

93

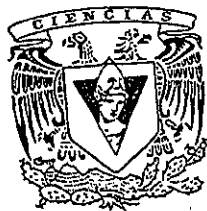


**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**

**REGULACIÓN ISOVOLUMETRICA:  
IMPORTANCIA Y MECANISMOS**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**B I Ó L O G A**  
P R E S E N T A  
KARLA HERNÁNDEZ FONSECA

DIRECTOR DE TESIS  
DRA. HERMINIA PASANTES MORALES



FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

292450



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.



REPUBLICA NACIONAL  
ESTADOS UNIDOS MEXICANOS  
MEXICO

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

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:  
 "Regulación isovolumétrica: importancia y mecanismos"

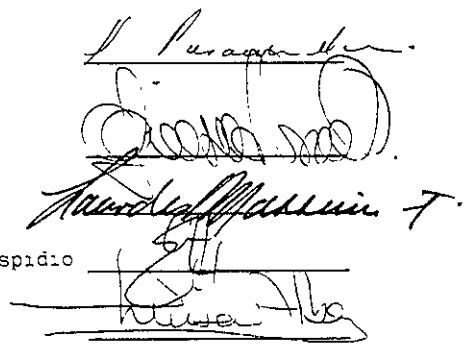
realizado por Karla Hernández Fonseca

con número de cuenta 9338287-4, pasante de la carrera de Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

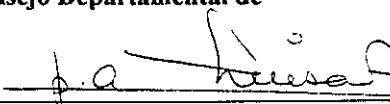
Atentamente

- Director de Tesis Propietario: Dra. Herminia Pasantes Morales
- Propietario: Dr. Octavio Quesada García
- Propietario: Dra. Lourdes Massieu Trigo
- Suplente: Q. Silvestres de Jesus Alavez Espidio
- Suplente: Dra. Luisa Alba Lois



FACULTAD DE CIENCIAS  
 U.N.A.M.

Consejo Departamental de

  
 Dra. Edna Ma. Suárez Díaz



DEPARTAMENTO  
 DE BIOLOGIA

## **A MIS PADRES**

Por todo el amor, cariño, apoyo y  
comprensión que en mi vida  
me han brindado

## AGRADECIMIENTOS

A mis hermanos Victor, Luis, Juan y Lesly por su amor, apoyo y compañía

A Jorge ( amigo inseparable), que aunque nunca me entiende, siempre me escucha.

A mis hijos Sadam, Elvis ( mi eterno compañero en mis horas de desvelo), Balam.

A Mis amigos y compañeros de trabajo, Lenin, Rodrigo, Benito, Claudia Peña y Claudia Rodríguez por su amistad y apoyo.

A mis amigos Héctor, Francisco, Mónica, Nicolle, Larisa, Perla, Ajaxacathl y Gonzalo por los momentos compartidos.

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

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biofísica del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, en el laboratorio BL-301 a cargo de la Dra. Herminia Pasantes Morales y con los subsidios: IN-201297 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM y 2262-P del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

# ÍNDICE

ÍNDICE .....	1
INTRODUCCIÓN .....	3
Importancia de la Regulación del volumen Celular .....	3
Cambios en el volumen celular en condiciones isosmóticas .....	4
Cambios en el volumen en condiciones anisosmóticas .....	5
Mecanismos de Regulación del Volumen Celular .....	7
Señales que activan la regulación del volumen celular .....	7
Osmolitos involucrados en la regulación del volumen celular .....	10
Movilización de osmolitos en respuesta a cambios de volumen celular en condiciones anisosmóticas .....	11
Incremento regulador de volumen .....	11
Decremento regulador de volumen .....	12
Mecanismos de movilización de los osmolitos en el DRV .....	13
Movilización de $K^+$ .....	13
Movilización de $Cl^-$ .....	14
Movilización de osmolitos orgánicos .....	16
Volumen celular en el cerebro .....	17
Decremento regulador de volumen en células nerviosas .....	18
Antecedentes directos y objetos .....	21
METODOLOGÍA .....	23
Cultivos celulares .....	23
Sistema generador de un gradiente osmótico .....	23
Cambios en el volumen celular .....	25
Liberación de aminoácidos .....	27
Cuantificación de aminoácidos endógenos .....	28
Materiales .....	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	29
Sistema generador de gradiente osmótico .....	29
Cambios en el volumen celular .....	34

Liberación de aminoácidos durante la RIV ..... 32

Cambios en el contenido endógeno de aminoácidos durante la RIV ..... 41

Efecto del ácido niflúmico y el EGTA-AM sobre la liberación de taurina durante la RIV ..... 43

Efecto del ácido niflúmico en el volumen celular ..... 45

CONCLUSIONES ..... 51

REFERENCIAS ..... 52

# INTRODUCCIÓN

## Importancia de la Regulación del Volumen Celular

Las células animales, a diferencia de las células vegetales y las bacterias, no cuentan con paredes rígidas que les permitan resistir diferencias significativas en la presión osmótica.

Por ello, han desarrollado los mecanismos de movilización de osmolitos intracelulares que ayudan a contrarrestar los cambios en el volumen ocasionados ya sea por modificaciones en la osmolaridad del medio externo o por la generación de gradientes osmóticos intracelulares (Chamberlain y Strange, 1989; Sarkadi y Parker, 1991). Entre estas, puede mencionarse el transporte de sustancias nutritivas, la secreción, los movimientos de organelos intracelulares (de manera particular, el citoesqueleto) y las fases de crecimiento y división celular.

En todos estos casos se crean gradientes osmóticos microscópicos que dan lugar a cambios locales y transitorios en el volumen celular, que deben ser corregidos (Sánchez-Olea et al., 1993).

La capacidad de las células para responder de manera rápida y eficiente ante variaciones en la osmolaridad externa mediante mecanismos de regulación del volumen celular, es un proceso homeostático que se ha conservado a lo largo de la evolución (Chamberlin y Strange, 1989). Esta propiedad es importante para la sobrevivencia y funcionamiento de la célula (Macknight, 1988), debido a que una variación en la concentración de los solutos intracelulares, producto de una modificación en el contenido de agua, puede alterar la morfología celular, el estado metabólico y los mecanismos de señalización y comunicación celular (Foskett, 1994; Hallows y Knauf, 1994; Alvarez-Leefmman y Reuss, 1996). El volumen celular también interviene directamente en la expresión genética, como señal de crecimiento y proliferación celular, y puede actuar como disparador para la iniciación de mecanismos de inserción de proteínas de membrana, canales, receptores y transportadores (Pasantés-Morales, 1996; Mc Manus y Churchwell, 1994).



## Cambios en el volumen celular en condiciones isosmóticas.

La presión osmótica de una solución se define como “la presión que se debe ejercer sobre la solución para contrarrestar cualquier movimiento neto de solventes entre la solución y el solvente puro, cuando éstos están separados por una membrana semipermeable perfecta” (Morris, 1980). Las soluciones isosmóticas son aquellas que poseen una misma presión osmótica con respecto al citosol, mientras que las que presentan una presión osmótica diferente a la del interior celular, son anisosmóticas: hiposmóticas, si la presión osmótica es menor e hiperosmóticas cuando la presión osmótica externa es mayor.

En condiciones fisiológicas, la mayoría de las células de los organismos multicelulares no se encuentran expuestas a situaciones anisosmóticas, (algunas excepciones son animales eurihalinos y células renales de animales terrestres). De manera similar, algunos tipos celulares como las células epiteliales del intestino y las células de la sangre de los capilares intestinales, posiblemente se encuentren en un medio hiposmótico después de una ingesta excesiva de agua (Hoffmann y Simonsen, 1989).

La osmolaridad de los fluidos corporales de mamíferos es de aproximadamente 285 mOsm/l, y solo presenta pequeñas variaciones que no exceden de un 3% (Hoffmann y Simonsen, 1989). En condiciones patológicas (hiponatremia e hipernatremia), la osmolaridad del plasma puede oscilar entre 220 y 350 mOsm/l, lo que resultaría, en ausencia de mecanismos reguladores de volumen, en un incremento o disminución del volumen de las células sanguíneas de aproximadamente 30% y 20% respectivamente (Macknight, 1983; 1985).

En el sistema nervioso, las células pueden incrementar su volumen en situaciones patológicas asociadas con hiponatremia. También ocurre un incremento en el volumen celular como consecuencia de situaciones de isquemia, epilepsia, encefalopatía hepática y particularmente durante los traumatismos craneoencefálicos. La exposición a compuestos que actúan como mensajeros químicos (neurotransmisores), tales como la norepinefrina y la adenosina, también producen un aumento en el volumen celular. Igualmente la activación de los receptores sinápticos a

los aminoácidos excitadores (ácido glutámico y ácido aspártico), produce aumento en el volumen celular (Choi, 1985). Ciertas vías catabólicas en las células, como la glucogenólisis y la lipólisis, pueden también conducir a un incremento en los niveles de solutos intracelulares osmóticamente activos (Kristensen, 1986). Así mismo, el metabolismo acelerado de las fibras musculares durante el ejercicio, aumenta los solutos intracelulares libres y activa los procesos reguladores de volumen (Saltin et al., 1987).

De forma general, puede afirmarse que cualquier proceso que conduzca a un aumento en la concentración intracelular de solutos osmóticamente activos, dará como resultado la formación de un gradiente osmótico y por tanto, un cambio en el volumen celular.

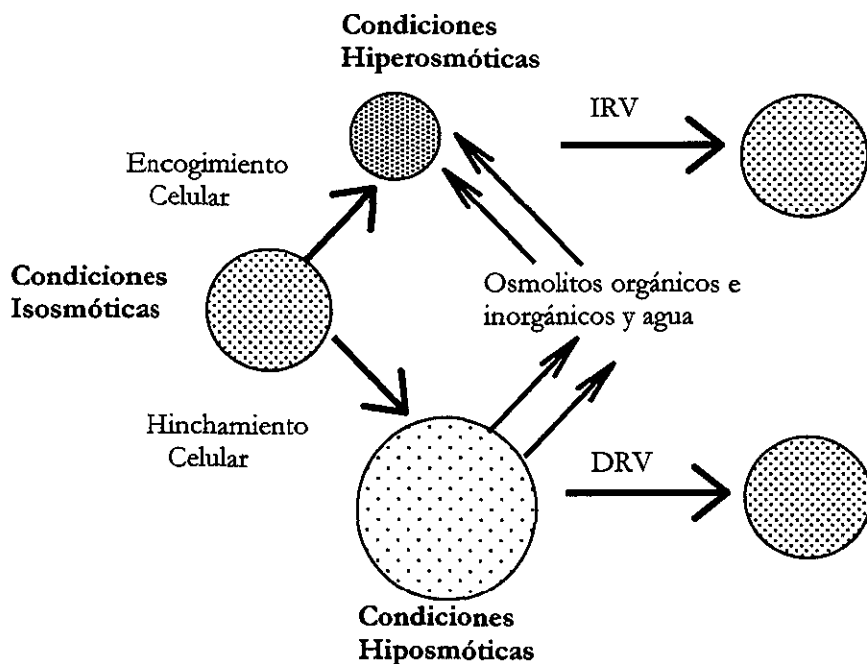
### **Cambios en el volumen en condiciones anisomóticas**

Las membranas celulares son altamente permeables al agua; por ello cuando existen diferencias en la concentración de los solutos osmóticamente activos entre los compartimentos intracelular y extracelular, se observan movimientos netos de agua que tienden a equilibrar el gradiente osmótico, con subsecuentes cambios en el volumen celular (Lang et al, 1998a). Por esto, las células responden como osmómetros perfectos.

En condiciones isosmóticas el volumen celular permanece constante, lo que indica que la entrada y salida de solutos osmóticamente activos se encuentra en equilibrio, con lo cual se evita la formación de un gradiente osmótico. Al ser expuestas a soluciones hiposmóticas, las células presentan inicialmente un aumento en el volumen celular provocado por la entrada de agua, seguido de una fase lenta de recuperación, durante la cual la célula alcanza un valor cercano al volumen original. Esta disminución del volumen es consecuencia directa de la pérdida de solutos intracelulares osmóticamente activos, que son acompañados por agua, lo que lleva a la disminución de la presión osmótica intracelular; este proceso se denomina Decremento Regulador de Volumen (DRV) (figura 1), y ha sido descrito en una gran variedad de células animales, incluyendo líneas tumorales (Hoffmann y col., 1988;

Strange y Morrison, 1992), células epiteliales (Welling et al., 1983; Davis y Finn, 1985; Kirk y Kirk, 1992), eritrocitos (Kregenow, 1981; Cala, 1983), linfocitos humanos (Grinstein et al., 1982; García et al., 1991), fibroblastos humanos (Bibby y Mc Culloch, 1994), células renales (Roy y Sauve, 1987) y células nerviosas (Olson et al., 1986; Kimelberg, 1985; Pasantes-Morales y Schousboe, 1988).

De igual manera, al ser expuestas a soluciones hiperosmóticas, las células sufren una disminución en el volumen celular como consecuencia de la salida de agua en respuesta al gradiente osmótico impuesto. En algunos tipos celulares esta disminución inicial del volumen es seguida de una fase de recuperación en la que se incrementa el contenido de agua a consecuencia de la acumulación de solutos osmóticamente activos. Este proceso de regulación de volumen se conoce como Incremento Regulator del Volumen (IRV) (figura 1).



**Figura 1.** Respuesta reguladora del volumen ante cambios anisomóticos. IRV (Incremento regulator del volumen. DRV (Decremento Regulator de Volumen)

## Mecanismos de Regulación del Volumen Celular

La regulación del volumen celular es un proceso complejo que implica varios eventos básicos. En primer lugar, la célula debe ser capaz de detectar los cambios en el volumen, mediante mecanismos sensores. Posteriormente, a través de señales de transducción se activan los mecanismos efectores, para modificar el contenido intracelular de solutos en la dirección necesaria para ajustar a la célula al nuevo gradiente osmótico (Strange, 1994). Esta movilización ocurre mediante la activación de vías de transporte transmembranal. Finalmente, la célula debe contar con un sistema de “memoria” del volumen original de la célula, para desactivar los mecanismos que se activaron durante el proceso regulador (Pasantes-Morales, 1996).

### *Señales que activan la regulación del Volumen Celular*

Los mecanismos propuestos como sensores y transductores del cambio del volumen celular, son:

- 1) De acuerdo con la hipótesis mecánica del sensor de volumen, este se localiza en la membrana plasmática o en el citoesqueleto adyacente a la misma y su activación pondría en marcha los mecanismos de transporte de solutos que subyacen a las respuestas reguladoras. Existen evidencias a favor de que algunos canales mecanosensibles conocidos como “cation-nonspecific stretch-activated channels” (SACS), presentes en la membrana plasmática, constituyen la parte central del sensor de volumen, y en algunos casos de los mecanismos efectores. La evidencia proviene de experimentos realizados en células en las que se ha logrado detectar, con técnicas electrofisiológicas, un aumento en la probabilidad de apertura de estos canales en respuesta a la distensión de la membrana cuando la célula aumenta de volumen.

También se ha propuesto que el citoesqueleto puede ser un componente tanto del mecanismo sensor de volumen, como del sistema de transducción (Goodman y Zagon, 1986);

- 2) La activación de canales catiónicos no selectivos sensibles al estiramiento, por efecto de la tensión mecánica de la membrana. La activación de la conductancia a través de estos canales, puede ser parte de los sistemas de señalización que activan los mecanismos de regulación de volumen (Christensen, 1987);
  
- 3) Los cambios en la concentración de moléculas señal, presentes en el citoplasma, como consecuencia del cambio en el contenido de agua. Tales señales pueden formar parte del sistema de transducción de señales de activación de los efectores. El  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{Mg}^{2+}$  se han propuesto como sensores/transductores primarios asociados con el incremento en el volumen producido por soluciones hiposmóticas.

La hipótesis que postula que los cambios en la concentración del  $\text{Mg}^{2+}$  libre intracelular, constituye la señal detonante de los mecanismos efectores de la respuesta reguladora carece de evidencia experimental sólida y actualmente es controvertida, ya que no se ha demostrado que los cambios en el volumen celular se correlacionen causalmente con modificaciones en la concentración del  $\text{Mg}^{2+}$  y que las respuestas efectoras sean moduladas por el  $\text{Mg}^{2+}$ .

