

212



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

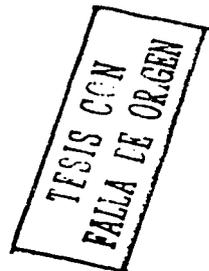
**MECANISMOS DE REGULACION ISOVOLUMICA EN
NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO DE RATA**

T E S I S

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

KARINA LIZETH TUZ MOYA

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. HERMINIA PASANTES ORDOÑEZ





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
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias

Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Mecanismos de Regulación Isovolumica en neuronas granulares de cerebelo
de rata"

realizado por Karina Lizeth Tuz Moya

con número de cuenta 9438629-1, quien cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario Dra. Herminia Pasantes Morales

Propietario Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade

Propietario Quím. Silvestre de Jesús Alavez Espidio

Suplente Dra. María Luisa Fanjul de Moles

Suplente Dr. Octavio Quesada García

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

Dra. Patricia Ramos Morales

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
Regulación del volumen celular.....	2
Regulación crónica del volumen celular.....	3
Regulación del volumen celular en condiciones anisomóticas.....	5
Regulación del volumen en condiciones hiposmóticas.....	5
Osmolitos involucrados en el DRV.....	7
Regulación del volumen en condiciones hiperosmóticas.....	9
Osmolitos involucrados en el IVR.....	10
Vías de transporte activadas en el DRV.....	10
Regulación del volumen en el cerebro.....	14
Importancia.....	14
Mecanismos celulares.....	18
Regulación isovolúmica.....	22
OBJETIVOS.....	22
METODOLOGÍA.....	23
Soluciones.....	23
Cultivos primarios de células granulares de cerebelo.....	23
Gradiente osmótico. Sistema de perfusión.....	24
Liberación de iones.....	25
⁸⁶ Rb.....	25
¹²⁵ I.....	26
Efecto de los inhibidores de canales de K ⁺ sobre la liberación de ⁸⁶ Rb.....	27
Determinación de potasio endógeno.....	27
Cambio gradual en la osmolaridad.....	27
Cambio súbito en la osmolaridad.....	28
Cuantificación de cambios en el volumen celular.....	28
Principio básico.....	28

Medición de la fluorescencia.....	28
Cálculo de los cambios en el volumen celular de agua.....	29
Efecto de inhibidores de canales de Cl ⁻ y K ⁺ sobre la regulación del volumen celular.....	30
Efecto de la sustitución aniónica en la regulación del volumen celular.....	32
Materiales.....	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
Sistema generador de un gradiente osmótico.....	33
Cambios en el volumen celular.....	34
Liberación de K ⁺ durante la RIV.....	38
Liberación de Cl ⁻ durante la RIV.....	44
Evaluación de la contribución de distintos osmolitos a la RIV.....	48
CONCLUSIONES.....	56
BIBLIOGRAFÍA.....	57

INTRODUCCIÓN

REGULACIÓN DEL VOLUMEN CELULAR

La capacidad que tienen las células para regular su volumen es un mecanismo homeostático muy importante. Este es probablemente uno de los más antiguos, ya que esta propiedad se ha preservado a través de la evolución (Chamberlin y Strange, 1989).

El mantenimiento del volumen celular es crítico para el funcionamiento celular normal y para la sobrevivencia de la célula (Macknight, 1988). Para mantener constante la concentración de solutos intracelulares, muchos de los cuales son parte de complejos eventos de señalización, es necesario mantener un volumen celular estable. Además, se ha propuesto que el volumen celular participa directamente como un mensajero para el control metabólico, como señal para el crecimiento y proliferación y como disparador de mecanismos que inician la inserción de proteínas de membrana, tales como: canales, receptores y transportadores (Pasantes-Morales, 1996).

La regulación del volumen celular se da de manera paralela a las funciones celulares básicas, durante los procesos de transporte de sustancias nutritivas; tales como azúcares y aminoácidos, durante las funciones de secreción, en los movimientos del citoesqueleto y durante las fases de crecimiento y división celular (Macknight, 1988).

Las membranas de las células animales son sumamente permeables al agua. Por ello, siempre que existan diferencias en la concentración de los solutos celulares con el exterior, es decir, un gradiente osmótico entre el interior y el exterior celular, se observarán movimientos netos de agua. Ante un gradiente de presión osmótica, el agua se moviliza del compartimento de menor al de mayor

presión osmótica; como consecuencia, el volumen celular aumenta en soluciones hiposmóticas y disminuye en soluciones hiperosmóticas. Sin embargo, las células se comportan como osmómetros perfectos sólo al inicio de la exposición a soluciones anisomóticas, ya que posteriormente se activa una serie de procesos que permiten la recuperación del volumen inicial a pesar de que persistan dichas condiciones.

La regulación del volumen celular que ocurre tanto en condiciones hiposmóticas como en hiperosmóticas tiene lugar debido a un cambio, ya sea una disminución o un aumento según sea el caso, en el contenido de solutos intracelulares osmóticamente activos, de manera tal que la presión osmótica tiende a alcanzar el mismo valor que la externa.

La regulación del volumen se ha estudiado tanto en organismos procariontes como en eucariontes (Chamberlin y Strange, 1989). Con relación a estos últimos, se ha estudiado prácticamente en todos los grupos más inclusivos. Se ha investigado en levaduras (Ramos *et al.*, 1990), protozoarios (Geoffrion y Laroche, 1984; Bursell, 1992), plantas (Morgan, 1984) y animales desde invertebrados hasta vertebrados. En mamíferos, se ha detectado en distintos tipos celulares como: eritrocitos, linfocitos, células del epitelio intestinal, astrocitos y neuronas (Lang *et al.*, 1998).

REGULACIÓN CRÓNICA DEL VOLUMEN CELULAR

La membrana plasmática de la mayoría de las células es altamente permeable al agua, y en menor grado y de manera selectiva, permeable a varios solutos de bajo peso molecular y prácticamente impermeable a las proteínas. Debido a que el pH intracelular es ligeramente básico (7.2-7.4) con respecto al punto isoeléctrico de la mayoría de las proteínas, éstas se comportan como aniones polivalentes. Esto trae como consecuencia que la presión coloidosmótica intracelular sea mayor que la del líquido extracelular. Como la membrana es permeable al agua y a solutos

como el Na^+ , K^+ y Cl^- , si los iones y el agua se distribuyesen de acuerdo al equilibrio de Gibbs-Donnan, las células se hincharían en condiciones isosmóticas. De acuerdo con esta teoría, en el estado de equilibrio, la concentración total de solutos intracelulares debería ser mayor que la de los extracelulares, lo cual resultaría en una disminución de la presión osmótica del agua en el interior, con respecto al exterior celular. Este gradiente de potencial químico del agua causaría un flujo osmótico neto de este solvente hacia el interior celular. Como la membrana de las células animales es distensible, cede ante pequeñas presiones hidrostáticas, por lo que dicho flujo osmótico neto de agua causaría un aumento de volumen y eventual lisis celular. Sin embargo, normalmente este aumento de volumen celular no ocurre y las células mantienen niveles constantes de agua y solutos.

Los mecanismos que previenen el hinchamiento coloidosmótico en condiciones isosmóticas son el transporte de iones a través de vías pasivas y activas, con la generación de cambios en la permeabilidad y en el potencial electroquímico de los mismos. La hipótesis que explica estos mecanismos es la de la "bomba y la fuga" propuesta por Tosteson y Hoffmann (1960). El modelo desarrollado (Cooke y Macknigh, 1984) sostiene que la membrana celular posee mecanismos de transporte activo que generan un flujo de solutos; el transportador responsable de esto es la bomba de Na^+/K^+ . Con la actividad de este transportador se gana Na^+ , se pierde K^+ y se genera y mantiene un gradiente electroquímico hacia el interior celular para Na^+ y hacia el exterior para K^+ . Con el establecimiento de este gradiente se activa otra serie de transporte de solutos cuyo movimiento ocurre acoplado a los movimientos de Na^+ y K^+ . Entre éstos están los intercambiadores Na^+/H^+ , $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y K^+/H^+ y los cotransportadores $\text{Na}^+/\text{aminoácido}$, K^+/Cl^- y $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ (Hallows y Knauf, 1994; Álvarez-Leefmans y Reuss, 1996). Finalmente, la suma de los flujos de Na^+ hacia el exterior e interior celular es cero, comportamiento esperado si la membrana plasmática fuera totalmente impermeable al Na^+ . Lo mismo ocurre para el potasio. Considerando la ganancia y pérdida de K^+ el resultado es un movimiento neto de cero, por lo que

puede considerarse que la membrana plasmática es impermeable al K^+ . Entonces, como el Na^+ y K^+ no entran en el equilibrio electroquímico de Gibbs-Donnan, las células no se hinchan en condiciones isosmóticas (Hallows y Knauf, 1994).

REGULACIÓN DEL VOLUMEN CELULAR EN CONDICIONES ANISISMÓTICAS

La regulación del volumen en condiciones anisismóticas involucra una cadena compleja de eventos que requiere al menos los siguientes componentes: 1) Un sensor que detecte los cambios en el volumen celular; 2) Un efector activado que inicie el proceso regulador: las vías de flujos transmembranales de osmolitos; 3) Un sistema de transducción de señales entre el sensor y el efector, y 4) Una "memoria" del volumen celular original y la consiguiente inactivación del proceso de regulación (Pasantes-Morales, 1996).

REGULACIÓN DEL VOLUMEN EN CONDICIONES HIPOSMÓTICAS

Cuando una célula animal es expuesta a un medio hiposmótico, se observa un aumento inicial rápido en su volumen celular debido a la entrada de agua, seguido de una fase de recuperación más lenta, durante la cual la célula alcanza un valor muy cercano a su volumen original (Fig. 1). Esta fase de recuperación conocida como Decremento Regulador del Volumen (DRV), constituye un proceso activo en el cual ocurre una expulsión de solutos intracelulares osmóticamente activos, lo que hace que se reduzca la presión osmótica intracelular y por consiguiente, el contenido de agua de las células. La recuperación del volumen inicial, después de un aumento producido por soluciones hiposmóticas, se ha descrito en una gran variedad de células animales, tales como eritrocitos (Kregenow, 1971), linfocitos (Grinstein *et al.*, 1982; García *et al.*, 1991), células renales (Roy y Sauve, 1987), astrocitos y neuronas (Pasantes-Morales, 1993; 1994b). Esta diversidad indica que esta propiedad parece ser una característica general de las células animales.

Sin embargo, este fenómeno no tiene carácter universal, ya que algunas células, como las del túbulo contorneado distal, son incapaces de recuperar su volumen una vez que éste se ha incrementado en soluciones hiposmóticas (Guggino *et al.*, 1985). Además, sólo una pequeña fracción de eritrocitos humanos posee los mecanismos para regular eficazmente el volumen celular (O'Neill, 1989).

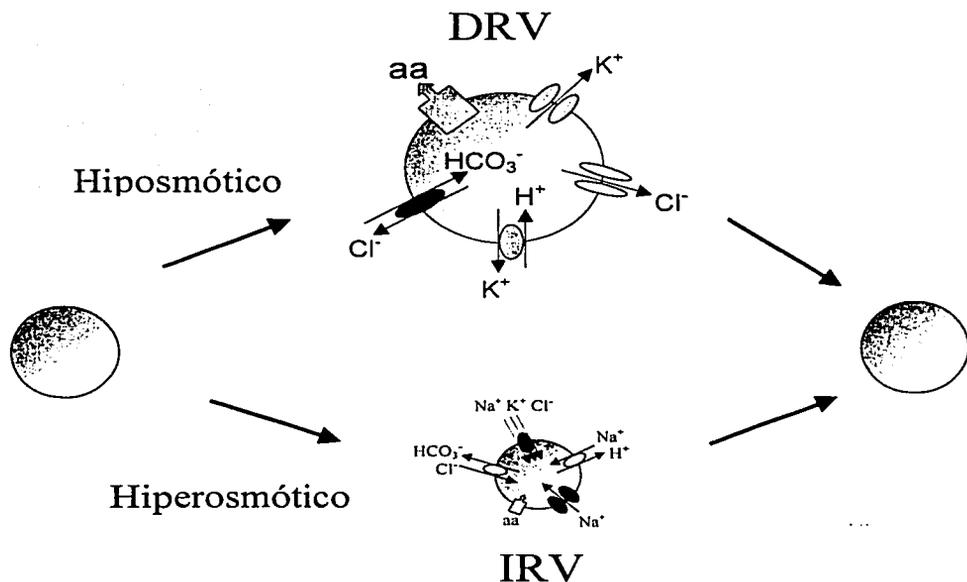


Figura 1. Regulación del volumen en condiciones anisomóticas. Cuando una célula es expuesta a un medio hiposmótico, aumenta inmediatamente su volumen desencadenando el proceso regulador DRV, con la respectiva salida de osmólitos. Por el contrario, cuando una célula es sometida a una solución hiperosmótica, se encoge y se activa el IRV, iniciándose la entrada de osmólitos.

Osmolitos involucrados en el DRV

Durante el DRV se activan distintos sistemas de transporte que permiten la salida del interior celular de osmolitos de diferente identidad (Fig. 1). En células de vertebrados superiores, los iones K^+ , Na^+ , Cl^- y HCO_3^- , constituyen la mayor parte de los solutos osmóticamente activos (Yancey, 1994). El K^+ y Cl^- son los que se encuentran en una mayor concentración intracelular, por lo que el DRV está dado primordialmente por una pérdida neta de estos iones. Los sistemas de transporte que se activan con más frecuencia en una célula hinchada para movilizar K^+ y Cl^- son canales de K^+ y canales aniónicos (Lang *et al.*, 1998b). Los canales de K^+ activados por volumen son muy selectivos y permean únicamente K^+ y Rb. Los canales aniónicos activados por hinchamiento celular a diferencia de los de K^+ no son selectivos, ya que permiten el paso no sólo de Cl^- y de todos los aniones monovalentes sino también de HCO_3^- y de aniones orgánicos y osmolitos orgánicos neutros. Además de los canales aniónicos, el KCl puede mobilizarse a través de cotransporte.

El movimiento de K^+ y Cl^- a través de los canales puede o no ser interdependiente. La evidencia experimental que apoya esta última hipótesis proviene de estudios efectuados en células de Ehrlich que mostraron los siguientes resultados: 1) cuando se inhibe la salida de potasio con quinidina se inhibe la recuperación del volumen; sin embargo si se provee una vía alterna para la salida de potasio con valinomicina (Hoffmann *et al.*, 1984) o con gramicidina en un medio sin sodio (Hoffmann *et al.*, 1986; Pasantes-Morales *et al.*, 1994; 1994c) el volumen disminuye normalmente, lo que indica que el canal de cloro se encuentra activo, además de que el potasio es el paso limitante. 2) El curso temporal de la inactivación del canal de cloro es diferente al del canal de potasio: el primero se activa abruptamente con el aumento de volumen y se inactiva en aproximadamente 10 minutos, mientras que el canal de potasio permanece activado por más tiempo (Sarkadi *et al.*, 1984). 3) La despolarización (de aproximadamente 10 mV) observada durante la fase reguladora del volumen es consistente con un mayor aumento en la permeabilidad de la membrana para el

cloro que para el potasio. Esta despolarización aumenta la fuerza electromotriz para la salida de potasio y puede explicar al menos parte de esta salida (Lang *et al.*, 1987).

El cotransporte electroneutro KCl se activa, principalmente en hinchamiento celular isosmótico (García-Romeu *et al.*, 1996). Se ha visto que la salida de KCl puede efectuarse a través de la activación paralela de los intercambiadores K^+/H^+ y Cl^-/HCO_3^- . El H^+ y HCO_3^- intercambiados por KCl forman CO_2 , el cual difunde al exterior celular y no es osmóticamente activo (Lang *et al.*, 1998b).

El Na^+ sale de la célula a través del intercambiador reverso Na^+/Ca^{2+} con la salida paralela de Ca^{2+} por medio de la ATPasa de Ca^{2+} . Alternativamente, se activa una ATPasa de Na^+ insensible a ouabaina o una ATPasa Na^+/K^+ . El hinchamiento celular puede estimular o inhibir la ATPasa Na^+/K^+ . El cotransporte $Na^+(HCO_3^-)$ también participa en el DRV.

