

00361
13



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLOGICAS

“CARACTERIZACION DE LA VIA DE MOVILIZACION AL POTASIO EN RESPUESTA A CAMBIOS EN EL VOLUMEN CELULAR EN ASTROCITOS EN CULTIVO: ESTUDIOS BIOQUIMICOS Y ELECTROFISIOLÓGICOS”.

294595

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLOGICAS
(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)

PRESENTA

Biol. BENITO ORDAZ SANCHEZ



COORDINACION
POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLOGICAS

DIRECTOR DE TESIS: DR. OCTAVIO QUESADA GARCIA



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.

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

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Herminia Pasantes-Morales por todo su apoyo y participación en todos los aspectos durante la realización de este trabajo de tesis y por permitirme conocer lo maravilloso y arduo que es hacer ciencia.

A mi maestro y amigo, el Dr. Octavio Quesada García por todos y cada uno de sus consejos, comentarios y palabras de aliento durante mi formación científica.

Al Dr. Luis A. Vaca Domínguez por su valiosa colaboración y asesoría durante mi formación en este fascinante mundo que es la electrofisiología.

A mis sinodales, la Dra. Herminia Pasantes-Morales, el Dr. Octavio Quesada García, la Dra. Clorinda Arias Alvarez, el Dr. Mauricio Díaz Muñoz y la Dra. María Luisa Fanjul Peña, por la revisión y valiosos comentarios sobre el presente trabajo.

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

A mis compañeros del laboratorio 301-BL: Claudia Peña, Lenin Ochoa, Rodrigo Franco, Karla Hernández y Karina Tuz por compartir los momentos buenos y malos en nuestro trabajo diario.

A mis compañeros del laboratorio 126-N (antes 102-Ote.) Vero, Carlos, Juan Ramón, Claudia, Alicia, Octavio, Gloria por su disposición para que pudiese realizar los experimentos de electro y hacer mi estancia en su laboratorio muy agradable.

A mis camaradas del IFC Fer, Octa, Quique, Cesar, Yu, Chelito, Ana, Che, Lucia, y los que me faltan por todas los momentos compartidos (chelas, pachangas y demás). Con especial cariño a mi amiga Bertha por los momentos compartidos y esas idas al estadio de beisbol.

DEDICATORIAS

*A MIS PADRES: JOSE ORDAZ Y Ma. LUCIA SANCHEZ POR SU APOYO E
INSPIRACION EN TODO MOMENTO !!!GRACIAS!!! .*

*A MIS HERMANOS HUGO, JOSE Y ALFREDO GRACIAS POR TODO SU APOYO Y
PORQUE SIEMPRE SIGAMOS ASI.*

*A MIS MEJORES AMIGOS GERARDO, RODOLFO, ALFREDO, GABRIEL, MIGUEL,
VELIA C., VERONICA, PORQUE SIEMPRE ESTAN AHÍ, AL PIE DEL CAÑON.*

A ELISA

***CON TODO MI AMOR Y CARIÑO PARA TI
POR ESTAR CONMIGO Y AYUDARME A SUPERAR EN
TODO MOMENTO
,!!!! TE QUIERO MUCHO FLACA!!!!***

INDICE

INTRODUCCION	
REGULACION DE VOLUMEN CELULAR.....	1
REGULACION DE VOLUMEN CELULAR BAJO BAJO CONDICIONES ANISOSMOTICAS.....	4
DECREMENTO REGULADOR DE VOLUMEN (DRV).....	6
DRV EN EL TEJIDO NERVIOSO.....	7
EL CALCIO COMO ACTIVADOR DEL DRV.....	9
CANALES DE POTASIO:PARTICIPACION EN EL DRV.....	11
OBJETIVO GENERAL.....	14
OBJETIVOS PARTICULARES.....	14
METODOLOGIA.....	15
ELECTROFISIOLOGIA.....	15
SOLUCIONES.....	16
RESULTADOS.....	17
ELECTROFISIOLOGIA.....	18
DISCUSION.....	20
ELECTROFISIOLOGIA.....	26
CONCLUSIONES.....	31
BIBLIOGRAFIA.....	33

INTRODUCCION

REGULACION DEL VOLUMEN CELULAR

La capacidad que tienen las células para mantener su volumen constante es una propiedad fundamental para su supervivencia. Esta capacidad de adaptación, se identificó inicialmente en las células de especies que se encuentran expuestas a medios acuosos de distintas concentraciones de sales, como las llamadas eurihalinas. Sin embargo recientemente se ha demostrado que un gran número de células animales, las cuales siempre están expuestas a fluidos de osmolaridad muy controlada, presentan también dicha capacidad de adaptación.

El agua, al igual que muchos solutos, se mueve de un lado a otro de una membrana, desde una región de baja concentración de soluto a una de alta concentración. La ósmosis se puede definir como el movimiento neto de agua a través de una membrana semipermeable, dirigido siempre hacia la región de mayor concentración de soluto, es decir de menor concentración de agua. Las células poseen mecanismos de transporte transmembranal de solutos que les permite regular el paso de estos componentes y de esta manera mantener un volumen celular constante.

La mayoría de las células de un organismo multicelular no se encuentran expuestas a situaciones anisomóticas, excepto las células renales y algunas células epiteliales. La osmolaridad promedio de los fluidos corporales en mamíferos es de aproximadamente 285 mOsmo/L valor que se mantiene prácticamente constante, manifestando sólo pequeñas fluctuaciones que no exceden de un 3% (Hoffman y Simonsen, 1989). A pesar de ello, la capacidad de regular el volumen se ha mantenido a lo largo de la evolución en prácticamente todos los tipos celulares. Las células pueden hacer uso de varias estrategias para manejar un desbalance osmótico: 1) los cambios osmóticos pueden ser ignorados por la presencia de una pared celular rígida como en las células vegetales, 2) pueden ser eludidos, como en el caso de ciertos moluscos al cerrar su concha o 3) pueden ser contrarrestados, por la modificación de la concentración intracelular de osmolitos, compuestos orgánicos y por ende del contenido de agua. Los organismos con pared celular, como las plantas y las bacterias, pueden ignorar cambios osmóticos dentro de cierto límite, ya que la rigidez de la pared previene de cambios en el volumen celular. Las paredes de celulosa de las células vegetales llegan a tolerar presiones internas tan altas como 50 atmósferas. En cambio, las membranas de las células animales son elásticas y no pueden

soportar una diferencia significativa en la presión hidrostática, por lo que tienen que activar mecanismos de transporte de solutos intracelulares osmóticamente activos, los cuales contrarrestan los cambios en el volumen celular ocasionados por alteraciones en la osmolaridad del medio externo (Chamberlin y Strange, 1989; Pasantes-Morales, 1990; Sarkadi y Parker, 1991). La movilización de solutos en respuesta a los cambios en la osmolaridad del medio externo ocurre debido a la presencia de proteínas de membrana, canales y acarreadores especializados en el transporte de especies moleculares diversas.

Cualquier desbalance osmótico que no sea corregido podría ocasionar alteraciones en el volumen celular como resultado de la libre permeabilidad de la membrana plasmática al agua. Tales cambios en el contenido de agua modifican no sólo el volumen de las células sino también su forma y geometría lo cual incide, en mayor o menor medida, sobre sus funciones metabólicas, el estado de hidratación de macromoléculas, así como en la concentración de moléculas que forman parte de la señalización intracelular y de la comunicación intercelular. (Foskett, 1994; Hallows y Knauf, 1994).

Numerosas patologías se encuentran asociadas con cambios anormales (no corregidos) en el volumen celular; así las deficiencias renales, la diabetes mellitus e insipidus, la diuresis osmótica con deshidratación, privación de agua y ciertos envenenamientos (como por etanol). La hipotonicidad del plasma, usualmente debida a hiponatremia, es clínicamente más frecuente que la hipertonicidad. La hiponatremia se presenta en circunstancias de malnutrición y cirrosis hepática.

En el sistema nervioso una alteración frecuente es el edema astrogial o ganancia neta de agua por los astrocitos. Tal situación se observa en las epilepsias, la isquemia (que se genera durante accidentes vasculares), los traumatismos craneanos y la encefalopatía hepática y el edema cerebral. El edema cerebral como circunstancia clínica, es muy frecuente si se considera el número de patologías asociadas causalmente con él. El edema cerebral se presenta como complicación de una amplia variedad de padecimientos crónicos, principalmente en las insuficiencias renales, debido a las críticas funciones de absorción y excreción de agua y electrolitos de ese sistema. Otras causas son la diabetes insípida, en donde la ingesta de agua puede ser muy elevada, y las insuficiencias hepática y cardíaca. Esta última propicia entre otros, episodios de hipoglucemia e hipoxia que tienen bien documentadas propiedades edematogénicas. A estas causas de edema cerebral han de

añadirse otras, que él mismo agrava y retroalimenta. Entre ellas está principalmente la anoxia, que puede presentarse como entidad aislada (p.e. en la asfixia), o lo que es más frecuente, como parte de la isquemia, como en las embolias o los accidentes vasculares cerebrales y aneurismas de causas diversas.

Otros grupos de entidades clínicas con un componente edematogénico cerebral incluyen los traumatismos y diversas causas de muerte celular, como las infecciones y los tumores. Dada la restricción que impone la caja del cráneo a la expansión del tejido cerebral, el edema que resulta de esta alteración en el volumen celular es, en muchos casos, una complicación aún más grave que la propia patología que le dio origen. La causa directa de la gravedad clínica es el incremento del volumen cerebral, lo cual provoca un incremento casi inmediato de la presión interna. La compresión del tejido cerebral compromete a su vez la eficiencia de la irrigación sanguínea, dando lugar a episodios de isquemia; así mismo se ven presionados los centros respiratorios y cardíacos de tallo cerebral, lo cual puede conducir a la muerte del individuo.

En el cerebro, el aumento del volumen celular puede promover hiperexcitabilidad, debido a la reducción del espacio extracelular como consecuencia del hinchamiento de los astrocitos e inducir la excitación neuronal a través de efectos de campo (Saly y Andrew, 1993). También en el cerebro, bajo condiciones isosmóticas las células pueden incrementar o disminuir su volumen por situaciones que modifiquen la concentración intracelular o extracelular de solutos. El primer caso se da, por ejemplo, como consecuencia de la acumulación intracelular de K^+ o Na^+ , a través de las membranas afectadas por lipoperoxidación, o durante la acumulación de sorbitol en animales hiperglicémicos. El hinchamiento celular de ambos tipos celulares, neuronas y glia, ocurre como consecuencia de la acción citotóxica del glutamato, lo cual conlleva a la acumulación de Na^+ , Cl^- y agua osmóticamente obligada (Goldberg y Choi, 1993). Bajo estas circunstancias, la muerte celular no se debe al hinchamiento *per se*, sino al incremento en los niveles de calcio citosólico asociado al efecto citotóxico del glutamato. La reducción en el volumen celular se observa en cuadros de deshidratación, en modificaciones de los niveles de hormona antidiurética circulante, lo cual puede provocar cuadros clínicos de hipernatremia. Es obvio, entonces, que un mejor conocimiento de los mecanismos responsables del mantenimiento

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

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

REGULACION DE VOLUMEN CELULAR BAJO CONDICIONES ANISOSMOTICAS.