Por el contrario, en los trabajos de Wong y Chase (1986) se reportó que un incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) es una característica constante del hinchamiento celular. McCarthy y O'Neil (1992) sugirieron en sus trabajos que canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a voltaje, canales tipo SACS y canales catiónicos no específicos, son las principales vías para la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  durante el hinchamiento celular. La inhibición de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por bloqueadores de estos tres tipos de canales sugiere que todos estos mecanismos pueden estar implicados en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . El  $\text{Ca}^{2+}$  también puede entrar por canales de calcio activados por metabolitos de los lípidos membranales, como fosfatidilinositol 1,3-bifosfato, a través de un mecanismo que involucra una proteína G (Tinel et al., 1997). Así mismo, se

ha reportado que el aumento de calcio intracelular puede ocurrir como consecuencia de la liberación del ión de pozas endógenas, principalmente del retículo endoplásmico, ya que su vaciamiento con tapsigargina y ácido ciclopiazónico previene el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  (Fisher et al., 1997; Jena et al., 1997; Wu et al., 1997; Tinel et al., 1994; Morán et al., 1997);

- 4) El cambio en la concentración de macromoléculas intracelulares también se ha propuesto como un posible sensor del cambio en volumen. La hipótesis denominada “apiñamiento de macromoléculas” (macromolecular crowding) postula que un cambio en la concentración de macromoléculas podría ser la señal intracelular que inicie el proceso regulador de volumen, modificando la actividad funcional de los transportadores efectores (Minton et al., 1994). Tal propuesta se basa en el hecho de que pequeños cambios en la concentración total de macromoléculas intracelulares producen grandes cambios en la actividad (o en el coeficiente de actividad) de otras macromoléculas. Este efecto se caracteriza por un poder amplificador de 10 a 1000 veces. Los cambios en la actividad funcional de los transportadores de solutos serían consecuencia de la actividad de solutos citoplásmicos, por ejemplo, enzimas que modulan la fosforilación de proteínas reguladoras o de los mismos transportadores. La hipótesis se derivó inicialmente de estudios realizados en fantasmas de eritrocitos en los que se demostró que la regulación del volumen celular no depende del valor absoluto del volumen, sino de la concentración de proteínas intracelulares. El efecto es inespecífico puesto que puede reproducirse con albúmina o hemoglobina. Aunque la posibilidad de que el fenómeno de apiñamiento macromolecular tiene un papel determinante en la regulación del volumen celular carece de evidencia definitiva (Alvarez-Leefmans y Reuss, 1996).

## *Osmolitos involucrados en la regulación del Volumen Celular*

Los mecanismos adaptativos de regulación del volumen celular se establecen a través de cambios en la concentración intracelular de solutos osmóticamente activos, los cuales son llamados osmolitos. Estos son esencialmente de dos tipos: iones inorgánicos, como:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y moléculas orgánicas, como aminoácidos, polialcoholes y metilaminas. La distribución y la concentración intracelular de los principales osmolitos orgánicos varían entre los diferentes tipos celulares, así como, las condiciones a las que las células se encuentran expuestas (Kirk et al., 1997). Las células de mamíferos, utilizan tres principales grupos de osmolitos orgánicos: polialcoholes, como sorbitol (Siebens y Spring, 1989) y mio-inositol; las metilaminas, como glicerofosforilcolina y betaína (Nakanishi et al., 1988) y aminoácidos, como glicina, glutamina, glutamato, aspartato, GABA y taurina (Pasantes-Morales et al., 1993 y Kimbelberg et al., 1990).

Entre los aminoácidos libres, la taurina tiene un papel importante en la función osmorreguladora. La taurina es un aminoácido sulfonado (ácido 2-aminoetasulfónico), que fue descubierto en la bilis de buey. Se encuentra ampliamente distribuido en los tejidos animales y en concentraciones notoriamente elevadas, constituyendo hasta el 70 % de la poza total de aminoácidos libres (80 mM en retina, 28 mM en linfocitos, 60 mM en músculo esquelético y cardiaco). La taurina es inerte fisiológicamente, ya que no forma parte de la estructura primaria de las proteínas, ni participa en el metabolismo primario de la célula (Jacobsen y Smith, 1968; Pasantes-Morales et al., 1991); su único papel bioquímico es la conjugación con el ácido cólico para formar el ácido taurocólico, y es acumulado en las células por un transportador dependiente de  $\text{Na}^+$ . La taurina puede ser considerada como un osmolito ideal, ya que al ser inerte metabólicamente, se moviliza dentro y fuera de la célula modificando el contenido de agua sin afectar ninguna función celular. También se ha sugerido que la taurina podría estar actuando no sólo como osmolito a nivel celular, sino para mantener espacios intracelulares en estructuras como el retículo sarcoplásmico, el músculo, los canalículos secretores en las glándulas y los espacios discales en los fotorreceptores (Pasantes-Morales et al., 1998).

## *Mobilización de osmolitos en respuesta a cambios de volumen celular en condiciones anisomóticas*

### **Incremento regulador de volumen**

El incremento regulador de volumen que se activa en condiciones hiperosmóticas se caracteriza generalmente por una acumulación inicial de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , seguida de un intercambio secundario de  $\text{Na}^+$  por  $\text{K}^+$ , mediante la activación de la  $\text{ATPasa Na}^+/\text{K}^+$ , resultando en ganancia neta de  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$ . Los sistemas de transporte iónicos más importantes en la acumulación de electrolitos son: el cotransportador  $\text{Na}^+/\text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$  y el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ; este último, por efecto de la salida de  $\text{H}^+$  de la célula produce un aumento en el pH intracelular y una activación paralela del intercambiador  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  (figura 2). En algunas células, la acumulación de electrolitos durante el IRV se lleva a cabo por la activación de canales de  $\text{Na}^+$  y/o canales catiónicos no selectivos (Orskov, 1954 y Parker, 1977). La despolarización inducida por la entrada de  $\text{Na}^+$  favorece la entrada de  $\text{Cl}^-$  particularmente en fases más tardías. Por otra parte, se ha observado la participación importante de los osmolitos orgánicos durante el IVR, viéndose involucrados procesos de síntesis y acumulación de osmolitos, como mio-inositol y sorbitol, de aminoácidos, como glutamato, glutamina y taurina (Pasantes-Morales, 1996), así como, glicerosforilcolina y urea (Ballantyne y Chamberlain, 1994; Yancey, 1994; Lang et al., 1998a). El proceso en el que intervienen los osmolitos orgánicos es más lento, ya que en general, involucra la síntesis *de novo* de moléculas transportadoras que son responsables del incremento en la concentración intracelular de los osmolitos. Los osmolitos orgánicos pueden ser usados preferentemente a los electrolitos (osmolitos inorgánicos) durante el IRV, debido que los iones en altas concentraciones, interfieren con la función enzimática. A diferencia de los iones, los osmolitos orgánicos aún en altas concentraciones son compatibles con la función normal de las macromoléculas (Lang et al., 1998b). En virtud de que el presente trabajo se ocupa de cambios de volumen en condiciones hiposmóticas, los mecanismos activados durante el IVR no se examinarán con más detalle.



# Decremento regulador de volumen

En células de vertebrados superiores son principalmente los iones  $K^+$  y  $Cl^-$  los que se movilizan en respuesta al incremento en el volumen inicial con el que la célula responde a condiciones hiposmóticas. Los sistemas de transporte que intervienen en el DRV, son preferencialmente canales de  $K^+$  y canales aniónicos. Los cotransportadores electroneutros  $K^+/Cl^-$  son utilizados menos frecuentemente como mecanismos para la salida de  $KCl$  (figura 2). Estos transportadores parecen ser activados preferentemente por hinchamiento celular isotónico. Otro mecanismo para liberar  $KCl$ , es la activación paralela de los intercambiadores  $K^+/H^+$  y  $Cl^-/HCO_3^-$  (Cala, 1983;

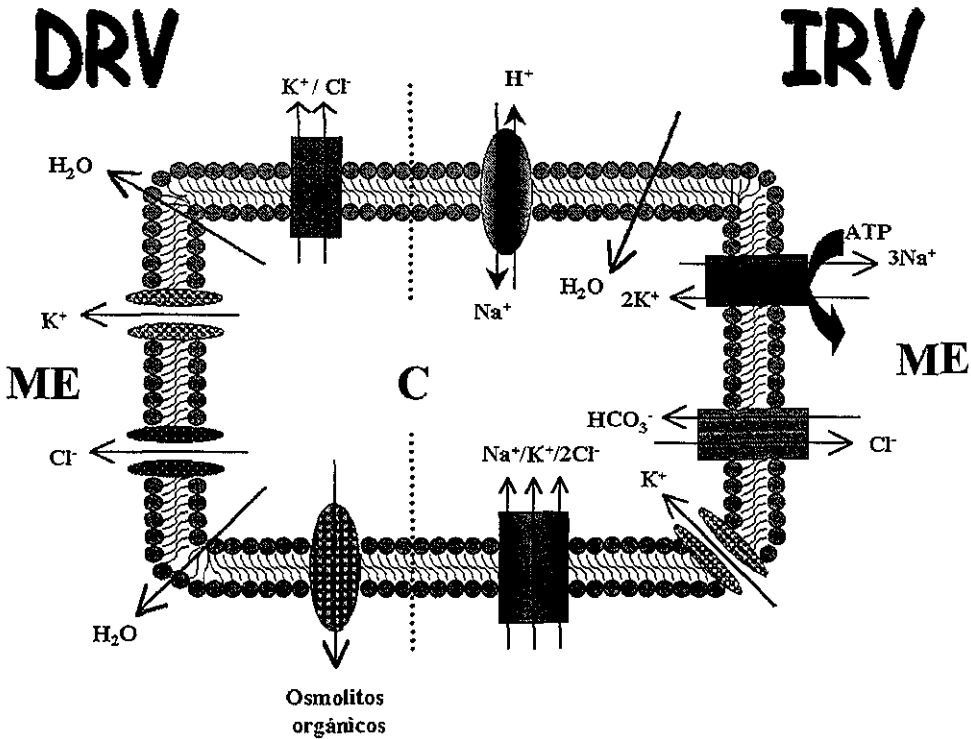


Figura 2. Mecanismos de Regulación del Volumen Celular. DRV (Decremento Regulador del Volumen; IRV (Incremento Regulador del Volumen); ME (Medio extracelular) y C (Citoplasma).

Kregenow, 1981). El  $H^+$  y el  $HCO_3^-$  intercambiados por  $KCl$  forman  $CO_2$ , que difunde al espacio extracelular, por lo que no es osmóticamente activo (Lang et al., 1998a). También se ha reportado la participación del intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  funcionando de manera inversa, así como la expulsión de  $Ca^{2+}$  a través de la ATPasa de  $Ca^{2+}$ , la activación de la ATPasa  $K^+/H^+$  y la ATPasa  $Na^+/K^+$ . De igual manera, la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de canales catiónicos no selectivos activa la salida de  $K^+$  vía canales de  $K^+$  sensibles a  $Ca^{2+}$ .

El mecanismo utilizado para disminuir los niveles intracelulares de  $Cl^-$  y  $K^+$  determina el curso temporal de la recuperación del volumen. Cuando se encuentra involucrado el sistema de cotransportador  $K^+/Cl^-$ , el proceso es lento y tarda aproximadamente 1 hora, mientras que si se activan los sistemas de intercambio  $Cl^-/HCO_3^-$  y  $K^+/H^+$  la regulación se completa en 30 minutos y si se activan los canales de  $K^+$  y  $Cl^-$ , el volumen inicia su recuperación en un tiempo de 10 a 15 minutos (Lauf, 1985).

## **Mecanismos de movilización de los osmolitos en el DRV**

### ***Movilización de $K^+$ .***

La salida de  $K^+$  asociada al DRV no está bien caracterizada, aunque se sabe que es una vía catiónica selectiva para  $K^+$ , insensible a 4-aminopiridina (4-AP) y tetraetil-amonio (TEA) (Pasantés-Morales et al., 1994a), sensible a quinidina, bario ( $Ba^{2+}$ ) y cesio (Morales-Mulia, et al., 1998). De hecho, no está bien definida la existencia de un canal de  $K^+$  activado exclusivamente por el cambio en el volumen. Es posible que una proporción importante de los movimientos de  $K^+$  asociados al DRV ocurra a través de canales que se activen por algunos de los fenómenos concurrentes con el hinchamiento, tales como incremento en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$ , cambios en la organización del citoesqueleto, fosforilación de varias proteínas y la expresión de algunos genes (Ninning et al., 1997; Tilly et al., 1996). El hinchamiento también afecta el potencial de membrana de acuerdo a la naturaleza y cinética de la corriente activada. En muchas células, la salida de  $Cl^-$  producida por hinchamiento

(Sánchez-Olea et al., 1990) conduce a una despolarización, que podría activar canales de  $K^+$  activados por voltaje (Kv) los cuales son candidatos a ser las vías por las que el  $K^+$  sale de las células. La evidencia que respalda esta hipótesis, proviene de estudios en linfocitos T, los que carecen de la habilidad de regular su volumen, y que al ser transfectados con el gen de los canales Kv 1.3 adquieren esa propiedad (Deutsh y Chen, 1993). Por esto, es posible que el  $K^+$  se movilice en respuesta a esos cambios en vez de o además de una respuesta exclusivamente al cambio en volumen.

### *Movilización del $Cl^-$ .*

La movilización del  $Cl^-$  durante el DRV se lleva a cabo por vías electrogénicas constituidas por canales aniónicos que han sido estudiados con detalle. Estudios electrofisiológicos de fijación de voltaje han demostrado que el  $Cl^-$  sale de la célula por una vía difusional. Esta vía aniónica es permeable a un gran número de aniones incluyendo los de gran tamaño como benzoato, tiocianato y sulfato (Pasantes-Morales et al., 1994a). Los canales de  $Cl^-$  activados por hinchamiento presentan varias propiedades electrofisiológicas, presentando una corriente rectificadora saliente, inactivación dependiente de voltaje (con potenciales de membrana mayores a +60 mV), activación dependiente de ATP y  $Mg^{2+}$  intracelular (Jackson et al., 1994), conductancia unitaria de 35-40 pS (Jackson and Strange, 1995a,b), así como la siguiente selectividad aniónica  $SCN^- > I^- > NO_3^- > Br^- > Cl^- > F^- > isotionato > gluconato$ . Los inhibidores generales de canales de  $Cl^-$  como el ácido niflúmico, el DIDS (4,4, diisothiocynato-stilbeno-2,-disulfónico ácido), el NPPB (5-nitro-2-[3-phenylpropylamino]benzoico ácido), la DDF (1-9-dideoxyforkolina), el tamoxifen, el dipiridamol, el ácido araquídónico, y otros ácidos grasos presentan un efecto inhibidor en los flujos de  $Cl^-$  activados por hinchamiento. A pesar de que las propiedades electrofisiológicas y la sensibilidad farmacológica de estos canales se conocen con detalle, no se ha podido establecer su identidad molecular.

Una serie de canales de  $Cl^-$  pertenecientes a la familia CIC han sido clonados recientemente: CLC-0, CLC-1, CIC-2 CIC-3, CIC-4, CIC-5, CIC-6, CIC-7, CIC-K1 y el CIC-K2) (Brandt y Jentsch, 1995), y algunos de ellos se activan por

hiposmolaridad. Sin embargo, sus características electrofisiológicas y su perfil farmacológico no corresponden con los del canal activado durante el DRV. Otras moléculas que se han postulado como posible vía de movilización del  $\text{Cl}^-$  durante el DRV son la glicoproteína-P, la  $\text{PI}_{\text{ClIn}}$  y la VDAC (canal aniónico dependiente de voltaje).

La glicoproteína-P pertenece a la familia de los transportadores ABC (ATP-binding-cassette, es decir presenta una secuencia consenso para unir ATP). Se ha sugerido que puede servir como un canal aniónico activado por hinchamiento y/o como proteína reguladora del canal. Esta interpretación ha sido cuestionada por trabajos que muestran que no existe correlación entre los niveles de expresión de la glicoproteína-P y la actividad del canal activado por hinchamiento, así como la existencia de tipos celulares que presentan corrientes de  $\text{Cl}^-$  activadas por hinchamiento sin tener glicoproteína-P y viceversa, las que aún, expresando esta proteína, no presentan el canal de  $\text{Cl}^-$  sensible a volumen (Mc Ewan et al., 1992).

La  $\text{PI}_{\text{ClIn}}$  tiene 235 aminoácidos y fue clonada originalmente de las células MDCK (Paulmichl et al., 1992). Está ampliamente distribuida en varios tipos de células y su secuencia de aminoácidos se encuentra altamente conservada. Cuando la  $\text{PI}_{\text{ClIn}}$  es expresada en ovocitos de *Xenopus* genera una conductancia de  $\text{Cl}^-$  con características similares a la del canal aniónico y a la de osmolitos activados por hinchamiento. Sin embargo, estudios subsecuentes demuestran que la  $\text{PI}_{\text{ClIn}}$  está principalmente localizada en el citoplasma, lo cual lleva a la suposición de que puede servir como regulador citosólico del canal activado por hinchamiento más que como un canal por sí mismo (Ackerman et al., 1994). Paulmichl y sus colegas han descrito resultados preliminares que indican que aunque la  $\text{PI}_{\text{ClIn}}$  esta normalmente en el citosol, migra a la membrana en respuesta al hinchamiento osmótico. Con base en estos resultados Paulmichl (1996) ha propuesto un modelo de “anclaje-inserción” que puede acoplarse a muchos de los datos obtenidos.

El canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), es un canal parecido a una porina y se ha encontrado formando parte de la membrana externa de las mitocondrias en eucariontes. Recientemente se ha descrito que VDAC se encuentra

también en la membrana plasmática de ovocitos de *Xenopus* y el anticuerpo anti-VDAC de linfocitos humanos inhibe los flujos iónicos activados por hiposmolaridad en estas células (Reyman et al, 1995).