Durante el DRV también se activan canales catiónicos no selectivos que parecen no contribuir a la regulación del volumen, ya que, debido a la diferencia de potencial negativo a través de la membrana, el movimiento del catión sería hacia el interior celular. Sin embargo, a través de estos canales puede entrar el Ca^{2+} , el cual activa canales de K^+ sensibles a Ca^{2+} , a través de los cuales podría movilizarse K^+ en cantidades suficientes para contribuir a la regulación del volumen celular, ya que algunos de estos canales, los BK, tienen una conductancia grande.

Además de la liberación de los osmolitos inorgánicos ya mencionados, durante el DRV también existe una liberación de osmolitos orgánicos, principalmente de aminoácidos que contribuyen con cerca del 15 % a la regulación del volumen celular en el modelo de cambio súbito en la osmolaridad externa. Durante la regulación de volumen, la poza intracelular de aminoácidos disminuye significativamente. Los aminoácidos que tienen una participación en la

regulación del volumen son: la taurina, el aspartato, el glutamato, el GABA, la glicina, la alanina y la glutamina (Kimmelberg *et al.*, 1990; Pasantes-Morales *et al.*, 1993a). Otros osmolitos orgánicos que tienen un papel en el DRV son los polialcoholes (sorbitol e inositol) y las metilaminas (glicerofosforilcolina y betaina) (Yancey, 1994).

Entre aminoácidos la taurina destaca como un osmoefector importante, ya que se encuentra en altas concentraciones en la mayoría de las células animales (Jacobsenn y Smith, 1968), constituyendo más del 65 % de la poza total de aminoácidos libres (Pasantes-Morales *et al.*, 1991). Además, parece tener propiedades ideales de osmolito, ya que no participa en ninguna reacción del metabolismo primario ni se encuentra constituyendo parte de la estructura primaria de las proteínas (Jacobsenn y Smith, 1968). Así, la taurina participa en gran magnitud como osmoefector sin que modificaciones en su concentración alteren otras funciones celulares.

REGULACIÓN DEL VOLUMEN EN CONDICIONES HIPEROSMÓTICAS

Al exponer a las células a una solución hiperosmótica, ocurre una disminución en el volumen celular, directamente relacionada con la magnitud del gradiente osmótico impuesto. Sin embargo, la recuperación del volumen en soluciones hiperosmóticas suele ser menos frecuente que la regulación en condiciones hiposmóticas. Este proceso de recuperación de volumen en soluciones hiperosmóticas es conocido como Incremento Regulador del Volumen (IRV) (Fig. 1). Ante condiciones hiperosmóticas, la mayoría de las células animales se comportan como osmómetros perfectos, disminuyen rápidamente su volumen y muestran un proceso de recuperación muy lento en comparación con el DRV, el cual se lleva a cabo en alrededor de 15 minutos (Pasantes-Morales *et al.*, 1993b).

Osmolitos involucrados en el IRV

Los osmolitos que principalmente participan en el IVR son los iones Na^+ , K^+ y Cl^- , al igual que osmolitos orgánicos, preferentemente aminoácidos y polialcoholes (Fig. 1). En las células encogidas se activa el cotransportador electroneutro $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$, con la respectiva acumulación intracelular de estos iones. También se activa el intercambiador Na^+/H^+ , el cual alcaliniza a la célula lo que conduce a la activación paralela del intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. El H^+ y el HCO_3^- forman CO_2 que difunde al interior celular y de esta manera no tiene contribución osmótica (Lang *et al.*, 1998).

En algunos tipos celulares, durante el IVR se acumula Na^+ intracelular mediante la activación de canales de Na^+ y/o canales catiónicos no selectivos. La entrada de Na^+ induce una despolarización que favorece la entrada de Cl^- a la célula y esto, junto con el agua dirigida osmóticamente, ajusta el volumen celular.

En cuanto a los osmolitos orgánicos involucrados en el IRV se encuentra el *myo*-inositol que se acumula por medio del cotransportador dependiente de Na^+ , cuya síntesis se induce por la condición hiperosmótica. También se activan los transportadores de los aminoácidos glutamato, glutamina y taurina.

VÍAS DE TRANSPORTE ACTIVADAS DURANTE EL DRV

Como ya se había mencionado, los principales osmolitos liberados durante el DRV son K^+ , Cl^- y aminoácidos, entre los cuales destaca la taurina.

Los canales de K^+ activados por hinchamiento celular pueden colocarse en dos grupos principales de acuerdo a sus propiedades electrofisiológicas y su dependencia al Ca^{2+} . Un grupo está constituido por canales dependientes de Ca^{2+}

caracterizados por una alta conductancia (100-200 pS), los cuales reciben el nombre de canales BK (Big Potassium). El segundo grupo de canales de potasio activados por hiposmolaridad consiste de canales de baja conductancia (20-30 pS), la mayoría de los cuales son independientes de Ca^{2+} (Pasantes-Morales y Morales-Mulia, 2000).

Se ha propuesto al canal de K^+ tipo N Kv1.3 como el responsable de la regulación del volumen en respuesta al estrés hiposmótico. La evidencia que apoya esta propuesta proviene de un estudio efectuado en células CTLL-2 (Deutsch y Chen, 1993). Esta línea de linfocitos T carece de canales de K^+ dependientes de voltaje y es incapaz de regular su volumen, pero cuando a este tipo celular se le transfectó con canales Kv1.3 recuperó su capacidad para regular volumen.

Por otro lado, los canales de Cl^- activados durante el DRV son independientes de Ca^{2+} en su gran mayoría. Las moléculas propuestas para actuar como canales de Cl^- activados por volumen son las siguientes:

1. CIC-2. Es una proteína de 99 KDa compuesta por 907 aminoácidos que forma parte de una familia de proteínas de membrana que funcionan como canales de Cl^- (CIC-0 – CIC-7, CIC-K1 y CIC-K2) (Brandt y Jentsch, 1995). Análisis de Northern-blot muestran que el CIC-2 está ampliamente distribuido en células de mamíferos y hay evidencia de que el CIC-2 forma un canal aniónico sensible a volumen (Gründer, *et al.*, 1992). Sin embargo, sus características farmacológicas, electrofisiológicas y de selectividad iónica son completamente diferentes de las reportadas para los canales aniónicos rectificadores salientes sensibles a volumen.
2. Glicoproteína-P. Codificada por el gen *mdr1* y perteneciente a la familia de transportadores ABC (ATP-binding-cassette, presentan una secuencia consenso para unir ATP). Se ha sugerido que esta proteína puede funcionar como un canal aniónico activado por hinchamiento y/o como proteína reguladora del canal. Sin embargo, esta interpretación ha sido cuestionada, ya

niveles de expresión de la glicoproteína-P y la actividad del canal activado por hinchamiento (Rasola *et al.*, 1994; McEwan *et al.*, 1992; Dong *et al.*, 1994; Kunzelmann *et al.*, 1994; Morin *et al.*, 1995; Viana *et al.*, 1995).

3. pl_{Clin} . Esta proteína de 235 aminoácidos fue clonada originalmente de las células MDCK (Paulmichl *et al.*, 1992). La pl_{Clin} está ampliamente distribuida y conservada. Cuando esta proteína es expresada en ovocitos de *Xenopus* genera una conductancia al Cl^- constitutivamente activa con características similares a las del canal aniónico activado por hinchamiento (Strange *et al.*, 1996). Los grupos de Paulmichl (1992) y Gschwentner (1995) han realizado estudios que apoyan el hecho de que esta proteína podría ser la responsable del proceso de regulación del volumen. Sin embargo, otros trabajos indican que la proteína está principalmente localizada en el citoplasma celular (Krapivinsky *et al.*, 1994), lo que lleva a suponer que sirva entonces como un regulador citosólico de un canal endógeno activado por hinchamiento (Ackerman *et al.*, 1994). Paulmichl y sus colegas han descrito resultados preliminares que sugieren que aunque la proteína está normalmente presente en el citosol, migra a la membrana en respuesta al hinchamiento osmótico. (Paulmichl *et al.*, 1996). Sin embargo, se encontró que la pl_{Clin} de células endoteliales se encuentra predominantemente en el citosol, sin distinguir ninguna alteración en su distribución intracelular en respuesta al hinchamiento osmótico, por lo que se descarta como canal activado por hinchamiento o como regulador. Estos resultados no descartan la posibilidad de que la translocación de la l_{Clin} sí ocurra en otros tipos celulares.
4. Banda-3. Esta proteína es el principal constituyente de la membrana plasmática de los eritrocitos de muchas especies de vertebrados y tiene su parte homóloga en otros tejidos. Es un intercambiador aniónico electroneuro (Cl^-/HCO_3^-). Muchos inhibidores del intercambiador Banda-3 inhiben al canal aniónico activado por hinchamiento, lo que sugiere que esta molécula podría estar involucrada en la actividad del canal activado por hinchamiento o actuar en sí misma como un canal de Cl^- unidireccional (Goldstein *et al.*, 1990; Goldstein y Bill 1991; García-Romeu *et al.*, 1991; Motais *et al.*, 1991; 1992).

nombre de canales BK (Big Potassium). El segundo grupo de canales de potasio activados por hiposmolaridad consiste de canales de baja conductancia (20-30 pS), la mayoría de los cuales son independientes de Ca^{2+} (Pasantes-Morales y Morales-Mulia, 2000).

Se ha propuesto al canal de K^+ tipo N Kv1.3 como el responsable de la regulación del volumen en respuesta al estrés hiposmótico. La evidencia que apoya esta propuesta proviene de un estudio efectuado en células CTLL-2 (Deutsch y Chen, 1993). Esta línea de linfocitos T carece de canales de K^+ dependientes de voltaje y es incapaz de regular su volumen, pero cuando a este tipo celular se le transfirió con canales Kv1.3 recuperó su capacidad para regular volumen.

Por otro lado, los canales de Cl^- activados durante el DRV son independientes de Ca^{2+} en su gran mayoría. Las moléculas propuestas para actuar como canales de Cl^- activados por volumen son las siguientes:

1. CIC-2. Es una proteína de 99 KDa compuesta por 907 aminoácidos que forma parte de una familia de proteínas de membrana que funcionan como canales de Cl^- (CIC-0 – CIC-7, CIC-K1 y CIC-K2) (Brandt y Jentsch, 1995). Análisis de Northern-blot muestran que el CIC-2 está ampliamente distribuido en células de mamíferos y hay evidencia de que el CIC-2 forma un canal aniónico sensible a volumen (Gründer, *et al.*, 1992). Sin embargo, sus características farmacológicas, electrofisiológicas y de selectividad iónica son completamente diferentes de las reportadas para los canales aniónicos rectificadores salientes sensibles a volumen.
2. Glicoproteína-P. Codificada por el gen *mdr1* y perteneciente a la familia de transportadores ABC (ATP-binding-cassette, presentan una secuencia consenso para unir ATP). Se ha sugerido que esta proteína puede funcionar como un canal aniónico activado por hinchamiento y/o como proteína reguladora del canal. Sin embargo, esta interpretación ha sido cuestionada, ya que existen trabajos en donde se muestra que no existe correlación entre los

5. Fosfolema. Proteína de 72 aminoácidos que cuando es reconstituida en bicapas lipídicas forma canales aniónicos con una aparente permeabilidad a la forma aniónica de la taurina 70 veces mayor sobre la del Cl⁻. Esto sugiere que la proteína podría estar relacionada preferentemente con el transporte de la taurina regulado por volumen (Moorman *et al.*, 1995).
6. VDAC. El canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) es parecido a una porina y se ha encontrado formando parte de la membrana externa de las mitocondrias en eucariontes y podría también estar presente en otras fracciones de membrana plasmática (Reymann *et al.*, 1995; Junankar *et al.*, 1995). Se ha reportado que el anticuerpo dirigido contra el VDAC de linfocitos humanos inhibe los flujos iónicos activados por hiposmolaridad en estas células. Estos datos avalan la hipótesis de un papel para VDAC en la actividad del canal aniónico activado por hinchamiento (Reymann *et al.*, 1995).

Con respecto a la vía de movilización de los osmolitos orgánicos, hay que mencionar que los más estudiados han sido la taurina y el *myo*-inositol, que se transportan de manera independiente de Ca²⁺ (Pasantes-Morales y Morales-Mulia, 2000). Los estudios realizados por Sánchez-Olea y colaboradores (1991) y Schousboe y colaboradores (1991) sugieren un proceso difusional más que un transporte de alta afinidad para la liberación de taurina. Con esos trabajos se demostró que la dirección de los flujos de taurina activados por hiposmolaridad está determinada primariamente por el gradiente transmembranal.

Existe evidencia circunstancial que sugiere una ruta sensible a volumen común para Cl⁻ y aminoácidos. Parte de esta evidencia la constituye la semejanza observada en las acciones de los inhibidores de canales de Cl⁻ (ácido 5-nitro-2-(3-fenilpropil-amino) benzoico (NPPB), 1,9-dideoxiforskolina (DDF), dipiridamol y ácido niflúmico) sobre los flujos de Cl⁻ y taurina (Law 1994; Sánchez-Olea *et al.*, 1996). En estudios electrofisiológicos se han encontrado corrientes de aspartato, glutamato y taurina aniónica a través de un canal aniónico activado por hinchamiento (Banderali y Roy, 1992). Se piensa pues que este canal es muy

poco selectivo, permitiendo el paso de varios aniones. Sin embargo, también existe evidencia en contra de una vía común para Cl^- y osmolitos orgánicos sensible a volumen. A pH intracelular fisiológico normal la taurina se encuentra predominantemente en forma electroneutra, y en un estudio realizado en eritrocitos de pez, se demostró que es en esta forma como se libera este aminoácido de células hinchadas (Guizouarn, *et al.*, 2000). En células de Ehrlich la liberación de taurina estimulada por hiposmolaridad se inhibe por DIDS y se potencia por ácido araquidónico, mientras que la liberación de $^{36}\text{Cl}^-$ no se afecta por DIDS y se inhibe por ácido araquidónico (Lambert y Hoffmann, 1994). Se ha sugerido que la taurina permea través del fosfolema. El fosfolema forma canales aniónicos con una aparente permeabilidad a la forma aniónica de la taurina 70 veces mayor sobre la del Cl^- (Moorman *et al.*, 1995). Esto sugiere que la proteína podría estar relacionada preferentemente con el transporte de la taurina regulado por volumen. En sustento de esta propuesta está un estudio en el que oligonucleótidos construidos contra fosfolema, reducen la liberación de taurina ante condiciones de hiposmolaridad en más de 60 % sin afectar los flujos de Cl^- (Morales-Mulía *et al.*, 2000). Este resultado descarta a esta proteína como canal de Cl^- activado por volumen y sugiere que la permeación de taurina ocurre a través de una molécula parecida a un canal aniónico, pero no idéntico al canal de Cl^- activado por volumen.

REGULACIÓN DEL VOLUMEN EN EL CEREBRO

Importancia

El mantenimiento del volumen celular en el cerebro tiene importantes implicaciones clínicas, ya que cambios pequeños en el volumen celular pueden producir profundas secuelas patológicas. Los cambios de volumen celular en el cerebro pueden deberse a alteraciones en la osmolaridad de los fluidos externos o a cambios en la distribución de iones y agua en condiciones isosmóticas (Ballanyi y Grafe, 1988). Los efectos más obvios de los cambios en el volumen celular son

mecánicos, ya que la función de las neuronas depende de su arquitectura y estratificación. A nivel funcional, una modificación en el contenido de agua puede alterar las reacciones metabólicas a través de los cambios que ocurren en las concentraciones de enzimas y sustratos (O'Neill, 1999), así como en los mecanismos de señalización que están a cargo de la comunicación intercelular.

El volumen intracraneal tiene cuatro compartimientos, a saber: volumen de sangre, volumen extracelular, volumen intracelular y volumen del fluido cerebroespinal. Debido a que el cráneo es rígido no provee espacio para la expansión, así que un incremento en el volumen de cualquiera de los compartimientos debe ser acompañado por una disminución recíproca en el volumen total de los tres restantes. Cabe resaltar que el volumen intracraneal más grande, el intracelular, ha sido el menos estudiado. Los cambios que ocurren en este último pueden ser de aumento (edema) o reducción.

Los estados patológicos que provocan una reducción en el volumen cerebral del compartimiento intracelular son principalmente los estados que inducen hiperosmolaridad en el plasma, los cuales incluyen: hipernatremia, hiperglicemia, diarrea severa, falla renal, diabetes mellitus, diabetes insipidus, diuresis osmótica con deshidratación y deshidratación.