Como respuesta homeostática, las células animales han desarrollado eficientes mecanismos de recuperación de su volumen, cuando son expuestas a soluciones anisomóticas. Estos mecanismos les permiten retornar a su volumen inicial, aún cuando persistan las condiciones anisomóticas. Las células con estas propiedades, al exponerse a medios de osmolaridad diferente de su normal, inicialmente se comportan como osmómetros perfectos, es decir, el volumen celular cambia en el sentido que tiende a disipar la diferencia de presión osmótica; posteriormente se observa una tendencia a la recuperación del volumen original, no obstante la persistencia de la condición anisomótica (Fig. 1). La regulación de volumen celular es un proceso complejo que implica varios eventos básicos: primero, la célula debe ser capaz de sensar los cambios en su volumen, posteriormente, debe reaccionar a los cambios de volumen que ha detectado, iniciando un proceso regulador que modifique el contenido intracelular de solutos en la dirección necesaria para corregir el contenido celular de agua. Finalmente, la célula durante el proceso regulatorio, debe "recordar" su volumen original e inactivar los mecanismos que se dispararon en el proceso regulatorio. En términos generales, cuando las células ganan agua, responden expulsando moléculas que se hallan en solución (osmolitos) hacia el exterior celular, provocando una diferencia de presión osmótica que por ósmosis, impulsa al agua hacia el

exterior, este proceso se denomina decremento regulador de volumen (DRV). Cuando por el contrario, las células pierden agua, el mecanismo activado es opuesto, es decir, acumulan osmólitos en su interior provocando ahora la entrada de agua; este proceso se conoce como incremento regulador de volumen (IRV). Los osmólitos involucrados en la regulación de volumen son de dos tipos: compuestos inorgánicos, como K^+ , Cl^- y el Na^+ (Grinstein, 1992, Roy y Sauve, 1987) y un grupo de moléculas orgánicas, como aminoácidos (Smith, 1987), aminas (Nakanishi, 1988), azúcares y polialcoholes (Balaban, 1987, González, 1995). El K^+ está involucrado en el DRV, ya que es el ión más abundante en el interior de la célula. Los flujos de K^+ están acoplados a flujos de aniones (Cl^- , HCO_3^-) y compuestos orgánicos cargados negativamente para mantener la electronegatividad. El Na^+ y el Cl^- que son los más abundantes en el medio extracelular, participando de manera importante en el IRV.

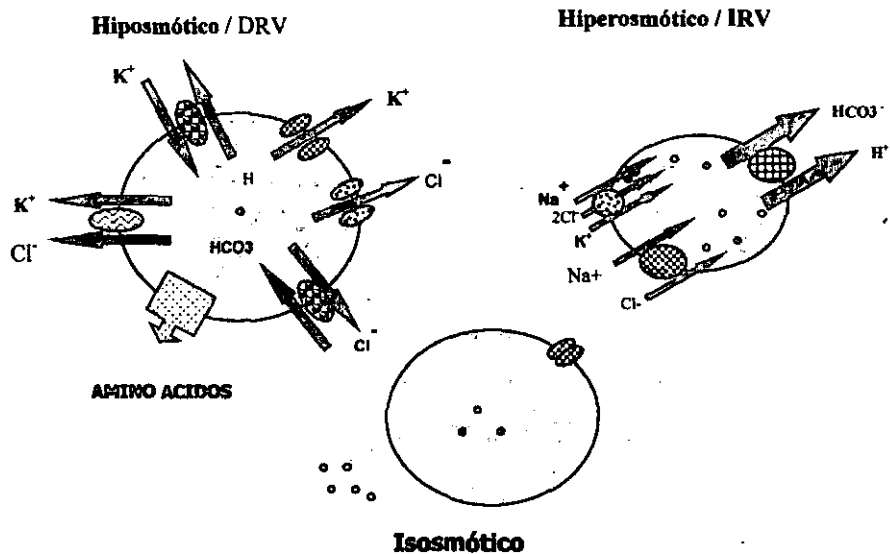


Figura 1.- El proceso de ajuste del volumen celular se lleva a cabo a través de la modificación en la concentración de solutos intracelulares osmóticamente activos, que se reduce o aumenta, en soluciones hiposmóticas e hiperosmóticas, respectivamente.

Los aminoácidos que participan en la regulación de volumen son el glutamato, el aspartato, la glutamina, el GABA y la taurina (Pasantes-Morales, 1993b, Kimelberg, 1990c). Entre ellos la taurina ocupa un lugar importante, debido a que se encuentra en concentraciones muy elevadas en la mayoría de las células animales y a su baja actividad metabólica (Jacobsen y Smith, 1968).

Se puede decir que ambos procesos están mediados por la expulsión o acumulación de solutos osmóticamente activos, con lo cual modifican la presión osmótica y por lo tanto el contenido de agua en las células. La regulación de volumen celular bajo condiciones anisomóticas representa un modelo experimental sencillo para examinar los mecanismos básicos de este proceso. Sin embargo, no se conoce bien si estos mecanismos funcionan de la misma forma durante los cambios de volumen que ocurren en condiciones fisiológicas.

DECREMENTO REGULADOR DE VOLUMEN (DRV)

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

Las diversas investigaciones indican que el DRV está mediado por la activación de mecanismos de salida de iones como el K^+ y el Cl^- (Grinstein, 1982; Eveloff y Warnock, 1987), que en condiciones isosmóticas se encuentran inactivos, y/o a la liberación de compuestos orgánicos osmóticamente activos, como polialcoholes, azúcares, aminas y aminoácidos libres (Pierce y Greenberg, 1972; Fugelli y Thoroed, 1986; Fincham, 1987). El movimiento de estos solutos es la consecuencia de un cambio en la permeabilidad de la membrana plasmática, ya sea por la activación de canales iónicos o de vías conductivas para compuestos orgánicos. La salida de dichos osmolitos siempre está regido por su

gradiente electroquímico, en el caso de compuestos cargados, o solo por el gradiente químico en el caso de moléculas electroneutras. Al modificarse así la concentración intracelular de osmolitos orgánicos y iones, se provocan movimientos de agua osmóticamente obligada, lo cual se traduce en un cambio del volumen previamente alterado. Los mecanismos de liberación de osmolitos varían de una célula a otra. Entre los sistemas de transporte involucrados durante el DRV en la liberación de K^+ y Cl^- , el sistema de transporte más frecuentemente utilizado es el co-transporte electroneutro K^+/Cl^- (Perry y O'Neil, 1993). Este sistema de transporte se ha visto que se encuentra más involucrado durante el hinchamiento celular en condiciones isosmóticas (García-Romeu, 1996). En otras preparaciones celulares parece ser que la liberación de KCl ocurre mediante los sistemas intercambiadores K^+/H^+ y Cl^-/HCO_3^- (Cala, 1985). Así mismo el contranporte Na^+/HCO_3^- podría participar en el DRV.

Se sabe que el mecanismo más generalizado para los movimientos de K^+ y Cl^- es la apertura de canales iónicos separados específicos y que éstos, junto con el flujo de osmolitos orgánicos, ocurren mediante un proceso difusional dirigido sólo por el gradiente de concentración.

El mecanismo de liberación de los iones K^+ y Cl^- bajo condiciones hiposmóticas varía dependiendo del tipo celular que se trate. Así mismo existen otros iones involucrados en este proceso como el H^+ y el HCO_3^- . En otros estudios, los canales aniónicos activados por hinchamiento celular se ha encontrado que son no selectivos, permitiendo el paso no sólo de cloro sino también de HCO_3^- (Lang y Paulmichl, 1995), aniones orgánicos y osmolitos orgánicos neutros (Kirk, 1992; Jackson y Strange, 1993).

En muchas células, el hinchamiento provoca la activación de canales catiónicos no-selectivos (Sachs, 1991; Lang, 1998). La salida de potasio observada durante el DRV ha sido descrita en numerosas preparaciones (Hazama, 1988; Macleod, 1991; Hoffmann, 1989; Sánchez-Olea, 1993).

DRV EN EL TEJIDO NERVIOSO

En el tejido nervioso, el DRV ha sido estudiado principalmente en células en cultivo, líneas celulares, neuronas y células gliales (Kimelberg y Ranson, 1986; Pasantes-Morales y Schousboe, 1988; Pasantes-Morales et al., 1993b, 1994a; Mountain et al., 1996; Pasantes-

Morales et al., 1997). Las células expuestas a condiciones hiposmóticas se hinchan rápidamente para posteriormente recuperar su volumen aún persistiendo estas condiciones. En neuronas y astrocitos, el DRV es un proceso rápido que se completa en un período de 15-30 min. EL DRV en los astrocitos es esencialmente independiente de temperatura y de la presencia de sodio en el medio; es insensible al bloqueo del sistema de cotransporte $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$, por compuestos como la furosemida o la bumetanida, mientras que es inhibido por bloqueadores de los canales de Cl^- , como el ácido 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino) benzoico (NPPB), la 1,9-dideoxiforskolina (DDF), el ácido niflúmico o el dipiridamol (Pasantes-Morales, 1994a). El DRV además, es insensible a los bloqueadores generales de canales de K^+ como el tetraetilamonio (TEA), la 4-aminopiridina (4AP) o el bario, mientras que muestra sensibilidad a la quinidina y, notablemente, a los ácidos grasos poliinsaturados como el araquidónico, el linoléico y el linolénico (Pasantes-Morales, 1994a; Sánchez-Olea, 1995; McManus, 1994). En cuanto a sus dependencias iónicas, si bien la presencia de bloqueadores de canales de Cl^- inhibe poderosamente el DRV, la omisión del Cl^- del medio no previene su expresión, lo cual sugiere una baja permeabilidad de los astrocitos a este ión en condiciones isosmóticas, lo que mantendría una disponibilidad suficiente de Cl^- intracelular para sustentar el proceso regulador (Pasantes-Morales, 1993b; 1994a). En respuesta al hinchamiento celular, en contraste, la permeabilidad de la membrana al cloro aumenta notablemente, haciendo al movimiento de potasio el paso limitante del proceso. Lo anterior halla sustento en la observación de que en presencia de gramicidina (un ionóforo de cationes) y en ausencia de sodio, el DRV se ve notablemente acelerado, debido a la apertura de una vía alterna para la salida de potasio intracelular (Pasantes-Morales, 1993b; 1994a). Estas observaciones, luego entonces, señalan al movimiento saliente de potasio como crítico en la expresión y desarrollo temporal de la respuesta regulatoria en las células astrogliales.

