* 14: 558-563.
17. Banay-Schwartz M., Lajtha A., Palkovits. 1989b. Changes with aging in the levels of amino acids in rat CNS structural elements II. Taurine and small neutral amino acids. *Neurochem. Res.* 14: 563-570.
18. Baraban S. C., Bellingham M. C., Berger A. J., Schwartzkroin P. A. 1997. Osmolarity modulates K⁺ channel function on rat hippocampal interneurons but not CA1 pyramidal neurons. *J. Physiol.* 498: 679-689.
19. Baraban S. C., Schwartzkroin P. A. 1998. Effects of hyposmolar solutions on membrane currents of hippocampal interneurons and mossy cells in vitro. *J. Neurophysiol.* 79: 1108-1112.
20. Bedford, J. J., Leader J. P. 1993. Response of tissues of the rat to anisomolality in vivo. *American Journal of Physiology.* 264: R1164-R1169.
21. Bruhn T., Christensen T., Cobo M., Damgaard I., Diemer N. H., Schousboe A. 1996. Effects of phenylsuccinate on potassium-stimulated taurine release in cultured neurons and astrocytes and in rat hippocampus in vivo. *J. Neurosci. Res.* 46: 198-203.
22. Chamberlain M. E., Strange K. 1989. Anisomotic cell volume regulation: a comparative view. *Am. J. Physiol.* 257: C159-C173.
23. Chan P. H., Fishman R. A., Lee J. L., Candelise L. 1979. Effects of excitatory neurotransmitter amino acids on swelling of rat brain cortical slices. *J. Neurochem.* 33:1309-1315.
24. Chebabo S. R., Hester M. A., Jing J., Aitken P. G., Somjen G. G., 1995a. Interstitial space, electrical resistance and ion concentrations during hypotonia of rat hippocampal slices. *J. Physiol. (Lond).* 487: 685-697.

25. Chebabo S. R., Hester M. A., Jing J., Aitken P. G., Somjen G. G., 1995b. Hypotonic exposure enhances synaptic transmission and triggers spreading depression in rat hippocampal tissue slices. *Brain Res.* 695: 203-216.
26. Davies S. E., Gotoh M., Richards D. A., Obrenovitch T. P. 1998. Hypoosmolarity induces an increase of extracellular N-acetylaspartate concentration in the rat striatum. *Neurochem. Res.* 23: 1021-5.
27. Deleuze C., Duvoid A., Hussy N. 1998. Properties and glial origin of osmotic-dependent release of taurine from the rat supraoptic nucleus. *J. Physiol.* 507: 463-471.
28. Dudek F. E., Obenaus A., Tasker J. G. 1990. Osmolarity-induced changes in extracellular volume after epileptiform bursts independent of chemical synapses in the rat: importance of non-synaptic mechanisms in hippocampal epileptogenesis. *Neurosci. Lett.* 120: 267-270.
29. Dong Y., Chen G., Duran G. E., Kouyama K., Chao A. C., Sikic B. I., Gollapudi S. V., Gupta S., Gardner P. 1994. Volume-activated chloride current is not related to P-glycoprotein overexpression. *Cancer Res.* 54: 5029-32.
30. Estevez A. Y., O'Regan M. H., Song D., Phillis J. W., 1999a. Effects of anion channel blockers on hyposmotically induced amino acid release from the in vivo rat cerebral cortex. *Neurochem. Res.* 24: 447-452.
31. Estevez A. Y., O'Regan M. H., Song D., Phillis J. W., 1999b. Hyposmotically induced amino acid release from the rat cerebral cortex: role of phospholipases and protein kinases. *Brain Res.* 844: 1-9.
32. Fishman R. A., Reiner M., Chan P. H. 1977. Metabolic changes associated with iso-osmotic regulation in brain cortex slices. *J. Neurochem.* 28:1061-7.