En la hipernatremia, cuando los cambios en la osmolaridad del plasma son agudos, los mecanismos de restauración del volumen dependen del transporte de electrolitos, mientras que cuando los cambios son crónicos, los mecanismos involucran la acumulación lenta de solutos orgánicos, que ya han sido mencionados y que incluyen aminoácidos, polioles, metilaminas y moléculas orgánicas pequeñas que no perturban la función celular a altas concentraciones (McManus y Churchwell, 1994).

Los cambios en el volumen del compartimiento intracelular que involucran un aumento, llevan al edema celular, el cual tiene dos orígenes: citotóxico y

anisotónico (McManus y Churchwell, 1994). Mientras que en el edema anisotónico si hay corrección del volumen posiblemente a través de mecanismos similares al DRV, no parece que haya esta regulación en el edema citotóxico. Esto podría deberse a que en este tipo de daño los sistemas de transporte encargados de regular el volumen, principalmente los flujos de Cl^- , están funcionando a la inversa, ya que debido a la despolarización que implica la acumulación de Na^+ hay una entrada continua de Cl^- a la célula. En estas condiciones, es posible que la liberación de los aminoácidos no sea suficiente para lograr una regulación de volumen, aunque si podría reducir la magnitud del edema.

El edema celular cerebral citotóxico involucra daño celular; las patologías a las que se asocia son: isquemia, trauma craneal, episodios de hipoxia y anoxia. Los cambios en el volumen celular cerebral que ocurren por cambios en la tonicidad del plasma, no implican daño celular primario. Sin embargo, las alteraciones anisotónicas en el volumen producen morbilidad y mortalidad importante. Las secuelas clínicas asociadas a las alteraciones anisotónicas en el volumen son daño focal neurológico y edema cerebral severo, el cual lleva a coma y muerte.

La causa principal de edema anisotónico es la hipotonicidad del plasma, la cual puede deberse a hiponatremia de distintos orígenes o a hipoglucemia. Se considera una condición hiponatrémica cuando la concentración de Na^+ en plasma alcanza valores iguales o menores a 130 mEq/l. La hiponatremia se desarrolla cuando el consumo de agua sobrepasa la capacidad del riñón de excretarla (intoxicación por agua), o cuando la pérdida de cationes monovalentes sobrepasa su consumo (Na^+ y K^+ fundamentalmente) (Fraser y Allen, 1997). Esto trae como consecuencia la disminución de la concentración de Na^+ en el plasma y por tanto, una reducción en su osmolaridad. El desequilibrio osmótico entre el plasma y el fluido extracelular cerebral, provoca la entrada de agua al espacio intersticial y la reducción osmolar del medio, generando edema celular y cerebral.

La hiponatremia se define como una disminución en la concentración de Na^+ en plasma por debajo del valor normal y está asociada a desordenes tales como insuficiencia renal, falla hepática, falla cardíaca e intoxicación por agua como ocurre en ciertos estados psicóticos (Fraser y Allen, 1997). La hiponatremia es un desequilibrio en la distribución de fluidos corporales y de los electrolitos disueltos en ellos, debido principalmente a la retención excesiva de agua y en ocasiones a una baja reabsorción de sodio. La disminución en la concentración de sodio de los fluidos genera medios hiposmóticos, los cuales provocan hinchamiento celular, el cual es corregido por mecanismos compensatorios que contrarrestan eficientemente el edema celular, mientras que otros corrigen los niveles de Na^+ en plasma. No obstante, las secuelas más importantes debidas a este trastorno ocurren cuando se involucra al sistema nervioso central, ya que los límites a la expansión impuestos por el cráneo da márgenes limitados para el amortiguamiento de los cambios en el volumen intracraneal y a medida que la presión aumenta, el desplazamiento caudal del parénquima cerebral a través del *foramen magnum* puede conducir a la muerte por paro respiratorio y cardíaco (Pasantes-Morales, 1996).

Una causa importante de hiponatremia es el síndrome de secreción inapropiada de vasopresina, también conocida como hormona antidiurética (ADH). Esta hormona es la principal responsable en la regulación del agua del cuerpo. Se sintetiza en los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo y se almacena para su liberación en la glándula hipófisis. Dos estímulos primarios provocan la liberación de la ADH: un aumento en la osmolaridad del plasma y una disminución en el volumen intravascular (Share, 1996). El efecto de la hormona liberada es la retención del agua ingerida, lo que provoca una disminución en la osmolaridad del plasma y la recuperación del volumen plasmático. Una vez que estos parámetros alcanzan sus valores normales, la liberación de ADH se inhibe y cualquier exceso en la ingesta de agua es eliminado en forma de orina. Otros factores diferentes de la elevación en la osmolaridad del plasma y la hipovolemia pueden ocasionar la liberación de la ADH con los subsecuentes efectos en la

osmolaridad y volumen del plasma. El incremento en los niveles de la ADH en estas circunstancias es referida como síndrome de secreción inapropiada de la hormona antidiurética. Los pacientes que desarrollan este síndrome presentan hiposmolaridad en el volumen intravascular y disminuciones en los niveles plasmáticos de Na^+ , urea, ácido úrico y creatinina (Fraser y Arieff, 1997).

La hiponatremia o la hipotonicidad del plasma impone un gradiente osmótico a los compartimentos de volumen intracraneal, promoviendo eventualmente edema celular cerebral. Ante esta situación, las células cerebrales activan la salida de electrolitos y osmolitos orgánicos. La primera respuesta consiste en la liberación rápida de Na^+ , K^+ y Cl^- , la cual es detectable dentro de 3-24 h del inicio de la hiponatremia y provee un mecanismo para contrarrestar el edema cerebral (Melton *et al.*, 1987). Después, se observa un descenso en los niveles celulares de osmolitos orgánicos (Thurston *et al.*, 1980; Tratchman *et al.*, 1991; Lien *et al.*, 1991; Verbalis y Gullans, 1991; Sterns *et al.*, 1993). Los osmolitos orgánicos que predominantemente contribuyen a corregir el volumen cerebral en respuesta a la hiponatremia son aminoácidos (taurina, glutamato, aspartato, glutamina y GABA), *myo*-inositol, creatina y N-acetil aspartato. La disminución en los osmolitos orgánicos ocurre a los dos días del curso de la hiponatremia y su contenido permanece a niveles reducidos durante el tiempo que la condición osmótica permanezca alterada.

El porcentaje de disminución de los osmolitos orgánicos es de 50-80 %, el cual excede el de los electrolitos de 10-30 %, pero debido a que los electrolitos están más concentrados en el cerebro, su contribución al DRV es más grande (60-70 %) que la de los osmolitos orgánicos (30-40 %) (Thurston *et al.*, 1987; Lien *et al.*, 1991).

Mecanismos celulares

El DRV ha sido ampliamente investigado en células cerebrales en cultivo, tanto en neuronas (Pasantes-Morales *et al.*, 1994) como en células gliales (Kimelberg y

Frangakis, 1986; Olson *et al.*, 1986; Pasantes-Morales y Schousboe, 1988; Bender *et al.*, 1992). Además, se ha estudiado en líneas celulares cerebrales (Falke y Misler, 1989; Medrano y Gruenstein, 1993; Lohr y Yohe, 1994). La regulación de volumen en neuronas y astrocitos en cultivo es un proceso que ocurre de manera rápida, y se concluye dentro de 15-30 minutos (Pasantes-Morales, 1994; 1994b). La fase de hinchamiento mostrada por las células expuestas a soluciones hiposmóticas es seguida por una rápida de disminución en el volumen celular, la cual ocurre aún cuando persisten las condiciones hiposmóticas. La eficiencia del DRV está relacionada con la severidad del estímulo osmótico impuesto; es parcial en soluciones muy hiposmóticas y total en soluciones de baja hiposmolaridad. El DRV es independiente de temperatura y de Na^+ . Este proceso no se afecta por inhibidores de los cotransportadores de osmolitos orgánicos e inorgánicos tales como furosemida, bumetanida y florizina, pero es sensible a bloqueadores de canales, particularmente de aquellos que afectan a los canales de cloro; entre ellos están: el ácido 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino) benzoico (NPPB), la 1,9-dideoxiforskolina (DDF), el dipiridamol y el ácido niflúmico (Pasantes-Morales, 1994b). El DRV es insensible a los inhibidores comunes de los canales de K^+ , tales como: bario, 4-aminopiridina y tetraetilamonio (TEA). Únicamente la quinidina muestra un efecto inhibitorio (Pasantes-Morales, 1994b). Los ácidos grasos poli-insaturados, ácidos araquidónico, linoléico y linolénico están entre los más potentes inhibidores del DRV, pero este efecto no está mediado por el metabolismo del ácido araquidónico (McManus *et al.*, 1994; Sánchez-Olea *et al.*, 1995). La dependencia al Cl^- del DRV se ha observado en una línea celular C6 pero no en neuronas ni astrocitos (Pasantes-Morales *et al.*, 1993; 1994b), lo que sugiere que la permeabilidad al Cl^- en condiciones isosmóticas es baja. Durante el hinchamiento, la permeabilidad al cloro aumenta y la permeabilidad al K^+ es limitante para el DRV, ya que cuando se abre una ruta alterna para el K^+ con gramicidina (en ausencia de Na^+), se observa una aceleración en el DRV.

Los osmolitos liberados durante el DRV en neuronas y células gliales en cultivo son esencialmente los mismos que *in vivo*, K^+ , Cl^- , aminoácidos y *myo*-inositol. Sin embargo, la diferencia en el curso temporal entre el flujo de electrolitos y osmolitos orgánicos observada *in vivo* no ocurre en células en cultivo. La liberación de aminoácidos en neuronas y astrocitos (Pasantes-Morales y Schousboe, 1988) es rápida y sigue al curso temporal del DRV. La liberación de Cl^- también es rápida, mientras que la de K^+ y *myo*-inositol es más lenta, pero también ocurre en el curso de minutos (Sánchez-Olea *et al.*, 1993; Strange *et al.*, 1993; González *et al.*, 1995). La liberación de taurina y otros aminoácidos, en rebanadas de cerebro expuestas a un medio hiposmótico, también ocurre de manera rápida (Law, 1995).

La liberación de taurina y *myo*-inositol estimulada por hinchamiento en neuronas y astrocitos ocurre a través de una vía difusional y no involucra al cotransporte dependiente de Na^+ (Sánchez-Olea *et al.* 1991; Strange *et al.*, 1993). Esta vía difusional para osmolitos orgánicos podría ser un canal aniónico, como se discutió en la sección general correspondiente. En general, la liberación de K^+ y Cl^- en neuronas y astrocitos ocurre a través de los mismos mecanismos y canales ya descritos anteriormente.

REGULACIÓN ISOVOLÚMICA

En un estudio realizado por Lohr y Grantham (1986) en células renales, se demostró que las células son capaces de mantener constante su volumen al ser expuestas a condiciones anisomóticas, siempre que el cambio en la osmolaridad externa ocurriera de forma gradual, manteniéndose éste dentro de ciertos límites. A este nuevo tipo de regulación de volumen se le llamó regulación isovolúmica (RIV) (Fig. 2). En este tipo de regulación, las células pierden solutos intracelulares cuando los cambios en la osmolaridad externa son decrecientes (el medio se hace hiposmótico) y ganan solutos intracelulares cuando los cambios son crecientes (el medio se hace hiperosmótico).

En condiciones hiperosmóticas, los osmolitos internalizados por la célula, que le permiten mantener constante su volumen, son Na^+ , K^+ y Cl^- , mediante el cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ y la ATPasa Na^+/K^+ (Mountain y Van Driessche, 1997). En condiciones hiposmóticas, los mecanismos de transporte que llevan a cabo la regulación aún no están bien definidos (Lohr, 1990; Van Driessche *et al.*, 1997). Más aún, no todos los tipos celulares presentan regulación isovolúmica en condiciones hiposmóticas, ya que en un estudio llevado a cabo por Godart (1999) en eritrocitos, se demostró que este tipo celular no exhibe regulación isovolúmica aún cuando la velocidad de cambio en la osmolaridad externa es muy pequeña (0.7 mOsm/min.). En los eritrocitos expuestos a estas condiciones se activó la salida de K^+ y taurina que, sin embargo, no fue suficiente para contrarrestar la entrada de agua debida al gradiente osmótico impuesto.

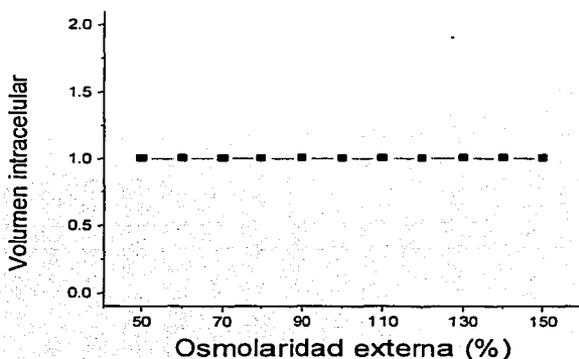


Figura 2. *Regulación isovolúmica.* Cambios graduales y continuos en la osmolaridad externa ($\pm 50\%$) no afectan el volumen celular.

Mientras que los mecanismos de regulación en el DRV y en el IRV están bien caracterizados, los mecanismos de la regulación isovolúmica aún no están

esclarecidos; además, este tipo de regulación sólo ha sido estudiado en células de túbulo proximales y en una línea celular de nefrona (A6) (Lohr, 1990; Van Driessche *et al.*, 1997).

La regulación isovolúmica en cerebro sólo se ha estudiado en la línea celular C6 (glioma de rata) ante condiciones hiperosmóticas. El mecanismo de regulación en este sistema involucra la captura de iones por medio de la bomba Na^+/K^+ y del cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ (Mountian y Van Driessche, 1997).

Entender los mecanismos responsables de la RIV es muy importante, ya que estas condiciones experimentales pueden reflejar más de cerca los cambios que ocurren en el volumen celular en condiciones fisiológicas. Más aún, también podría considerarse como un modelo de estudio para situaciones patológicas en donde los cambios en la osmolaridad ocurren de manera lenta y no súbita, como ocurre en el modelo de IRV y DRV. Con estos antecedentes, el presente trabajo tiene por objeto identificar los mecanismos que sustentan la RIV en células nerviosas, en particular en las neuronas.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si las células granulares de cerebelo en cultivo presentan regulación isovolúmica, así como los mecanismos involucrados en este proceso de regulación.

Objetivos específicos

- I. Examinar la presencia de regulación isovolúmica en neuronas en cultivo.
- II. Caracterizar los flujos de K^+ y Cl^- en este proceso.
- III. Caracterizar farmacológicamente la vía de movilización del K^+ .
- IV. Determinar la importancia relativa de los flujos de K^+ activados en la RIV.
- V. Determinar la contribución de vías de transporte aniónicas al proceso de regulación.

METODOLOGÍA

SOLUCIONES

Las soluciones isosmóticas (300 mOsm/l) utilizadas como medio de perfusión tienen la siguiente composición en mM: 135 NaCl, 4.7 KCl, 1 CaCl₂, 1.17 MgSO₄, 1.7 KH₂PO₄, 5 Dextrosa y 10 HEPES (pH 7.4). Las soluciones hiposmóticas 30 % (210 mOsm/l) y 50 % (150 mOsm/l) se prepararon reduciendo la concentración de NaCl. Las soluciones hiperosmóticas 30 % (390 mOsm/l) y 50 % (450 mOsm/l) se prepararon aumentando la concentración de NaCl. La osmolaridad final de los medios se verificó con un osmómetro de punto de congelación (Osmette A, Precision Systems Inc., Natick, MA).

CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS GRANULARES DE CEREBELO

Los cultivos primarios de células granulares de cerebelo (CGC) de rata se obtuvieron de acuerdo a la técnica descrita por Morán y Patel (1989). Una vez realizada la decapitación de las ratas, el cerebelo se disecó y las células se disociaron con tripsina. Las suspensiones de células disociadas del cerebelo de ratas Wistar de 8 días de nacidas se sembraron a una densidad de 265×10^3 células/cm² en cajas petri de plástico de 35 mm, previamente cubiertas con poli-L-lisina (5 µg/ml), para permitir su adherencia. El medio de cultivo es el Medio Basal Eagle (Sigma, St Louis, MO) suplementado con 10 % de suero fetal bovino inactivado por calor, 2mM de glutamina, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin. Los cultivos celulares se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ (5 %) y aire saturado con vapor de agua (95 %). El enriquecimiento en neuronas de los cultivos utilizados se determinó por inmunofluorescencia, contando células positivas a enolasa específica de neuronas y a la proteína ácida

fibrilar glial (GFAP) (Dakkopatts, Carpinteria, CA). La proporción de neuronas en estos cultivos fue de 95-97 % y la de células gliales de 2-4 %. Las neuronas se utilizaron después de un día *in vitro*. Para las medidas de volumen celular, las neuronas granulares se sembraron en cubreobjetos a baja densidad (200×10^3 células/cm²).

GRADIENTE OSMÓTICO. SISTEMA DE PERFUSIÓN

El método utilizado para generar un gradiente osmótico (cambio gradual en la osmolaridad a una determinada tasa) fue un sistema de vasos comunicantes similar al descrito por Lohr y Grantham, 1986 (Fig. 3).

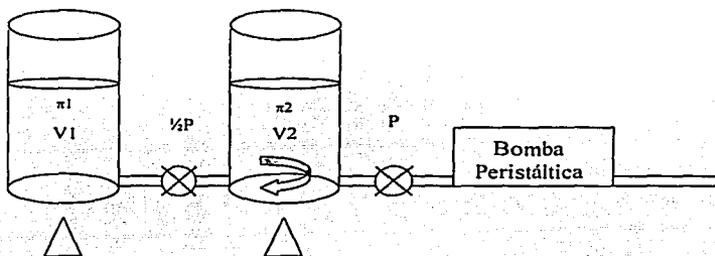


Figura 3. Sistema de vasos comunicantes que genera un gradiente osmótico. π_1 , osmolaridad del vaso 1 (V_1) 150 mOsm/l; π_2 , osmolaridad del vaso 2 (V_2); P, velocidad de perfusión de la bomba peristáltica (2 ml/min); $\frac{1}{2}P$, la mitad de la velocidad de perfusión de la bomba peristáltica; X, válvula de interrupción.

Este sistema consta de dos vasos de vidrio idénticos interconectados entre sí, uno de los cuales contiene medio isosmótico (MI) y el otro, la misma cantidad de medio hiposmótico (MH) 50 %. El medio se mantuvo a 39 °C, colocando los vasos en planchas a temperatura constante y con agitación magnética. El medio

de perfusión del primer contenedor se succiona con una bomba peristáltica, produciendo que el medio hiposmótico entre a este cilindro, mezclándose gradual y continuamente con el medio isosmótico. De esta manera, se produce un gradiente de osmolaridad en el cual, al final del experimento (82 min después) se alcanzaron 150 mOsm.

Para probar este sistema, se colectaron muestras cada minuto del medio profundido y se les midió la osmolaridad con un osmómetro de punto de congelación. Se obtuvo una curva osmolaridad contra tiempo, a partir de la cual se calculó la tasa de cambio del sistema. Se calculó la tasa de cambio teórica para el sistema, con la ecuación establecida por Van Driessche, *et al.* (1997):

$$\pi_v = \pi_2 = - (\pi_2^0 - \pi_1) (P/2V_0) t + \pi_2^0$$

Donde:

π_v es la osmolaridad de la muestra colectada al tiempo t

π_2 es la osmolaridad del vaso 2 y es igual a π_v

π_2^0 es la osmolaridad inicial del vaso 2 (300 mOsm/l)

π_1 es la osmolaridad del vaso 1, la cual no cambia (150 mOsm/l)

P es la velocidad de perfusión de la bomba peristáltica (2 ml/min)

y V_0 es el volumen inicial de cualquiera de los vasos (375 ml).

La tasa de cambio experimental fue de -1.74 ± 0.015 mOsm/min, similar a la esperada de -1.8 mOsm/min.

LIBERACIÓN DE IONES

^{86}Rb

Las células en cultivo se incubaron a 37°C en el medio de cultivo con $1.0 \mu\text{Ci/ml}$ de ^{86}Rb , como trazador de los flujos de K^+ , durante 60 min. Después del periodo

de incubación, las cajas de cultivo se perfundieron durante 18 min a una velocidad de 2 ml/min, por medio de una bomba peristáltica, con MI para eliminar la radiactividad no internalizada celularmente. Después de este periodo, se alcanzó una liberación basal (6 min) y se colectaron muestras cada minuto. Inmediatamente después, los cultivos celulares fueron perfundidos bajo el gradiente osmótico (Fig. 4) durante 82 min hasta alcanzar una hiposmolaridad del 50 %. Se colectaron muestras cada minuto y la radiactividad se cuantificó por medio de un contador de centelleo líquido (LS 6000SC, Beckman, CA) a través de la interacción con líquido de centelleo (tritosol). Se obtuvo el número de cuentas por min y los datos se expresaron como tasa constante de liberación, la cual representa la cantidad de radiactividad liberada en una fracción dada dividida por la cantidad total de marca presente en las células en ese momento.

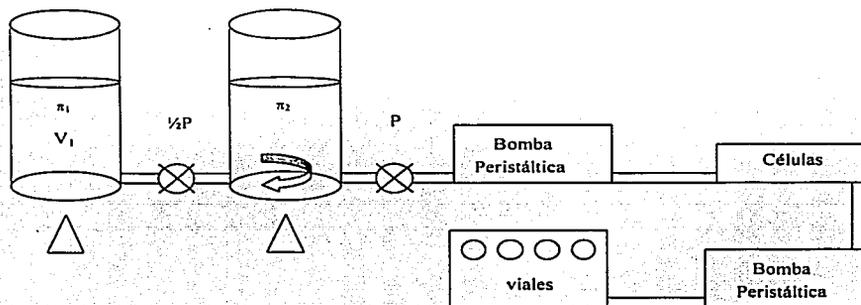


Figura 4. Sistema de perfusión. Las células fueron perfundidas bajo el gradiente osmótico, el medio se colectó en viales.

125I

Los cultivos se incubaron durante 15 min con 5.0 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^{125}I , como trazador de los flujos de Cl^- . Se lavaron durante 5 min y se obtuvo una basal de liberación. A partir de aquí, las muestras se colectaron cada minuto y después de 5 minutos de

liberación basal, la osmolaridad de la perfusión se redujo linealmente a una tasa de -1.74 mOsm/min con el sistema de vasos comunicantes. La cantidad de radiactividad de las muestras se cuantificaron por medio de un contador de radiación gamma. Los datos se expresan como tasa constante de liberación (c) y se calcularon utilizando la ecuación desarrollada por Venglarik, *et al.* (1990):

$$c = [\ln(C_1) - \ln(C_2)] / (t_1 - t_2)$$

donde C_1 y C_2 son el porcentaje de cuentas que permanecen en la monocapa celular a los tiempos 1 (t_1) y 2 (t_2).

EFFECTO DE LOS INHIBIDORES DE CANALES DE K^+ SOBRE LA LIBERACIÓN DE ^{86}Rb

Los inhibidores de canales de K^+ , tales como: 4-AP (1 mM), TEA (10 mM), Caribdotoxina (20 nM), Cs^{2+} (5 mM), Gd^{3+} (25 μ M) y Ba^{2+} (5, 10 y 15 mM), se probaron sobre la liberación de ^{86}Rb estimulada por el gradiente hiposmótico. Los fármacos estuvieron presentes todo el tiempo de perfusión.

DETERMINACIÓN DE POTASIO ENDÓGENO

Cambio gradual en la osmolaridad

Las células se estimularon con medio isosmótico o bajo el gradiente hiposmótico y se les retiró totalmente el medio extracelular. Para eliminar cualquier residuo de K^+ extracelular, las cajas de cultivo se lavaron 2 veces con 1 ml de medio isosmótico (control) o hiposmótico 50% (gradiente). Se desprendieron de la caja con 0.5 ml de H_2O doble destilada (H_2O dd) y se lavaron con 0.5 ml de H_2O dd para recuperar cualquier resto celular. El extracto celular se sonicó 10 s para homogeneizar la muestra. Se tomó una alícuota de 0.1 ml para cuantificar la cantidad de proteína por la técnica de Bradford. A los 0.9 ml restantes se les agregó 4.1 ml de HCl (0.1 N) y se hirvieron durante 30 min para lisar todas las

membranas celulares. Las muestras se filtraron a través de un poro de 0.22μ y el contenido de K^+ se determinó por medio de Espectrofotometría de Absorción Atómica (Varian 460). Los datos se expresan como $\mu\text{mol } K^+/\text{mg proteína}$.

Cambio súbito en la osmolaridad

A las células en cultivo se les retiró este medio y se les agregó 1 ml de MKN isosmótico o 50% hiposmótico. Se perfundieron 15 min con medio isosmótico o hiposmótico (50%), respectivamente. Después del periodo de perfusión, las células se mantuvieron libres de medio. El contenido de K^+ se cuantificó como se describió en el párrafo anterior.

CUANTIFICACIÓN DE CAMBIOS EN EL VOLUMEN CELULAR

Principio básico

Los cambios en el volumen celular se determinaron por medio de una técnica espectrofluorométrica basada en la descrita por Alvarez-Leefmans y colaboradores (1995) y por Crowe y colaboradores (1995). El principio básico de la técnica es la medida de cambios en el volumen de agua de las células (VAC) cuantificando los cambios en la concentración de sustancias impermeantes fluorescentes (Alvarez-Leefmans, *et al.*, 1995). Los cambios en el VAC se estiman a partir de cambios en la intensidad de la fluorescencia de la marca, los cuales resultan de los cambios en su concentración intracelular.

Medición de la fluorescencia

Las CGC sembradas en cubreobjetos se colocaron en una cámara de perfusión (RC-25, Warner Instrument Corp, CT) y se incubaron en MI con calceína-AM ($1 \mu\text{M}$), durante 15 min a temperatura ambiente. Se lavaron varias veces con MKN_i durante 2 min. La cámara de perfusión se colocó en un microscopio invertido de epifluorescencia (Nikon Diaphot TMD, Nikon Corp., Japan), equipado con un

objetivo fluorescencia para aceite de inmersión (40X, AN 1.3; Nikon) y acoplado a un espectrofluorómetro (Fig. 5). Las células se iluminaron con una lámpara de arco de Xe a 497 nm de excitación, a través de un filtro de aire. La luz llegó al objetivo a través de un cubo equipado con un espejo dicromático (515 nm) y un filtro de emisión de 516-520 nm (DM510, Nikon, Japan). La fluorescencia emitida se midió y amplificó con un sistema fotométrico, la señal fotomultiplicada se digitalizó con una cámara CCD (Charge Coupled Device, c2400-87, Hamamatsu Bridgewater, NJ) acoplada a una computadora personal. Los datos se analizaron y almacenaron en la computadora con el software Biolase Imaging System (Newton, MA). Con este sistema se adquirieron las medidas de fluorescencia de pequeñas áreas situadas en células individuales.

Las células se expusieron a dos protocolos de estimulación osmótica. En el primero, diferentes cubreobjetos se perfundieron a 2ml/min, inicialmente con medio isosmótico (2 min) y después con medio hiposmótico (30% o 50%) o hiperosmótico (30% o 50%) durante 15.5 min. En el segundo protocolo, las células en cubreobjetos se perfundieron con MI a 2 ml/min y después con el gradiente osmótico (-1.8 mOsm/min) hasta alcanzar 50% de hiposmolaridad. Las imágenes se colectaron cada 10 min. En ambos protocolos, se perfundieron cubreobjetos sólo con MI como controles.

Cálculo de los cambios en el volumen celular de agua

Los cambios en el VAC se determinaron a partir de los cambios en la fluorescencia relativa de acuerdo con la siguiente ecuación (Alvarez-Leefmans, *et al.*, 1995):

$$[(F_0 / F_t) - F_{bkg}] / (1 - F_{bkg}) = V_t / V_0 \quad (1)$$

donde F_0 es la fluorescencia de una región de la célula equilibrada con medio isosmótico, teniendo una presión osmótica π_0 ; F_t es la fluorescencia de la misma región de la célula en un medio con presión osmótica π_t ; F_{bkg} es la fluorescencia

background; V_0 es el volumen de agua de la célula en un medio con presión osmótica π_i y V_0 es el volumen correspondiente de la célula en un medio con presión osmótica π_0 . La F_{bkg} incluye la fluorescencia intrínseca de la célula y el componente no sensible osmóticamente de la fluorescencia en las células marcadas. Ambos componentes de la F_{bkg} son insensibles a los cambios en la osmolaridad externa. F_{bkg} se estimó a partir de la intersección en el eje y de una curva F_0/F_i vs π_0/π_i , exponiendo diferentes cubreobjetos durante 15.5 min a medios con distintas osmolaridades (mOsm/l): 150, 180, 300, 390 y 450. Los valores de fluorescencia graficados por cada condición fueron los cambios más altos adquiridos. El valor numérico obtenido para nuestro tipo celular estudiado fue de 0.6.

Para cuantificar los cambios en el volumen celular relativo (V_i/V_0) ocasionados por el gradiente osmótico, F_0 y F_i se determinaron midiendo a diferentes tiempos la fluorescencia de células perfundidas con medio isosmótico y con el gradiente osmótico, respectivamente. Con el objeto de corregir la deriva en la señal de la fluorescencia debida al fotoblanqueo del fluoróforo, los puntos experimentales se ajustaron a una regresión lineal. Los valores de V_i/V_0 se determinaron sustituyendo en la ecuación 1 los datos corregidos de F_0 y F_i .

EFFECTO DE INHIBIDORES DE CANALES DE Cl^- Y K^+ SOBRE LA REGULACIÓN DEL VOLUMEN CELULAR

Para determinar el papel de los canales de cloro en la regulación del volumen celular de CGC expuestas a cambios graduales en la osmolaridad externa, estos se inhibieron con ácido niflúmico (600 μM). Los cambios en el volumen celular relativo se determinaron de la manera antes descrita. El inhibidor estuvo presente en el medio de perfusión. Las células perfundidas con MI en presencia del inhibidor funcionaron como control.

Los canales de K^+ en las CGC expuestas a cambios graduales en la osmolaridad se inhibieron con Ba^{2+} (15 mM). Los cambios en la relación V_t/V_0 se definieron a partir de los cambios en la fluorescencia de células estimuladas con el gradiente osmótico, de la manera ya descrita. El fármaco se disolvió en el medio de perfusión. Las células control se perfundieron con MI y Ba^{2+} .

EFFECTO DE LA SUSTITUCIÓN ANIÓNICA EN LA REGULACIÓN DEL VOLUMEN CELULAR

En estos experimentos se sustituyó el Cl^- extracelular por un compuesto impermeante. De esta manera, se depletó por completo a la célula de este ion. Se determinó el volumen celular de células depletadas y no depletadas expuestas al gradiente hiposmótico.

MATERIALES

Las diferentes sales ($NaCl$, $MgSO_4$, KCl , $CaCl_2$, KH_2PO_4 , $BaCl_2$) y la Dextrosa se obtuvieron de J.T. Baker, Méx. El ácido níflúmico ($C_{13}H_9F_3N_2O_2$), la colina ($C_5H_{14}NO \cdot Cl$) y las distintas sales de ácido glucónico ($C_6H_{11}O_7 \cdot Na$, $C_6H_{11}O_7 \cdot K$ y $C_6H_{11}O_7 \cdot 1/2Ca$) se adquirieron de SIGMA, St Louis, MO. El HEPES se obtuvo de Boehringer Mannheim, Germany. Los compuestos radiactivos (^{86}Rb y ^{125}I) se adquirieron en Amersham, UK. La calceína-AM se obtuvo de Molecular Probes, Eugene, Oregon.