La identidad molecular de las proteínas responsables del movimiento de osmolitos asociado a la regulación del volumen celular en condiciones hiposmóticas, no es del todo conocida. Hasta el momento no se ha identificado un canal de potasio regulado por volumen y sólo tres proteínas, la glicoproteína-P (Valverde, 1992); el CLC-2 (Grüder, 1992) y el fosfoleman (Moorman, 1995) han sido propuestas para ser las vías conductivas de cloro

activados por un aumento en el volumen celular. Una cuarta proteína que podría estar involucrada en la regulación del volumen es la pl_{Cl} (Paulmichl, 1992), ya que cuando es expresada en ovocitos de *Xenopus*, produce una prominente corriente de Cl^- con características semejantes a las corrientes aniónicas de cloro inducidas por hiposmolaridad observadas en células epiteliales.

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

Los mecanismos de liberación de los osmolitos orgánicos están aún menos caracterizados. Se ha establecido en cambio, que el movimiento de taurina en respuesta al aumento en el volumen celular, se da a través de vías difusionales donde la dirección del flujo está dirigido estrictamente por su gradiente de concentración (Sánchez-Olea, 1991).

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

EL CALCIO COMO ACTIVADOR DEL DRV.

Uno de los efectos primarios del incremento en el volumen celular observado en condiciones hiposmóticas, es un incremento en los niveles de calcio libre [Ca^{2+}];

(Rothstein, 1990); El incremento en Ca^{2+} inducido por hiposmolaridad es una respuesta bifásica, muy similar entre los diferentes tipos celulares; esta respuesta consiste en un incremento inmediato en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ debido a la liberación de Ca^{2+} a partir de almacenes intracelulares, seguido de una fase sostenida que representa la entrada de calcio extracelular.

Lo anterior ha llevado a postular que el Ca^{2+} puede estar participando en el DRV, concretamente como señal activadora de los sistemas de transporte para la salida de los osmolitos. Sin embargo, la evidencia al respecto es controvertida. En los astrocitos en cultivo, el hinchamiento celular provoca un incremento en los niveles de $[\text{Ca}^{+2}]_i$, tanto por contribuciones de influjos de calcio, como de la liberación de calcio de almacenes endógenos (Bender, 1994; Fischer, 1997, Morales-Mulia, 1998, O'Connor and Kimelberg, 1993). La vía de salida de K^+ osmosensible es dependiente de Ca^{+2} en algunas células, particularmente en células epiteliales (Sarkadi y Parker, 1991), mientras que en otras células es independiente de Ca^{+2} (O'Connor y Kimelberg, 1993) reportaron que la salida de potasio activado por hiposmolaridad, se bloquea cuando se elimina el calcio del medio extracelular. Estos resultados fueron corregidos por los trabajos de Vitarella (1994) y de Bender y Noremborg (1994), quienes encontraron que la salida de potasio sensible a volumen se ve incrementada en un medio libre de calcio extracelular.

A pesar de estos resultados, se llegó a la conclusión de que la salida de ^{86}Rb (utilizado como marcador de K^+) estimulada por hiposmolaridad, depende de Ca^{+2} extracelular, con base en un efecto inhibitorio parcial (20-40%), que se observa en presencia de nimodipina, un conocido inhibidor de canales de calcio (Bender y Noremborg, 1994, Vitarella, 1994). En astrocitos corticales, pretratados con un eficiente quelante de Ca^{+2} intracelular esterificado, el ácido acetoxi-metil 1,2 (O-aminofenoxiletano-N,N,N',N'tetracetico) o (BAPTA-AM) o en usencia de calcio extracelular (Bender y Noremborg (1994, Vitarella, 1994) se observó sólo una inhibición parcial del DRV (40%).

En otros tipos celulares, existe muy frecuentemente un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ cuando son expuestos a soluciones hiposmóticas. En algunos casos, la activación de los mecanismos correctores del volumen parece depender de este incremento en Ca^{2+} pero en muchos otros, esto no es así (Lang, 1998). Hay así mismo, diferencias en cuanto a la fuente de aporte de Ca^{2+} que parece no ser siempre la misma, ya que en algunas células el Ca^{2+} proviene del

medio extracelular y de pozas endógenas, que en algunos casos probablemente se da por la activación de receptores a IP_3 .

En las células nerviosas la salida de solutos intracelulares en condiciones hiposmóticas se ha asociado a una posible tensión mecánica de la membrana que puede activar los sistemas de transporte sensibles a estiramiento (canales activados por estiramiento, SACs), lo cual se ha descrito en varias preparaciones (Sachs, 1991). Estos canales se activan después de una aplicación de presión directa o distensión de la membrana, como ocurre durante el hinchamiento celular. Los SACs se encuentran agrupados en familias; así se encuentran los selectivos a cationes, a aniones y los no selectivos. Se han propuesto cambios en el citoesqueleto, así como la implicación de segundos mensajeros como posibles señales de activación durante el DRV (Mills, 1994; Ziyadeh, 1992; Bender, 1993), sin embargo, en las células nerviosas no existe evidencia o información suficiente para involucrar a estas entidades moleculares del citoesqueleto en los mecanismos de liberación de osmolitos durante el DRV

CANALES DE POTASIO: PARTICIPACION EN DRV.

Dentro de las familias de canales iónicos, la más extensa es la de los canales de K^+ . Existen muchas variedades de canales de K^+ , algunos de los cuales se ha reportado que participan dentro del DRV (Sackin, 1989, Welling, 1985, Grinstein, 1982, Vanoye y Reus, 1999) presentando cinéticas y sensibilidad farmacológica muy variada, así como diversos grados de dependencia al calcio, datos por demás controvertidos (Bender y Norenberg, 1994, Vitarella, 1994). Alguno de los posibles candidatos para movilizar al potasio bajo condiciones hiposmóticas, podrían involucrar a los canales pertenecientes a la superfamilia S4, la cual incluye: a) Canales de K^+ de rectificación tardía (K_D), b) Corrientes transitorias o tipo "A" (K_A), c) y canales de K^+ dependientes de calcio (K_{Ca}), además no se descartan la participación de canales de potasio activados por ligandos (como los activados por ATP). Todos estos canales muestran fuertes similitudes en sus mecanismos de permeabilidad, lo cual sugiere mucha similitud física en sus poros (Hille, 1992). Dentro de la muchas funciones que realizan los canales de K^+ , están las de mantenimiento del potencial de membrana, su participación en las fases de repolarización e hiperpolarización celular, la

regulación en la tasa de disparo de los potenciales de acción, el mantenimiento de la fase de meseta del potencial de acción. Por otro lado los canales de K^+ muestran también actividad de marcapaso en células cardíacas. Los diferentes tipos de canales de K^+ se distinguen principalmente por sus características de dependencias de voltaje, su selectividad iónica o sensibilidad farmacológica, así como sus formas de regulación fisiológica (Hille, 1992; Rudy, 1988).

La movilización de los iones involucrados en el DRV tiene lugar a través de transportadores electroneutros aunque de manera más general ocurre a través de canales iónicos (Hoffmann, 1989 y Sarkadi y Parker, 1991). Se ha visto que durante el hinchamiento celular hay un aumento muy importante de la permeabilidad de la membrana a los aniones y a los aminoácidos, el cual es seguido de la activación de canales de K^+ , la cual es posiblemente consecuencia de la movilización de Cl^- . Tanto la salida de K^+ como la de Cl^- se lleva a cabo a través de canales activados por hiposmolaridad, específicos para cada uno de los iones, pero interdependientes. Evidencias en este sentido son (i) la insensibilidad del proceso regulador DRV a la bumetanida, un potente y selectivo inhibidor del cotransporte K^+/Cl^- (Grinstein, 1982), (ii) el requerimiento no específico de Cl^- como anión acompañante para el K^+ , como se requeriría en el caso del cotransporte (Kimmelberg, 1990c), (iii) el efecto de la gramicidina, un ionóforo catiónico específico, acelerando el DRV (Pasantes-Morales, 1994a), (iv) el hecho de que conocidos bloqueadores de canales de potasio puedan inhibir la salida de K^+ activada por hiposmolaridad (Grinstein, 1982; Sánchez-Olea, 1993) y; (v) los inhibidores clásicos de canales de cloro inhiben los flujos de Cl^- activados por hiposmolaridad. En estudios con técnicas electrofisiológicas se han detectado corrientes tanto de K^+ como de Cl^- , que se activan por hiposmolaridad. No se ha identificado molecularmente a la proteína responsable de la movilización del K^+ sensible a hiposmolaridad, sin embargo, se ha visto que la corriente de K^+ activada por hiposmolaridad es una corriente saliente que se activa también por despolarización y que es sensible a quinina (Nilius, 1995). Estos canales son muy específicos para el K^+ , ya que no son permeables a otros cationes como el Na^+ . En varios tipos celulares se han reportado canales de K^+ dependientes de calcio del tipo BK activados por hinchamiento; consecuentemente la liberación de K^+ y el DRV son, en esos casos, dependientes del calcio externo (Sarkadi and Parker, 1991). Deutsch y Chen (1993) han propuesto a los canales Kv

1.3 como posibles candidatos en el transporte de los flujos de K^+ osmosensibles. Para apoyar esta propuesta llevaron a cabo un estudio en linfocitos -T, los cuales no tienen la habilidad de regular su volumen. Después de la transfección y subsecuente expresión de los canales Kv 1.3, los linfocitos adquieren la capacidad de regular su volumen.

Los canales de K^+ que se activan durante el DRV han sido estudiados en diversas preparaciones, células de Ehrlich (Hoffman, 1989; Hougaard, 2000), linfocitos (Girnstein, 1984) en varios tipos de células epiteliales (Klaerke, 1988; Roy y Sauve, 1987; Wiener, 1990), plaquetas (Livne, 1987; Szirmai, 1988) y en osteosarcoma (Yamaguchi, 1989). En astrocitos en cultivo, la conductancia a K^+ se ha visto incrementada por soluciones hiposmóticas (Olson y Li, 1998). De hecho, sólo con pocas excepciones, la movilización de K^+ se observa siempre durante el DRV. En mucho de los tejidos estudiados, la activación de la conductancia al K^+ ocurre independiente y simultáneamente con una corriente de Cl^- . El movimiento saliente de KCl, dirigido por el gradiente de K^+ resulta en una salida de agua osmóticamente obligada durante el DRV.

OBJETIVO GENERAL

El Estudio y la caracterización bioquímica y electrofisiológica de la vía de permeabilidad al potasio en respuesta a un cambio en el volumen celular inducido por soluciones hiposmóticas en astrocitos de cerebelo de rata en cultivo.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterización farmacológica de la salida de potasio activada por hiposmolaridad
- El establecimiento de la dependencia al Ca^{+2} de dicho movimiento, sea intra o extracelular, en tanto que se ha propuesto a dicho catión divalente como señal necesaria para la activación del proceso de DRV en su conjunto (Bender y Noremborg, 1994).
- Caracterización electrofisiológica de la vía de movilización del K^+ , lo cual incluye curso temporal y la dependencia al voltaje de su activación e inactivación; el valor de su potencial de inversión; su apego o desviación de una conducta óhmica; el valor de su conductancia, así como su interdependencia con los movimientos de Cl^- activados también por el cambio en volumen.