### *Movilización de osmolitos orgánicos*

Los mecanismos responsables de los ajustes en la concentración de los osmolitos orgánicos en respuesta a los cambios de volumen, no están del todo aclarados. Se ha demostrado que la exposición de diferentes tipos celulares a medios hiposmóticos produce un incremento en los flujos de taurina y de otros aminoácidos a través de la membrana, así como de polialcoholes y metilaminas. La salida de taurina y de mio-inositol, no ocurre por la vía del cotransportador dependiente de  $\text{Na}^+$ , lo cual es sustentado por las siguientes evidencias: 1. la salida de los osmolitos es independiente de  $\text{Na}^+$  e insensible a bloqueadores del transportador, como la florizina en el caso del mio-inositol (Sánchez-Olea y col., 1991; Strange et al., 1994); 2. la salida de los osmolitos es un proceso difusional, por lo que el movimiento de los mismos, sólo depende de su gradiente de concentración; así, en una situación normal en donde la concentración intracelular excede a los niveles extracelulares, se observa la salida de osmolitos, pero si los niveles extracelulares rebasan a los intracelulares, los osmolitos se acumulan en la célula (Pasantes-Morales et al, 1994b; Sánchez-Olea et al., 1991); 3. la salida de osmolitos activada por hiposmolaridad no es saturable (Sánchez-Olea et al., 1991; González et al., 1995).

Evidencias recientes sugieren que la vía difusional de los osmolitos orgánicos pudiera ser un canal aniónico (Pasantes-Morales, 1996). La vía de movilización de los aminoácidos se inhibe por bloqueadores de canales de  $\text{Cl}^-$  como el DIDS, el dipiridamol, el NPPB, la DDF, los ácidos grasos poliinsaturados y el ácido niflúmico (Sánchez-Olea et al., 1993; Sánchez-Olea et al., 1996; Pasantes-Morales et al., 1994a). Estos resultado han sugerido la posibilidad de que los osmolitos orgánicos se movilen a través de la misma vía que el  $\text{Cl}^-$ , es decir, mediante alguno de los mecanismos antes mencionados. En el caso particular de la taurina se han sugerido además otras dos posibles vías: la banda 3, que es la principal proteína constituyente

de la membrana plasmática de los eritrocitos de muchas especies de vertebrados y tiene su parte homóloga en otros tejidos. Este es un sistema de intercambiador aniónico electroneutro ( $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ) pero también puede funcionar como un canal unidireccional de  $\text{Cl}^-$  activado por volumen. La observación de que los inhibidores clásicos del intercambiador aniónico inhiben el movimiento de osmolitos y las corrientes de  $\text{Cl}^-$  activadas por volumen sugerirían que la banda 3 está involucrada como vía osmosensible de translocación (Goldstein et al., 1990; Goldstein y Brill, 1991; García-Romeu et al., 1991; Motais et al., 1991, 1992). Es posible que existan isoformas de la banda 3 con esta actividad y otras desprovistas de ella. Se ha reportado que en ovocitos de *Xenopus* la expresión de la banda 3 de los eritrocitos de trucha induce una actividad de canal de  $\text{Cl}^-$  activado por hinchamiento, así como un incremento en la permeabilidad de la taurina, a diferencia de la banda 3 de los eritrocitos de ratón cuya expresión en los ovocitos no genera ningún cambio (Fiévet y col., 1995).

Otro candidato para ser una vía osmosensible en particular de la taurina es el fosfolema. El fosfolema es una 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 que la del  $\text{Cl}^-$ . Una de sus propiedades particulares es que el canal formado por el fosfolema cambia de configuración, permitiendo el paso de cationes o aniones. Esta característica explicaría el paso de zwitteriones como la taurina. Está proteína es por tanto un candidato muy sólido para ser la vía de transporte de taurina regulado por volumen (Moorman et al., 1995).

## **Volumen celular en el cerebro**

El edema cerebral representa un cuadro clínico severo, asociado a numerosas patologías. La causa directa de gravedad clínica subsecuente al edema es la restricción que impone el cráneo a la expansión del tejido cerebral (Pasantes-Morales, 1996), lo cual provoca un incremento casi inmediato de la presión intracraneal, comprometiendo la irrigación sanguínea y provocando episodios de isquemia,

seguidos de muerte neuronal y daño permanente. Los cambios patológicos en el edema cerebral pueden ser agrupados en dos categorías: citotóxicos, que ocurren en patologías como isquemia, encefalopatía hepática, excitotoxicidad, hipoxia/anoxia, epilepsias, estrés oxidativo y trauma craneoencefálico; y anisomóticos, ocasionados por alteraciones en la tonicidad del plasma como hiponatremia, síndrome de secreción inapropiada de hormona antidiurética, intoxicación por agua, uso inapropiado de diuréticos, deshidratación y diabetes insípida.

La hiponatremia ocurre como resultado de pérdida de  $\text{Na}^+$  en el fluido extracelular, así como por una inapropiada secreción de la arginina vasopresina (Trachtman, 1992) o por una falla renal que conlleva a una pérdida de sales en el fluido cerebral, y una disminución en el fluido extracelular (Harrigan, 1996 y Zafonte, 1997). La hiponatremia crónica se desarrolla de manera incidental en un periodo indefinido de tiempo y con frecuencia los pacientes permanecen asintomáticos. En la hiponatremia aguda se produce edema cerebral y severas alteraciones neurológicas; sin embargo, en la hiponatremia prolongada, el edema no es tan severo debido a los mecanismos de ajuste en el contenido de electrolitos y osmolitos celulares que ocurren muy probablemente a través de los mecanismos de regulación del volumen celular que se investigan en el presente trabajo.

### **Decremento regulador de volumen en células nerviosas**

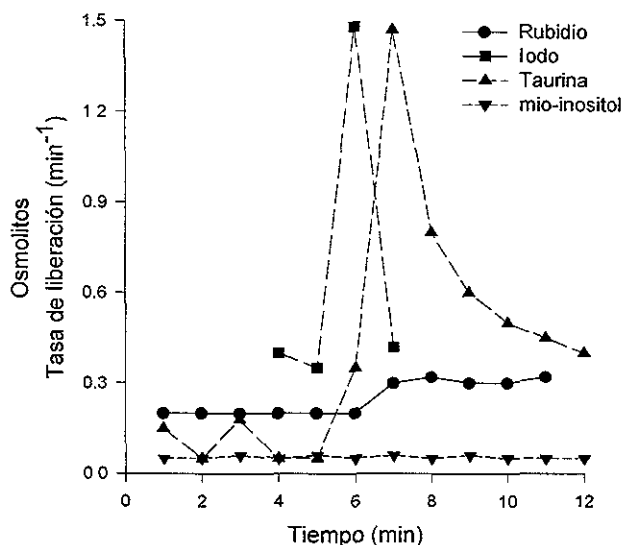
El DRV ha sido estudiado principalmente en células en cultivo, líneas celulares, neuronas y células gliales (Pasantes-Morales y Schousboe, 1988; Pasantes-Morales et al., 1994b, 1994c; Pasantes-Morales et al., 1997). En células de cerebro en cultivo (astrocitos y neuronas), el DRV es un proceso rápido que requiere entre 15 y 30 minutos, después del choque hiposmótico para completarse. Consiste de una fase inicial que ocurre durante los primeros 5-6 minutos después del hinchamiento, seguida de una fase lenta que dura alrededor de 10 minutos, en la cual la célula recobra su volumen original, con una eficiencia que es proporcional a la magnitud del decremento en la osmolaridad y del tipo celular. El DRV es la consecuencia de la salida de solutos intracelulares osmóticamente activos. (Pasantes-Morales et al., 1998).

El DRV en células nerviosas es esencialmente independiente de temperatura y  $\text{Na}^+$  (Pasantes-Morales et al., 1994a), no se afecta por inhibidores de los cotransportadores de osmolitos orgánicos e inorgánicos, como bumetanida, furosemida y florizina. Es sensible a bloqueadores de canales de  $\text{Cl}^-$ , tales como el NPPB, el DDF, el dipiridamol y el ácido niflúmico. Se ha observado también que el DRV es dependiente de  $\text{Cl}^-$  sólo en células C6, no así en neuronas y astrocitos (Pasantes-Morales et al., 1993, 1994a). También es insensible a inhibidores de canales de  $\text{K}^+$ , como 4-AP y TEA. Sólo el bario y la quinidina presentan un efecto inhibitor (Morales-Mulia et al., 1998). Los ácidos grasos poliinsaturados, como el ácido araquídico, el linoléico y el linolénico se cuentan entre los más potentes inhibidores del DRV (Sánchez-Olea et al., 1996). Tal efecto no es mediado por la cascada metabólica del ácido araquídico (Pasantes-Morales, 1996).

En neuronas y astrocitos en cultivo, el curso temporal de liberación de los principales osmolitos:  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y aminoácidos es marcadamente diferente. La salida de  $\text{Cl}^-$  es activada inmediatamente después del aumento de volumen e inactivada en menos de 80 segundos. La liberación de taurina tiene un comportamiento más cercano a los cambios en el volumen celular, alcanzando un máximo de activación alrededor de 1 minuto después de la exposición al medio hiposmótico, seguida por una inactivación en los 2-3 minutos subsecuentes. En cambio, la salida de  $\text{K}^+$  muestra un curso temporal lento, con un máximo de activación de aproximadamente 2 minutos, seguido de una meseta de 2-5 minutos antes de comenzar la fase de inactivación (figura 3). En astrocitos en cultivo, una proporción de 30 - 80 % de la poza celular de aminoácidos activos como osmolitos es liberada en respuesta a medios 50% hiposmóticos (150 mOsmol/l). La proporción de  $\text{K}^+$  liberado es de 21%, pero teniendo en cuenta que la concentración intracelular de ión es muy alta, esto representa un aporte sustancial al proceso de ajuste osmótico. Frecuentemente se ha observado que un incremento en la salida de  $\text{K}^+$ , obtenido por diferentes procedimientos experimentales como la presencia de ionóforos, incrementa la velocidad y la eficiencia del DRV (Pasantes-Morales et al., 1998).



Las vías de movilización de los osmolitos en células nerviosas tienen características similares a las descritas en la sección general de esta introducción. De hecho los estudios en células nerviosas han contribuido muy significativamente al avance del conocimiento que hoy se tiene de estas vías (Pasantes-Morales, 1996).



**Figura 3.** Curso temporal de la liberación de osmolitos inducida por hinchamiento osmótico en astrocitos de cerebelo en cultivo. Las células fueron incubadas con trazadores radioactivos,  $^{86}\text{Rb}$  (como trazador de  $\text{K}^+$ ),  $^{125}\text{I}$  (como trazador de  $\text{Cl}^-$ ),  $^3\text{H}$ -taurina y  $^3\text{H}$ -mio-inositol, se lavaron y perfundieron a 1 ml/min con medio isosmótico por 4 min. Al min. 5 la perfusión continuó con medio hiposmótico 50% (Pasantes-Morales et al., 1998).

## ANTECEDENTES DIRECTOS Y OBJETIVOS

Los mecanismos de regulación del volumen celular han sido principalmente estudiados en respuesta a cambios súbitos de osmolaridad. Tales modificaciones en el medio no corresponden en magnitud y velocidad a los cambios en la osmolaridad del medio extracelular que ocurren en condiciones fisiológicas o patológicas. Por ello se ha diseñado un paradigma experimental consistente en exponer a las células a cambios graduales y continuos en la osmolaridad. Este modelo es sin duda, más cercano a situaciones que ocurren en vivo, como en condiciones de hipotonicidad del plasma a consecuencia de una hiponatremia, que impone un gradiente osmótico al cerebro. Las células nerviosas reaccionan a esta situación activando los flujos de electrolitos y osmolitos orgánicos. El paso inicial consiste en una rápida liberación de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , lo cual es detectable en 3-24 horas del inicio de la hiponatremia, esto provee un rápido mecanismo para contrarrestar el edema cerebral (Melton et al., 1987). En un segundo paso, se presenta una disminución en los osmolitos orgánicos (Thurston et al., 1980; Trachtman et al., 1991; Lien et al., 1991; Verbalis and Gullans, 1991; Sterns et al., 1993).

En estudios realizados en células de túbulos proximales de riñón ( $\text{S}_2$ ) (Lohr y Grantham, 1986), en una línea celular de nefrona distal (A6) (Van Driessche et al., 1997) y en células de glioma de rata (C6), se demostró que cuando la osmolaridad del medio extracelular cambia lenta y gradualmente las células tienen la capacidad de mantener su volumen. Este fenómeno fue denominado regulación isovolumétrica (RIV).

La RIV ocurre dentro de un rango de osmolaridad muy amplio, entre 300 a 440 mOsm/l en células  $\text{S}_2$  (Lohr y Grantham, 1986). Los mecanismos que subyacen a esta regulación se han estudiado sobre todo en el rango de condiciones hiperosmóticas. En este caso, el mecanismo de regulación de volumen se efectúa mediante la acumulación de solutos orgánicos a través de la activación de cotransportadores dependientes de  $\text{Na}^+$  y la entrada de electrolitos por medio del cotransportador  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  y de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (Lohr et al., 1989; Mountian y Van Driessche, 1997; Van Driessche, 1997). En el caso de cambios de osmolaridad

decrecientes, el mecanismo no se conoce, pero podría llevarse a cabo mediante la pérdida de osmolitos por mecanismos que pueden ser similares de los que se activan durante el DRV (Lohr, 1990; Van Driessche et al., 1997). Es interesante hacer notar que no todas las células responden de la misma manera a estas condiciones, ya que en un estudio en eritrocitos se encontró que estos no presentan RIV (Godart, 1999). Por ello, es importante determinar si otros tipos celulares, particularmente en el cerebro, tienen esta capacidad.

Con estos antecedentes, el objetivo del presente estudio fue establecer si las neuronas (usando como modelo las células granulares de cerebelo) presentan regulación isovolumétrica. En una aproximación inicial al conocimiento de los mecanismos responsables de esta regulación, se caracterizó la liberación de osmolitos orgánicos (aminoácidos osmóticamente activos) en respuesta a cambios graduales y continuos de osmolaridad y se evaluó el impacto de esta movilización sobre la RIV.

# METODOLOGÍA

## Cultivos celulares

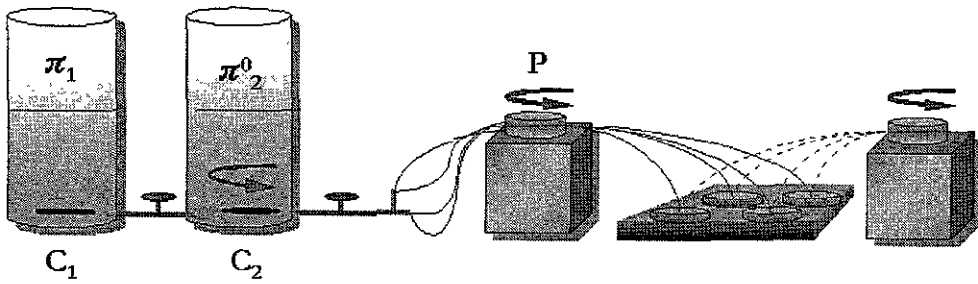
Los cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo de 1 de un día *in vitro* se obtuvieron de acuerdo al método descrito por Morán y Patel (1989). Brevemente, las células se aislaron del cerebelo de ratas de 8 días de edad por disociación enzimática. Se sembraron a una densidad de  $265 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> en cajas petri de plástico de 35mm, previamente cubiertas con poli-L-lisina (5 µg/ml, MW > 300,000) como sustrato y citosina arabinosa (10 µM) aproximadamente 20 h. antes de sembrar. El medio de cultivo consiste de medio basal Eagle (Sigma, St Louis, MO) suplementado con 10% de suero fetal de ternera inactivado por calor (Gibco, Grand Island, NY), glutamina 2 mM, penicilina 50 U/ml y estreptocimina 50 µg/ml. Las cajas de células se mantuvieron a una temperatura constante de 37°C, en una atmósfera húmeda (5% de CO<sub>2</sub>/ 95% aire).

El enriquecimiento del cultivo en neuronas fue determinado mediante un anticuerpo policlonal contra una enolasa específica de neuronas (Dakopatts, Dako, Carpinteria, CA). De acuerdo con este procedimiento se observó que la proporción de neuronas en cultivo es de 95-97%. La proporción de las células no neuronales fue estimada en 2-3% de células gliales y 1-2% de células endoteliales y fibroblastos (Morán y Patel, 1989).

Para medir el volumen celular, las neuronas granulares de cerebelo fueron sembradas a baja densidad ( $200 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>) y crecidas sobre cubreobjetos, en las condiciones descritas.

## Sistema generador de un gradiente osmótico

Para generar un cambio gradual de osmolaridad a una tasa determinada (gradiente osmótico), se utilizó un dispositivo que consiste en dos vasos de vidrio con la misma capacidad de volumen (C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> en la figura 4), interconectados en la base por un tubo con una válvula de interrupción.



**Figura 4.** Sistema de perfusión acoplado a un sistema de vasos comunicantes (Lohr y Grantham, 1986)

Ambos vasos se llenaron con el mismo volumen de medio. El recipiente  $C_2$  contiene medio isosmótico (300 mOsm/l) a partir del cual se genera la reducción continua de la osmolaridad, al irse mezclando gradualmente con el medio hiposmótico (150 mOsm/l) del contenedor  $C_1$ . La tasa de cambio o reducción en la osmolaridad teórica fue calculada por medio de la ecuación (1) (Mountian y Van Driessche, 1997).