33. Garcia-Romeu F., Cossins A. R., Motais R. 1991. Cell volume regulation by trout erythrocytes: characteristics of the transport systems activated by hypotonic swelling. *J. Physiol. (Lond)* 440:547-567.
34. Godart H., Ellory J. C., Motais R., 1999. Regulatory volume response of erythrocytes exposed to a gradual and slow decrease in medium osmolality. *Pflügers Arch.* 437: 776-779.
35. Goldstein L., Luer C.A., Blum P.C. 1990. Taurine accumulation by the heart of embryonic skates, *Raja eglanteria*. *J. Exp. Biol.* 150: 449-452.
36. Goldstein L., Brill S. R. 1991. Volume-activated taurine efflux from skate erythrocytes: possible band 3 involvement. *Am. J. Physiol.* 260: R1014-R1020.
37. Grunder S., Thimann A., Pusch M., Jentsch T. J. 1992. Regions involved in the opening of ClC-2 chloride channel by voltage and cell volume. *Nature* 360. 759-762.
38. Gschwenter M., Susanna A., Woll E., Ritter M., Nagl U. O., Schmarda A., Laich A., Pinggera G. M., Ellemunter H., Huemer H., et al. 1995. Antiviral drugs from the nucleoside analog family block volume-activated chloride channels. *Mol. Med.* 1:407-417.
39. Gullans S. R., Verbalis J. G. 1993. Control of brain volume during hyperosmolar and hyposmolar conditions. *Ann. Rev. Med.* 44: 289-301.
40. Harrigan N. R., 1996. Cerebral salt wasting syndrome: a review. *Neurosurgery* 38: 152-160.
41. Haugstad T. S., Vaio E. T., Lagmoen I. A. 1995. Changes in brain amino acid content induced by hyposmolar stress and energy deprivation. *Neurosci. Res.* 17: 402-408.
42. Haugstad T. S., Langmoen I. A. 1996. Release of brain amino acids during hyposmolar stress and energy deprivation. *J. Neurosurg. Anesthesiol.* 8: 159-168.
43. Haugstad, T. Karlsen H. E., Krajtci P., Due-Tonnessen B., Laisen M., Sandberg C., Sand O., Brandtaeg P., Langmoen I. A. 1997. Efflux of gamma-aminobutyric acid caused by changes in ion concentrations and cell swelling simulating the effect of cerebral ischaemia. *Acta Neurochir. Wien.* 139: 453-63.
44. Hallows K. R., Knauf P. A. 1994. , en *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation*, Strange K., Eds., CRC Press, Boca Ranton, 3-30 pp.
45. Häussinger D. 1996. The role of cellular hydration for the regulation of cell function. *Biochem. J.* 313: 697-710.
46. Hoffmann E. K., Simonsen L. O., Lambert I. H., 1984. Volume-induced increase of K⁺ and Cl⁻ permeabilities in Ehrlich ascites tumor cells. Role of internal Ca²⁺. *Membr. Biol.* 78:211-222.
47. Hoffmann E. K., Lambert I. H., Simonsen L. O. 1986. Separate, Ca²⁺-activated K⁺ and Cl⁻ transport pathways in Ehrlich ascites tumor cells. *J. Membr. Biol.* 91:227-244.
48. Huang R., Bossut D. R., Somjen G. G. 1997. Enhancement of whole cell synaptic currents by low osmolality and by low [NaCl] in rat hippocampal slices. *J. Neurophysiol.* 77: 2349-2359.
49. Hussy N., Deleuze C., Pantolini A., Desarmenien M. G., Moos F. 1997. Agonist action of taurine on glycine receptors in rat supraoptic magnocellular neurones: possible role in osmoregulation. *J. Physiol.* 502: 609-621.

50. Isaacks R. E., Bender A. S., Kim C. Y., Prieto N. M., Norenberg M. D. 1994. Osmotic regulation of myo-inositol uptake in primary astrocyte cultures. *Neurochem. Res.* 19: 331-8.