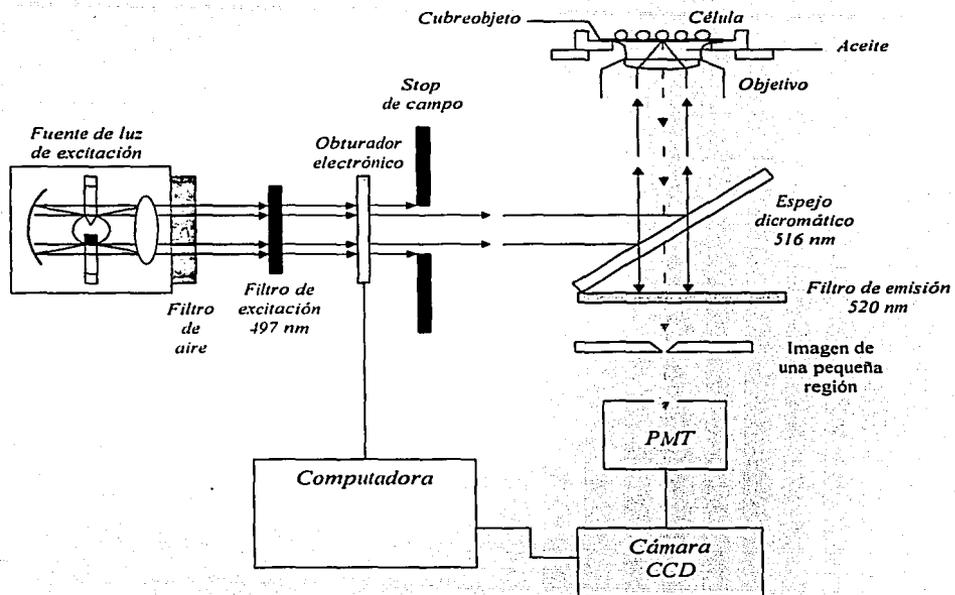


Figura 5. Espectrofluorómetro acoplado a un microscopio invertido de epifluorescencia. PMT, fotomultiplicador; Cámara CCD (Charge Coupled Device), transformador digital.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

SISTEMA GENERADOR DE UN GRADIENTE OSMÓTICO

Para validar el sistema generador de un gradiente osmótico descrito en la sección de métodos, se colectó cada fracción del medio perfundido y se les midió la osmolaridad. Con estos datos se construyó una curva osmolaridad contra tiempo (Fig. 6) y se calculó la tasa de cambio del sistema.

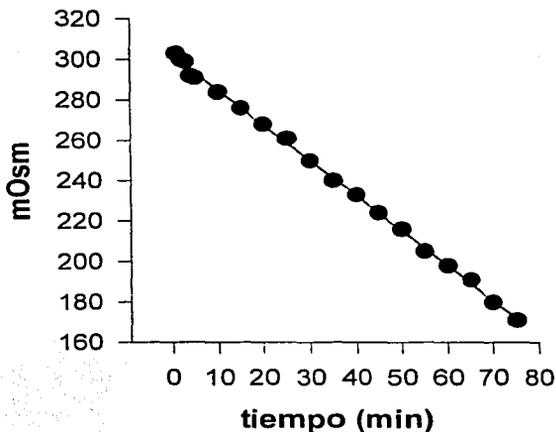


Figura 6. Cambio en la osmolaridad del medio con respecto al tiempo en el sistema de vasos comunicantes (Fig. 1). La tasa de cambio, a una velocidad de perfusión de 2 ml/min, fue de -1.74 ± 0.015 mOsm/min, mientras que la teórica fue de -1.8 mOsm/min. Al final del análisis (75 min) se alcanzan 171 mOsm correspondientes al 57% de hiposmolaridad. $r^2 = 0.999$.

La tasa de cambio de osmolaridad fue de -1.74 ± 0.015 mOsm/min, que es muy similar a la tasa de cambio teórica calculada según la ecuación de Van Driessche y colaboradores (1997) de -1.8 mOsm/min. Estos resultados validan el método para generar un gradiente osmótico, que constituye la base experimental de este trabajo.

CAMBIOS EN EL VOLUMEN CELULAR

Para examinar la presencia de regulación isovolumétrica en CGC, se determinaron los cambios en el volumen de células expuestas al gradiente osmótico, según el método espectrofluorométrico previamente descrito.

El cambio en el volumen celular (V_t/V_0) se determinó según la ecuación 1 a partir de los cambios en la fluorescencia relativa F_0/F_t de células marcadas con el calceína y sometidas al gradiente osmótico o a un medio isosmótico como control. Para calcular el cambio en el volumen celular con la ecuación 1, se determinó la F_{bkg} exponiendo diferentes células a medios con distintas osmolaridades; el valor de esta constante se estimó a partir de la intersección en el eje y de una curva F_0/F_t vs π_0/π_t (Fig. 7), y fue de 0.6.

En la figura 8 se muestran los cambios en la fluorescencia relativa de células perfundidas a 2 ml/min con medio isosmótico durante 82 min (A) o con el gradiente hiposmótico (B) a una tasa de cambio de osmolaridad de -1.8 mOsm/min, tiempo al cual se alcanzan 150mOsm/l correspondientes al 50% de disminución en la osmolaridad externa. El comportamiento de decremento de la fluorescencia observado en ambos protocolos es el mismo, y se debe probablemente al fotoblanqueo del fluoróforo. Con estos resultados de fluorescencia se resolvió la ecuación 1 y se obtuvieron los valores de volumen relativo de las células perfundidas con el gradiente osmótico (Fig. 9).

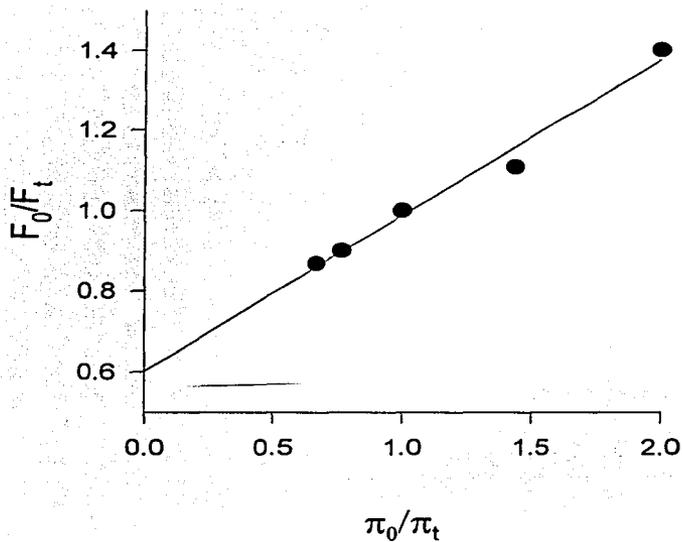


Figura 7. F_{bkg} . Relación entre la osmolaridad a la cual se estimularon las células y el cambio de fluorescencia. Las células fueron estimuladas con medios de distintas osmolaridades y se graficaron los valores de cambio de fluorescencia más altos obtenidos. $r^2 = 0.983$.

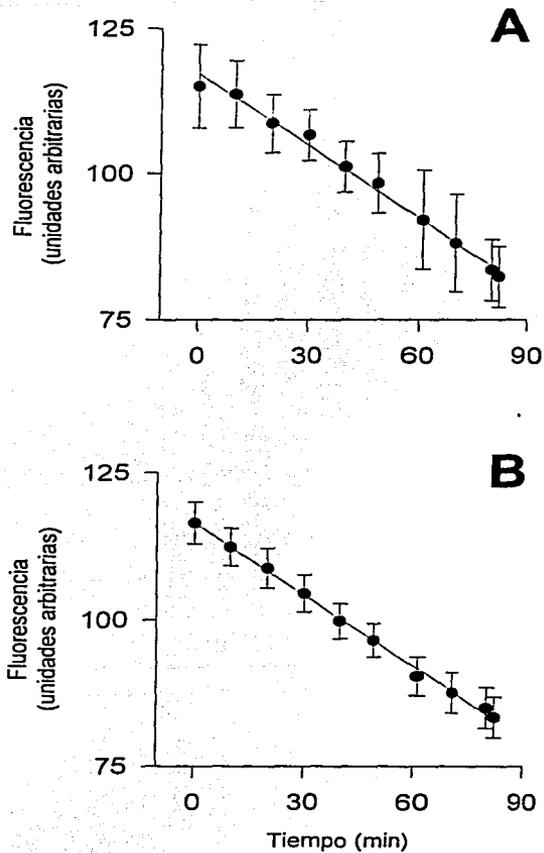


Figura 8. Datos crudos de fluorescencia de CGC cargadas con calceína-AM ($1\mu\text{M}$) y expuestas a un MI (control) (A) o expuestas al gradiente osmótico (B). Los puntos representan promedios \pm EE. Las líneas son regresiones lineales, A: $r^2= 0.991$; B: $r^2= 0.997$.

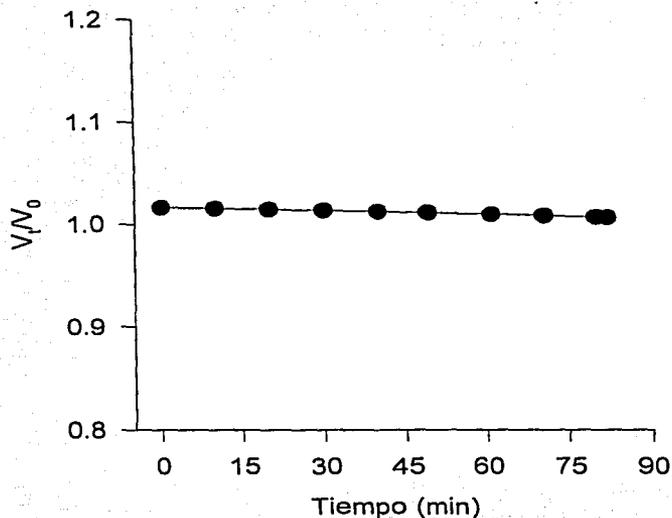


Figura 9. Cambios en el volumen celular relativo (V_t/V_0) de CGC expuestas al gradiente osmótico. La curva se construyó resolviendo la ecuación 1 con los datos mostrados en la figura 8.

Como se observa en la figura, no hay cambio en volumen aún cuando el cambio osmótico neto impuesto a la célula fue muy drástico (50%). Estos resultados demuestran la presencia de regulación isovolúmica en esta preparación y señalan por primera vez la existencia de este fenómeno en células nerviosas. Este resultado se suma a los previamente descritos para otros tipos celulares estimulados igualmente con un gradiente hiposmótico, estos son: túbulos proximales S₂ (Lohr y Grantham, 1986), línea celular renal A6 (Van

Driessche *et al.*, 1997), células C6 (Lohr y Yohe, 2000) y parcialmente en cardiomiocitos (Souza *et al.*, 2000).

LIBERACIÓN DE K^+ DURANTE LA RIV

Los movimientos de K^+ durante la regulación isovolúmica se siguieron con el trazador ^{86}Rb . Las células se incubaron con el trazador y se lavaron. Fueron perfundidas a 2 ml/min con MI isosmótico durante 5 minutos para obtener una liberación basal constante. Después se perfundieron con el gradiente osmótico durante 82 min a una tasa de cambio de -1.8 mOsm/min hasta alcanzar un 50% de hiposmolaridad. Los controles se perfundieron todo el tiempo con MI. Los datos se expresaron como constantes de liberación (Fig. 10).

En la figura se observa que la liberación de ^{86}Rb estimulada con el gradiente osmótico permaneció sin cambio con respecto a la liberación basal hasta que se alcanzaron 212 mOsm/l (-29% de osmolaridad). A partir de este punto, la liberación de ^{86}Rb aumentó progresivamente y no mostró inactivación durante el tiempo que dura el experimento. Al final del mismo, cuando la osmolaridad externa disminuye 50% (150 mOsm/l) la tasa de liberación del ^{86}Rb fue 2 veces más grande que la de medio isosmótico.

Se determinó la disminución en concentración de K^+ endógeno de células expuestas al gradiente osmótico (Fig. 11). Estos resultados están en concordancia con los datos generados por medio del trazador radiactivo. El contenido de K^+ permaneció igual que en la condición control (MI) hasta que se alcanzaron 212 mOsm/l (29% de reducción en la osmolaridad externa), es decir, justo antes del umbral de activación de la liberación de ^{86}Rb . Al final de la perfusión, cuando la osmolaridad ha alcanzado 150 mOsm/l, el contenido de K^+ disminuye de 1.44 a 1.08 $\mu\text{mol/mg}$ proteína, es decir, disminuye 25%.

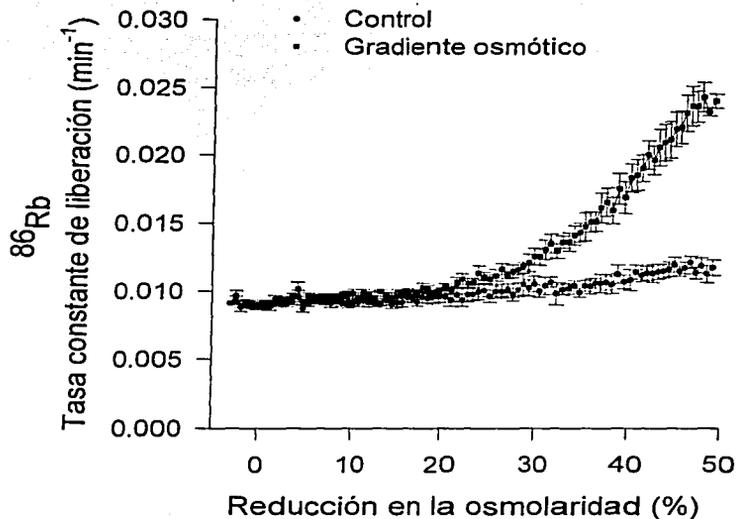


Figura 10. Liberación de ^{86}Rb estimulada por el gradiente osmótico. Las células se incubaron con el trazador radiactivo y se lavaron. Se perfundieron a 2 ml/min con MI durante 5 minutos para obtener una liberación basal estable. Se estimularon con el gradiente osmótico (■) a una tasa de cambio de -1.8 mOsm/min, hasta alcanzar una disminución en la osmolaridad externa de 50%. Los controles (●) se perfundieron todo el tiempo con MI. Los datos se expresaron como tasa constante de liberación. Los puntos representan promedios \pm EE (n=8).

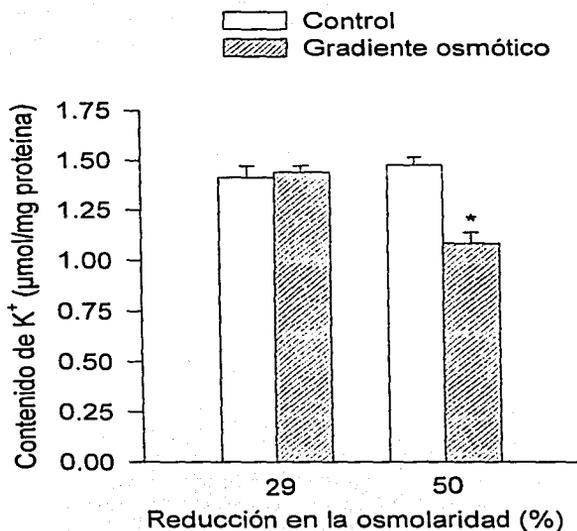


Figura 11. Cambios en el contenido de K^+ de CGC expuestas al gradiente osmótico. Las células fueron perfundidas con el gradiente osmótico y la concentración de K^+ intracelular se determinó a 29% de reducción en la osmolaridad externa (correspondiente al umbral de liberación de ^{86}Rb) y a 50% (al final del experimento). El contenido de K^+ se determinó por espectrometría de absorción atómica. Los barras representan promedios \pm SE (n=6). * $p < 0.005$, prueba de t de student.

Se caracterizó farmacológicamente la liberación de ^{86}Rb estimulada por el gradiente osmótico. Esta liberación fue insensible a TEA (10 mM), 4-AP (1 mM), charybdotoxina (20 nM), cesio (5 mM) y gadolinio (10 μM). El bario a concentraciones de 5-10 mM (datos no mostrados) no tuvo efecto, pero inhibió totalmente la salida de ^{86}Rb cuando la concentración se elevó a 15 mM (Fig. 12).

Los datos presentados de liberación de ^{86}Rb y de disminución en la concentración intracelular de K^+ de CGC ante el gradiente osmótico, indican una movilización importante de este ion durante la regulación isovolúmica. Estudios realizados en una línea celular de nefrona (A6) y en cardiomiocitos también demuestran la participación de K^+ en la RIV (Van Driessche *et al.*, 1997; Souza *et al.*, 2000). Sin embargo, el movimiento de este osmolito parece participar en la RIV, sólo en la última parte del proceso de regulación, como es patente por el umbral retardado de liberación del trazador radiactivo y la disminución de los niveles intracelulares de K^+ sólo una vez que se ha alcanzado éste (29% de reducción en la osmolaridad externa). Similares a estos resultados están los obtenidos en la línea celular A6 (Van Driessche *et al.*, 1997) y en miocitos (Souza *et al.*, 2000), en donde se encuentra que la liberación de K^+ es retrasada y se observan disminuciones del contenido celular de K^+ de 29%, muy similares a las obtenidas en CGC.