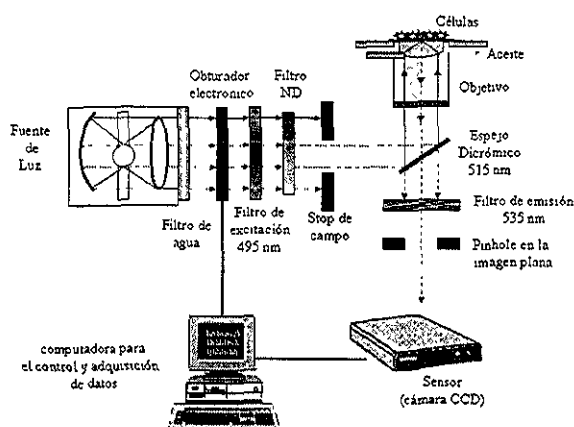
$$\pi_2 = -(\pi_2^0 - \pi_1) \frac{P}{2V_0} t + \pi_2^0 \quad (1)$$

Donde  $\pi_2^0$  es la osmolaridad inicial en  $C_2$  (300 mOsm/l),  $\pi_1$  es la osmolaridad del medio en  $C_1$  (150 mOsm/l);  $P$  es la velocidad de perfusión de la bomba peristáltica (2 ml/min) y  $V_0$  es el volumen en  $C_1$  y  $C_2$  al comenzar el decremento osmótico. Con esta tasa de cambio (-1.8 mOsmol/min), al término de 82 min. la osmolaridad en el vaso  $C_2$  se redujo en 150 mOsm.

Para probar el funcionamiento del sistema generador del gradiente, se colectaron muestras cada minuto del medio de perfusión y se midió la osmolaridad en cada muestra por medio de un osmómetro de punto de congelación (Osmette A. Precision Systems Inc).

## Cambios en el Volumen Celular

Los cambios en el volumen celular fueron determinados en neuronas granulares de cerebelo cultivadas sobre cubreobjetos, por un método espectrofluorométrico, basado en la descripción de los grupos de Crowe (1995) y Altamirano (1998) (figura 5). En este estudio se utilizó al fluoróforo calceína-AM para determinar los cambios en el volumen de agua intracelular, por medio del cambio en la concentración intracelular del fluoróforo. Las células fueron incubadas con calceína-AM  $1 \mu\text{M}$  por 15 min. a temperatura ambiente. Después de este tiempo, el exceso de calceína-AM se eliminó mediante lavados sucesivos con medio sin el fluoróforo. Las células se colocaron en una cámara de perfusión, para posteriormente ser observadas en un microscopio invertido de epifluorescencia (Nikon Diaphot TMD, Japón), unido a un espectrofluorómetro (SLM Aminco DMX-1000, Urbana IL). La longitud de onda de excitación fue fijada a 497 nm. Las imágenes se transmitieron por medio de una cámara CCD (C2400, Hamamatzu, Japón) a una computadora personal, donde las imágenes de la fluorescencia se analizaron con el Software Biolase Imaging System (Newton, MA).



**Figura 5.** Método espectrofluorométrico para determinar el volumen celular, utilizando calceína-AM como fluoróforo, basado en la descripción de Crowe et al (1995) y Altamirano et al. (1998).

Para el desarrollo experimental que permita estudiar los cambios en el volumen, las células fueron expuestas a una de las dos condiciones de estimulación hiposmótica, de acuerdo los siguientes protocolos de estimulación. En el primero, se perfundieron las células con medio isosmótico y se expusieron a cambios súbitos de osmolaridad (hiposmótico ó hiperosmótico, 30 % para ambos casos) durante 15 min. Las imágenes de la fluorescencia se obtuvieron cada 30 segundos hasta los 7 min., posteriormente cada 5 min. En el segundo protocolo, las células fueron perfundidas inicialmente con medio isosmótico y enseguida expuestas a un medio gradualmente hiposmótico a una tasa de  $-1.8 \text{ mOsm/l/min.}$ , hasta obtener una osmolaridad externa de  $150 \text{ mOsm/l}$  (50 % hiposmótico). Las imágenes de la fluorescencia se colectaron cada 10 min. En ambos protocolos, se determino el cambio de volumen en controles perfundidos con medio isosmótico.

Los experimentos se realizaron un medio isosmótico ( $300 \text{ mOsm/l}$ ), conteniendo(en mM):  $135 \text{ NaCl}$ ,  $1.0 \text{ CaCl}_2$ ,  $1.17 \text{ MgCl}_2$ ,  $1.17 \text{ KH}_2\text{PO}_4$ ,  $5 \text{ KCl}$ ,  $5 \text{ glucosa}$  y  $10 \text{ HEPES}$  (pH 7.4). Los medios hiposmóticos se prepararon reduciendo la concentración de  $\text{NaCl}$  a  $94.5$  y  $67.5 \text{ mM}$  (30% y 50% hiposmótico respectivamente). La osmolaridad se verificó por medio de un osmómetro de punto de congelación.

Los cambios en el volumen celular ( $V_t/V_0$ ) se calcularon a partir de las medidas en fluorescencia relativa ( $F_t/F_0$ ), de acuerdo a la ecuación (2) (Crowe et al., 1995):

$$[(F_0/F_t) - F_{\text{bkg}}] / (1-F_{\text{bkg}}) = V_t/V_0 \quad (2)$$

donde  $F_0$  es la fluorescencia de una célula en medio isosmótico control, teniendo una presión osmótica  $\pi_0$ ;  $F_t$  es la fluorescencia de la misma célula en un medio de presión osmótica  $\pi_1$ ;  $F_{\text{bkg}}$  es la fluorescencia de fondo;  $V_0$  es el volumen de agua de la célula en un medio con presión osmótica  $\pi_0$  y  $V_t$  es el volumen de agua de una célula en un medio con presión osmótica  $\pi_1$ .  $F_{\text{bkg}}$  incluye la fluorescencia intrínseca de la célula y el componente insensible osmóticamente de la fluorescencia en las células marcadas con el fluoróforo.  $F_{\text{bkg}}$  fue calculada de acuerdo a lo descrito por Crowe y colaboradores

(1995), a partir de la intercepción con el eje-y de una gráfica  $F_0/F_t$  vs.  $\pi_0/\pi_t$ , de diferentes células expuestas durante 15 min. a medios con 450, 390, 300, 210 y 150 mOsm/l. El valor numérico obtenido fue 0.6. Para cuantificar los cambios en el volumen debidos a la exposición a un gradiente osmótico,  $F_0$  y  $F_t$  fueron inicialmente determinadas, midiendo a diferentes tiempos la fluorescencia de las células perfundidas con medio isosmótico y con el gradiente osmótico, respectivamente. Los puntos experimentales fueron ajustados a una regresión lineal para corregir el decaimiento en la señal de fluorescencia debida al escape de la coloración y al fotoblanqueamiento. Los datos  $F_0$  y  $F_t$  obtenidos de esta manera fueron utilizados en la ecuación (2) para calcular los datos del volumen  $V_t/V_0$ .

### Liberación de aminoácidos

Las células se incubaron durante 60 min. en el medio isosmótico conteniendo aminoácidos marcados radiactivamente:  $^3\text{H}$ -taurina (3.0  $\mu\text{Ci/ml}$ ),  $^3\text{H}$ -D-aspartico (0.5  $\mu\text{Ci/ml}$ ),  $^3\text{H}$ -glicina (3.0  $\mu\text{Ci/ml}$ ) y  $^3\text{H}$ -alanina (5.0  $\mu\text{Ci/ml}$ ). Después de la incubación, las células se lavaron para eliminar el exceso de radioactividad, con un medio isosmótico durante 18 min. a una velocidad de perfusión de 2 ml/min. A continuación se colectaron alícuotas del mismo medio de perfusión a una tasa de 2 ml/min. Después de 6 min. en un medio isosmótico la perfusión continuó durante 82 min. bajo gradiente osmótico. Las alícuotas fueron colectadas directamente en viales y las células se desprendieron de las cajas para cuantificar la radioactividad remanente. La radioactividad remanente y de las alícuotas se cuantificó por espectrometría de centelleo líquida.

Los resultados de los experimentos anteriores se expresaron como tasa de liberación (f), de acuerdo a la siguiente ecuación:

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



donde A es la radioactividad pérdida en el intervalo t y At es la diferencia entre el total de la radioactividad acumulada por las células durante la incubación y la radioactividad liberada al tiempo de perfusión dado (Sánchez-Olea et al., 1991).

### **Cuantificación de aminoácidos endógenos**

Para corroborar los resultados obtenidos de los experimentos de flujos, se midió el contenido endógeno de aminoácidos en las células después de ser expuestas al gradiente osmótico o a un medio isosmótico, al terminar el experimento las células se desprendieron de las cajas con 150  $\mu$ l de agua bidestilada, y la suspensión fue homogenizada y sonicada en alcohol al 70%; posteriormente, se centrifugó a 500 rpm durante 5 min., recuperando el sobrenadante para después filtrarlo. El contenido de proteína en la muestra se cuantificó por medio del método Bradford (Bradford, 1976). Los aminoácidos contenidos en la muestra filtrada se cuantificaron por HPLC y el resultado se expresó como nmolas de aminoácidos por mg de proteína.

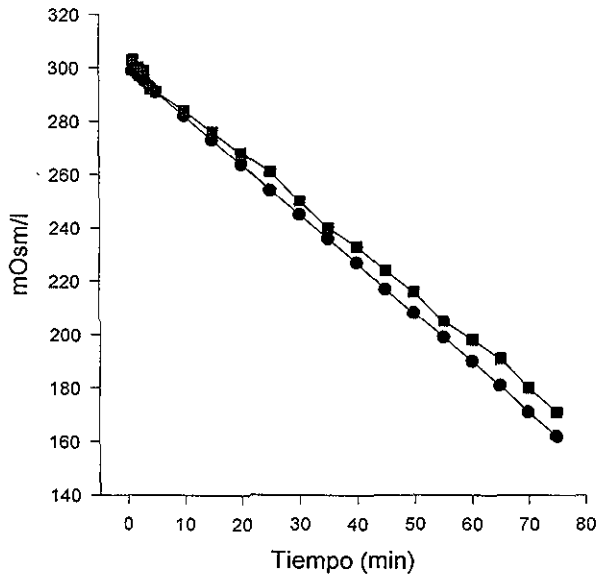
### **Materiales**

Los aminoácidos radioactivos ( $^3$ H-aurina,  $^3$ H-D- aspartato,  $^3$ H-glicina,  $^3$ H-alanina) fueron adquiridos a New England Nuclear, Boston, MA. Las sales, glucosa, HEPES, EGTA-AM y EGTA fueron adquiridas a Sigma St. Louis MO. El ácido niflúmico y la calceína-AM fueron adquiridos a Research Biochemical International.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Sistema generador del gradiente osmótico

En esta primera etapa del trabajo se probó el funcionamiento del sistema generador de gradiente osmótico descrito en la sección de métodos, calculando la osmolaridad del gradiente generado y colectando cada minuto fracciones del medio perfundido. Posteriormente, se midió la osmolaridad de las muestras colectadas y se calculó la tasa de cambio en la osmolaridad del medio en el sistema de gradiente osmótico. Con estos resultados se construyó la gráfica que se muestra en la figura 6.



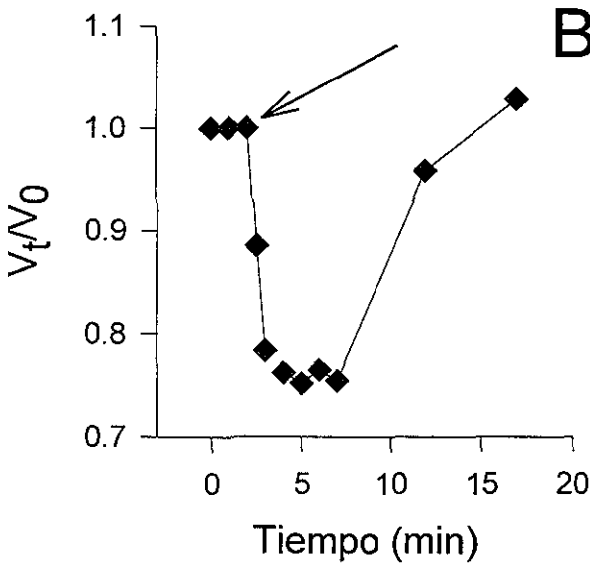
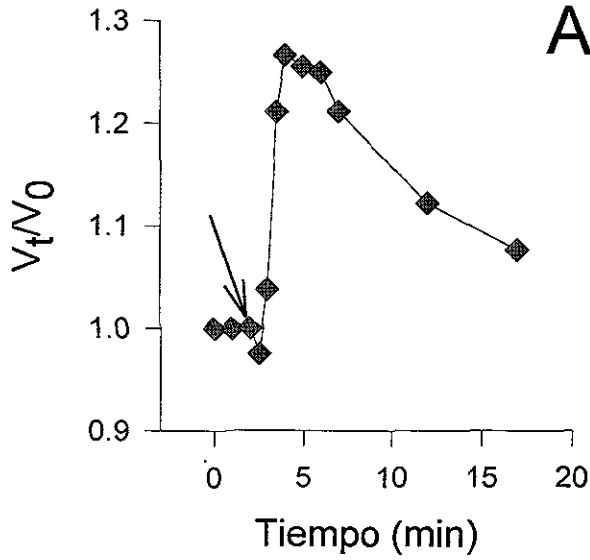
**Figura 6.** Cambios en la osmolaridad del medio generada por el gradiente osmótico. La tasa de cambio real (■) fue de  $-1.76 \pm 0.0857$  mOsm/min., a una velocidad de 2ml/min. La tasa de cambio teórica (●) fue de  $-1.8$  mOsm/min. Al final del tiempo de análisis (75 min.) la osmolaridad del medio alcanzó las 163 mOsm.

La tasa de disminución de osmolaridad del sistema fue de  $-1.76 \pm 0.0857 \text{ mOsm/min.}$  y la tasa de disminución teórica obtenida por la ecuación establecida por Mountian y Van Driessche (1997) fue de  $-1.8 \text{ mOsm/min.}$  Con estos resultados consideramos que queda validado el método para generar el gradiente de osmolaridad necesario para el propósito de la investigación.

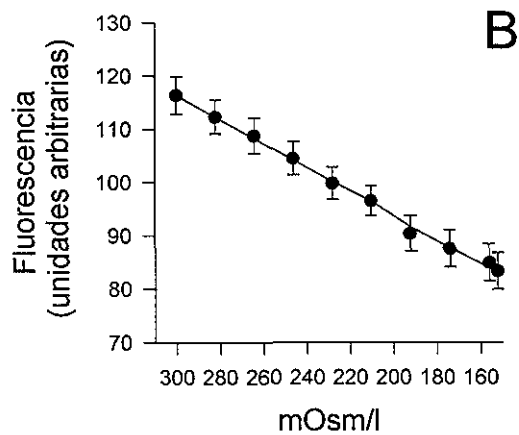
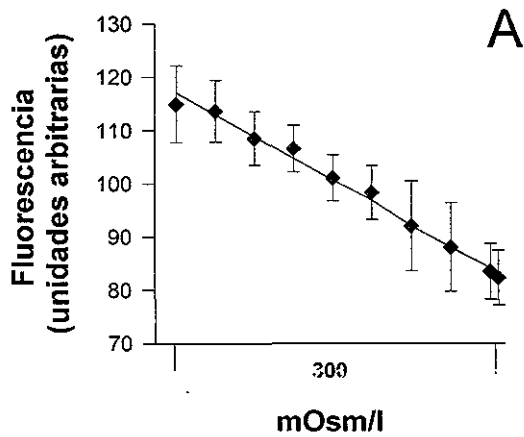
### **Cambios en el volumen celular**

En esta etapa del trabajo se expusieron las células a condiciones anisomóticas o a una disminución gradual en la osmolaridad. En la figura 7, se muestra el cambio en el volumen relativo ( $V_t/V_0$ ), obtenido del cálculo de la fluorescencia relativa ( $F_t/F_0$ ) como se describe en la metodología. Las neuronas expuestas a soluciones 30 % hiposmóticas (210 mOsm/l) exhibieron el incremento característico en el volumen celular. El incremento máximo (28 %) se alcanzó entre los 2-5 min. posteriores al estímulo, seguido por la fase de corrección de volumen característica de estas células (DRV) (figura 7A) (Pasantes-Morales et al., 1994). El mismo tratamiento pero con soluciones hiperosmóticas (350 mOsm/l), produjo el encogimiento característico en las células, con un máximo de disminución (25 %) en los 5-7 min. posteriores al estímulo, seguido por el incremento regulador de volumen (figura 7B). Estas respuestas típicas de células expuestas a condiciones anisomóticas, sirvieron para validar el método usado para estimar el cambio en el volumen celular en nuestras preparaciones.