51. Jakobsson, E., 1980. Interactions of cell volume, membrane potential, and membrane transport parameters. *Am. J. Physiol.* 238: C196-C203.
52. Kandel E. R., Schwartz J. H., Jessell T. M. 2000. *Principles of Neural Science*. Cuarta Edición. Elsevier. New York. 1135 páginas.
53. Kenneth R. H. P. 1994. *Principles of Cell Volume Regulation*, en *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation*, Strange K., Eds., CRC Press, Boca Ranton, 3 – 29.
54. Kimelberg H. K., Ranson B. R. 1986. Physiological aspects of astrocytic swelling. En: Fedoroff S., Vemadakis A., editores. *Astrocytes*, Vol 3. San Diego: Academic Press. p 129-166.
55. Kimelberg H. K., Anderson E., Kettenmann H. 1990. Swelling-induced changes in electrophysiological properties of cultures astrocytes and oligodendrocytes. II. Whole cell currents. *Brain Res.* 529: 262-268.
56. Kimelberg H. K., Goderie S. K., Higman S., Pang S., Waniewski R. A. 1990. Swelling induced release of glutamate, aspartate and taurine from astrocyte cultures. *J. Neurosci.* 10: 1583-1591.
57. Kirk K., 1997. Topical review: Swelling-activated Organic Osmolyte Channels. *J. Mem. Biol.* 158: 1 – 16.
58. Knauf P. A., Anion transport in erythrocytes, en *Physiukigy of Membrane Disorders*, 2nd ed., Androceoli, T. E., Hoffman, J. F., Fanestil, D. D., Schultz, S. G., Eds., Plenum Press, New York, 1986, 191.
59. Knoublauch C., Montrose M. H., Murer H. 1989. Regulatory volume decrease in cultured renal cells, *Am. J. Physiol.*, 256: C252-C257.
60. Kontro P, Oja SS. 1983. Binding of taurine to brain synaptic membranes. *Adv Biochem Psychopharmacol.* 37:23-34.
61. Kontro P., Oja S. S. 1985. Properties of sodium-independent taurine binding to brain synapticmembranes. *Prog. Clin. Biol. Res.* 179:249-59.
62. Kontro P., Oja S. S. 1987. Co-operativity in sodium-independent taurine binding to brain membranesin the mouse. *Neuroscience.* 23:567-70.
63. Kreisman N. R., Soliman S., Gozal D. 2000. Regional differences in hypoxic depolarization and swelling in hippocampal slices. *J. Neurophysiol.* 83: 1031-1038.
64. Laming P. R. 2000. Potassium signalling in the brain: its role in behaviour. *Neurochem. Int.* 36: 271-290.
65. Lang F. 1987. Osmotic diuresis. *Ren. Physiol.* 10:160-73.
66. Lang F., Busch G. L., Ritter M., Völki H., Waldegger S., Gulbins E., Häussingeret D. 1998. Functional Significance of Cell Volume Regulatory Mechanisms. *Physiol. Rev.* 78: 247-305.
67. Law R. O., 1987. The volume and ionic composition of cells in incubated slices of rat renal cortex, medulla and papilla. *Biochym. Biophys. Acta* 931: 276-285.
68. Law R. O., 1992. Efflux of potassium (⁸⁶Rb⁺) attenuates the volume-restorative effect of sodium-amino acid cotransport in rat renal inner medulary cells shrunken by exposure to hyperosmotic media. *Biochym. Biophys. Acta.* 1107: 186-192.
69. Law R. O., 1994a. Taurine efflux and the regulation of cell volume in incubated slices of rat cerebral cortex. *Biochym. Biophys. Acta* 1221: 21-2.
70. Law R. O., 1994b. Regulation of mammalian brain cell volume. *J. Exp.Zoology* 268: 90-96.
71. Law R. O., 1994b Effects of extracellular bicarbonate ions and pH on volume-regulatory taurine efflux from rat cerebral cortical slices in vitro: evidence for separate neutral and anionic transport mechanisms. *Biochym. Biophys. Acta* 1224: 377-383.