Con respecto a la caracterización farmacológica de la liberación de ^{86}Rb estimulada por el gradiente osmótico, se utilizaron inhibidores generales de los canales de K^+ : TEA, 4-AP, charybdotoxina, cesio, gadolinio y bario. De todos estos, sólo el bario a una concentración de 15 mM, mostró un efecto inhibitorio sobre la liberación de ^{86}Rb . Cabe mencionar que la utilización de inhibidores para caracterizar farmacológicamente la vía de liberación de K^+ sólo se ha efectuado en este estudio. Aunque en el estudio de las células A6 (Van Driessche *et al.*, 1997) se utilizó Ba^{2+} para bloquear el flujo de ^{86}Rb , el cual se inhibió sólo parcialmente utilizando una concentración muy alta (30 mM) y por experimentos

de sustitución aniónica, parece ser que el cotransportador K^+/Cl^- es el que lleva a cabo la extrusión del K^+ , más que un canal de este catión.

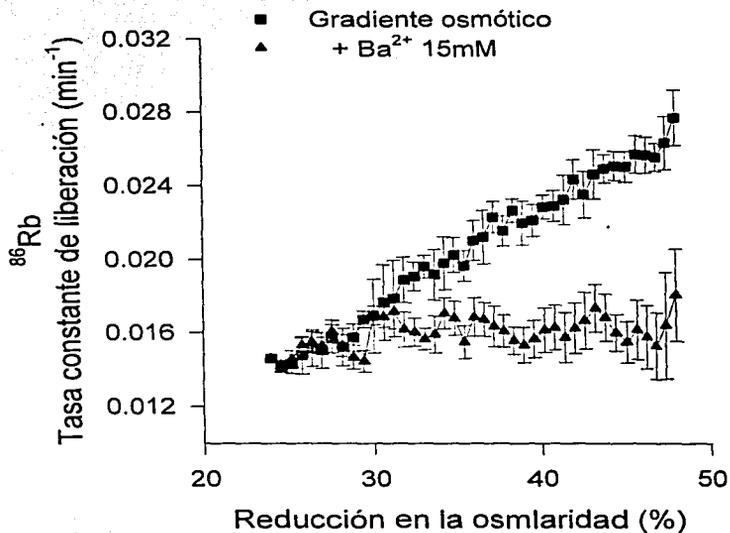


Figura 12. Efecto de Ba^{2+} (15 mM) sobre la liberación de ^{86}Rb estimulada por el gradiente osmótico. Las células se incubaron con el trazador radiactivo, se lavaron y perfundieron a 2 ml/min con el gradiente osmótico a una tasa de cambio de -1.8 mOsm/l, hasta alcanzar 50% de reducción en la osmolaridad externa. Los puntos se graficaron a partir del 24% de esta y son promedios \pm EE ($n=4$). Los controles se perfundieron con el gradiente osmótico (■) y los experimentales se perfundieron bajo el gradiente osmótico más Ba^{2+} 15 mM (▲).

El perfil de sensibilidad farmacológica de la liberación de K^+ de CGC expuestas a un gradiente osmótico es muy parecido al mostrado cuando estas células se exponen súbitamente a una solución 50% hiposmótica (Morales-Mulia *et al*, 1998). Ambas liberaciones son insensibles a TEA, 4-AP, carybdotoxina y gadolinio. También son sensibles a bario, pero en el protocolo gradual, este inhibe totalmente el flujo a una alta concentración (15 mM); en el protocolo de cambio súbito, la liberación se inhibe sólo un 30% a una concentración de 5 mM. Otra diferencia entre ambos protocolos es que la liberación de K^+ en el cambio gradual es insensible a cesio, mientras que en el cambio súbito se inhibe un 12%. Estos resultados indican que la vía de movilización de K^+ de CGC ante un estrés hiposmótico es muy parecida, no importando si el cambio sucede lenta o abruptamente.

LIBERACIÓN DE Cl^- DURANTE LA RIV

La liberación de K^+ debe acompañarse por un anión para mantener la neutralidad eléctrica y permitir su salida. El anión acompañante podría ser Cl^- , por lo que se caracterizó el movimiento de este ion ante el gradiente osmótico, utilizando el trazador radiactivo ^{125}I . En la figura 13 se observa una clara y continua liberación del trazador en condiciones basales (MI). Ante el gradiente osmótico, la liberación del trazador radiactivo fue diferente de la de MI sólo hasta que se alcanzaron 225 mOsm/l, es decir, cuando la osmolaridad del medio externo disminuyó un 25%. Al final del experimento, cuando se han alcanzado 150 mOsm/l (una disminución del 50% en la osmolaridad externa), la liberación de ^{125}I fue tres veces mayor que la que ocurre en MI. Aunque esta liberación de Cl^- ocurre en la fase tardía de la RIV, se presenta antes que la de K^+ . Cabe mencionar que la liberación de Cl^- ante un gradiente osmótico no había sido examinada en ningún otro tipo celular.

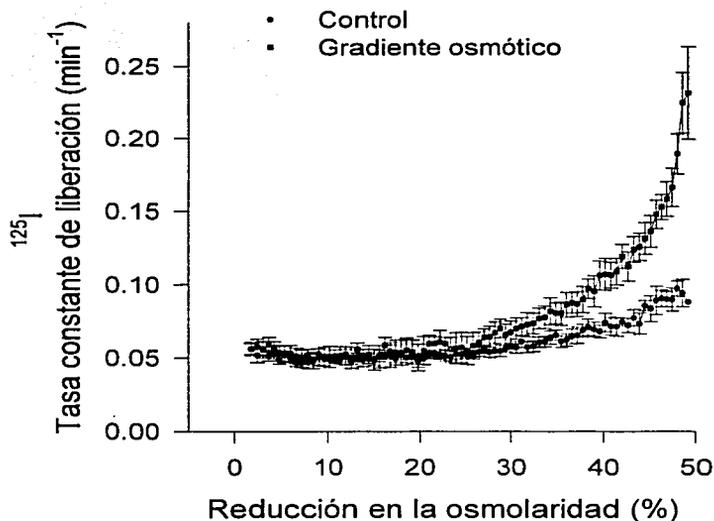


Figura 13. Liberación de ^{125}I inducida por el gradiente osmótico. Las CGC se incubaron con el trazador radiactivo y se lavaron. Se perfundieron a 2 ml/min durante 82 min a una tasa de cambio en la osmolaridad de -1.8 mOsm/min, tiempo al cual se alcanzó un decremento de 50% en la osmolaridad externa (■). Los controles se perfundieron todo el tiempo con MI (●). Los puntos representan promedios \pm EE (n=4).

Por otro lado, se probó el efecto del ácido niflúmico 600 μM en la liberación de ^{125}I estimulada por el gradiente osmótico. Se ha visto que este ácido es un potente inhibidor de la liberación de ^{125}I y taurina osmosensible en neuronas granulares de cerebelo, en modelos de disminución súbita en la osmolaridad (Sánchez-Olea *et al.*, 1996).

La liberación de ^{125}I de CGC estimuladas con el gradiente osmótico se inhibió completamente con ácido niflúmico a una concentración de 600 μM . Más aún, esta liberación fue inhibida por debajo del valor obtenido en condiciones isosmóticas (Fig. 14). Es de notar que la liberación de taurina de CGC durante la RIV también se inhibe completamente por este ácido (Tuz *et al.*, 2001). Lo que sugiere una probable vía común para la liberación de estos dos osmolitos en la RIV, fenómeno similar al que ocurre en el RVD (Law 1994; Sánchez-Olea *et al.*, 1996). Aunque con estos resultados no se puede concluir nada acerca de la identidad molecular del canal de Cl^- activado en este proceso, ya que los inhibidores de los canales de Cl^- son muy inespecíficos e inhiben otros sistemas de transporte de Cl^- .

Estos resultados muestran que aunque el K^+ y el Cl^- contribuyen al proceso de regulación de volumen, lo hacen sólo en una fase tardía. Para la fase temprana se hace entonces necesario considerar la participación de otros osmolitos, posiblemente moléculas orgánicas, tal como ocurre en el RVD (Sánchez-Olea *et al.*, 1996).

En un estudio paralelo al presente en neuronas granulares de cerebelo se midió la liberación de diversos aminoácidos durante la RIV (Tuz *et al.*, 2001). La taurina fue el aminoácido liberado más tempranamente, casi al inicio de la estimulación gradual hiposmótica (2% de reducción en la osmolaridad externa). Su liberación fue de 4-10 veces más grande que la de glicina y glutamato y mostró la mayor disminución en el contenido celular al final del experimento. Estos

resultados denotan un papel muy importante de este aminoácido en la RIV, principalmente como osmoefector en la fase temprana de regulación.

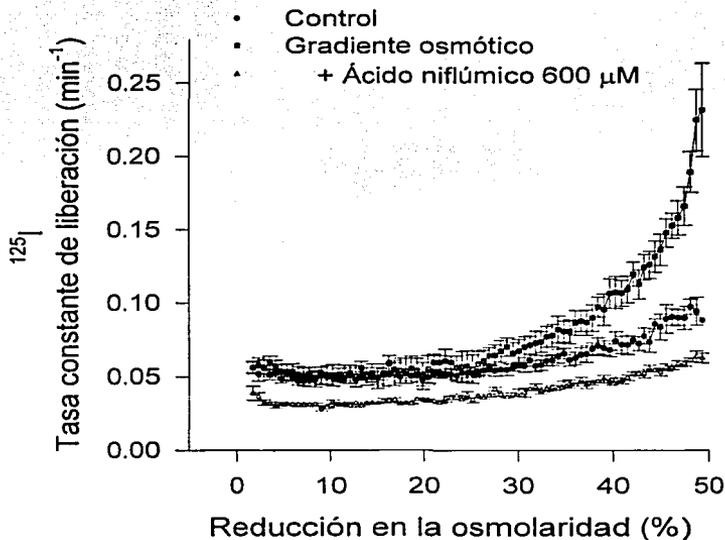


Figura 14. Efecto del ácido niflúmico (600 μM) sobre la liberación de ^{125}I estimulada por el gradiente osmótico. Las CGC se incubaron con el trazador radiactivo, se lavaron y perfundieron a 2 ml/min con el gradiente osmótico a una tasa de cambio de -1.8 mOsm/l , hasta alcanzar 50% de reducción en la osmolaridad externa. Los controles se perfundieron con el gradiente osmótico (■) y los experimentales se perfundieron con el gradiente osmótico más ácido niflúmico 600 μM (▲). Se muestra la liberación del trazador en condiciones isosmóticas (●). Los puntos son promedios \pm EE (n=4).

Sin embargo, la liberación y disminución de los aminoácidos descritos durante la RIV es insuficiente para equilibrar el gradiente osmótico impuesto en la primera fase del proceso, cuando los flujos de K^+ y Cl^- aún no han sido activados. Por ello se requiere una contribución adicional de otros osmolitos orgánicos para compensar este déficit. Moléculas tales como: *myo*-inositol, glicerofosforilcolina, betaina, fosfoetanolamina, creatina, fosfocreatina y *N*-acetil aspartato pueden proveer contribuciones significantes en esta fase de ajuste de volumen (Gotoh *et al.*, 1997).

Los osmolitos orgánicos e inorgánicos parecen contribuir diferencialmente a la regulación del volumen dependiendo de la severidad del cambio hiposmótico en las CGC. De acuerdo a los estudios mencionados y a los resultados del presente trabajo los osmolitos orgánicos se movilizan preferencialmente ante bajas disminuciones en la osmolaridad y los osmolitos inorgánicos, K^+ y Cl^- , ante grandes reducciones en la osmolaridad. Esto es similar a lo que se observa en condiciones patológicas. Esto puede deberse al papel que juegan estos iones en el control de la excitabilidad neuronal. Ya que la acumulación extracelular de tales puede afectar la excitabilidad neuronal interfiriendo con el funcionamiento celular normal.

EVALUACIÓN DE LA CONTRIBUCIÓN DE DISTINTOS OSMOLITOS A LA RIV

La contribución de diferentes osmolitos al proceso de regulación puede estimarse a partir del análisis del efecto de agentes o condiciones que afecten la liberación de osmolitos sobre el volumen celular.

Como ya se ha descrito en este trabajo, la liberación de K^+ y Cl^- estimulada por un gradiente hiposmótico en CGC, se inhibe completamente por Ba^{2+} (15 mM) y ácido niflúmico (600 μ M), respectivamente. Además, la liberación del aminoácido taurina, que parece tener una participación relevante en la primera

fase de la RIV, también se inhibe totalmente por ácido niflúmico (Tuz *et al.*, 2001). Por ello, estos fármacos son vitales para evaluar la contribución de estos osmolitos a la RIV.

La presencia de Ba^{2+} en CGC, que inhibe los flujos de K^+ , no mostró efecto sobre la regulación de volumen ante el gradiente osmótico, sino hasta que la osmolaridad externa disminuyó 30% (210 mOsm) (Fig. 15), la cual coincide con el umbral de activación de la liberación de ^{86}Rb y con la disminución en el contenido celular de K^+ . Después de este tiempo, donde la liberación de K^+ se activa completamente, la RIV se previno con la presencia de Ba^{2+} , hasta alcanzar un aumento en volumen de aproximadamente 30%.

Como se demostró en este trabajo, el ácido niflúmico inhibe la liberación de Cl^- , pero también de la osmolitos orgánicos (Lang *et al.*, 1998), incluyendo a la taurina. La figura 16 muestra que este agente previno la RIV desde sus fases tempranas. El aumento en volumen fue aparente desde el primer punto estimado (282 mOsm), en el cual la disminución en la osmolaridad externa es del 6% (Fig. 16). El volumen aumentó continua y progresivamente, y cuando se alcanzaron 210 mOsm (-30%) el aumento en volumen registrado fue de 25%. Este incremento en volumen es muy parecido al que ocurre en CGC expuestas a una disminución súbita en la osmolaridad de la misma magnitud (soluciones 30% hiposmóticas), como se observa en la figura 17 y se indica con un asterisco en la figura 16. Al final del experimento, cuando la osmolaridad externa se reduce un 50%, el hinchamiento celular fue de 52%. En células expuestas súbitamente a esta reducción, el incremento máximo en volumen es de 60% (Fig. 17, asterisco en la Fig. 16).

El incremento en volumen de 25% alcanzado con el tratamiento con ácido niflúmico cuando la osmolaridad externa es de -30%, es casi idéntico al de 27% obtenido después de la exposición súbita a un medio hiposmótico similar (30%).

Estos resultados permiten concluir que la regulación isovolúmica, en su fase temprana, está a totalmente a cargo de mecanismos sensibles a ácido niflúmico.

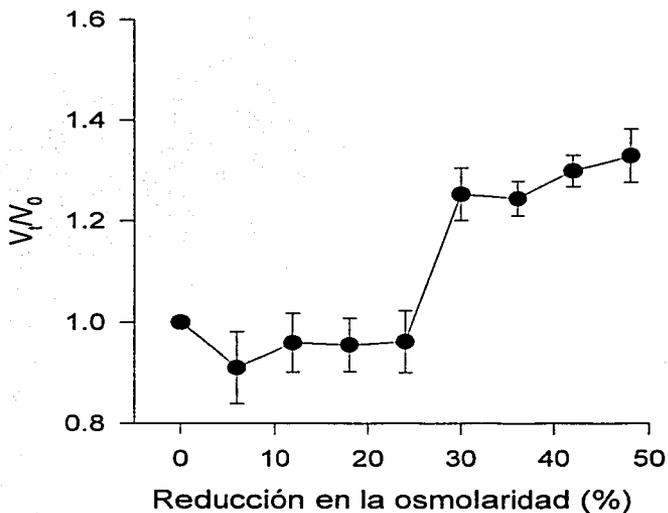


Figura 15. Efecto de Ba^{2+} (15 mM) en la regulación isovolúmica. El volumen celular relativo se estimó como se indica en la figura 9. Los puntos representan el cambio en volumen de células expuestas al gradiente osmótico en la presencia de Ba^{2+} (15 mM). El volumen celular se midió cada 10 min, correspondiendo a disminuciones en la osmolaridad externa de 18 mOsm/l. Los datos son promedios de 3 experimentos \pm EE.