En la figura 8, se muestra la respuesta que tuvieron las neuronas granulares de cerebelo ante el cambio gradual de la osmolaridad externa del medio. Las células fueron perfundidas con soluciones isosmóticas (figura 8A) o con un gradiente hiposmótico continuo (figura 8B) durante 82 min., de tal manera que transcurrido este tiempo la osmolaridad externa alcanzó un decremento de 150 mOsm/l (50 % hiposmótico). En ambos casos se observó una disminución en la fluorescencia, debida al blanqueamiento por extinción del fluoróforo. En ambas condiciones se calculó la regresión lineal de los datos obtenidos de la fluorescencia, obteniéndose una  $r^2 = 0.991$  para el control y una



**Figura 7.** Curso temporal del cambio en el volumen de neuronas granulares de cerebelo expuestas súbitamente a medios anisomóticos. Las células se incubaron con calceína-AM ( $1\mu\text{M}$ ), se lavaron y se perfundieron inicialmente con medio isomótico. Al tiempo indicado por la flecha el medio isomótico fue reemplazado por un medio 30% hiposmótico (A) o 30% hiperosmótico (B) y la perfusión continuó durante 15 min. A:  $n=11$  y B:  $n=9$ .

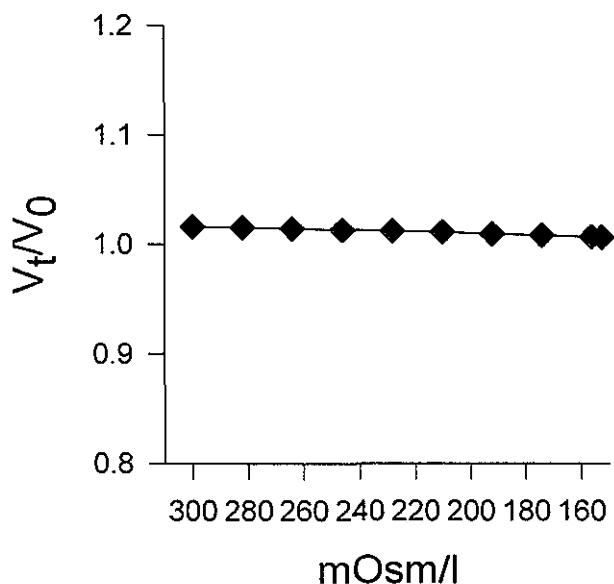


**Figura 8.** Cambio en la fluorescencia de neuronas granulares de cerebelo expuestas a un gradiente hiposmótico. Las células conteniendo el fluoróforo calceína-AM (1  $\mu$ M) se perfundieron durante 82 min. en medio isosmótico (A) o en el gradiente hiposmótico como se describe en la figura 4 (B). Los datos corresponden a las regresiones lineales de las medidas de fluorescencia cada 10 min. A:  $r^2=0.991$ ; B:  $r^2=0.997$ . Los datos son el promedio  $\pm$  SE. A:  $n=4$  y B:  $n=14$ .

$r^2 = 0.997$  para el gradiente hiposmótico; la figura 8 muestra que no hay una diferencia en el cambio en la fluorescencia de las neuronas expuestas a un gradiente hiposmótico con respecto a aquellas que fueron perfundidas con medio isosmótico.

Los datos experimentales se calcularon tomando como base la extinción del fluoróforo en células perfundidas con un medio isosmótico en las mismas condiciones que las expuestas a medios hiposmóticos.

En la figura 9, se muestra el resultado del cálculo del volumen relativo de las neuronas granulares de cerebelo obtenido de los datos de las figuras 8A y 8B por medio de la ecuación establecida por Crowe y colaboradores (1995), descritas en la metodología. En esta figura se muestra la ausencia de un cambio en el volumen



**Figura 9.** Volumen celular relativo ( $V_t/V_0$ ) de neuronas granulares de cerebelo expuestas al gradiente hiposmótico descrito en la Fig. 4. Las medidas de fluorescencia obtenidas en la figura 8 se convirtieron en medidas de volumen celular de acuerdo a la ecuación (2).

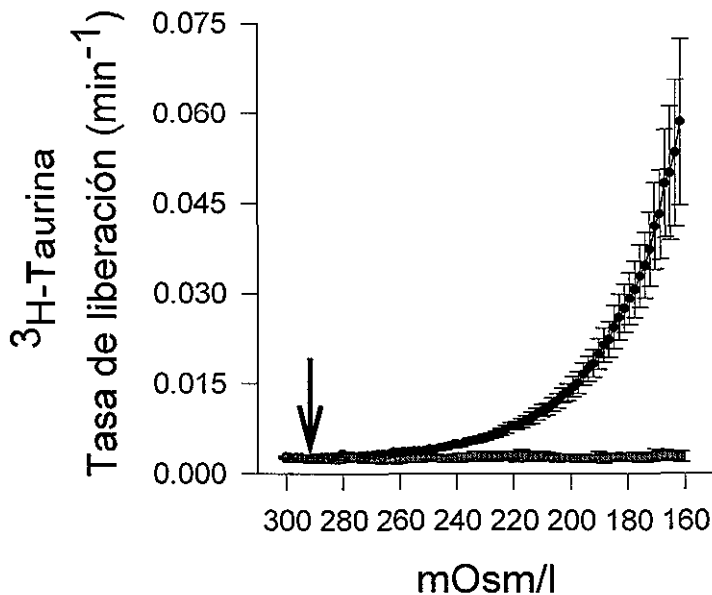
celular de las neuronas perfundidas con un sistema generador de gradiente osmótico, a una tasa de  $-1.8 \text{ mOsm/l}$ , durante 82 min., a pesar de que al final del experimento la osmolaridad se ha reducido 50% ( $150 \text{ mOsm/l}$ ).

La capacidad de las neuronas granulares de cerebelo de mantener su volumen constante en condiciones de cambios graduales en la osmolaridad de medio externo ( $-1.8 \text{ mOsm}$  por minuto) queda comprobada con los resultados descritos. Por ello se puede afirmar que las neuronas granulares de cerebelo presentan regulación isovolumétrica. Este mecanismo de regulación del volumen ha sido previamente descrito en células renales y líneas celulares por diferentes grupos (Lohr y Grantham, 1986; Lohr et al., 1989; Lohr, et al, 1990; y Mountian y Van Driessche, 1997), sin que se haya estudiado los mecanismos responsables de esta respuesta.

### **Liberación de aminoácidos durante la RIV**

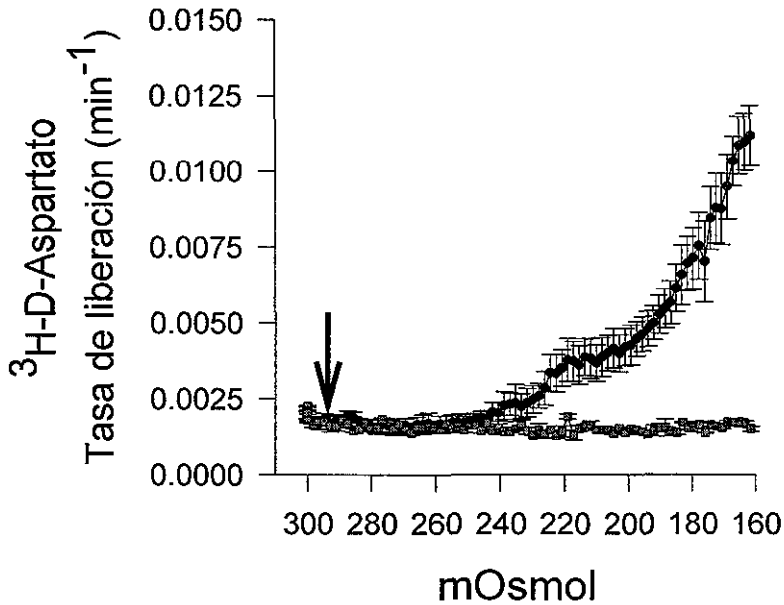
Como se mencionó anteriormente, los mecanismos de la regulación isovolumétrica no han sido estudiados, por lo que en el presente trabajo se exploró el comportamiento de los aminoácidos, que se sabe funcionan como osmolitos durante la RIV. Se utilizaron trazadores radioactivos para medir la liberación de los aminoácidos, utilizándose  $^3\text{H}$ -taurina,  $^3\text{H}$ -glicina,  $^3\text{H}$ -alanina y el  $^3\text{H}$ -D-aspartato como análogo no metabolizable del ácido glutámico. En las figuras 10, 11, 12 y 13 se muestra la liberación de estos trazadores en respuesta a una disminución gradual en la osmolaridad. La liberación de los aminoácidos marcados durante estas condiciones fue comparada en cada punto con la liberación de las células perfundidas con medio isosmótico.

Como se observa en la figura 10, la liberación de la  $^3\text{H}$ -taurina en las células perfundidas con el medio hiposmótico fue similar a la que ocurre en el medio isosmótico hasta los 28 minutos. A partir de este momento, en el que el medio tiene una osmolaridad de  $249 \text{ mOsm/l}$  (16.6 % hiposmótico) la liberación de taurina de

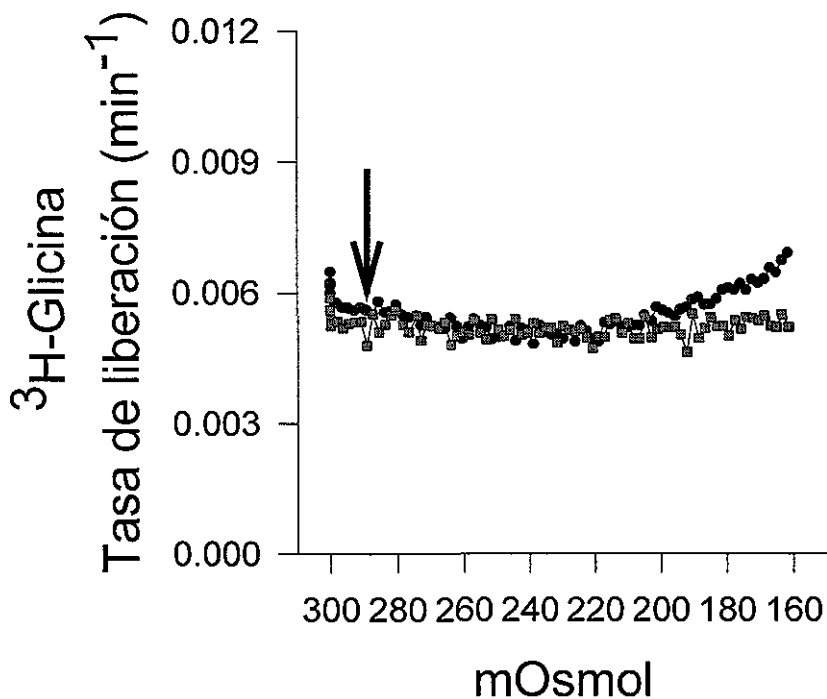


**Figura 10.** Liberación de taurina de neuronas granulares de cerebelo expuestas a un gradiente hiposmótico. Las células fueron preincubadas con  $^3\text{H}$ -taurina, lavadas y perfundidas (2 ml/min) durante 6 min. con medio isosmótico para obtener una liberación basal constante. En el tiempo indicado por la fecha en (●) la osmolaridad del medio disminuyó a una tasa de  $-1.8$  mOsm/min., hasta los 76 min., cuando se alcanzó una osmolaridad de 163 mOsm/l. Los controles (○) fueron perfundidos continuamente con medio isosmótico. Las fracciones fueron colectadas cada minuto. Los datos se expresan como tasa de liberación ( $\text{min}^{-1}$ ) y son promedios  $\pm$  SE. (n = 10)

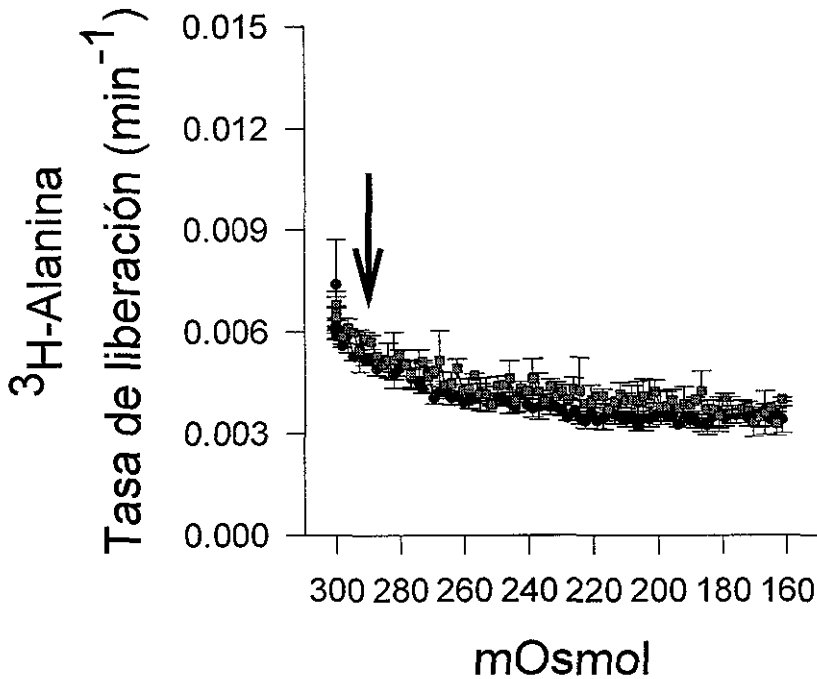




**Figura 11.** Liberación de aspartato de neuronas granulares de cerebelo expuestas a un gradiente hiposmótico. Las células fueron preincubadas con  $^3\text{H-D}$ -aspartato, lavadas y perfundidas (2 ml/min) durante 6 min. con medio isosmótico para obtener una liberación basal constante. En el tiempo indicado por la flecha (●) la osmolaridad del medio disminuyó a una tasa de  $-1.8$  mOsm/min., hasta los 76 min., cuando se alcanzó una osmolaridad de 163 mOsm/l. Los controles (□) fueron perfundidos continuamente con medio isosmótico. Las fracciones fueron colectadas cada minuto. Los datos se expresan como tasa de liberación (min<sup>-1</sup>) y son promedios  $\pm$  SE. (n=10)



**Figura 12.** Liberación de glicina de neuronas granulares de cerebelo expuestas a un gradiente hiposmótico. Las células fueron preincubadas con <sup>3</sup>H-glicina, lavadas y perfundidas (2 ml/min) durante 6 min. con medio isosmótico para obtener una liberación basal constante. En el tiempo indicado por la flecha en (●) la osmolaridad del medio disminuyó a una tasa de  $-1.8$  mOsm/min., hasta los 76 min., cuando se alcanzó una osmolaridad de 163 mOsm/l. Los controles (■) fueron perfundidos continuamente con medio isosmótico. Las fracciones fueron colectadas cada minuto. Los datos se expresan como tasa de liberación (min<sup>-1</sup>) y son promedios. (n= 10)



**Figura 13.** Liberación de alanina de neuronas granulares de cerebelo expuestas a un gradiente hiposmótico. Las células fueron preincubadas con  $^3\text{H}$ -alanina, lavadas y perfundidas (2 ml/min) durante 6 min. con medio isosmótico para obtener una liberación basal constante. En el tiempo indicado por la flecha en (●) la osmolaridad del medio disminuyó a una tasa de  $-1.8$  mOsm/min., hasta los 76 min., cuando se alcanzó una osmolaridad de 163 mOsm/l. Los controles (□) fueron perfundidos continuamente con medio isosmótico. Las fracciones fueron colectadas cada minuto. Los datos se expresan como tasa de liberación ( $\text{min}^{-1}$ ) y son promedios  $\pm$  SE. (n=4)

las células expuestas al gradiente osmótico se empezó a separar con respecto a la liberación de las células en condiciones isosmóticas, al incrementarse la liberación.

En el caso del  $^3\text{H-D-aspartato}$  (figura 11), la liberación en ambas condiciones es similar hasta el minuto 36, cuando la osmolaridad del medio es de 235 mOsm/l (21 % hiposmótico). A partir de este tiempo, la liberación en las células expuestas al gradiente osmótico, comienza a separarse de la liberación basal. A diferencia de los dos casos anteriores, la  $^3\text{H-glicina}$  no se libera sino hasta tiempo muy tardíos (65 min.) (figura 12), cuando se alcanzan 183 mOsm/l (39 % hiposmótico), mientras que la liberación de la  $^3\text{H-alanina}$  no se estimuló por el gradiente osmótico a lo largo de todo el experimento (figura 13).

El análisis de estas curvas de liberación de aminoácidos en respuesta al gradiente hiposmótico revela algunas diferencias significativas en cuanto a la participación de cada una de ellos en la RIV.

La taurina mostró el umbral de liberación más bajo, así como la magnitud de la liberación más elevada. Así, la liberación de la taurina fue cinco veces mayor a la del

**Tabla 1.** Tasas máximas de liberación de aminoácidos

	Isosmótico	Gradiente Hiposmótico
$^3\text{H-taurina}$	$27.94 \pm 8.41$	$585 \pm 139$
$^3\text{H-D-aspartico}$	$15.06 \pm 0.86$	$112 \pm 9.96$
$^3\text{H-glicina}$	52.06	69.15
$^3\text{H-alanina}$	$40.01 \pm 0.67$	$34.12 \pm 3.39$

Tasas máximas de liberación de  $^3\text{H-taurina}$ ,  $^3\text{H-D-aspartico}$ ,  $^3\text{H-glicina}$  y  $^3\text{H-alanina}$ , en condiciones de perfusión con un medio isosmóticos o con el gradiente osmótico en células granulares de cerebelo. Los datos representan la máxima tasa de liberación  $\text{min}^{-1} \times 10^{-4}$ .