72. Law R. O., 1996a. Volume regulation and the efflux of amino acids from cells in incubated slices of rate cerebral cortex. I. Characteristics of transport mechanisms. *Biochym. Biophys. Acta* 1314: 34-42
73. Law R. O., 1996b. Volume regulation and the efflux of amino acids from cells in incubated slices of rate cerebral cortex. II. Dependence on Ca²⁺ ions. *Biochym. Biophys. Acta* 1314: 43-48.
74. Law R. O. 1999a. Amino acid efflux and cell volume regulation in cerebrocortical minislices prepared from chronically hyponatraemic and hypernatraemic rats. *Neurochem. Int.* 35: 423-430.
75. Law R. O. 1999b. The role of taurine in the regulation of brain cell volume in chronically hyponatraemic rats. *Neurochem. Int.* 33: 467-472.
76. Lehmann A. 1989. Effects of microdialysis-perfusion with anisoosmotic media on extracellular amino acids in the rat hippocampus and skeletal muscle. *J. Neurochem.* 53:525-535.

77. Lehmann A., Carlstrom C., Nagelhus E. A., Ottersen O. P. 1991. Elevation of taurine in hippocampal extracellular fluid and cerebrospinal fluid of acutely hypoosmotic rats: contribution by influx from blood? *J Neurochem.* 56:690-697.
78. Leschinger A., Stabel J., Igelmud P., Heinemann U. 1993. Pharmacological and electrographic properties of epileptiform activity induced by elevated K^+ and lowered Ca^{2+} and Mg^{2+} concentration in rat hippocampal slices. *Exp. Brain Res.* 96(2): 230-240.
79. Lien, Y. H., Shapiro, J. I., Chan, L. 1991. Study of brain electrolytes and organic osmolytes during correction of chronic hyponatremia. *J. Clin. Invest.* 88: 303-309.
80. Lohr J.W., Grantham J. J., 1986. Isovolumetric Regulation of Isolated S2 Proximal Tubules in Anisotonic Media. *J. Clin. Invest.* 78: 1165-1172.
81. Lohr J. W., Sullivan L. P., Cragoe E. J., Grantham J. J. 1989. Volume regulation determinants in isolated proximal tubules in hypertonic medium. *American Journal of Physiology.* 256: F622-F631
82. Lohr J. W., 1990. Isovolumetric regulation of renal proximal tubules in hypotonic medium. *Ren. Physiol. Biochem.* 13:233-240.
83. Lopez-Colome A. M., Pasantes-Morales H. 1981. Taurine binding to membranes from rat brain regions. *J. Neurosci. Res.* 6: 475-85.
84. Lopez-Colome A. M. 1981. Taurine receptors in CNS membranes: binding studies. *Adv. Exp. Med. Biol.* 139:293-310.
85. Lux H. D., Heinemann U., Dietzel I. 1986. Ionic changes and alterations in the size of the extracellular space during epileptic activity. *Adv. Neurol.* 44: 619-39.
86. McBain C. J., Traynelis S. F., Dingledine R. 1990. Regional variation of extracellular space in the hippocampus. *Science.* 249: 674-677.
87. Macknight, A. D. C. 1988. Principles of cell volume regulation. *Renal Physiol. Biochem.* 3: 114-141.
88. McEwan G. T., Hunter J., Hirst B. H., Simmons N. L. 1992. Volume-activated Cl^- secretion and transepithelial vinblastine secretion mediated by P-glycoprotein are not correlated in cultured human T84intestinal epithelial layers. *FEBS Lett.* 304:233-236.
89. McManus M. L., Churchwell K. B. 1994 Clinical significance of cellular osmoregulation, en *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation*, Strange K., Eds., CRC Press, Boca Ranton, 63-79
90. Melton J. E., Patlack C. S., Pettigrew K. D., Cserr H. F., 1987. Volume regulatory loss of Na, Cl, K from rat brain during acute hyponatremia. *Am J Physiol* 252: F661-F669.