METODOLOGIA

Tanto los cultivos de astrocitos como las soluciones utilizadas y métodos de liberación de los movimientos de K^+ , se refieren en la publicación anexa que se obtuvo durante la fase experimental

ELECTROFISIOLOGIA

Para el estudio y determinación de las corrientes de K^+ activadas por cambios en el volumen celular, se utilizó la técnica de pinzamiento de membrana (Patch clamp) en su modalidad de fijación de voltaje en célula entera (whole cell). Dicha técnica consiste, brevemente, en aplicar un protocolo de pulsos cuadrados de corriente eléctrica de 300 mseg de duración, iniciando en -100 mV a $+120$ mV en pasos de 20 mV cada uno. (Fig. B) manteniendo el potencial de membrana fijo (-70 mV). Este protocolo evidenciara las corrientes endógenas presentes en el tipo celular estudiado, permite el registro de aquellas inducidas por un cambio en el volumen, además de permitir por comparación si son las mismas, aunque amplificadas, que las observadas en condiciones previas al estímulo.

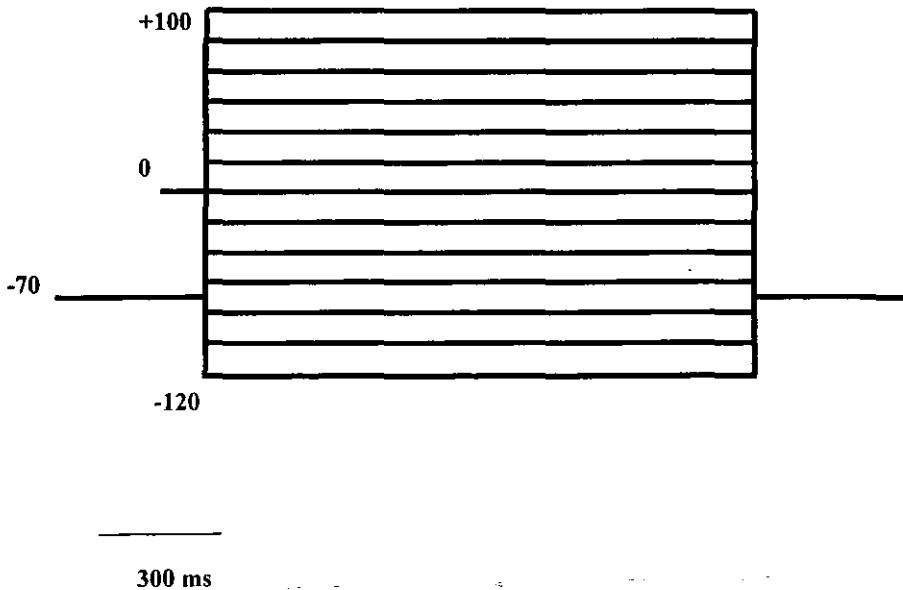
Los registros en célula entera (whole cell) fueron realizados usando un amplificador Axopatch 200A (Axon Instruments, Foster City, Calif. USA). Las pipetas de patch-clamp fueron hechas con tubos de vidrio de borosilicato con un diámetro externo de 1.5 mm y un diámetro interno de 1mm (World Precision Instruments, Inc.), utilizando un generador manual de electrodos de dos fases (PP-83 Narishige, Kyoto, Japón). La resistencia de las pipetas fue de 3-5 M Ω . Los registros de las corrientes fueron digitalizados usando una computadora PC acoplada a una interface AD/DA (Digidata series 1200, Axon Instruments). El análisis de los datos y resolución de gráficas se realizaron con los programas de Pclamp y Clampfit v.6.02 (Axon Instrument). Todos los experimentos se hicieron a temperatura ambiente.

SOLUCIONES

La composición de las soluciones de registro electrofisiológicos fue la siguiente (en mM): medio extracelular: NaCl 135, KCl 4.7, CaCl₂ 1, MgSO₄ 1.17, glucosa 5, HEPES 10 ajustado a pH 7.4; composición de la solución intracelular (en mM): Aspartato de K⁺ 140, MgCl₂ 1, glucosa 5, HEPES 10, ácido etilen glicol-bis (B-aminoetil eter)-N;N;N;N tetraacético (EGTA) 5.

La solución hiposmótica se preparó únicamente diluyendo al medio isosmótico con el mismo volumen de agua bidestilada, para una hipotonidad final de 150 mOsm /lt (50% hiposmótico)

Figura B.- Protocolo de estimulación electrofisiológica (whole cell)



RESULTADOS.

Tanto los resultados como la metodología de los estudios bioquímicos de esta investigación se encuentran en el artículo anexo publicado en la revista *Journal of Neuroscience Research* 57: 350-358 (1999).

Influence of Ca^{2+} on K^+ Efflux During Regulatory Volume Decrease in Cultured Astrocytes

Octavio Quesada, Benito Ordaz, Sandra Morales-Mulia, and Herminia Pasantes-Morales*

Institute of Cell Physiology, National University of Mexico, Mexico City, Mexico

The calcium (Ca^{2+}) dependence of potassium (K^+) efflux activated by hyposmolarity in cultured cerebellar astrocytes was investigated, measuring in parallel experiments ^{86}Rb release and changes in cytosolic Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Hyposmotic (50%) medium increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ from 117 to 386 nM, with contributions of extracellular Ca^{2+} and Ca^{2+} from the endoplasmic reticulum. Hyposmotic medium increased ^{86}Rb efflux rate from 0.015 min^{-1} to a maximal of 0.049 min^{-1} and a net release of 30%. This osmosensitive efflux was inhibited by Ba^{2+} (0.028 min^{-1}), quinidine (0.024 min^{-1}), and charybdotoxin (0.040 min^{-1}), but was unaffected by TEA, 4-AP, or apamin. Removal of external Ca^{2+} from the hyposmotic medium increased ^{86}Rb efflux to a maximal rate constant of 0.056 min^{-1} and a net release of 38% and caused a delay of inactivation. These changes were due to the overlapping of an efflux activated by Ca^{2+} removal in isosmotic medium. This isosmotic ^{86}Rb efflux was unaffected by TEA or 4-AP, reduced by verapamil, and abolished by Ba^{2+} , nitrendipine, and Mg^{2+} . With the swelling-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rise suppressed by ethyleneglycoltetraacetic acid-acetoxy-methyl ester (EGTA-AM), hyposmotic ^{86}Rb was 30% reduced. The Ca^{2+} entry blockers Cd^{2+} , Ni^{2+} , La^{3+} , and Gd^{3+} did not affect ^{86}Rb efflux. A 40% decrease observed with verapamil and nitrendipine was found unrelated to Ca^{2+} , because these agents did not affect the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rise and the inhibition persisted in the absence of external Ca^{2+} . The phospholipase C blocker U-73122 did not affect $[\text{Ca}^{2+}]_i$, nor ^{86}Rb efflux. Blockers of Ca^{2+} /calmodulin W7 and KN-93 decreased ^{86}Rb efflux to the same extent as EGTA-AM. Ionomycin markedly potentiated ^{86}Rb release in hyposmotic conditions only when $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was raised to about $1 \mu\text{M}$, suggesting the implication of maxi- K^+ channels at this $[\text{Ca}^{2+}]_i$ threshold, which nonetheless, was not attained during hyposmotic swelling. It is concluded that ^{86}Rb efflux in cerebellar astrocytes is largely (70%) Ca^{2+} -independent and the Ca^{2+} -dependent fraction is sustained essentially by Ca^{2+} released from the endoplasmic reticulum and

mediated by a mechanism involving Ca^{2+} /calmodulin. *J. Neurosci. Res.* 57:350-358, 1999.

© 1999 Wiley-Liss, Inc.

Key words: volume regulation; Ca-blockable K channels; volume-sensitive potassium channels

INTRODUCTION

Cultured cerebellar astrocytes respond to swelling evoked by hyposmolar solutions by an active process of cell volume recovery, accomplished by the extrusion of intracellular osmolytes, K^+ , Cl^- , and organic molecules, including polyalcohols and amino acids (Kimelberg and Frangakis, 1996; Kimelberg et al., 1990a; Olson et al., 1986; Pasantes-Morales and Schousboe, 1988). The efflux pathways for these osmolytes consist essentially of separate K^+ and Cl^- channels and a leak pathway for the organic molecules, which shares with the anion channel a number of physiologic and pharmacologic features (Jackson and Strange, 1993; Kirk, 1997; Pasantes-Morales, 1996; Roy, 1995). Swelling in astrocytes elicits an immediate and maximal increase in the permeability to Cl^- and amino acids, which represent the initial event in the regulatory volume decrease (RVD). K^+ exit is delayed and is the rate-limiting step in this process (Pasantes-Morales et al., 1994). Increasing the rate of K^+ efflux results in an increase in the rate and efficiency of RVD (Pasantes-Morales et al., 1994; Quesada et al., 1998).

The signal transducing the change in cell volume into the activation of the osmolyte efflux pathways has not been conclusively identified. Ca^{2+} is a likely candidate for this role, because in most cells, including cultured astrocytes, swelling elicits a rise in cytosolic Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) with contributions of both Ca^{2+} influx and

Contract grant sponsor: DGAPA-UNAM; Contract grant number: IN-201297; Contract grant sponsor: CONACYT; Contract grant number: 2262P-N.

*Correspondence to: Herminia Pasantes-Morales, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Ap. Postal 70-253, Mexico, 04510, D.F. Mexico. E-mail: hpasante@ifisiol.unam.mx

Received 5 April 1999; Revised 21 April 1999; Accepted 21 April 1999

Ca²⁺ release from internal sources (Bender et al., 1994; Fischer et al., 1997; Morales-Mulia et al., 1998; O'Connor and Kimelberg, 1993). The osmosensitive K⁺ efflux pathway is Ca²⁺ dependent in some cells, particularly in epithelial cells (Sarkadi and Parker, 1991), whereas it seems to be Ca²⁺ independent in other cell types. In cultured astrocytes, this matter is at present unclear, due to some conflicting results. In cortical astrocytes, O'Connor and Kimelberg (1993) reported a blockade of the hyposmotic ⁸⁶Rb efflux upon removal of external Ca²⁺. This finding was corrected in a further report showing an increase in ⁸⁶Rb efflux in Ca²⁺-free medium (Vitarella et al., 1994). Bender and Norenberg (1994) also showed enhanced hyposmotically stimulated ⁸⁶Rb efflux in the absence of external Ca²⁺. Despite these clear results, the conclusion is that ⁸⁶Rb efflux depends on extracellular Ca²⁺ (Bender and Norenberg, 1994). A partly inhibitory effect of nimodipine of about 20–40% was also considered in support of this conclusion (Bender and Norenberg, 1994; Vitarella et al., 1994). The hyposmotic ⁸⁶Rb efflux in cortical astrocytes after treatment with 1,2-bis(O-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N' tetraacetic acid acetoxy-methyl ester (BAPTA-AM) is reported as partly decreased (Vitarella et al., 1994) or unaffected in Ca²⁺-free medium (Bender and Norenberg, 1994) or inhibited (40%) if external Ca²⁺ is removed (Bender and Norenberg, 1994). In view of these results, we reexamined the influence of Ca²⁺ from external and internal sources on the swelling-activated ⁸⁶Rb efflux in cultured cerebellar astrocytes measuring [Ca²⁺]_i and ⁸⁶Rb fluxes in parallel experiments. We found results that may provide an explanation for most of the apparent inconsistencies mentioned above.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

Primary cultures of cerebellar astrocytes were prepared as previously described (Sánchez-Olea et al., 1993). Briefly, the dissociated cell suspensions from cerebellum of 8-day-old rats were plated at a density of 2.1×10^4 cells/cm² in plastic dishes. The culture medium consisted of basal Eagle's medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 2 mM glutamine, 50 U/ml penicillin, and 50 µg/ml streptomycin. The culture dishes were incubated at 37°C in atmosphere (5% CO₂/95% air). The enrichment of cultures in astrocytes and the proportion of other cells were assessed by immunocytochemical techniques as previously described (Sánchez-Olea et al., 1993).