D-aspartato, y ocho veces mayor que la de la glicina (Tabla 1). La liberación de la  $^3\text{H}$ -taurina en condiciones de cambio gradual en la osmolaridad aumentó 21 veces respecto a la liberación obtenida al perfundir con medio isosmótico, mientras que para el  $^3\text{H}$ -D-aspartato el aumento fue de 7.5 veces y para la  $^3\text{H}$ -glicina de sólo 0.53 (Tabla 1). La tasa máxima de liberación de la taurina fue también mucho mayor que la de los otros aminoácidos (Tabla 1).

La cinética de liberación de  $^3\text{H}$ -taurina y  $^3\text{H}$ -D-aspartato en condiciones de un gradiente osmótico, fue analizada ajustando los datos experimentales a una función lineal (regresión lineal) en distintos segmentos de la curva. Las cinéticas de liberación se ajustan a tres constantes ( $k$ ) cuyos valores se muestran en la Tabla 2.  $k_1$  describe la liberación desde el inicio del gradiente hasta el min. 34, cuando la disminución en la osmolaridad del medio alcanzó 239 mOsm/l (20.4 % hiposmótico);  $k_2$  describe la liberación desde ese punto hasta el min. 60, una vez que el medio alcanza 192 mOsm/l (36 % hiposmótico). Finalmente,  $k_3$  describe el último intervalo de la curva

hasta el min. 76 (163 mOsm/l  $\rightarrow$  45.6 % hiposmótico). Los intervalos de tiempo descritos por cada constante fueron muy similares para la  $^3\text{H}$ -taurina y el  $^3\text{H}$ -D-aspartato.

**Tabla 2.** Constantes de liberación de  $^3\text{H}$ -taurina y  $^3\text{H}$ -D-aspartato en condiciones de gradiente osmótico en neuronas granulares de cerebelo. La liberación de estos aminoácidos en condiciones de RIV fue analizada de manera cinética ajustando los datos experimentales de las figuras 9 y 10 a regresiones lineales en diferentes segmentos de las curvas. Los valores son las pendientes de los datos promedios ajustados

	$K_1$ ( $\times 10^{-5}$ )	$K_2$ ( $\times 10^{-5}$ )	$K_3$ ( $\times 10^{-5}$ )
$^3\text{H}$ -taurina	$5.29 \pm 0.33$	$34.97 \pm 1.59$	$213.38 \pm 10.12$
$^3\text{H}$ -D-aspartato	N.A.	$10.37 \pm 0.53$	$37.17 \pm 1.26$

En estudios realizados en neuronas granulares de cerebelo y astrocitos, con el protocolo de cambio súbito en la osmolaridad del medio, la taurina también presenta el umbral de liberación más temprano, seguido del D-aspartato. Del mismo modo la glicina y la alanina presentan una liberación muy pequeña (Pasantes-Morales et al., 1993).

Las diferencias en el umbral y en la tasa de liberación de los tres aminoácidos (taurina, glutámico y glicina) movilizados en condiciones isovolumétricas, puede deberse a: 1) diferencias en el coeficiente de permeabilidad a través de la vía de movilización implicada y 2) la disponibilidad relativa de las pozas endógenas de aminoácidos para ser liberada durante la hipotonicidad. Con relación al primer punto, en un estudio de Roy (1995) en el que midió la permeabilidad de varios aniones a través del canal de Cl<sup>-</sup> activado por hiposmolaridad en células gliales, se encontró que el coeficiente de permeabilidad de la taurina en relación con la del Cl<sup>-</sup> es de 0.36, la del aspártico y glutámico es de 0.077 y 0.074 respectivamente (menor que el de la taurina). En cuanto a la disponibilidad de las pozas citosólicas para responder al estímulo hiposmótico, es posible que la de la taurina sea mayor que la del aspártico, el glutámico y/o la glicina, debido a que la taurina es un compuesto soluble en el citosol y metabólicamente inerte, por lo que no está comprometida en otros mecanismos o funciones celulares.

### **Cambios en el contenido endógeno de aminoácidos durante RIV.**

En la Tabla 3 se presentan los niveles de aminoácidos endógenos en neuronas granulares de cerebelo ante cambios graduales y continuos en la osmolaridad externa. En respuesta a una disminución súbita de osmolaridad (50 % hiposmótico), todos los aminoácidos disminuyeron significativamente (excepto el aspartato que no pudo ser determinado). Ante un cambio gradual en la osmolaridad del medio, la taurina fue el aminoácido con la mayor disminución (31.11 %), seguida por el glutamato (29.33 %), la β-alanina (28.2 %), la glicina (23.21 %) y el aspartato (9.31 %). La glutamina y la alanina no sufrieron cambios significativos en el contenido endógeno en esta condición.

Estos resultados concuerdan con lo observado en neuronas granulares de cerebelo expuestas a cambios súbitos en la osmolaridad, en donde glicina, taurina,

**Tabla 3.** Cuantificación del contenido endógeno de aminoácidos en neuronas granulares de cerebelo en cultivo, mediante HPLC. Las neuronas se expusieron a medios isosmótico, hiposmótico (15 min.) y a un gradiente hiposmótico como el descrito en la figura 3 (82 min., 50% hiposmótico).

	Aminoácidos libres (nmolas/mg de proteína)				
	Isosmótico	Hiposmótico 50%	% de cambio	Gradiente Hiposmótico	% de cambio
Aspartato	74.1 ± 5.1 (8)	N.D.	N.D.	67.2 ± 1.6 <sup>δ</sup> (7)	9.31
Glutamato	166.7 ± 7.9 (12)	58.3 ± 4.9 <sup>δ</sup> (4)	65.02	117.8 ± 4.5 <sup>z</sup> (8)	29.33
Glutamina	44.1 ± 2.8 (12)	35.2 ± 2.9 <sup>α</sup> (4)	20.18	49.1 ± 1.9 <sup>*</sup> (11)	-
Glicina	62.9 ± 5.4 (11)	34.5 ± 2.9 <sup>δ</sup> (4)	45.15	48.3 ± 2.4 <sup>β</sup> (8)	23.21
Taurina	66.2 ± 3.3 (10)	23.2 ± 1.1 <sup>δ</sup> (4)	64.95	45.6 ± 3.4 <sup>δ</sup> (10)	31.11
β-Alanina	7.8 ± 0.8 (8)	3.7 ± 0.1 <sup>β</sup> (4)	52.56	5.6 ± 0.2 <sup>β</sup> (6)	28.20
Alanina	34.3 ± 1.7 (11)	13.7 ± 0.9 <sup>δ</sup> (4)	60.05	30.7 ± 1.7 <sup>*</sup> (10)	10.49

Los datos representan los promedios ± SE. Los números en los paréntesis indican el número de experimentos, N.D. no determinado. Los símbolos indican diferencias significativas: \*no significativo, <sup>α</sup>p < 0.1, <sup>β</sup>p < 0.01, <sup>z</sup>p < 0.05, <sup>δ</sup>p < 0.001 entre el valor experimental y su control correspondiente. El número de experimentos realizados se encuentra entre los paréntesis.

aspartato y glutamato son liberados preferentemente sobre alanina y glutamina (Pasantes-Morales et al., 1994b). Estos cambios *in vitro* corresponden también al decremento en la concentración de los aminoácidos inducida por hiponatremia en el cerebro *in vivo* (Verbalis and Gullans, 1991; Gullans and Verbalis, 1993; Sterns et al., 1993). En ratones hiponatémicos el contenido total de aminoácidos en todo el cerebro disminuye aproximadamente un 50 % (Thurston y Hauhart, 1987a). En este modelo son los niveles de taurina los que disminuyen en mayor cantidad (70 %). Estos resultados tienen una importancia particular para entender de los mecanismos que regulan el contenido de agua cerebral. En estudios realizados por Verbalis y Gullans (1991) y Thurston (1980), se demuestra que la contribución de las moléculas orgánicas (aminoácidos y otros osmolitos) es cuantitativamente mayor a la del K<sup>+</sup> y es mantenida durante un periodo más prolongado de tiempo

### **Efecto del ácido niflúmico y el EGTA-AM sobre la liberación de taurina durante la RIV**

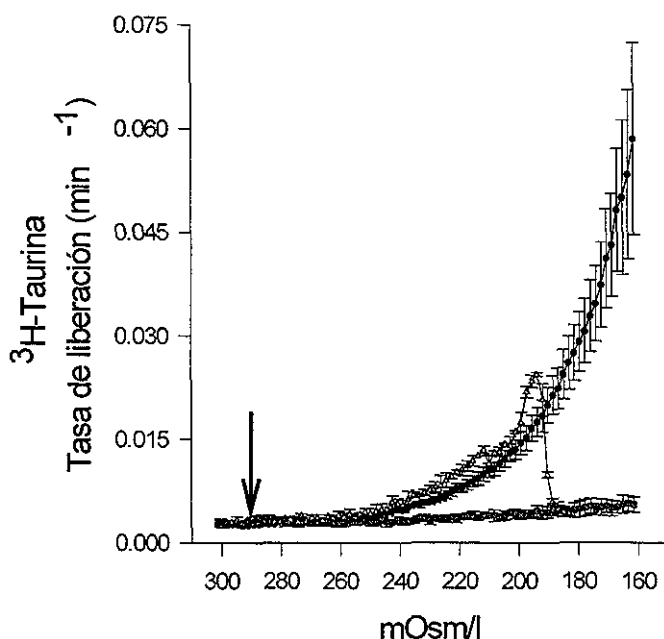
Como se menciona en la introducción, algunas líneas de investigación sugieren que el movimiento de taurina en respuesta al aumento en el volumen celular, se produce a través de vías difusionales en las que el movimiento de este aminoácido está dirigido por su gradiente de concentración, sin la participación del transportador (Sánchez-Olea et al., 1991). En neuronas y astrocitos en cultivo, se ha observado que la liberación de taurina disminuye notablemente en presencia de inhibidores de canales de Cl<sup>-</sup> como el DIDS, el dipiridamol, el NPPB, la DDF, el ácido niflúmico o los ácidos poliinsaturados (Sánchez-Olea et al., 1993; 1996; Pasantes-Morales et al., 1994b; 1999). Estas observaciones han llevado a sugerir una posible vía común para el Cl<sup>-</sup> y los aminoácidos activada durante el RVD. Con esta base decidimos examinar el efecto del ácido niflúmico sobre la liberación de taurina en el modelo de la RIV.

El ácido niflúmico (600  $\mu$ M) tuvo un potente efecto inhibitor. La Figura 14 muestra que si el fármaco está presente desde el inicio del tratamiento con el gradiente osmótico, la liberación de taurina no tiene lugar. Si el fármaco se agrega al medio una



vez que ya se activó la vía de liberación del aminoácido (en este caso en el min. 64 de la perfusión) el bloqueador suprime la liberación.

Estos resultados demuestran que el ácido niflúmico es un potente inhibidor de la liberación de taurina en condiciones isovolumétricas y sugieren una similitud en el perfil farmacológico de las vías de movilización de la taurina en el DRV y la RIV.



**Figura 14.** Efecto del ácido niflúmico en la liberación de <sup>3</sup>H-taurina en células granulares de cerebelo expuestas a un gradiente hiposmótico. Las células se preincubaron con <sup>3</sup>H-taurina, se lavaron y perfundieron (2 ml/min) con medio isosmótico durante 6 min para obtener una liberación basal constante. Al tiempo indicado por la flecha la osmolaridad del medio disminuyó a una tasa de -1.8 mOsm/min. (●), en presencia de 600 μM de ácido niflúmico en el medio durante todo el experimento (◻) y añadiendo 600 μM de ácido niflúmico al min. 64 de la perfusión (◻). Las fracciones fueron colectadas cada minuto. Los datos se expresan como tasa de liberación (min<sup>-1</sup>) y son promedios ± SE. (n = 4)

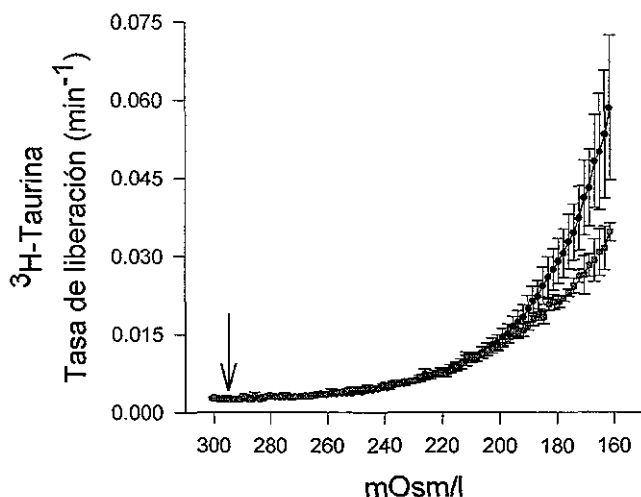
En general, parece que la mayoría de las células en las que el DRV es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  son de origen epitelial (con excepción de los hepatocitos) (Pasantés-Morales y Morales-Mulía, 2000). En otros tipos celulares el DRV es esencialmente independiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . En células nerviosas existe una controversia, ya que se ha reportado al DRV como dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , debido a que altas concentraciones de EGTA (más de 2 mM) en medio libre de  $\text{Ca}^{2+}$  inhiben parcialmente el DRV (Vitarella et al., 1994; Lohr y Yohe, 1994). A bajas concentraciones de EGTA (0.5 mM) que son suficientes para eliminar todo el  $\text{Ca}^{2+}$  del medio, el DRV es independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Falke y Míslér, 1989; Medrano y Gruenstein, 1993). La liberación de  $\text{Cl}^-$  en astrocitos es reportada como totalmente dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (O'Connor y Kimerlberg, 1993) o independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Sánchez-Olea et al., 1995). En contraste hay un acuerdo en que la liberación de aminoácidos activada por hinchamiento es independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Vitarella et al., 1994; Sánchez-Olea et al., 1995).

Para examinar la dependencia de  $\text{Ca}^{2+}$  de la liberación de la taurina durante la RIV, se examinó el efecto de reducir la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Para ello se trataron las células con EGTA-AM que es un quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  que permea la membrana celular.

En la figura 15, se muestra el efecto del EGTA-AM sobre la liberación de taurina en condiciones de un gradiente osmótico. Se observó que la primera fase de la liberación es independiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que la última fase mostró una reducción de aproximadamente 30 % en la liberación de taurina, lo que sugiere que la liberación de taurina en este componente es parcialmente dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

### **Efecto del ácido niflúmico en el volumen celular**

Con el propósito de evaluar la contribución de los aminoácidos, y de otros osmolitos cuya liberación es sensible al ácido niflúmico, a mantener constante o sin cambios el volumen celular durante la exposición al gradiente osmótico, se examinó



**Figura. 15.** Efecto de la depleción de  $\text{Ca}^{2+}$  en la liberación de  $^3\text{H}$ -taurina en células granulares de cerebelo expuestas a un gradiente hiposmótico. Las células fueron preincubadas con  $^3\text{H}$ -taurina, se lavaron y perfundieron (2 ml/min) durante 6 min. con medio isosmótico para obtener una liberación basal constante. En el tiempo indicado por la flecha la osmolaridad del medio disminuyó a una tasa de  $-1.8$  mOsm/min. (●). Las células fueron preincubadas con EGTA-AM (50  $\mu\text{M}$ ), 30 min. y perfundidas con medio libre de  $\text{Ca}^{2+}$ , más EGTA (◻). Las fracciones fueron colectadas cada minuto. Los datos se expresan como tasa de liberación ( $\text{min}^{-1}$ ) y son promedios  $\pm$  SE. ( $n = 4-6$ )

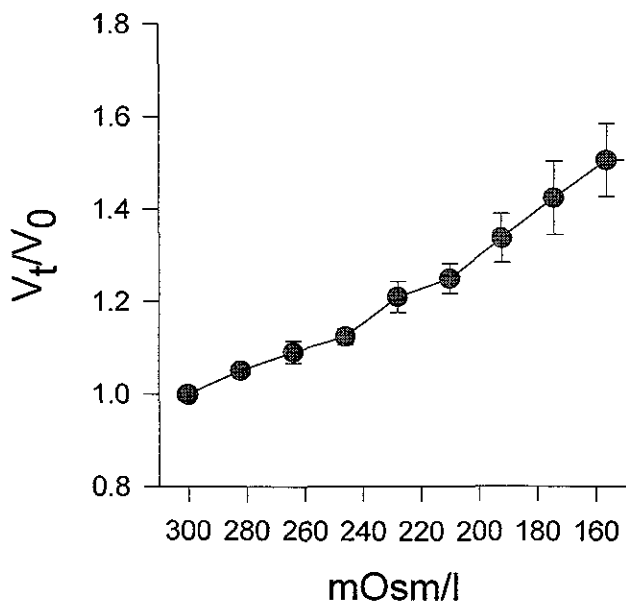
el efecto de este agente sobre el volumen celular durante la RIV. Para ello las células se crecieron en cubreobjetos, y se incubaron con calceína-AM (1  $\mu\text{M}$ ) durante 15 min. Posteriormente las células se perfundieron con medio isosmótico o con el gradiente osmótico en presencia de ácido niflúmico (600  $\mu\text{M}$ ), durante 82 min. (50 % hiposmótico). Los cambios en la fluorescencia, se determinaron cada 10 min. según el procedimiento que se describe en los métodos. El volumen relativo se determinó de acuerdo a la ecuación de Crowe et al. (1995) con los datos de fluorescencia obtenidos en ambas condiciones, como se describió previamente.