91. Melzian, D., Scheuffler, E., Grieshaber, M., Tegtmeier, F., 1996. Tissue swelling and intracellular pH in the CA1 region of anoxic rat hippocampus. *J. Neurosci. Methods.* 65: 183-7.
92. Mooman J. R., Ackerman S. J., Kowdley G. C., Griffin M. P., Mounsey J. P., Chen Z., Cala S. E., O'Brian J. J., Szabo G., Jones L. R.. 1995. Unitary anion currents through phospholemman channel molecules. *Nature.* 377: 737-740.
93. Morales-Mulia S., Ordaz B., Quesada O., Pasantes-Morales H. 1998. Ca^{2+} changes and ^{86}Rb efflux activated by hyposmolarity in cerebellar granule neurons. *J. Neurosci. Res.* 53(5):626-35.
94. Morgan J. M. 1984. Osmoregulation and water stress in higher plants. *Ann. Rev. Plant Phy.* 35: 299-319.
95. Motais R., Guizouam H., Garcia-Romeu F. 1991. Red cell volume regulation: the pivotal role of ionic strength in controlling swelling-dependent transport systems. *Biochim. Biophys. Acta.* 1075: 169-80.
96. Motais R., Borgese F., Fievet B., Garcia-Romeu F. 1992. Regulation of Na^+/H^+ exchange and pH in erythrocytes of fish. *Comp. Biochem. Physiol. Comp. Physiol.* 102:597-602.
97. Mountain I., Declercq P. E., Van Driessche W. 1996. Volume regulation in rat brain glial cells: lack of a substantial contribution of free amino acids. *Am. J. Physiol.* 270: C1319-C1325.
98. Mountain I., Van Driessche W. 1997. Isovolumetric regulation of C6 rat glioma cells in hyperosmotic media. *American Journal of Physiology.* 272: C318-C323.
99. Nilius B., Eggermont J., Voets T., Buyse G., Manolopoulos V., Droogmans G. 1997. Properties of volume-regulated anion channels in mammalian cells. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 68: 69-119.
100. Nagelhus E. A., Lehmann A., Ottersen O. P. 1993. Neuronal exchange of taurine during hypoosmotic stress: a combined immunocytochemical and biochemical analysis in rat cerebellar cortex. *Neurosci.* 54: 615-631.
101. Oja S.S., Saransaari P. 1992. Taurine release and swelling of cerebral cortex slices from adult and developing mice in media of different ionic compositions. *J. Neurosci. Res.* 32: 551-561.
102. Oja S. S., Saransaari P. 1996. Kinetic analysis of taurine influx into cerebral cortical slices from adult and developing mice in different incubation conditions. *Neurochem. Res.* 2: 161-166.

103. Olson J. E., Li G. Z. 1997. Increased potassium, chloride, and taurine conductances in astrocytes during hyposmotic swelling. *Glia*. 20:254-261.
104. O'Neill W. C. 1999. Physiological significance of volume-regulatory transporters. *Am. J. Physiol.* 276: C995-C1011.
105. Pasantes-Morales H., Schousboe A. 1988. Volume regulation in astrocytes: a role for taurine as an osmoeffector. *J. Neurosci. Res.* 20:503-509.
106. Pasantes-Morales H., Alavez S., Sanchez-Olea R., Moran J. 1993a. Contribution of organic and inorganic osmolytes to volume regulation in rat brain cells in culture. *Neurochem. Res.* 18: 445-452.
107. Pasantes-Morales, H., Maar, T., Morán, J., 1993b. Cell volume regulation in cultured cerebellar granule neurons. *J. Neurosci. Res.* 34: 219-224.