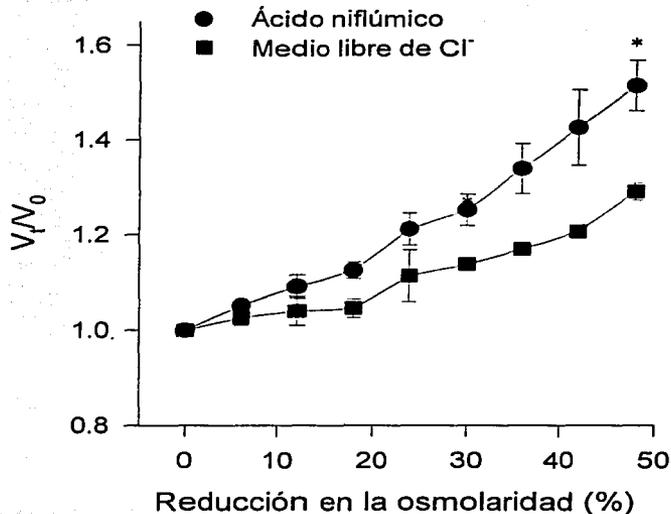


Figura 16. Efecto de ácido niflúmico y de un medio libre de Cl⁻ en la regulación isovolúmica. El volumen celular relativo se cuantificó como se señala en la figura 9. Los puntos indican el cambio en volumen de células expuestas al gradiente osmótico en la presencia de ácido niflúmico (600 μM) (●) o ante un medio libre de Cl⁻ (reemplazado por gluconatos) (■). El volumen celular se midió cada 10 min, correspondiendo a disminuciones en la osmolaridad externa de 18 mOsm/l. Los datos son promedios de 3 experimentos ± EE. Los asteriscos (*) indican el incremento en volumen celular ante la exposición a una solución 30 o 50% hiposmótica.

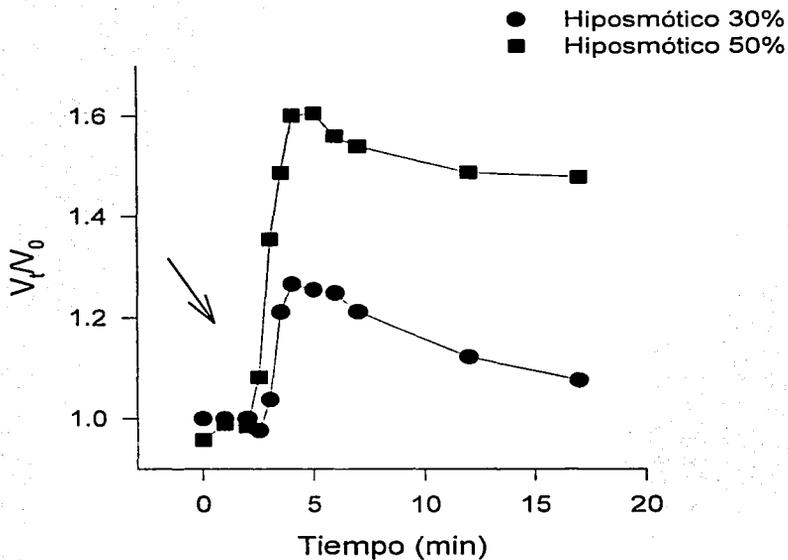


Figura 17. Volumen celular de CGC expuestas a reducciones súbitas en la osmolaridad. Las células se incubaron con calceína-AM $1 \mu\text{M}$, lavaron y perfundieron con medio isosmótico y subsecuentemente (flecha) con medios hiposmóticos. Los puntos indican el cambio en volumen celular relativo (V_t/V_0) de células expuestas a una solución hiposmótica 30% (●) e hiposmótica 50% (■).

Queda aún por discernir la contribución de los flujos de Cl^- o de osmolitos orgánicos, ya que el ácido niflúmico inhibe el movimiento de ambos flujos de osmolitos. Para aclarar este punto se examinó el efecto de un medio sin Cl^- , en el cual sólo se afecta el movimiento de este y no el de los osmolitos orgánicos. El Cl^- del medio extracelular se reemplazó con gluconatos y se determinaron los cambios en el volumen celular relativo ante el gradiente osmótico (Fig. 16). Como se observa en la figura 16, las células bajo estas condiciones muestran un hinchamiento marginal (5%) en el intervalo de osmolaridad externa de 300-246 mOsm/l, correspondiente a 0-18% de reducción en la osmolaridad, lo que demuestra que esta condición no afecta la RIV dentro de este intervalo de reducción en la osmolaridad. Cuando la osmolaridad externa ha alcanzado 228 mOsm/l (-24%), el volumen celular se incrementó un 11%, punto a partir del cual el volumen continuó aumentando hasta alcanzar 29% (disminución en la osmolaridad externa -50%). Este incremento fue similar al obtenido cuando se bloquearon los flujos de K^+ (Fig. 15). Ya que la inhibición de los flujos de Cl^- y K^+ afecta la RIV sólo en su segunda fase, las medidas de cambio en volumen debido a los inhibidores de los flujos radiactivos confirman lo sugerido por las medidas de movilización de los iones, es decir que estos están participando como osmolitos sólo en la última parte del proceso de regulación.

La comparación entre el hinchamiento provocado en presencia de ácido niflúmico, el cual inhibe los flujos de osmolitos orgánicos y de Cl^- , y el provocado en un medio libre de Cl^- , el cual afecta solamente los flujos de Cl^- y no los de osmolitos orgánicos, puede dar una estimación aproximada de la contribución de estos últimos y del Cl^- en ambas fases de la RIV.

La diferencia entre las dos curvas de la figura 16 denota una participación temprana y continua de los osmolitos orgánicos a la RIV, mientras que la participación del Cl^- es posterior. La inhibición del flujo de Cl^- y K^+ provoca un aumento en el volumen celular del 30%, mientras que el hinchamiento celular observado cuando se inhibe el flujo de los osmolitos orgánicos con ácido

niflúmico es de 22%. Lo que indica que la liberación de los iones es de una magnitud más importante en la fase tardía del proceso de regulación, aunque ambas se requieran para mantener un volumen celular constante.

El aumento en volumen de CGC inducido por una exposición súbita a una solución 50% hiposmótica es de 60%, lo que da una diferencia de casi 10% con respecto al máximo incremento alcanzado cuando se afecta a la regulación isovolúmica con inhibidores de los flujos de osmolitos. Esta diferencia puede deberse a la participación de transportadores electroneutros no afectados por ácido niflúmico o a una fracción de K^+ liberada independientemente de la del flujo de Cl^- .

Finalmente, estos resultados indican un carácter activo del proceso de regulación isovolúmica, el cual se lleva a cabo por vías de salida de osmolitos sensibles a ácido niflúmico, posiblemente activadas por mecanismos similares a los que ocurren en RVD. Sin embargo, esta aseveración requiere del sustento experimental ya que no existe a la fecha ningún estudio en este sentido.

Los resultados derivados de este trabajo pueden explicar parcialmente los mecanismos compensatorios que el tejido cerebral utiliza para regular su volumen ante un estrés hiposmótico, tal como sucede en situaciones patológicas *p.e.* hiponatremia. Los mecanismos de regulación descritos para tales situaciones provienen de estudios realizados *in vitro* con protocolos súbitos de estimulación hiposmótica, pero estos no simulan ni en magnitud ni en temporalidad el proceso de cambio en la osmolaridad. Una mejor aproximación la constituye una estimulación gradual con cambios pequeños en la osmolaridad externa, como el sistema gradual y continuo descrito en este trabajo. Este apoya una participación de osmolitos orgánicos, tales como aminoácidos y principalmente taurina, para regular el incremento en volumen ocasionado por una disminución en la osmolaridad de baja magnitud, con la subsecuente activación de flujos de iones, K^+ y Cl^- , en reducciones de osmolaridad más severas. La liberación retrasada de

estos iones parece ser una respuesta adaptativa, ya que su movilización temprana comprometería el funcionamiento celular normal, debido al papel que desempeñan en la excitabilidad neuronal. En concordancia con esto, se ha observado que en situaciones de hiponatremia o isquemia, en donde la osmolaridad externa se reduce de 12-16%, se observa liberación de taurina (Trachtman, 1991; McManus y Chuchwell, 1994; Fraser y Arieff, 1997). Se ha visto que el contenido de osmolitos orgánicos en el cerebro presenta una mayor reducción que la de K^+ en ratones hiponatremicos crónicos. (Thurston *et al.*, 1987). La taurina parece tener una mayor contribución en la corrección osmótica, ya que es el aminoácido más abundante en el cerebro de los ratones y porque mostró la reducción más grande ante la condición hiponatremica. Por lo que la taurina parece tener un papel fundamental en contrarrestar el edema celular cerebral. Además, en astrocitos en cultivo expuestos a un periodo de hiponatremia de 24 h, el volumen celular permanece constante y la poza de taurina se depletó casi por completo, mientras que no hubo cambio en el contenido de glutamato y K^+ (Olson, 1999).

CONCLUSIONES

- Las células granulares de cerebelo de rata presentan regulación isovolúmica cuando se exponen a un gradiente hiposmótico.
- Durante este proceso de regulación, se movilizan los iones K^+ y Cl^- , siendo predominantemente responsables de una fase tardía de la regulación.
- La liberación de K^+ no se afecta por la mayoría de los inhibidores generales de canales de K^+ : TEA, 4-AP, carybdotoxina, cesio, gadolinio y bario. Se inhibe por este último sólo a altas concentraciones (15 mM).
- La salida de Cl^- se inhibe totalmente por un inhibidor general de los canales de este ión: el ácido niflúmico.
- La primera fase de regulación isovolúmica se lleva a cabo por mecanismos sensibles a ácido niflúmico, que involucran la participación de osmolitos orgánicos, con un papel predominante de la taurina.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ackerman, M. J., Wickman, K. D. y Clapham, D. E. 1994. Hypotonocicity activates a native chloride current in *Xenopus* oocytes. *J. Gen. Physiol.* 103: 153-179.
2. Álvarez-Leefmans, F. J., Altamirano, J. y Crowe, W. E. 1995. Use of Ion-Selective Microelectrodes and Fluorescent Probes to Measure Cell volume. *Methods in Neurosciences.* 27: 361-391.
3. Álvarez-Leefmans, J. y Reuss, L. 1996. Operación orquestada de los sistemas de transporte a través de la membrana plasmática: regulación y mantenimiento del volumen celular. Capítulo 7. En: *Biofísica y Fisiología Celular* (editores). Editorial pp 179-212.
4. Ballanyi, K. y Grafe, P. 1988. Cell volume regulation in the nervous system. *Ren. Physiol. Biochem.* 3(5): 142-157.
5. Banderali, U. y Roy, G. 1992. Anion channels for amino acids in MDCK cells. *Am. J. Physiol.* 263: C1200-C1207.
6. Bender, A. S., Neary, J. T., Blicharska, J., Norenberg, L. O. B. y Norenberg, M. D. 1992. Role of Calmodulin and protein kinase C in astrocytic cell volume regulation. *J. Neurochem.* 58: 1874-1882.
7. Brandt, S. y Jentsch, T. J. 1995. CIC-6 y CIC-7 are two novel broadly expressed members of the CIC chloride channel family. *FEBS Lett.* 377: 15-20.
8. Bursell, J. D. H., Kirk, J., Hall, S. T., Gero, A. M. y Kirk, K. 1992. Volume-regulatory amino acid release from the Protozoan parasite *Crithidia luciliae*. *J. Membr Biol.* 154: 131-141.
9. Cooke, K. R. y Macknight, A. D. C. 1984. Effects of medium acetate on cellular volume in rabbit renal cortical slices. *J. Physiol.* 349: 135-156.

10. Crowe, W. E., Altamirano, J., Huerto, L. y Alvarez-Leefmans F. J. 1995. Volume changes in single N1E-115 neuroblastoma cells measured with a fluorescent probe. *Neuroscience*. 69(1): 283-296.
11. Chamberlain, M. E. y Strange, K. 1989. Anisotonic cell volume regulation: a comparative view. *Am. J. Physiol.* 257: C159-C173.
12. Deutsch, C. y Chen, L. 1993. Heterologous expression of specific K⁺ channels in T lymphocytes: functional consequences for volume regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 10036-10040.
13. Dong, Y., Chen, G., Duran, G. E., Kouyama, K., Chao, A. C., Sikic, B. I., Gollapudi, S. V., Gupta, S. y Gardner, P. 1994. Volume-activated chloride current is not related to P-glycoprotein overexpression. *Cancer Res.* 54: 5029-5032.
14. Falke, L. C. y Mislner, S. 1989. Activity of ion channels during volume regulation by clonal N1E115 neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 3919-3923.
15. Fraser, C. L. y Allen, A. I. 1997. Epidemiology, Pathophysiology, and management of hyponatremic encephalopathy. *Am J Med.* 102: 67-77.
16. García, J. J., Sánchez-Olea, R. y Pasantes-Morales, H. 1991. Taurine release associated to volume regulation in rabbit lymphocytes. *J. Cell Biochem.* 45(2): 207-212.
17. García-Romeu, F., Borgese, F. Guizouarn, H., Fievet, B. y Motais, R. 1996. A role for the anion exchanger AE1 (band 3 protein) in cell volume regulation. *Cell. Mol. Biol.* 42: 985-994.
18. García-Romeu, F., Cossins, A. R. y Motais, R. 1991. Cell volume regulation by trout erythrocytes: characteristics of the transport systems activated by hypotonic swelling. *J. Physiol.* 440: 547-567.
19. Geoffrion, Y. Y Larochele, J. 1984. The free amino acid contribution to osmotic regulation in *Acanthamoeba castellanii*. *Can J Zool.* 62: 1954-1959.
20. Godart, H., Ellory, J. C. y Motais, R. 1999. Regulatory volume response of erythrocytes exposed to a gradual and slow decrease in medium osmolarity. *Pflügers Arch-Eur J. Physiol.* 437: 776-779.

21. Goldstein, L., Brill, S. R. y Freund, E. V. 1990. Activation of taurine efflux in hypotonically stressed elasmobranch cells: inhibition by stilbene disulfonates. *J. Exp. Zool.* 254: 114-118.
22. González, E., Sánchez-Olea, R. y Pasantes-Morales, H. 1995. Inhibition by Cl channel blockers of the volume activated, diffusional mechanism of inositol transport in primary astrocytes in culture. *Neurochem. Res.* 20: 895-900.
23. Gotoh, M., Davies, S. E. y Obrenovitch, T. P. 1997. Brain tissue acidosis: effects on the extracellular concentration of N-acetylaspartate. *J. Neurochem.* 69: 655-661.
24. Grinstein, S., Clarke, C. A., Dupre, A. y Rothstein, A. 1982. Volume-induced increase of anion permeability in human lymphocytes. *J Gen Physiol.* 80(6): 801-823.
25. Gründer, S., Thiemann, A., Pusch, M. y Jentsch, T. J. 1992. Regions involved in the opening of ClC-2 chloride channel by voltage on cell volume. *Nature.* 360: 759-762.
26. Gschwentner, M., Nagl, U. O., Woll, E., Schmarda, A., Riter, M. y Paulmichl, M. 1995. Antisense oligonucleotides suppress cell-volume-induced activation of chloride channels. *Pfluegers Arch.* 430: 464-470.
27. Guggino, W. B., Oberleithner, H. y Giebisch, G. 1985. Relationship between cell volume and ion transport in the early distal tubule of the *Amphiuma* kidney. *J. Gen. Physiol.* 86(1): 31-58.
28. Guizouarn, H., Motais, R., García-Romeu, F. y Borgese, F. 2000. Cell volume regulation: the role of taurine loss in maintaining membrane potential and cell pH. *J. Physiol.* 523: 147-154.
29. Hallows, R. K. y Knauf, P. A. 1994. Principles of cell volume regulation. Capítulo 1. En: Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation. Editor Strange, K. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp 3-29.
30. Hoffmann, E. K., Lambert, I. H. y Simonsen, L. O. 1986. Separate, Ca²⁺-activated K⁺ and Cl⁻ transport pathways in Ehrlich ascites tumor cells. *J. Membr. Biol.* 91: 227-244.