En la figura 16, se muestra el cambio en el volumen celular en presencia de ácido niflúmico. El ácido niflúmico es un bloqueador de vías aniónicas, por lo cuál es presumible que bloquee la salida de  $\text{Cl}^-$  y de otros osmolitos orgánicos (como los aminoácidos). En presencia de este fármaco la RIV fue abatida. Se observó un incremento en el volumen de las células desde los primeros 10 min. de perfusión (primer punto estimado), y el incremento fue progresivo y continuo, hasta observarse un incremento en el volumen del 25 % cuando la osmolaridad externa es de 210 mOsm/l (30 % hiposmótico). Al final del experimento, con una osmolaridad externa de 150 mOsm/l (50 % hiposmótico), el volumen celular ha incrementado un 52 %. Al comparar el cambio en volumen en condiciones de cambio súbito en osmolaridad (Figura 6) se observó que con un decremento en osmolaridad del 30 %, el volumen celular aumenta 28%. Esta magnitud de incremento es aproximadamente la misma que muestran las neuronas durante la RIV en presencia del ácido niflúmico. Estos resultados sugieren que en la RIV participan mecanismos de liberación de osmolitos sensibles al ácido niflúmico.

Estos pueden ser evidentemente los propios aminoácidos, así como también otros osmolitos orgánicos cuya movilización es sensible al ácido niflúmico tales como los polialcoholes y algunas aminas. El propio  $\text{Cl}^-$  podría estarse movilizando en la RIV y evidentemente la salida es sensible al ácido niflúmico.

En un estudio paralelo efectuado en el laboratorio se probó el efecto del bario (inhibidor de canales de  $\text{K}^+$ ) en el mismo sistema. En este caso el volumen celular se mantuvo sin cambios hasta el min. 50 de la perfusión (con una osmolaridad externa de 210 mOsm/l, 30 % hiposmótico). En las subsecuentes determinaciones el volumen celular se incremento un 29 % sobre el volumen original, al final del experimento (82 min.).

Estas observaciones indican una contribución de salida de  $\text{K}^+$  solo en la última etapa de la RIV, y que la primera fase de la misma, presenta una contribución de vías aniónicas sensibles a ácido niflúmico, así como una selectividad en la utilización de los osmolitos orgánicos durante el transcurso del RIV.



**Figura 16.** Efecto del ácido niflúmico en el volumen celular durante la RIV. La curva representa el volumen relativo ( $V_t/V_0$ ) obtenido de la fluorescencia de células perfundidas con un gradiente hiposmótico o con medio isosmótico, ambos conteniendo ácido niflúmico  $600 \mu\text{M}$ . Los resultados son el promedio  $\pm$  SE de 8-19 células de 2-3 experimentos separados.

En resumen, el conjunto de estos resultados muestra que las neuronas granulares de cerebelo tienen la capacidad de regulación isovolumétrica y que la movilización de los aminoácidos intracelulares forma parte importante de estos mecanismos de regulación.

Durante años, los estudios dirigidos a conocer los mecanismos involucrados en la regulación del volumen se llevaron a cabo principalmente en protocolos de cambio drástico y súbito de osmolaridad, que difícilmente reflejan condiciones fisio-

patológicas, ya que cambios en osmolaridad de tal magnitud y con ese curso temporal, no suceden ni aún en condiciones de hiponatremia aguda (Melton et al., 1987; Thurston et al., 1980; Tratchman et al., 1991; Verbalis y Gullans, 1991; Sterns et al., 1993) En cambio, los mecanismos implicados en la regulación isovolúmetrica podrían reflejar con mayor fidelidad, los mecanismos que se encuentran involucrados tanto en condiciones fisiológicas como en patologías que generen en una hiponatremia crónica. En estudios experimentales de hiponatremia crónica en ratas, el contenido de agua en el cerebro se mantiene constante durante periodos prolongados (días) (Verbalis y Gullans, 1991; Gullans y Verbalis, 1993). De la misma manera en ratas hiponatrémicas, el contenido de agua en rebanadas corticales aparece sin cambio (Law, 1998; 1999). Esto se debe posiblemente a que la entrada de agua originada por el gradiente osmótico ocurre de manera gradual y es contrarrestada con la pérdida de solutos intracelulares (Law, 1998; 1999). Por el contrario en casos de hiponatremia aguda (horas), se presenta un incremento en el contenido de agua en el cerebro (Trachtman, 1992) y el exceso de agua genera un edema celular.

Los casos de hiponatremia crónica se encuentran asociados con una casi completa normalización en el contenido de agua en el cerebro (Arieff et al., 1976; Sterns, 1989; Verbalis et al., 1986; Verbalis y Drutarosky, 1988). En varios estudios en los cuales se ha medido el contenido de electrolitos en estados crónicos de hiponatremia, se registra una disminución de 10 % a 30 %, mientras que el contenido de agua aumenta un 0.6 % (Verbalis y Drutarosky, 1988). En ratones hiponatrémicos, el contenido de aminoácidos en todo el cerebro disminuye aproximadamente un 50 % (Thurston y Hauhart, 1987a), siendo la taurina, el aminoácido que disminuye de manera más importante (70%). En estudios realizados por Verbalis y Gullans (1991) y Thurnston (1980), se demuestra que la contribución de las moléculas orgánicas (aminoácidos y otros osmolitos) es cuantitativamente mayor a la del  $K^+$  y se mantiene durante un periodo más prolongado de tiempo. Además la pérdida de estos osmolitos orgánicos es una respuesta, correlacionada en el tiempo con la normalización en el contenido de agua (Berl, 1990). Estos resultados sustentan la importante contribución de los osmolitos orgánicos en la protección del cerebro ante las condiciones

hiponatremias. Igualmente, en astrocitos en cultivo expuestos a un periodo de 24 h. de hiponatremia, el volumen celular permaneció constante y en respuesta a este tratamiento, la poza de taurina se depletó casi por completo sin que se obtuvieran cambios en el contenido de glutamato y  $K^+$  (Olson, 1999).

Los resultados obtenidos en el presente estudio concuerdan bien con lo expuesto anteriormente, en el sentido de que en condiciones fisio-patológicas los aminoácidos son liberados preferencialmente al  $K^+$ , siendo la taurina el principal aminoácido involucrado en el mecanismo de RIV. La liberación de  $K^+$  parecería ser un último recurso de las neuronas para contrarrestar la disminución en la osmolaridad (30% hiposmótico), manteniendo un volumen constante. Sin embargo, esta situación extrema llevaría a un desequilibrio en la excitabilidad neuronal, debido al incremento en el  $K^+$  extracelular, que generaría una situación de hiperexcitabilidad incompatible con la función normal de las neuronas (Tancredi y Avoli, 1987; Stringer y Lothman, 1988).

Sin embargo, el análisis de la pérdida neta en el contenido de taurina y otros aminoácidos durante la regulación isovolumétrica es claramente insuficiente para equilibrar el gradiente osmótico impuesto, cuando aún no ha sido activada la salida de  $K^+$ , por lo que es necesario considerar la contribución de otros osmolitos para contrarrestar el incremento en el contenido de agua en las células. Otras moléculas orgánicas, como mio-inositol, glicerofosforilcolina, betaina, fosfoetanolamina, creatina, fosfocreatina y N-acetil-aspartato pueden proveer una importante contribución al ajuste en el volumen celular. Así mismo, compuestos como el citrato, el bicarbonato y otros aniones orgánicos podrían formar parte de esta poza de osmolitos (Thurnston et al., 1987b; Lien et al., 1991). En las neuronas el N-acetil-aspartato podría ser particularmente importantes como osmolito (Gotoh et al., 1997).

## CONCLUSIONES

- Las neuronas granulares de cerebelo tienen la capacidad de mantener constante su volumen celular cuando son expuestas a cambios graduales y continuos en la osmolaridad del medio, es decir presentan el mecanismo de regulación isovolumétrica
- El fenómeno de regulación isovolumétrica es un proceso activo de regulación de volumen acompañado por la liberación de osmolitos intracelulares.
- El principal aminoácido utilizado para la regulación isovolumétrica es la taurina.
- La vía de translocación de la taurina a través de la membrana durante la regulación isovolumétrica involucra la participación de canales aniónicos sensibles a ácido niflúmico.
- Las condiciones de cambios graduales y continuos en la osmolaridad, presentadas en este trabajo pueden acercarse más a las condiciones fisiopatológicas que se presentan en patologías que conllevan a estados de hiponatremia crónica, en donde se presentan cambios graduales en la osmolaridad del medio extracelular



## REFERENCIAS

1. Ackerman M.J., Wickman K.D. and Clapham D.E. 1994. Hypotonicity activated a native chloride current in *Xenopus* oocytes. *J. Gen. Physiol.* 103:153-179.
2. Altamirano J., Brodwick M.S., and Alvarez-Leefmans F.J. 1998. Regulatory Volume Decrease and Intracellular  $Ca^{2+}$  in Murine Neuroblastoma Cells Studied with Fluorescent Probes. *J. Gen Physiol.* 112:145-160.
3. Alvarez-Leefmans F.J. y Reuss L. 1996. Operación orquestada de los sistemas de transporte a través de la membrana plasmática: regulación y mantenimiento del volumen celular. Capítulo 7 en: *Biofísica y fisiología Celular*. Latorre R., López-Barneo J., Bezanilla G. Y Llinás R. (Eds.) Universidad de Sevilla, España.
4. Arieff A.I., Llach F. and Massry S.G. 1976. Neurological manifestations and morbidity of hyponatremia: correlation with brain water and electrolytes. *Medicine.* 55:121-129.
5. Ballantyne J. and Chamberlain M.E. 1994. Regulation of Cellular Amino Acids Levels. en *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation*, Strange K., Eds., CRC Press, Boca Raton, 111-122
6. Berl T. 1990. Treating hyponatremia: Damned if we do and damned if we don't. *Kidney Int.* 37:1006-1018.
7. Bibby K.J. and McCulloch C.A.G. 1994. Regulation of cell volume and  $[Ca^{2+}]_i$  in attached human fibroblasts responding to anisotonic buffers. *Am. J. Physiol.* 266:C1639-C1649.
8. Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248
9. Brandt S, Jentsch T.J. 1995. ClC-6 and ClC-7 are two novel broadly expressed members of the CLC chloride channel family. *FEBS Lett.* 377:15-20.
10. Cala P.M. 1983. Cell volume regulation by *Amphiuma* red blood cells. The role of  $Ca^{2+}$  as modulator of alkali metal/ $H^+$  exchange. *J. Gen Physiol.* 82:761-784.
11. Chamberlain M. E., Strange K. 1989. Anisotonic cell volume regulation: a comparative view. *Am. J. Physiol.* 257: C159-C173.
12. Choi D.H. 1985. Glutamate neurotoxicity in cortical cell cultured is calcium dependent. *Neurosci Lett.* 58:293-297.
13. Christensen O. 1987. Mediation of cell volume regulation by  $Ca^{2+}$  influx through stretch-activated channels. *Nature* 330: 66-68.
14. Crowe W.E., Altamirano J., Huerto L., and Alvarez-Leefmans F.J. 1995. Cell volume changes in single N1E-115 neuroblastoma cells measured with a fluorescent probe. *Neuroscience.* 69:283-296.
15. Davis C.W. and Finn A.L. 1985. Cell volume regulation in frog urinary bladder. *Fed. Proc.* 44: 2520-2525.

16. Deutsh C., and Chen L.Q. 1993. Heterologous expressium of specific K<sup>+</sup> channels in T lymphocytes: Functional consequences for volume regulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90:10036-10040.
17. Falke L.C., Mislser S. 1989. Activity of ion channels during volume regulation by clonal NIE115 neuroblastoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3919-3923.
18. Fiévet B., Gabillat N., Borgese F., Motais R. 1995. Expression of band-3 anion exchange induces chloride current and taurine transport, structure function analysis. EMBO J. 14:5158-5169.
19. Fisher R., Schliess F. and Häussinger D. 1997. Characterization of the Hypo-Osmolarity-Induced Ca<sup>2+</sup> Response in Cultured Rat Astrocytes. Glia. 20:51-58.
20. Foskett J.K. 1994. The role of Calcium in the Control of Volume Regulatory Transport Pathways, en Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation, Strange K., Eds., CRC Press, Boca Ra0ton, 259-277.
21. García J.J., Sánchez-Olea R. and Pasantes-Morales H. 1991. Hyposmolarity-sensitive efflux of taurine and free amino acids from human lymphocytes. Biochem Pharm. 41:303-307.
22. García-Romeau F., Coussins A.R., Motais R. 1991. Cell volume regulation by trout erythrocytes: characteristics of the transport systems activated by hypotonic swelling. J. Physiol. (Lond) 440:547-567.
23. Godart H., Ellory J.C., Motais R., 1999. Regulatory volume response of erythrocytes exposed to a gradual and slow decrease in medium osmolality. Pflügers. Arch. 437:776-779.
24. Goldstein L., Luer C.A., Blum P.C. 1990. Taurine accumulation by the heart of embryonic skates, *Raja eglanteria*. J. Exp. Biol. 150:449-452.
25. Goldstein L. and Brill S.R. 1991. Volume-activated taurine efflux from skate erythrocytes: possible band 3 involvement. Am. J. Physiol. 260:R1014-R1020.
26. González E., Sánchez-Olea R. and Pasantes-Morales. 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.
27. Gotoh M., Davies S.E. and Obrenovitch T.P. 1997. Brain Tissue acidosis: effects on the extracellular concentration of N-acetyl-aspartate. J.Neurochem. 69:655-661.
28. Grinstein S., Dupre A. and Rothstein A. 1982. Volume regulation by human lymphocytes. Role of calcium. J. Gen Physiol. 79: 849-868.
29. Gullans S.R. and Verbalis M.D. 1993. Control in brain volume during hyperosmolar and hyposmolar conditions. Annu. Rev. Med. 44:289-301.
30. Hallows K.R., Knauf P.A. 1994. Principles of Cell Volume Regulation, en Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation, Strange K., Eds., CRC Press, Boca Raton, 3-29.
31. Harrigan N.R. 1996. Cerebral salt wasting syndrome: a review. Neurosurgery. 38:152-160.

32. Hoffman E.K., Lambert I.H., and Simonsen L.O. 1988. Mechanisms in volume regulation in Ehrlich ascites tumor cells. *Renal Physiol. Biochem.* 221:3-5
33. Hoffman E.K., Simonsen, L.O. 1989. Membrane mechanism in volume and pH regulation in vertebrate cells. *Physiol. Rev.*, 69:315-382.
34. Jackson P.S., Morrison R. and Strange K. 1994. The volume-sensitive organic osmolyte-anion channel VSOAC is regulated by nonhydrolytic ATP binding. *Am. J. Physiol.* 267:C1203-C1209.
35. Jackson P.S. and Strange K. 1995a. Characterization of the voltage-dependent properties of a volume-sensitive anion conductance. *J. Gen. Physiol.* 105:661-676.
36. Jackson P.S. and Strange K. 1995b. Single-Channel properties of a volume-sensitive anion conductance 105:643-660.
37. Jacobsen J.G. and Smith L.H. 1968. Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. *Physiol. Rev.* 48:424-511.
38. Jena M., Minore J.F., and O'Neil W.C. 1997. A volume-sensitive, IP<sub>3</sub>-sensitive Ca<sup>2+</sup> store in vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 42:C316-C322.
39. Kimelberg H.K. and Frangakis M.V. 1985. Furosemide- and bumetanide-sensitive ion transport and volume control in primary astrocytes from rat brain. *Brain Res.* 361:125-134.
40. Kimelberg H.K., Goderie S.K., Higman S., Pang S. and Waniewski R.A. 1990. Swelling induced released of glutamate, aspartate and taurine from astrocytes cultured. *J. Neurosci.* 10:1583-1591.
41. Kirk K.L., Buku A. And Eggena P. 1987. Cell specificity of vasopressin binding in renal collecting duct: computer-enhanced imaging of a fluorescent hormone analog. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:6000-6004.
42. Kirk K.L. and Kirk K. 1992. Inhibition of volume-activated I<sup>-</sup> and taurine efflux from HeLa cells by P-glycoprotein blockers correlates with calmodulin inhibition. *J. Biol. Chem.* 267:23475-23478.
43. Kirk K. 1997. Topical review: Swelling-activated Organic Osmolytes Channels. *J. Mem. Biol.* 158:1-16.
44. Kregenow F.M. 1981. Osmoregulatory salt transporting mechanisms: control of cell volume in anisotonic media. *Annu. Rev Physiol.* 43:493-505.
45. Kristensen L.O. 1986. Association between transports of alanine and cations across cell membrane in rat hepatocytes. *Am J. Physiol.* 251:G575-G584.
46. Lang F., Busch G.L., Ritter M., Völki H., Waldegger S., Gulbins E., Haussinger D. 1998a. Functional Significance of Cell Volume Regulatory Mechanisms. *Physiol. Rev.* 78: 247-305.
47. Lang F., Busch G.L. and Völkl H.. 1998b. The Diversity of Volume Regulatory Mechanisms. *Cell Physiol. Biochem.* 8:1-45.
48. Lauf P.K. 1985. On the relationship between volume- and thiol-stimulated K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> fluxes in red cells membranes. *Mol. Physiol.* 8:215-234.