108. Pasantes-Morales H., Murray R. A., Lilja, L., Morán, J. 1994a. Regulatory volume decrease in cultured astrocytes I. Potassium and chloride-activated permeability. *Am J. Physiol.* 266: C165-C171.
109. Pasantes-Morales H., Murray R. A., Sanchez-Olea R., Morán, J. 1994b. Regulatory volume decrease in cultured astrocytes II. Activated Permeability to amino acids and polyalcohols. *Am. J. Physiol.* 266: C172-C178.
110. Pasantes-Morales H., Chacon, E., Murray R. A., Morán, J. 1994c Properties of osmolyte activated during regulatory volume decrease in cultured cerebellar granule neurons. *J. Neurosci. Res.* 37: 720-727.
111. Pasantes-Morales, H. 1996. Volume Regulation in Brain Cells: Cellular and Molecular Mechanisms. *Met. Brain Dis.* 11: 187-203.
112. Pasantes-Morales H., Sanchez-Olea R., Miranda D., Moran J., 1997 Volume regulation in NIH/3T3 cells not expressing P-glycoprotein I. Regulatory volume decrease. *Am. J. Physiol.* 272: C1798-C1803
113. Pasantes H., Massieu L., Arias C., Tapia R. 1998. Mecanismos celulares y moleculares de la neurodegeneración. *Gac Med Mex.* 134:685-703.
114. Pasantes-Morales H., Ochoa de la Paz L. D., Sepulveda J., Quesada O. 1999. Amino acids as osmolytes in the retina. *Neurochem. Res.* 24:1339-1346.
115. Paulmichi M., Li Y., Wickman K., Ackerman M., Peralta E., Clapham D. 1992. New mammalian chloride channel identified by expression cloning. *Nature.* 356:238-241.
116. Pollock A. S, Arieff A. I. 1980. Abnormalities of cell volume regulation and their functional consequences. *Am. J. Physiol.* 239:F195-F1205.
117. Quesada O., Gonzalez E., Morales-Mulia S., Bargas J., Pasantes-Morales H.. 1998. Effects of NaCl removal on osmolyte fluxes and regulatory volume decrease in cultured astrocytes. *J Neurosci Res.* 53:195-202.
118. Quesada O., Ordaz B., Morales-Mulia S., Pasantes-Morales H. 1999. Influence of CA2+ on K+ efflux during regulatory volume decrease in cultured astrocytes. *J. Neurosci. Res.* 57:350-358.
119. Rasola A., Galletta L. J., Gruenert D. C., Romeo G. 1994. Volume-sensitive chloride currents in four epithelial cell lines are not directly correlated to the expression of the MDR-1 gene. *J. Biol. Chem.* 269:1432-1436.
120. Rausche G., Igelmud P., Heinemann U. 1990. Effects of changes in extracellular potassium, magnesium and calcium concentration on synaptic transmission in area CA1 And the dentate gyrus of rat hippocampal slices. *Pflugers Arch.* 415: 588-93.
121. Reymann S., Florke H., Heiden M., Jakob C., Stadtmuller U., Steinacker P., Lalk V. E., Pardowitz I., Thinner F. P. 1995. Further evidence for multitopological localization of mammalian porin (VDAC) in the plasmalemma forming part of a chloride channel complex affected in cystic fibrosis and encephalomyopathy. *Biochem. Mol. Med.* 1995 54:75-87.
122. Roper S. N., Obenaus A., Dudek F. E. 1992. Osmolarity and nonsynaptic epileptiform bursts in rat CA1 And dentate gyrus. *Ann. Neurol.* 31: 81-85.
123. Roy G. 1995. Amino acid current through anion channels in cultured human glial cells. *J. Membr Biol.* 147:35-44.
124. Rosen A. S., Andrew R. D. 1990. Osmotic effects upon excitability in rat neocortical slices. *Neuroscience* 38: 579-590.