⁸⁶Rb Release Measurements

Cultured cells were incubated in culture medium containing ⁸⁶Rb (2.5 µCi/ml) for 60 min. After incuba-

tion, the medium was replaced with *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N*-2-ethanesulfonic acid (HEPES)-buffered saline containing 135 mM NaCl, 1.0 mM CaCl₂, 1.17 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, and 5 mM glucose, pH 7.4. The medium osmolarity, determined with a freezing-point osmometer (model 5002, Precision Instruments, Natick, MA), was 295 ± 6 mOsm/l. After 15 min of successive washes with this medium, cells were superfused at a rate of 1 ml/min for 5 min, after which stable ⁸⁶Rb efflux baseline was attained. Then, the superfusion medium was replaced by one of reduced osmolarity (150 mOsm; 50% hyposmotic), and samples were collected for 10 more min. Hyposmotic media were prepared by reducing the NaCl concentration to 60 mM. Control dishes were added with the vehicle used to prepare solutions containing the drugs tested. At the end of the experiments, radioactivity in media and that remaining in the cells was measured in a liquid scintillation counter. Results are expressed as the radioactivity released in each collected sample as percentage of the total radioactivity present in the cells at that time.

Intracellular Free Ca²⁺ Measurement

For Ca²⁺ measurements, cells were detached from dishes by treatment with phosphate-buffered Ca²⁺-free saline containing 1 ml of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and 0.01% trypsin for 2 min and loaded with 5 µM Fura-2/AM at 37°C during 1 hr in basal Eagle's medium. After loading, cells were centrifuged, resuspended in an equal volume of medium, and incubated for an additional 30 min. The cells were then washed, and fluorescence was measured in an Aminco-Bowman luminescence spectrometer (SLM-AMINCO®, Rochester, NY) series 2. Excitation wavelength was alternated between 340 and 380 nm, and fluorescence intensity was monitored at 510 nm. Each experiment was individually calibrated to obtain the maximum fluorescence after disrupting the cells with 0.1% Triton X-100 and the minimum fluorescence obtained after buffering the calcium in the solution with 20 mM ethyleneglycoltetraacetic acid (EGTA). The values obtained through this procedure were used to calculate the intracellular calcium concentration according to previously published equations (Grynkiewicz et al., 1995).

RESULTS

[Ca²⁺]_i Increase by Hyposmolarity

Exposure of cerebellar astrocytes to 50% hyposmotic medium markedly increased [Ca²⁺]_i. This was first examined in individual astrocytes attached to coverslips measured as previously described (Morán et al., 1997). The Ca²⁺ signal largely varied in shape and amplitude

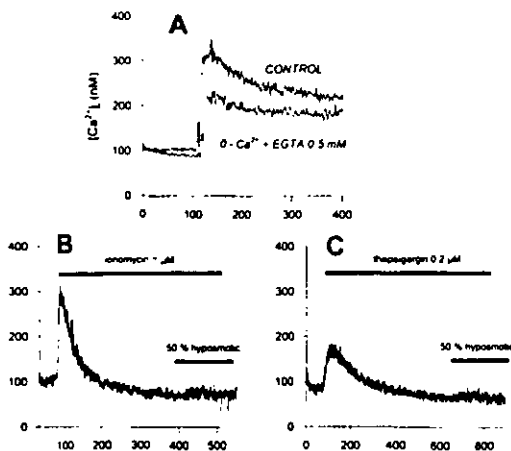


Fig. 1. Intracellular calcium changes in cultured astrocytes induced by hyposmolarity and the effect of ionomycin and thapsigargin exposure before the hyposmotic stimulus. A: After 100 sec recording of basal $[Ca^{2+}]_i$, (see Materials and Methods), cells were exposed to 50% hyposmotic medium, either with 1.2 mM extracellular Ca^{2+} (upper trace) or without Ca^{2+} plus 0.5 mM ethyleneglycoltetraacetic acid (EGTA) (lower trace). B: Intracellular calcium changes induced by 1 μ M ionomycin dissolved in a Ca^{2+} -free/EGTA isosmotic medium (upper bar) and the absence of response to a hyposmotic stimulus (lower bar). C: Same as B, but using 0.2 μ M thapsigargin as endoplasmic reticulum Ca^{2+} -depleting agent (upper bar). Representative traces of three separate assays are shown.

from essentially no increase, to large, rapid increases up to 800 nM. Due to this variability, we considered a study in a large population of cells in suspension as more representative of the real phenomenon. The average $[Ca^{2+}]_i$ in cells in suspension in isosmotic medium was $117 \text{ nM} \pm 12.4$, ($n = 16$) and raised to $386 \pm 36 \text{ nM}$ ($n = 7$) in 50% hyposmotic solutions (Fig. 1A). In Ca^{2+} -free media containing 0.5 mM EGTA, $[Ca^{2+}]_i$ was $87 \pm 15 \text{ nM}$ in isosmotic medium and $190 \pm 26 \text{ nM}$ ($n = 8$) in 50% hyposmotic medium (Fig. 1A), indicating a substantial contribution of Ca^{2+} influx to the $[Ca^{2+}]_i$ elevation. To evaluate the contribution of Ca^{2+} released from endogenous sources, astrocytes were treated with 1 μ M ionomycin or 0.2 μ M Tg in isosmotic Ca^{2+} -free medium. This treatment elicited a transient increase in $[Ca^{2+}]_i$, and a subsequent hyposmotic stimulus did not evoke any further increase in $[Ca^{2+}]_i$, (Fig. 1B,C). These results in cerebellar astrocytes in suspension were remarkably similar to those reported by Fischer et al. (1997) in their characterization of the hyposmolarity-induced Ca^{2+} response in cultured cortical astrocytes at the single-cell level, showing that the response in astrocytes attached or in suspension is not significantly different.

Influence of Ca^{2+} on ^{86}Rb Efflux

Exposure of cerebellar astrocytes to 50% hyposmotic solutions increased ^{86}Rb release from an efflux rate of $0.022 \text{ (min}^{-1}\text{)}$ to a maximal rate constant of $0.049 \text{ (min}^{-1}\text{)}$, attained after 3 min (Fig. 2A). The amount of ^{86}Rb released by the hyposmotic stimulus during the time of the experiment (10 min) was $30 \pm 3\%$ ($n = 12$) of the accumulated radioactivity. Some variations in the response were observed among the different experiments. Therefore, the effects of all drugs or experimental conditions tested were always compared with their corresponding day controls. The osmosensitive release of ^{86}Rb was unaffected by TEA, up to 10 mM, or 1 mM 4AP (results not shown) and was markedly decreased by 1 mM quinidine or barium (Fig. 2A). Charibdotoxin but not apamin inhibited the release, decreasing the maximal rate to 0.040 ± 0.002 ($n = 4$, $P < 0.05$). Removal of Ca^{2+} from the hyposmotic medium resulted in a significant change in the osmosensitive ^{86}Rb efflux. The time course was modified, showing a delay in the inactivation phase and an increase in the maximal rate constant (Fig. 2B) and in the net amount released (38% in Ca^{2+} -free medium vs. 30% in controls). The possibility was then explored that all these changes were due to the activation of a separate ^{86}Rb efflux elicited by Ca^{2+} removal. This possibility was examined in astrocytes exposed first to isosmotic Ca^{2+} -containing medium and subsequently to isosmotic Ca^{2+} -free (0.5 mM EGTA) medium. Figure 3A shows that Ca^{2+} removal elicited an increase in ^{86}Rb efflux, slowly activating to reach a maximal rate of 0.056 min^{-1} after 10 min, with no detectable inactivation during the time of the experiment. The amount of ^{86}Rb released in 10 min was $36 \pm 3\%$ ($n = 6$). This effect of Ca^{2+} removal was essentially the same in solutions in which Ca^{2+} was omitted, containing only the residual Ca^{2+} in water or in those made virtually free of Ca by addition of the chelators BAPTA or EGTA (results not shown). The ^{86}Rb efflux activated by Ca^{2+} removal could be blocked immediately after readdition of Ca^{2+} to the medium. The isosmotic ^{86}Rb release activated by Ca^{2+} removal was unaffected by TEA and 4-AP and markedly inhibited by Ba^{2+} and Mg^{2+} (Fig. 3A). Due to a possible similarity of this pathway with the Ca^{2+} -blockable channels described in epithelial cells (Van Driessche et al., 1994; Van Driessche and Ertij, 1994) that are sensitive to dihydropyridines and verapamil, these agents were also tested in the ^{86}Rb release activated by Ca^{2+} removal. Figure 3A shows a marked inhibition of ^{86}Rb efflux by 100 μ M verapamil and 25 μ M nitrendipine. Also, similar to the Ca^{2+} -blockable channels, isosmotic ^{86}Rb efflux in astrocytes was sensitive to H^+ , being reduced at external acidic pH (Fig. 3B). This isosmotic ^{86}Rb efflux elicited by Ca^{2+} removal, superimposed to the hyposmotic efflux may

account for the delayed inactivation and the net increase in ^{86}Rb efflux observed in these conditions.