49. Law R.O. 1998. The role of taurine in the regulation of brain cell volume in chronically hyponatraemic rats. *Neurochem. Int.* 33:467-472.
50. Law R.O. 1999. Amino acids efflux and cell volume regulation in cerebrocortical minislices prepared from chronically hyponatraemic and hypernatraemic rats. *Neurochem. Int.* 1314:423-430.
51. Lien Y.H., Shapiro J.J. and Chan L. 1991. Study of brain electrolytes and organic osmolytes during correction of chronic hyponatremia. *J. Clin. Invest.* 88:303-309.
52. Lohr J.W., and Grantham J.J. 1986. Isovolumetric Regulation of Isolated S<sub>2</sub> Proximal Tubules in Anisotonic Media. *J. Clin. Invest.* 78:1165-1172.
53. Lohr J.W., Sullivan L.P., Cragoe E.J. and Grantham J.J. 1989. Volume regulation determinants in isolated proximal tubules in hyperosmotic medium. *Am. J. Physiol.* 256:F622-F631.
54. Lohr J.W. 1990. Isovolumetric regulation of renal proximal tubules in hypotonic medium. *Ren. Physiol. Biochem.* 13:233-240.
55. Lohr J.W. and Yohe L.A. 1994. Mechanisms of hyposmotic volume regulation in glioma cells. *Brain Res.* 667:163-268.
56. Macknight A.D.C. 1983. Volume regulation in mammalian kidney cells. *Mol. Physiol.* 4:17-31.
57. Macknight A.D.C. 1985. Cellular responses to extracellular osmolality. In: *The Kidney Physiology and Pathophysiology.* Seldin D.W., Giebisch G. (eds) New York. Raven. pp. 117-132
58. Macknight A.D.C. 1988. Principles of cell volume regulation. *Renal Physiol. Biochem.* 3:114-141.
59. McCarty N.A. and O'Neil R.G. 1992. Calcium signaling in cell volume regulation. *Physiol. Rev.* 72:1037-1061
60. McEwan G.T., Hunter J., Hirst B.H. and Simmons N.L. 1992. Volume-activated Cl<sup>-</sup> secretion and transepithelial vinblastine secretion mediated by P-glycoprotein are not correlated in cultured human T84 intestinal epithelial layers. *FEBS Lett.* 304:233-236.
61. McManus M. L., Churchwell K.B. 1994. Clinical significance of cellular osmoregulation, in *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation*, Strange K., Eds., CRC Press, Boca Raton, 63-77.
62. Medrano S. and Gruenstein E. 1993. Mechanisms of regulatory volume decrease in UC-11MG human astrocytoma cells. *Am. J. Physiol.* 264:C1201-C1209.
63. Melton J.E., Patlak C.S., Pettigrew K.D. and Cserr H.F. 1987. Volume regulatory loss of Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> and K<sup>+</sup> from rat brain during acute hyponatremia. *Am. J. Physiol.* 252:F661-669.
64. Minton A.P. 1994. Influence of macromolecular crowding on intracellular association reactions: possible role in volume regulation. In: *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation* (K. Strange editor), CRC Press. Boca Raton. Florida. Pp181-190.

65. Moorman R., Ackerman S.J., Kowdley G.C., Groffin M.P., Moonsey J.P., Chen Z. 1995. Unitary anion currents through phospholemman channel molecule. *Nature*. 377:347-352.
66. Morales-Mulia S., Ordaz B., Quesada O. and Pasantes-Morales H.. 1998. Ca<sup>2+</sup> changes and <sup>86</sup>Rb efflux activated by hyposmolarity in cerebellar granule neurons. *J. Neurosci. Res.* 53(5):626-635.
67. Morán J. and Patel A. J. 1989. Stimulation of the N-methyl-D-aspartate receptor promotes the biochemical differentiation of cerebellar granule and not astrocytes. *Brain. Res.* 486:15-25.
68. Morán J., Morales-Mulia S., Hernández-Cruz A., and Pasantes-Morales H. 1997. Regulatory Volume Decrease and Associated Osmolyte Fluxes in Cerebellar Granule Neurons are Calcium Dependent. *J. Neurosci. Res.* 47:144-154.
69. Morris J.G. 1980. *Fisicoquímica para Biólogos*. 2ª. Ed. Reverte. España. pp.389.
70. Motais R. , Guizauarn H., García-Romeu F. 1991. Red cell volume regulation: the pivotal role of ionic strength in controlling swelling-dependent transport systems. *Biochme. Biohys. Acta.* 1075:169-180.
71. Motais R., Borgese F., Fiévet B., García-Romeu F. 1992. Regulation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange and pH in erythrocytes of fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 102:597-602
72. Mountain I., Van Driessche W. 1997. Isovolumetric regulation of C6 rat glioma cells in hyperosmotic media. *American Journal of Physiology.* 272:C318-C323.
73. Nakaniski T., Balaban R.S., Burg M.B. 1988. Survey of osmolytes in renal cell lines. *Am J. Physiol.* 255:C181-C191.
74. Ninning R., Schliess F., Kutis R. and Häisinger D. 1997. Osmosignalling in C6 glioma Cells. *FEBS Lett.* 400:163-167.
75. O'Connor E.R. and Kimelberg H.K.. 1993. Role of calcium in astrocytes volume regulation and in the release of ions and amino acids. *J. Neurosci.* 13:2638-2650.
76. Olson J., Sankar R., Hotzman D, James A. and Fleischhaker D. 1986. Energy-dependent volume regulation in primary cultured cerebral astrocytes. *J. Cell. J.E. Physiol.* 128:209-215.
77. Olson 1999. Osmolyte contents of cultured astrocytes grown in hypoosmotic medium. *Biochem. Biophys. Acta.* 1453:175-179.
78. Orskov S.L. 1954. The potassium absorption by pigeon blood cells is absorbed when a hypertonic sodium chloride solution is added. *Acta Physiol. Scand.* 32:221-229.
79. Parker J. C. 1977. Solute and water transporting and cat red blood cells. In: *Membrane transport in red cells*. Ellory J.C. and Lew V.L. (eds.) London. Academic Press. pp 427-465.
80. Pasantes-Morales H., Schousboe A. 1988. Volume regulation in astrocytes: a role for taurine as an osmoeffector. *J. Neurosci. Res.* 20:503-509.

81. Pasantes-Morales H., García J.J. and Sánchez-Olea R. 1991. Hyposmolarity-sensitive release of taurine and free amino acids from human lymphocytes. *Biochem. Pharmacol.* 41:303-307.
82. Pasantes-Morales H., Alavez S., Sánchez-Olea R., Morán J. 1993. Contribution of organic and inorganic osmolytes to volume regulation in rat brain cells in culture. *Neurochem. Res.* 18:445-452.
83. Pasantes-Morales H., Murray R.A., Lilja L. and Morán J. 1994a. Regulatory volume decrease in cultured astrocytes I. Potassium-and Chloride-activated permeability. *Am. J. Physiol.* 266:C165-C171.
84. Pasantes-Morales H., Murray R.A., Sánchez-Olea R., and Morán J. 1994b. Regulatory volume decrease in cultured astrocytes II. Activated Permeability to amino acids and polyalcohols. *Am. J. Physiol.* 266:C172-C178.
85. Pasantes-Morales H., Chacon, E., Murray R.A., Morán J. 1994c. Properties of osmolyte activated during regulatory volume decrease in cultured cerebellar granule neurons. *J. Neurosci. Res.* 37:720-727.
86. Pasantes-Morales H. 1996. Volume Regulation in Brain Cells: Cellular and Molecular Mechanisms. *Met Brain Dis.* 11:187-203.
87. Pasantes-Morales H., Sánchez-Olea R., Miranda D., Morán J. 1997. Volume regulation in NIH/3T3 cells not expressing P-glycoprotein I. Regulatory volume decrease *Am. J. Physiol.* 272:C1798-C1803.
88. Pasantes H., Massieu L., Arias C. y Tapia R. 1998. Mecanismos celulares y moleculares de la neurodegeneración. *Gac. Med. Mex.* 134: 685-703.
89. Pasantes-Morales H., Ochoa de la Paz L.D., Sepulveda J., and Quesada O. 1999. Amino acids as osmolytes in the retina. *Neurochem. Res.* 24:1339-1346.
90. Pasantes-Morales H. and Morales-Mulia S.. 2000. Influence of calcium on regulatory volume decrease: role of potassium channels. *Nephron* 86:414-427.
91. Paulmichl M., Li Y., Wickman K., Ackerman M., Peralta E. and Clapham D. 1992. New mammalian chloride channel identified by expression cloning. *Nature.* 356:238-241.
92. Paulmichl M., Laich A., Fürst H., Ggschwentner M., Nagl V.O., Hittmair A. And Ritter M. 1996. Transportation of the chloride channel I<sub>CLN</sub> from the cytosol into the cell membrane after volume stress. *Biohys. J.* 70:A9
93. Reyman S., Florke H., Heiden M., Jakob C., Stadtmuller U., Steinacker P., Lalk V.E., Pardowitz I., Thinnis F.P. 1995. Futher evidence for multitopological localization of mammalian porin (VDAC) in the plasmalemma forming part of a chloride channel complex affected in cystic fibrosis and encephalomyopathy. *Biochem. Mol. Med.* 54:75-87.
94. Roy G. and Sauvé R. 1987. Effect of an anisosmotic medium on volume ion and amino acid content and membrane potencial of kidney cells (MDCK) in culture. *J. Membr. Biol.* 100:83-96.
95. Roy G. 1995. Amino acids current through anion channels in cultured human glial cells. *J. Membr. Biol.* 147:35-44.

96. Saltin B., Sjogaard G., Strange S. and Juel C. 1987. Redistribution of K<sup>+</sup> in the human body during muscular exercise; its role to maintain whole body homeostasis. En *Man in Stressful environment Thermal and Work Physiology*. K Shiraky y MK Ypusef (eds) Springfield, USA. pp.247-267.
97. Sánchez-Olea R. y Pasantes-Morales H. 1990. Chloride dependence of the K<sup>+</sup> -stimulated release of taurine from synaptosomes. *Neurochem. Res.* 15:535-540.
98. Sánchez-Olea R., Morán J., Schousboe A., and Pasantes-Morales H. 1991. Hyposmolarity-activated fluxes of taurine in astrocytes are mediated by diffusion. *Neurosci. Lett.* 130:233-236.
99. Sánchez-Olea R., Peña C., Morán J., Pasantes-Morales H. 1993. Inhibition of volume regulation and efflux of osmoregulatory amino acids by blockers of Cl<sup>-</sup> transport in cultured astrocytes. *Neurosci. Lett.* 156:141-144.
100. Sánchez-Olea R., Morales-Mulia M., Morán J. and Pasantes-Morales H. 1995. Inhibition by polyunsaturated fatty acids of regulatory volume decrease and osmolyte fluxes in cultured astrocytes is unrelated to extracellular calcium. *Nuerosci. Lee.* 193:165-168.
101. Sánchez-Olea R., Morales-Mulia M., García O., and Pasantes-Morales H. 1996. Cl Channel blockers inhibit the volume-activated efflux of Cl and taurine in cultured neurons. *Am. J. Physiol.* C1703-C1708.
102. Sarkadi B. and Parker J.C. 1991. Activation of ion transport pathways by changes in cell volume. *Biochem. Biophys. Acta*, 1071,407-427.
103. Siebens A.W. and Spring K.R.. 1989. A novel sorbitol transport mechanism in cultured renal papillary epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 257:F937-F946.
104. Sterns R.H., Thomas D.J. and Herndon R.M. 1989. Brain dehydration and neurologic deterioration after rapid correction of hyponatremia. *Kidney Int.* 35:69-75.
105. Sterns RH., Baer J., Erbersol S., Thomas D., Lohr J.W. and Kamm D.E. 1993. Organic osmolytes in acute hyponatremia. *Am. J. Physiol.* 264:F833-F836.
106. Strange K. and Morrison R. 1982. Volume regulation during recovery from chronic hypertonicity in brain glial cells. *Am. J. Physiol.* 263:C412-419.
107. Strange K. 1994. *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation*. CRC Press. Boca Raton, Florida. 400 pag.
108. Stringer J.L. and Lothman E.W. 1988. Epileptiform dischargers induced by altering extracellular potassium and calcium in the rat hippocampal slice. *Exp Neurol*, 101:147-157.
109. Tancredi V. and Avoli M. 1987. Control of spontaneous epileptiform discharges by extracellular potassium: an "in vitro" study in the Ca1 subfield of hippocampal slice. *Exp. Brain. Res.* 67:363-372.
110. Tilly C.B., Gaestel M., Engl K., Edixhoven J.M., Junge H.R. 1996. Hyposmotic cell swelling activated the p38 MAP-Kinase signaling cascade. *FEBS Lett.* 395:133-136.

111. Thurston J.H., Huhart R.D. and Dirco J.A. 1980. Taurine: role in osmotic regulation in mammalian brain and possible clinical significances. *Life Sci.* 26:1562-1568.
112. Thurston J.H. and Huhart R.E. 1987a. Brain amino acids decrease in chronic hyponatremia and rapid correction causes brain dehydration: possible clinical significance. *Life Sci.* 40:2539-2542.
113. Thurston J.H., Huhart R.E. and Nelson J.S. 1987b. 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 myelolysis) causes dehydration and shrinkage of brain. *Metab. Brain. Disease.* 2:223-241.
114. Tinel H., Wehner F., Sauer H. 1994. Intracellular  $Ca^{2+}$  release and  $Ca^{2+}$  influx during regulatory volume decrease in IMCD cells. *Am. J. Physiol.* 267:F130-F138.
115. Tinel H., Wehner F., Kinne R.K.H. 1997. Arachidonic acid as a second messenger for hypotonicity-induced calcium transients in rat IMCD cells. *Pflügers Arch.* 433:245-253.
116. Trachtman H., Futterweit S., Hammer E. Siegel T.W. and Oates P. 1991. The role of polyols in cerebral cell volume regulation in hypernatremia and hyponatremic states. *Life Sci.* 49:677-688.
117. Trachtman H. 1992. Cell volume: a review of cerebral adaptive mechanisms and implications for clinical treatment of osmolar disturbances. II. *Ped. Neph.* 6:104-112.
118. Van Driessche W., de Smet P., Li J., Allen S., Zizi M., Mountian I. 1997. Isovolumetric regulation in a distal nephron cell line (A6). *Am. J. Physiol.* 272:C1890-C1898.
119. Verbalis J.G., Baldwin E.F. and Robinson A.G. 1986. Osmotic regulation of plasma vasopressin and oxytocin after sustained hyponatremia. *Am. J. Physiol.* 250:R444-R451.
120. Verbalis J.G. and Drutarosky M.D. 1988. Adaptation to chronic hypoosmolarity in rats. *Kidney Int.* 34:351-360.
121. Verbalis J.G. and Gullans S.R. 1991. Hyponatremia causes large sustained reductions in brain content of multiple organic osmolytes in rats. *Brain. Res.* 567:274-282.
122. Verbalis J.G. and Gullans S.R. 1993. Rapid correction of hyponatremia produces differential effects on brain osmolytes and electrolyte reaccumulation in rats. *Brain. Res.* 606:19-27.
123. Vitarella D., DiRisio, D.J., Kimelberg, H.K., Aschner M. 1994. Potassium and taurine release are highly correlated with regulatory volume decrease in neonatal primary rat astrocyte culture. *J. Neurochem.* 63:1143-1149.
124. Welling L.W., Welling D.J. and Ochs T. 1983. Video measurements of basolateral membrane hydraulic conductivity in the proximal tubules. *Am. J. Physiol.* 245:F123-F129.

**ESTA TESIS NO SALIÓ  
DE LA BIBLIOTECA**



125. Wong S.M. and Chase H.S. Jr. 1986. Role of intracellular calcium in cellular volume regulation. *Am. J. Physiol.* 250:C841-852.
126. Wu X., Yang H., Iserovich P., Fischbarg J., Reinach P.S. 1997. Regulatory volume decrease by SV40-transformed rabbit corneal epithelial cells requires ryanodine-sensitive  $Ca^{2+}$  release. *J. Membrane Biol.* 158:127-136.
127. Yancey P.H. 1994. Compatible and Counteracting Solutes. en *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation*, Strange K., Eds., CRC Press, Boca Raton, 81-109.
128. Zafonte R.D. 1997. Psychogenic polydipsia after traumatic brain injury. A case report. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* 76:246-248.