125. Sanchez-Olea R., Moran J., Schousboe A. Pasantes-Morales H. 1991. Hyposmolarity-activated fluxes of taurine in astrocytes are mediated by diffusion. *Neurosci. Lett.* 130:233-236.
126. Sanchez-Olea R., Pena C., Moran J., Pasantes-Morales H. 1993. Inhibition of volume regulation and efflux of osmoregulatory amino acids by blockers of Cl- transport in cultured astrocytes. *Neurosci. Lett.* 156:141-4.

127. Sanchez-Olea R., Morales M., Garcia O., Pasantes-Morales H. 1996. Cl channel blockers inhibit the volume-activated efflux of Cl and taurine in cultured neurons. *Am. J. Physiol.* 270: C1703-C1708.
128. Saransaari P., Oja S. S. 1992. Release of GABA and taurine from brain slices. *Prog. Neurobiol.* 38: 455-482.
129. Sarkadi B., Muller M., Homolya L., Hollo Z., Seprodi J., Germann U. A., Gottesman M. M., Price E. M., Boucher R. C. 1994. Interaction of bioactive hydrophobic peptides with the human multidrug transporter. *FASEB J.* 8:766-70.
130. Schwartzkroin P. A., Baraban S. C., Hochman D. W. 1998. Osmolarity, ionic flux, and changes in brain excitability. *Epilepsy Res.* 32: 275-285.
131. Silver S. M., Schroeder B. M., Bernstein P., Sterns R. H. 1999. Brain adaptation to acute hyponatremia in young rats. *Am. J. Physiol.* 276:R1595-R1599.
132. Solis J. M., Herranz A. S., Herreras O., Lerma J., Martin del Rio R. 1988. Does taurine act as an osmoregulatory substance in the rat brain? *Neurosci. Lett.* 91:53-58.
133. Somjen, G. G., Faas, G. C., Vreugdenhil, M., Wadman, W. J., 1993. Channel shutdown, a response of hippocampal neurons to adverse environments. *Brain. Research.* 632: 180-94.
134. Somjen G. G. 1999. Low external NaCl concentration and low osmolarity enhance voltage-gated Ca currents but depress K currents in freshly isolated rat hippocampal neurons. *Brain Res.* 851: 189-197.
135. Steenbergen C., Hill M. L., Jennings R. B. 1985. Volume regulation and plasma membrane injury in aerobic, anaerobic, and ischemic myocardium in vitro. Effects of osmotic cell swelling on plasma membrane integrity. *Circ Res.* 57:864-875.
136. Sterns R. H., Baer J., Ebersol S., Darbie T., Lohr J. W., Kamm D. E. 1993. Organic osmolytes in acute hyponatremia. *Am. J. Physiol.* 264: F833-F836.
137. Strange, K., Morrison R., Heiling C. W., DiPietro S., Gullans S. R. 1991. Upregulation of inositol transport mediates inositol accumulation in hyperosmolar brain cells. *Am. J. Physiol.* 260: C784-90.
138. Strange, K. 1994. Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation. CRC Press. Boca Raton, Florida. 400 pag.
139. Strange K., Emma F., Jackson P. S. 1996. Cellular and molecular physiology of volume sensitive anion channels. *Am. J. Physiol* 270: C711-C730.
140. Stringer J. L., Lothman E. W. 1988. Epileptiform discharges induced by altering extracellular potassium and calcium in the rat hippocampal slice. *Exp. Neurol.* 101: 147-157.
141. Tancredi V., Avol M. 1987. Control of spontaneous epileptiform discharges by extracellular potassium: an "in vitro" study in the CA1 subfield of hippocampal slice. *Exp. Brain. Res.* 67: 363-372.
142. Thurston J. H., Huhart R. D., Dirco J. A. 1980. Taurine: role in osmotic regulation in mammalian brain and possible clinical significance. *Life Sci.* 26: 1562-1568.