Suppression of all the hyposmotically induced increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, by treatment with $50\ \mu\text{M}$ EGTA-AM during 30 min (Fig. 4A) reduced ^{86}Rb efflux with no change in the activation or inactivation pattern (Fig. 4B). The maximal rate decreased from $0.055\ \text{min}^{-1}$ to $0.41\ \text{min}^{-1}$ ($P < 0.05$, $n = 12$), and the amount released from 30% to 24% ($P < 0.05$, $n = 12$) EGTA-AM was used

instead of the more common BAPTA-AM due to some effects of this later, somehow reducing the extent of cell swelling (Morales-Mulia et al., 1998; Jorgensen et al., 1997). Attempts were made to identify the Ca^{2+} source, which sustains this Ca^{2+} -dependent fraction of ^{86}Rb efflux. Because the common approach of external Ca^{2+} removal cannot be used due to the isosmotic activation of ^{86}Rb efflux in this condition, we instead examined the effect of Cd^{2+} , Ni^{2+} , and La^{3+} , which are general blockers of Ca^{2+} channels, and of Gd^{3+} , a known blocker of stretch-activated channels. None of these agents affected ^{86}Rb efflux [maximal rate min^{-1} in controls 0.045 ± 0.004 ($n = 8$), Cd^{2+} 0.045 ± 0.001 , Ni^{2+} 0.044 ± 0.002 , La^{3+} 0.040 ± 0.002 , and Gd^{3+} 0.042 ± 0.003 ($n = 4$)]. The L-type Ca^{2+} -channel blockers verapamil and nitrendipine, but not diltiazem, significantly inhibited ^{86}Rb efflux (Fig. 5A). This appears to be an effect unrelated to Ca^{2+} , because these agents did not affect the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation induced by hyposmolarity (Fig. 5B,C). Besides, when external Ca^{2+} was removed, still nitrendipine inhibited ^{86}Rb efflux (Fig. 5D).

All these results indicate a marginal contribution of external Ca^{2+} to the activation of the osmosensitive ^{86}Rb efflux and rather suggest the involvement of Ca^{2+} release from an endogenous source. This is most likely, the pool stored in the endoplasmic reticulum, as suggested by data showing that upon depletion of this reservoir, there is no Ca^{2+} available to be released by the hyposmotic stimulus. To investigate whether the mechanism of Ca^{2+} release from endoplasmic reticulum involves activation of IP_3 receptors, astrocytes were treated with the phospholipase C (PLC) blocker U-73122. This agent was essentially ineffective (maximal rates: control, $0.048 \pm 0.006\ \text{min}^{-1}$; U-73122, $0.046 \pm 0.004\ \text{min}^{-1}$; $n = 6$). The Ca^{2+} /calmodulin blockers W7 and KN-93 decreased ^{86}Rb

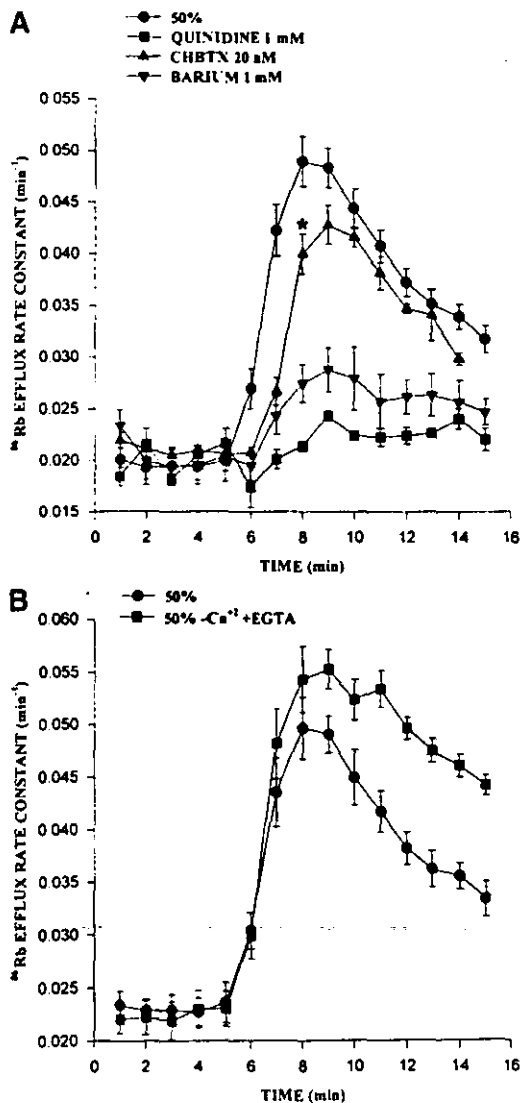


Fig. 2. Time course of the swelling-induced ^{86}Rb release from cultured cerebellar astrocytes. After a 1-hr loading period with $2.5\ \mu\text{Ci}$ ^{86}Rb , cells were perfused 15 min with isosmotic medium and fractions were collected each subsequent minute. After a stable efflux was attained, a 50% hyposmotic medium was introduced (sixth min in figure) and fractions were collected for 10 more minutes. A: Swelling-induced ^{86}Rb release without additions (control: circles) and in the presence of 1 mM quinidine (squares), 20 nM charibdotoxin (triangles), or 1 mM barium (inverted triangles) B: Swelling-induced ^{86}Rb release in the presence (circles) or absence (squares) of external Ca plus 0.5 mM ethyleneglycoltetraacetic acid. Data are expressed as efflux rate constant as described in Materials and Methods. Results are means \pm SE of 29 (circles) or 6 experiments (all other conditions). * $P < 0.05$; significant differences in A ($P < 0.001$) for quinidine and barium conditions were found from the sixth to fifteenth fraction; symbols were omitted, however, for clarity purposes.

efflux to about the same extent as by the treatment with EGTA-AM (Fig. 6).

Potentiation of ^{86}Rb Efflux by Increasing $[\text{Ca}^{2+}]_i$

The osmosensitive efflux of ^{86}Rb from cerebellar astrocytes was dramatically increased by a treatment with $1\ \mu\text{M}$ ionomycin in the presence of Ca^{2+} (Fig. 7A). The magnitude of this increase was clearly dependent on the elevation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ due to the ionophore, which in turn increased with increasing the external Ca^{2+} concentration (Fig. 7B). The effect of ionomycin potentiating ^{86}Rb efflux could be observed only when $[\text{Ca}^{2+}]_i$ levels

increased over $1\ \mu\text{M}$. In isotonic conditions ionomycin did not affect ^{86}Rb efflux (results not shown). At variance with results in cortical astrocytes (Bender and Norenberg, 1994), in which ouabain markedly increased the osmosensitive ^{86}Rb efflux, in our preparation this agent did not increase $[\text{Ca}^{2+}]_i$, and did not potentiate ^{86}Rb efflux (results not shown).

DISCUSSION

It has been consistently observed that omission of extracellular Ca^{2+} does not decrease but rather increases the osmosensitive ^{86}Rb efflux in astrocytes, a result in conflict with its proposed Ca^{2+} dependence (Bender and Norenberg, 1994; Sánchez-Olea et al., 1993; Vitarella et al., 1994). The finding in the present work of a ^{86}Rb efflux activated by Ca^{2+} removal in isosmotic medium, contributes to clarify this point. It also explains why, in cortical astrocytes, inhibition of the osmosensitive ^{86}Rb efflux by BAPTA-AM is reversed in Ca^{2+} -free medium (Bender and Norenberg, 1994). Besides, this K^+ movement activated in the absence of external Ca^{2+} , by increasing the net amount of K^+ released, explains the apparently paradoxical acceleration of RVD observed in this condition (Morales-Mulia et al., 1998). The mechanism by which Ca^{2+} omission activates ^{86}Rb efflux is unclear. Nonspecific cation channels gated by removal of divalent cations have been described in epithelial cells (Van Driessche et al., 1994; Van Driessche and Ertlij, 1994), with features resembling those of the ^{86}Rb efflux activated by Ca^{2+} removal in astrocytes, such as inhibition at low pH and blockade by Ba^{2+} , verapamil, and dihydropyridines. These channels could be those carrying K^+ in the absence of external Ca^{2+} . The occurrence of increased K^+ efflux by Ca^{2+} removal has not been closely exam-

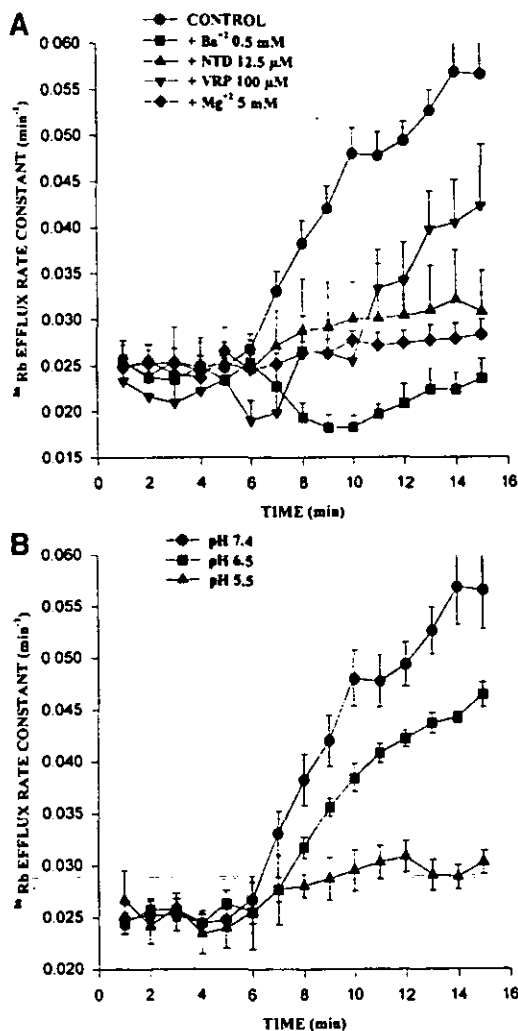


Fig. 3. Time course of the isosmotic ^{86}Rb release activated by Ca^{2+} removal from cultured cerebellar astrocytes. Dishes preloaded with ^{86}Rb were perfused with isosmotic medium until a stable ^{86}Rb efflux was attained. Then, the perfusing medium was switched to an isosmotic Ca^{2+} -free medium added with $0.5\ \text{mM}$ ethyleneglycoltetraacetic acid (EGTA). A: ^{86}Rb release induced by Ca^{2+} -free media plus EGTA (circles) and supplemented with $0.5\ \text{mM}$ barium (squares), $12.5\ \mu\text{M}$ nifedipine (NTD; triangles), $100\ \mu\text{M}$ verapamil (VRP; inverted triangles) or $5\ \text{mM}$ Mg^{2+} (diamonds). Significant differences ($P < 0.05$ for NTD and $P < 0.01$ for VRP and Mg^{2+}), were found. B: Sensitivity of the isosmotic ^{86}Rb release to extracellular pH. Control (circles) at pH 7.4 and at pH 6.5 (squares) or 5.5 (triangles). Results are means \pm SE of 6–26 experiments. Significant differences ($P < 0.01$ for pH 6.5 curve and $P < 0.001$ for pH 5.5 curve) were found for every point starting from the eighth fraction, compared with the Ca^{2+} -free condition (control); significance symbols were omitted for simplicity.

ined in other cell types. This possibility should be considered, though, in all studies in which the Ca^{2+} dependence of osmosensitive K^+ movements is investigated.