31. Hoffmann, E. K., Lambert, I. H. y Simonsen, L. O. 1988. *Renal Physiol Biochem.* 3-5: 221-247.
32. Hoffmann, E. K., Simonsen, L. O. y Lambert, I. H. 1984. Volume-induced increase of K^+ and Cl^- permeabilities in Ehrlich ascites tumor cells. Pole of internal Ca^{2+} . *J. Membr. Biol.* 78: 211-222.
33. Jacobsen, J. G. y Smith, L. H. 1968. Biochemistry and physiology of taurine derivatives. *Physiol. Rev.* 48: 424-511.
34. Junankar, P. R., Dulhunty, A. F., Curtis, S. M. y Thinnis, F. P. 1995. Porin-type 1 proteins in sarcoplasmic reticulum and plasmalemma of striated muscle fibres. *J. Muscle Research and Cell Motility.* 16: 595-610.
35. Kimelberg, H. K. y Frangakis, M. 1986. Volume regulation in primary astrocyte cultures. *Adv. Biosci.* 67: 177-186.
36. Kimelberg, H. K., Goderie, S. K., Higman, S., Pang, S. y Waniewski. 1990. Swelling-induced release of glutamate, aspartate, and taurine from astrocyte cultures. *The Journal of Neuroscience.* 10(5): 1583-1591.
37. Krapivinsky, G. B., Ackerman, M. J., Gordon, E. A., Krapivinsky, L. D. y Clapham, D. E. 1994. Molecular characterization of a swelling-induced chloride conductance regulatory protein, pI_{Cl} . *Cell.* 76: 439-448.
38. Kregenow, F. M. 1971. The response of duck erythrocytes to nonhemolytic hypotonic media. Evidence for a volume-controlling mechanism. *J Gen Physiol.* 58(4): 372-395.
39. Kunzelmann, K., Slotki, I. N., Klein, P., Aausiello, D. A., Greger, R. y Cabantchik, Z. I. 1994. Effects of P-glycoprotein expression on cyclic AMP and volume-activated ion flux and conductances in HT-29 colon adenocarcinoma cells. *J. Cell Physiol.* 161: 393-406.
40. Lambert, I. H. y Hoffmann, E. K. 1994. Cell swelling activates separate taurine and chloride channels in Ehrlich mouse ascites tumor cells. *J Membr Biol.* 142(3): 289-298.
41. Lang, F., Busch, G. L. y Völkl, H. 1998b. The diversity of volume regulatory mechanisms. *Cell Physiol Biochem.* 8: 1-45.

42. Lang, F., Busch, G. L., Ritter, M., Völkl, H., Waldegger, S., Gulbins, E. y Häussinger, D. 1998. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiological Reviews*. 78(1): 247-2.
43. Lang, F., Paulmichl, M., Voelkl, H., Gstrein, E. y Friedrich, F. 1987. Electrophysiology of cell volume regulation. En: Molecular Nephrology. Biochemical Aspects of Kidney Function. Editores Kovacevic, Z. y Guder, W. G. de Gruyter, Berlin. pp 133-139.
44. Law, R. O. 1994. Taurine efflux and the regulation of cell volume in incubated slices of rat cerebral cortex. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1221: 21-28.
45. Law, R. O. 1995. Taurine efflux and cell volume regulation in cerebral cortical slices during chronic hypernatremia. *Neurosci. Lett*. 185: 56-59.
46. Lien, Y. H., Shapiro, J. I. y Chan, L. 1991. Study of brain electrolytes and organic osmolytes during correction of chronic hyponatremia. *J. Clin. Invest*. 88: 303-309.
47. Lohr, J. W. 1990. Isovolumetric regulation of renal proximal tubules in hypotonic medium. *Ren. Physiol. Biochem*. 13(5): 233-240.
48. Lohr, J. W. y Grantham, J. J. 1986. Isovolumetric regulation of isolated S₂ proximal tubules in anisotonic media. *J. Clin. Invest*. 78: 1165-1172.
49. Lohr, J. W. y Yohe, L. 2000. Isovolumetric regulation of rat glial cells during development and correction of hypo-osmolarity. *Neuroscience Letters*. 286: 5-8.
50. Lohr, J. W. y Yohe, L. A. 1994. Mechanisms of hyposmotic volume regulation in glioma cells. *Brain Res*. 667: 263-268.
51. Macknight, A. D. C. 1988. Principles of cell volume regulation. *Renal Physiol. Biochem*. 3: 114-141.
52. McEwan, G. T. A., Hunter, J., Hirst, B. H. y Simmons, N. L. 1992. Volume-activated Cl⁻ secretion and transepithelial vinblastine secretion mediated by P-glycoprotein are not correlated in cultured human T84 intestinal epithelial layers. *FEBS Lett*. 304: 233-236.
53. McManus, M. L. y Churchwell, K. B. 1994. Clinical Significance of cellular osmoregulation. Capitulo 4. En: Cellular and molecular physiology of cell

- volume regulation. Editor Strange, K. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp 63-77.
54. McManus, M. L. Y Churchwell, K. B. 1994. Clinical significance of cellular osmoregulation. Capitulo 4. En: Cellular and molecular physiology of cell volume regulation. Editor Strange, K. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp 63-77.
55. Medrano, S. y Gruenstein, E. 1993. Mechanisms of regulatory volume decrease in UC-11MG human astrocytoma cells. *Am. J. Physiol.* 264: C1201-C1209.
56. Melton, J. E., Patlak, C. S., Pettigrew, K. D. y Cserr, H. F. 1987. Volume regulatory loss of Na^+ , Cl^- y K^+ from rat brain during acute hyponatremis. *Am. J. Physiol.* 252: F661-F669.
57. Moorman, R., Ackerman, S. J., Kowdley, G. C., Griffin, M. P., Mounsey, J. P. y Chen, Z. 1995. Unitary anion currents through phospholemman channel molecule. *Nature.* 377: 737-740.
58. Morales-Mulia, M., Pasantes-Morales, H. y Morán, J. 2000. Volume sensitive efflux of taurine in HEK293 cells overexpressing phospholemman. *Biochim. Biophys. Acta.* 1496(2-3): 252-260.
59. Morales-Mulia, S., Ordaz, B., Quesada, O. Y Pasantes-Morales, H. 1998. Ca^{2+} Changes and ^{86}Rb Efflux Activated by Hyposmolarity in Cerebellar Granule Neurons. *Journal of Neuroscience Research.* 53: 626-635.
60. Morán, J. y Patel, A. J. 1989. Stimulation of the N-methyl-D-aspartate receptor promotes the biochemical differentiation of cerebellar granule neurons and not astrocytes. *Brain Res.* 486(1): 15-25.
61. Morgan, J. M. 1984. Osmoregulation and water stress in higher plants. *Ann. Rev. Plant Phy.* 35: 299-319.
62. Morin, X. K., Bond, T. D., Loo, T. W. Clarke, D. M. y Bear, C. E. 1995. Failure of P-glycoprotein (MDR1) expressed in *Xenopus* oocytes to produce swelling-activated chloride channel activity. *J. Physiol.* 486: 707-714.
63. Motais, R., Fiévet, B., Borgese, F. y García-Romeu, F. 1992. Some functional properties of band 3 protein in nucleated red cells. *Proc. Cell. Res.* 2: 253-262.

64. Motais, R., Guizouarn, H. y García-Romeu, F. 1991. Red cell volume regulation: the pivotal role of ionic strength in controlling swelling-dependent transport systems. *Biochim. Biophys. Acta.* 1075: 169-180.
65. Mountain, I. y Van Driessche, W. 1997. Isovolumetric regulation of C6 rat glioma cells in hyperosmotic media.
66. O'Neill, W. C. 1989. Cl-dependent K transport in a pure population of volume-regulating human erythrocytes. *Am. J. Physiol.* 256: C858-C864.
67. O'Neill, W. C. 1999. Physiological significance of volume-regulatory transporters. *Am. J. Physiol.* 276: C995-C1011.
68. Olson, J. E., Sankar, R., Holtzman, D., James, A. y Fleischhacker, D. 1986. Energy-dependent volume regulation in primary cultured cerebral astrocytes. *J. Cell Physiol.* 128: 209-215.
69. Olson, J. E. 1999. Osmolyte contents of cultured astrocytes grown in hypoosmotic medium. *Biochim. Biophys. Acta.* 1453: 175-179.
70. Pasantes-Morales, H. 1996. Volume regulation in brain cells: cellular and molecular mechanisms. *Metabolic Brain Disease.* 11(3): 187-204.
71. Pasantes-Morales, H. y Morales-Mulia, S. 2000. Influence of calcium on regulatory volume decrease: role of potassium channels. *Nephron.* 86: 414-427.
72. Pasantes-Morales, H. y Schousboe, A. 1988. Volume regulation in astrocytes: a role for taurine as osmoeffector. *J. Neurosci. Res.* 20: 505-509.
73. Pasantes-Morales, H., Alavez, S., Sánchez Olea, R. y Morán, J. 1993. Contribution of organic and inorganic osmolytes to volume regulation in rat brain cells in culture. *Neurochemical Research.* 18(4): 445-452.
74. Pasantes-Morales, H., Chacón, E., Murray, R. A. y Morán, J. 1994. Properties of osmolyte fluxes activated during regulatory volume decrease in cultured cerebellar granule neurons. *Journal of Neuroscience Research.* 37: 720-727.
75. Pasantes-Morales, H., García, J. y Sánchez-Olea, R. 1991. Hyposmolarity-sensitive release of taurine and free amino acids from human lymphocytes. *Biochem. Pharmacol.* 41: 303-307.

76. Pasantes-Morales, H., Maar, T. y Morán, J. 1993. Cell volume regulation in cultured cerebellar granule neurons. *J. Neurosci. Res.* 34: 219-224.
77. Pasantes-Morales, H., Murray, R. A., Lilja, L. y Morán, J. 1994b. Regulatory volume decrease in cultured astrocytes I. Potassium-and chloride-activated permeability. *Am. J. Physiol.* C165-C171.
78. Paulmichl, M., Laich, A., Fürst, H., Ggschwentner, M., Nagl, U. O., Hittmair, A. y Ritter, M. 1996. Transportation of the chloride channel Icln from the cytosol into the cell membrane after volume stress. *Biophys. J.* 70: A9
79. Paulmichl, M., Li, Y., Wickman, K., Ackerman, M., Peralta, E. y Clapham, D. 1992. New mammalian chloride channel identified by expression cloning. *Nature.* 238: 38-43.
80. Ramos, J., Haro, R. y Rodríguez-Navarro, A. 1990. Regulation of potassium fluxes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* 1029(2): 211-217.
81. Rasola, A., Galletta, L. J., Gruenert, D. C. y 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.
82. Reymann, S., Flörke, H., Heiden, M., Jakob, C., Stadtmüller, U., Steinacker, P., Lalk, V. E., Pardowitz, I. y 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. *Biochemical and Molecular Medicine.* 54: 75-87.
83. Roy, G. y Sauve, R. 1987. Effect of anisotonic media on volume, ion and amino-acid content and membrane potential of kidney cells (MDCK) in culture. *J. Membrane Biol.* 100(1): 83-96.
84. Sánchez-Olea, R. y Pasantes-Morales, H. 1993. El control del volumen: una propiedad fundamental para la supervivencia de las células animales. *Ciencia.* 44: 473-485
85. Sánchez-Olea, R., Morales, M., García, O. y Pasantes-Morales, H. 1996. Cl channel blockers inhibit the volume-activated efflux of Cl and taurine in cultured neurons.

86. Sánchez-Olea, R., Morales-Mulía, M., Morán, J. y Pasantes-Morales, H. 1995. Inhibition by polyunsaturated fatty acids of regulatory volume decrease and osmolyte fluxes in astrocytes in culture. *Am. J. Physiol.* 269: C96-C192.
87. Sánchez-Olea, R., Morán, J., Schousboe, A. y Pasantes-Morales, H. 1991. Hyposmolarity-activated fluxes of taurine in astrocytes are mediated by diffusion. *Neuroscience Letters.* 130: 233-236.
88. Sánchez-Olea, R., Peña, C., Morán, J. y 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: 141-144.
89. Sarkadi, B., Mack, E. y Rothstein, A. 1984. Ionic events during the volume response of human peripheral blood lymphocytes to hypotonic media. II. Volume- and time-dependent activation and inactivation of ion transport pathways. *J. Gen. Physiol.* 83: 513-527.
90. Schousboe, A., Sánchez-Olea, R., Morán, J. y Pasantes-Morales, H. 1991. Hyposmolarity-induced taurine release in cerebellar granule cells is associated with diffusion and not with high-affinity transport. *Journal of Neuroscience Research.* 30: 661-665.
91. Share, L. 1996. Control of vasopressin release: an old but continuing story. *News Physiol Sci.* 11: 7-13.
92. Share, L. 1996. Control of vasopressin release: an old but continuing story. *News Physiol Sci.* 11: 7-13.
93. Souza, M. M., Boyle, R. T. y Lieberman, M. 2000. Different physiological mechanisms control isovolumetric regulation and regulatory volume decrease in chick embryo cardiomyocytes. *Cell Biol Int.* 24(10): 713-721.
94. Sterns, R. H., Baer, J., Ebersol, S., Thomas, D., Lohr, J. W. y Kamm, D. E. 1993. Organic osmolytes in acute hyponatremia. *Am. J. Physiol.* 264: F833-F836.
95. Strange, K., Emma, F. y Jackson, P. S. 1996. Cellular and molecular physiology of volume-sensitive anion channels. *Am. J. Physiol.* 270: C711-C730.

96. Strange, K., Morrison, R., Shrode, L. Y Putnam, R. 1993. Mechanism and regulation of swelling-activated inositol efflux in brain glial cells. *Am. J. Physiol.* 265: C244-C256.
97. Thurston, J. H., Hauhart, R. D. y Dirco, J. A. 1980. Taurine: a role in osmotic regulation in mammalian brain and possible clinical significance. *Life Sci.* 26: 1561-1568.
98. Thurston, J. H., Hauhart, R. E. y 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. *Metabol. Brain Dis.* 2: 223-241.
99. Thurston, J. H., Hauhart, R. E. y 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 cantral pontine myelinolysis) causes dehydration and shrinkage of brain. *Metab. Brain Dis.* 2: 223-241.
100. Tosteson, D. C. y Hoffman, J. F. 1960. Regulation of cell volume by active cation transport in high and low potassium sheep red cells. *J. of Gen. Physiol.* 44: 169-194.
101. Trachtman, H. 1991. Cell volume regulation: a review of cerebral adaptive mechanisms and implications for clinical treatment of osmolal disturbances II. *Pediatric Nephrol.* 5: 743-750.
102. Trachtman, H., Futterweit, S., Hammer, E., Siegel, T. W. y Oates, P. 1991. The role of polyols in cerebral cell volume regulation in hypernatremic and hyponatremic states. *Life Sci.* 49: 677-688.
103. Tuz, K., Ordaz, B., Vaca, L., Quesada, O. y Pasantes-Morales, H. 2001. Isovolumetric regulation mechanisms in cultured cerebellar granule neurons. *Journal of Neurochemistry.* 79: 1-10.
104. Van Driessche, W., De Smet, P., Li, J., Allen, S., Zizi, M. y Mountian, I. 1997. Isovolumetric regulation in a distal nephron cell line (A6).

105. Venglarik, C. J., Bridges, R. G. y Frizell, R. A. 1990. A simple assay for agonist-regulated Cl and K conductances in salt-secreting epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 259: C358-C364.
106. Verbalis, J. G. y Gullans, S. R. 1991. Hyponatremia causes large sustained reductions in brain content of multiple organic osmolytes in rats. *Brain Res.* 567: 274-282.
107. Viana, F., Van Acker, K., de Greef, C., Eggermont, J., Raeymaekers, L., Droogmans, G. y Nilius, B. 1995. Drug-transport and volume-activated chloride channel functions in human erythroleukemia cells: relation to expression level of P-glycoprotein. *J. Membrane Biol.* 145: 87-98.
108. Yancey, P. H. 1994. Compatible and counteracting solutes. Capitulo 5. En: Cellular and molecular physiology of cell volume regulation. Editor Strange, K. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp 81-109.