143. Thurston, J. H., Huhart, R. E., Nelson, J. S., 1987. Adaptive decreases in amino acids (taurine in particular) creatine and electrolytes, prevent cerebral edema in chronically hyponatremic mice: rapid correction (experimental model of central pontine myelinolysis) causes dehydration and shrinkage of brain. *Met. Brain Des.* 2: 223-241.
144. Thurston J. H., Huhart R. E., Brain amino acids decrease in chronic hyponatremia and rapid correction causes brain dehydration: clinical significance. *Life Sci.* 40: 2539-2542.
145. Tominaga M., Tominaga T., Miwa A., Okada Y. 1995. Volume-sensitive chloride channel activity does not depend on endogenous P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 270:27887-27893.
146. Tosteson, D. C. Hoffman, J. F. 1960. Regulation of cell volume by active cation transport in high and low potassium sheep red cells. *J. Gen. Physiol.* 44: 169-175.
147. Trachtman H., del Pizzo R., Sturman A. 1990. Taurine and osmoregulation. III. Taurine deficiency protects against cerebral edema during acute hyponatremia. *Pediatr. Res.* 27:85-8.
148. Trachtman H., 1992. Cell volume: a review of cerebral adaptive mechanisms and implications for clinical treatment of osmolar disturbances : II. *Ped. Neph.* 6: 104-112.
149. Van Driessche W., de Smet P., Li J., Allen S., Zizi M., Mountain I. 1997. Isovolumetric regulation in a distal nephron cell line (A6). *Am. J. Physiol.* 272: C1890-C1898.
150. Verbalis J. G. 1993. Hyponatremia: Trends Endocrin. Met. 3:1-7.
151. Verbalis J. G., Drutarosky M. D. 1988. Adaptation to chronic hypoosmolality in rats. *Kidney Int.* 34: 351-360.
152. Verbalis J. G., Gullans S. R. 1990. Decreased brain concentrations of multiple organic osmolytes accompanies volume regulatory electrolyte losses during chronic hyponatremia. *J. Am. Soc. Nephrol* 1: 709-713.

153. Verbalis J. G., Gullans S. R. 1991. Hyponatremia causes large sustained reductions in brain content of multiple organic osmolytes in rats. *Brain Res.* 567: 274-282.
154. Verbalis J. G., Gullans S. R. 1993. Rapid correction of hyponatremia produces differential effects on brain osmolyte and electrolyte reaccumulation in rats. *Brain Res.* 606: 19-27.
155. Viana F., Van Acker K., De Greef C., Eggermont J., Raeymaekers L., Droogmans G., Nilius B. 1995. Drug-transport and volume-activated chloride channel functions in human erythroleukemia cells: relation to expression level of P-glycoprotein. *J. Membr. Biol.* 145:87-98.
156. Vitarella D., DiRisio D. J., Kimelberg H. K., Aschner M. 1994. Potassium and taurine release are highly correlated with regulatory volume decrease in neonatal primary rat astrocyte cultures. *J. Neurochem.* 63: 1143-1149.
157. Vom Dahi S., Haussinger D. 1996. Nutritional state and the swelling-induced inhibition of proteolysis in perfused rat liver. *J. Nutr.* 126: 395-402.
158. Wade J. V., Olson J. P., Samson F. E., Nelson S. R., Pazdernik T. L. 1988. A possible role for taurine in osmoregulation within the brain. *J Neurochem.* 51:740-5.
159. Wang X., Wall D. M., Parkin J. D., Zaicberg J. R., Kemm R. E. 1994. P-glycoprotein expression in classical multi-drug resistant leukaemia cells does not correlate with enhanced chloride channel activity. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 21:101-108.
160. Wolfgang W. 2000. Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochem. Int.* 36: 291-300.
161. Yancey H. P., 1994 *Compatible and Counteracting Solutes*, in *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation*, Strange K., Eds., CRC Press, Boca Ranton, 81 – 109
162. Zafonte R. D. 1997. Psychogenic polydipsia after traumatic brain injury. A case report. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* 76: 246-248.