In astrocytes, as in many other cell types, hyposmotic swelling leads to a transient increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, with contributions from both extracellular and intracellular sources (Bender et al., 1994; Fischer et al., 1997; Morales-Mulia et al., 1998; O'Connor and Kimelberg, 1993). In cerebellar astrocytes, suppression of the swelling-associated $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rise by EGTA-AM reduced the

osmosensitive ^{86}Rb efflux by 30%. Attempts were made in this work to identify the source of Ca^{2+} involved in this component of ^{86}Rb efflux. Because neither general blockers of Ca^{2+} channels such as Cd^{2+} , Ni^{2+} , and La^{3+} , nor the blocker of stretch-activated channels Gd^{3+} , affected ^{86}Rb efflux, external Ca^{2+} influx appears not influential as a mechanism sustaining the Ca^{2+} -dependent fraction of ^{86}Rb efflux. Verapamil and nitrendipine, but not diltiazem, exhibited an inhibitory action, which, however, cannot be attributable to a blockade of Ca^{2+} entry, because first, these agents did not decrease Ca^{2+} entry during swelling, and second, substantial inhibition persists in the absence of external Ca^{2+} , when there is no Ca^{2+} influx. It is noteworthy that these agents also potentially blocked the ^{86}Rb efflux activated by Ca^{2+} removal, a condition which obviously excludes an effect related to Ca^{2+} influx. There is increasing evidence of direct effects of verapamil and dihydropyridines on K^+ channels, including maxi- K^+ channels and voltage-gated channels (Armstrong and Miller, 1990; Fagni et al., 1994; Schlichter et al., 1997). In these later, a Ca^{2+} -binding site at the outer domain of the pore region seems required to stabilize the native conformation of the protein preserving the normal operation of the channel (Armstrong and Miller, 1990). This may be the site where verapamil and dihydropyridines are interacting. In any event, evidence of the direct effect of these agents on at least two types of K^+ channels, suggests caution in interpreting their effects as strictly related to Ca^{2+} dependence in the osmosensitive K^+ pathways.

As for the involvement of Ca^{2+} from internal stores, there is evidence in cortical (Fischer et al., 1997) and

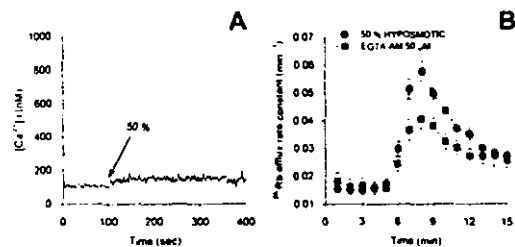


Fig. 4. Effect of ethyleneglycoltetraacetic acid-acetoxy-methyl ester (EGTA-AM) on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and ^{86}Rb efflux induced by hyposmolarity. A: Suppression of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rise in cultured astrocytes preloaded with $50 \mu\text{M}$ EGTA-AM and exposed to a 50% hyposmotic medium (arrow). Representative trace of three separate determinations. B: Time course of the ^{86}Rb efflux triggered by a 50% hyposmotic medium (at the sixth min) from control dishes (circles) and from cells preloaded with EGTA-AM (squares). Results are means \pm SE of 6–12 experiments. Significant differences ($P < 0.05$) between traces from the seventh to the twelfth minute were found.

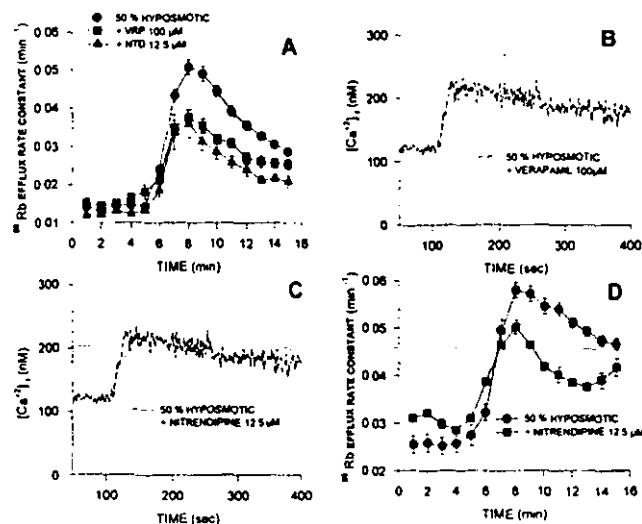


Fig. 5. The effects of verapamil ($100 \mu\text{M}$) and nitrendipine ($12.5 \mu\text{M}$) on the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase and the ^{86}Rb efflux induced by swelling. A: ^{86}Rb efflux from cells exposed at the sixth minute to a 50% hyposmotic medium without additions (control, circles), plus verapamil (squares), or nitrendipine (triangles). B: $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase induced by swelling in the presence or absence of verapamil. C: Same as in B, but testing the effect of nitrendipine on the swelling-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase. D: Effect of nitrendipine on the swelling-induced ^{86}Rb efflux in the absence of external Ca^{2+} . Control (circles) and nitrendipine (squares). Results are means \pm SE of 6–12 experiments for A and D. B and C are representative pairs of traces of three separate assays.

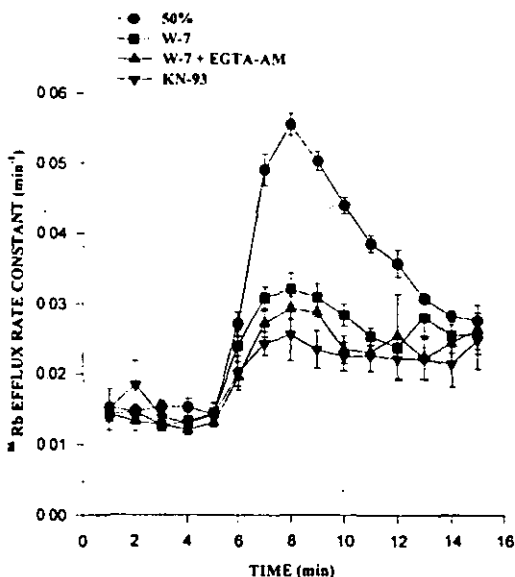


Fig. 6. Effects of the Ca^{2+} -calmodulin complex inhibitors W-7 and KN-93 on the swelling-induced ^{86}Rb release from astrocytes. The hyposmotic stimulus started at the sixth minute. Control condition (circles) with no additions. The effect of KN-93 reagent added with the hyposmotic stimulus is shown (inverted triangles). W-7 (50 μM) was preincubated 10 min and was present during the whole experiment; its effect was tested on untreated cells (squares) and in cells previously loaded with 50 μM ethyleneglycoltetraacetic acid-acetoxy-methyl ester (EGTA-AM; triangles); no significant differences were found between these two conditions. Results are means \pm SE of four to six separate experiments.

cerebellar astrocytes (present results) that points out to the endoplasmic reticulum pool as the source of Ca^{2+} released by the hyposmotic stimulus; therefore, this reservoir should be considered as the main contributor to the Ca^{2+} -dependent fraction of ^{86}Rb efflux. The mechanisms releasing Ca^{2+} from these stores by hyposmotic swelling are still unclear in astrocytes. Although the implication of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} pool seems clear (Bender et al., 1993; Fischer et al., 1997; Morales-Mulia et al., 1998), this does not necessarily mean that the release occurs through activation of IP_3 receptors (Bender et al., 1993). In cortical astrocytes, the PLC blocker U-73122 markedly decreased ^{86}Rb efflux, a result supporting the involvement of IP_3 receptors (Bender et al., 1994). In our preparation, this agent had only a marginal inhibitory effect on ^{86}Rb efflux, which besides, was reproduced by its inactive analogue. An additional conflicting evidence is the lack of effect of U-73122 on

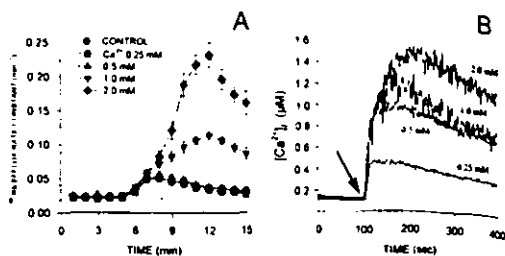


Fig. 7. Potentiation by ionomycin of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ changes and ^{86}Rb efflux induced by hyposmolarity. Hyposmotic media containing different $[\text{Ca}^{2+}]_o$ were supplemented with 1 μM ionomycin. A: ^{86}Rb efflux induced by 50% hyposmotic media (at the sixth minute in figure), containing the indicated $[\text{Ca}^{2+}]_o$. Results are means \pm SE of six separate experiments. Notice the ordinate scale change compared with previous figures. B: Time course of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in astrocytes exposed to 50% hyposmotic medium containing 1 μM ionomycin (arrow) and the indicated $[\text{Ca}^{2+}]_o$; representative set of traces of two to three separate assays is shown.

the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rise evoked by swelling in cortical astrocytes (Schliess et al., 1996). Caffeine decreases ^{86}Rb efflux in cortical astrocytes somehow involving also the ryanodine receptor (Bender et al., 1994). Other proposed mechanisms for Ca^{2+} release from the endoplasmic reticulum implicate (1) a direct effect releasing Ca^{2+} by arachidonic acid increased by swelling (Tinel et al., 1997); (2) the osmosensitive mechanical opening of Ca^{2+} channels at the endoplasmic reticulum; and (3) the activation of voltage-gated channels, sensing a voltage change after swelling, between endoplasmic reticulum and cytosol (Jena et al., 1997; McCarthy and O'Neil, 1992; Missiaen et al., 1996).

Reactions mediated by Ca^{2+} /calmodulin have been implicated in the hyposmotically stimulated ^{86}Rb efflux in cortical astrocytes based on the effect of blockers of Ca^{2+} /calmodulin and PKC. It was shown that KN-93 decreased ^{86}Rb release and W7 suppressed it completely (Bender et al., 1994). This later effect is difficult to interpret only in terms of Ca^{2+} dependence, because as shown in the same study (Bender et al., 1994), in astrocytes with all Ca^{2+} chelated by BAPTA-AM, ^{86}Rb efflux decreased only 45%. Thus, its complete blockade by W7 suggests actions additional to those of interruption of the Ca^{2+} /calmodulin-mediated reactions. We also found inhibition of ^{86}Rb efflux by W7 and KN-93 similar to that observed when all $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is quenched by EGTA-AM, implicating Ca^{2+} /calmodulin in the mechanisms of activation of the Ca^{2+} -dependent fraction of ^{86}Rb efflux in cerebellar astrocytes.

An observation considered as further evidence in support of the osmosensitive Ca^{2+} -dependence of ^{86}Rb

lux was the large increase induced by ionomycin (Bender et al., 1994). In the present work, the parallel increase in $[Ca^{2+}]_i$ allowed us to demonstrate that this increase starts only when $[Ca^{2+}]_i$ reached levels well in excess of those attained during swelling. Thus, it is not strictly Ca^{2+} dependence but a potentiation by a large $[Ca^{2+}]_i$ rise elicited by the ionophore. This may be due to the contribution of additional pathways activated above these Ca^{2+} thresholds. Likely candidates are the Ca^{2+} -activated maxi- K^+ channels, which have the dual requirement for depolarization and a large concentration of $[Ca^{2+}]_i$ (1–2 μM) for activating. Potentiation of ^{86}Rb release by ionomycin in astrocytes was observed when $[Ca^{2+}]_i$ increased to levels close to or above 1 μM and only in association with swelling, which in astrocytes is accompanied by a marked depolarization (Kimelberg et al., 1990b; Olson and Li, 1997). In a number of cell lines, particularly in epithelial cells, the K^+ channels activated by hypotonicity are the Ca^{2+} -activated maxi- K^+ channels (Sarkadi and Parker, 1991).

In conclusion, the swelling-activated ^{86}Rb efflux from astrocytes exhibit a Ca^{2+} -dependent fraction of 30% (cerebellar astrocytes) and 45% (cortical astrocytes; Bender et al., 1994) and a large Ca^{2+} -independent fraction responsible for the remaining 55–70%. The Ca^{2+} -dependent fraction is sustained by Ca^{2+} released from the endoplasmic reticulum, and the mechanism of activation involves Ca^{2+} /calmodulin. It is still undefined whether the Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent components correspond to separate pathways or represent a single pathway with partial Ca^{2+} dependence. It is also unclear at present whether a K^+ channel directly activated by swelling is present in astrocytes or whether K^+ efflux occurs through other types of K^+ channels activated by events occurring with swelling. The increase in $[Ca^{2+}]_i$ and the depolarization known to occur in astrocytes upon swelling (Olson and Li, 1997), may activate maxi- K^+ channels or/and voltage-gated K^+ channels, both contributing to the osmosensitive ^{86}Rb efflux. An electrophysiologic characterization in detail of the K^+ channel(s) activated during swelling is necessary to clarify these points.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the technical assistance of Ms. Claudia Peña and Ms. Claudia Rodríguez.

REFERENCES

Armstrong CM, Miller C. 1990. Do voltage-dependent K^+ channels require Ca^{2+} ? A critical test employing a heterologous expression system. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:7579–7582.

Bender AS, Norenberg MD. 1994. Calcium dependence of hypotoni-

cally induced potassium release in cultured astrocytes. *J Neurosci* 14:4237–4243.

Bender AS, Neary JT, Norenberg MD. 1993. Role of phosphoinositide hydrolysis in astrocyte volume regulation. *J Neurochem* 61:1506–1514.

Bender AS, Mantelle LL, Norenberg MD. 1994. Stimulation of calcium uptake in cultured astrocytes by hypotonic stress—effect of cyclic AMP. *Brain Res* 645:27–35.

Fagni L, Bossu JL, Bockaert J. 1994. Inhibitory effects of dihydropyridines on macroscopic K^+ currents and on the large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel in cultured cerebellar granule cells. *Pflügers Arch* 429:176–182.

Fischer R, Schliess F, Häussinger D. 1997. Characterization of the hypo-osmolarity-induced Ca^{2+} response in cultured rat astrocytes. *Glia* 20:51–58.

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. 1985. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440–3450.

Jackson PS, Strange K. 1993. Volume-sensitive anion channels mediate swelling-activated inositol and taurine efflux. *Am J Physiol* 265:C1489–C1500.

Jena M, Minore JF, O'Neil WC. 1997. A volume-sensitive, IP₃-insensitive Ca^{2+} store in vascular endothelial cells. *Am J Physiol* 265:C1489–C1500.

Jørgensen NK, Christensen S, Harbak H, Brown AM, Lambert IH, Hoffman EK, Simonsen LO. 1997. On the role of calcium in the regulatory volume decrease (RVD) response in Erlich mouse ascites tumor cells. *J Membr Biol* 157:281–299.

Kimelberg HK, Frangakis M. 1996. Volume regulation in primary astrocyte cultures. *Adv Biosci* 67:177–186.

Kimelberg HK, Goderie SK, Higman S, Pang S, Waniewsky RA. 1990a. Swelling-induced release of glutamate, aspartate, and taurine from astrocyte cultures. *J Neurosci* 1:1583–1591.

Kimelberg HK, Anderson E, Kettenmann H. 1990b. Swelling-induced changes in electrophysiological properties of cultured astrocytes and oligodendrocytes. II. Whole cell currents. *Brain Res* 529:262–268.

Kirk K. 1997. Swelling-activated organic osmolyte channels. *J Membr Biol* 158:1–6.

McCarty NA, O'Neil RG. 1992. Calcium signaling in cell volume regulation. *Physiol Rev* 72:1037–1061.

Morales-Mulia S, Vaca L, Hernández-Cruz A, Pasantes-Morales H. 1998. Osmotic swelling-induced changes in cytosolic calcium do not affect regulatory volume decrease in rat cultured suspended cerebellar astrocytes. *J Neurochem* 71:2330–2338.

Morán J, Morales-Mulia SM, Hernández-Cruz A, Pasantes-Morales H. 1997. Regulatory volume decrease and associated osmolyte fluxes in cerebellar granule neurons are calcium independent. *J Neurosci Res* 47:144–154.

Misaien L, De Smedt H, Parys JB, Sienart I, Vanlingen S, Droogmans G, Nilius B, Casteels R. 1996. Hypotonicity induced calcium release from intracellular calcium stores. *J Biol Chem* 271:4601–4604.

O'Connor ER, Kimelberg HK. 1993. Role of calcium in astrocyte volume regulation and in the release of ions and amino acids. *J Neurosci* 13:2638–2650.

Olson JE, Li G. 1997. Increased potassium, chloride, and taurine conductances in astrocytes during hypotonic swelling. *Glia* 20:254–261.

Olson JE, Sankar R, Holtzman D, James A, Fleischacker D. 1986. Energy-dependent volume regulation in primary cultured cerebral astrocytes. *J Cell Physiol* 128:209–215.

Pasantes-Morales H. 1996. Volume regulation in brain cells: cellular and molecular mechanisms. *Metab Brain Dis* 11:187–204.

- Pasantes-Morales H, Schousboe A. 1988. Volume regulation in astrocytes: a role for taurine as osmoeffector. *J Neurosci Res* 20:505-509.
- Pasantes-Morales H, Murray RA, Lilja L, Morán J. 1994. Regulatory volume decrease in cultured astrocytes. I. Potassium- and chloride-activated permeability. *Am J Physiol* 266:C165-C171.
- Quesada O, González E, Morales-Mulia S, Bargas J, Pasantes-Morales H. 1998. Effects of NaCl removal on osmolyte fluxes and regulatory volume decrease in cultured astrocytes. *J Neurosci Res* 53:195-202.
- Roy G. 1995. Amino acid current through anion channels in cultured human glial cells. *J Membr Biol* 147:35-44.
- Sánchez-Olea R, Morán J, Martínez A, Pasantes-Morales H. 1993. Volume-activated ^{86}Rb transport in astrocytes in culture. *Am J Physiol* 264:C836-C842.
- Sarkadi B, Parker JC. 1991. Activation of ion transport pathways by changes in cell volume. *Biochim Biophys Acta* 1071:407-427.
- Schlichter LC, Chung I, Chang MC. 1997. Regulation of Kv 1.3 channels in T lymphocytes by serine/threonine phosphorylation. *Cell Physiol Biochem* 7:159-171.
- Schliess F, Sinning R, Fischer R, Schmalenbach C, Häussinger D. 1996. Calcium-dependent activation of Erk-1 and Erk-2 after hypo-osmotic astrocyte swelling. *Biochem J* 320:167-171.
- Tinel H, Wehner F, Kinne RK. 1997. Arachidonic acid as a second messenger for hypotonicity-induced calcium transients in rat IMCD cells. *Pflügers Arch* 433:245-253.
- Van Driessche W, Ertij D. 1994. Cell swelling activates a poorly selective monovalent cation channel in the apical membrane of toad urinary bladder. *Pflügers Arch* 428:1-8.
- Van Driessche W, De Smet P, De Smedt H. 1994. Poorly selective cations channels in the apical membrane of A6 cells. *Pflügers Arch* 426:387-395.
- Vitarella D, DiRisio DJ, Kimelberg HK, Aschner M. 1994. Potassium and taurine release are highly correlated with regulatory volume decrease in neonatal primary rat astrocyte cultures. *J Neurochem* 63:1143-1149.

RESULTADOS

2) Electrofisiología

En condiciones basales (medio isosmótico) se registraron un total de 10 células mediante la técnica de patch-clamp, en la modalidad de fijación de voltaje en la configuración de célula entera (whole cell). Todas las células registradas, bajo condiciones isosmóticas (300 mOsm) muestran en general escasa corriente entrante con una máxima de 100 pA a pulsos hiperpolarizantes, mientras que a pulsos de voltaje más despolarizantes se observa una corriente rectificadora saliente con un máximo de corriente de 500 pA; el potencial reverso fue de -72 mV (Fig. 8.). Cuando las células son expuestas a medio hiposmótico 50 % (150 mOsm) se observa una despolarización evidenciada por un cambio en el potencial reverso, estableciéndose en -48 mV; así mismo, se produce un gran incremento de las corrientes salientes alcanzando un máximo de corriente de 2500 pA, mientras que se observa un pequeño incremento en las corrientes entrantes, alcanzando un valor máximo de 400 pA. La figura 9 muestra un registro de astrocito de cerebelo en condiciones isosmóticas (panel A) y luego bajo condiciones hiposmóticas (panel B).

Para establecer la participación de las corrientes de potasio activadas por cambios en el volumen celular, se utilizaron los bloqueadores generales de canales de K^+ quinidina (1 mM) y bario (2 mM). La figura 10, panel A, B y C muestra un experimento representativo bajo la presencia de quinidina. Este registro de un astrocito en condiciones isosmóticas denota la presencia de una corriente con una cinética rectificadora saliente que se activa a pulsos de voltaje más despolarizante. En la relación corriente-voltaje de este registro (Fig. 11) se muestra un potencial reverso de -76 mV, con un máximo de corriente de 390 pA; no se observaron apertura de corrientes entrantes a pulsos hiperpolarizantes. Cuando se da el estímulo hiposmótico (Fig. 10 panel B) se observa un incremento en las corrientes, así como una despolarización denotada por el cambio en el potencial reverso, siendo este ahora de -54 mV; las corrientes alcanzaron un máximo de 1800 pA, observándose, además, un ligero incremento en la corriente entrante. La presencia de quinidina 1 mM (Fig. 10 panel C), inhibe en un 90 % las corrientes activadas por hiposmolaridad, se observaron cambios en el potencial reverso cuando el fármaco fue adicionado, quedando finalmente -70 mV (Fig. 11).

En la figura 12 paneles A, B y C, se observa el registro electrofisiológico de otro astrocito bajo las mismas condiciones de estimulación osmótica y en presencia de bario (2 mM), conocido bloqueador general de canales de potasio. En condiciones isosmótica se observa una cinética rectificadora saliente con una máximo de corriente de 400 pA y un potencial reverso de -80 mV. No se observa apertura alguna de corrientes entrantes con comandos de voltaje hiperpolarizante. El cambio súbito a un medio hiposmótico induce una despolarización, quedando el potencial reverso en -46 mV (Fig. 13). Así mismo, se observa un incremento tanto en la corriente saliente como entrantes; las corrientes alcanzan un máximo de 1500 y 400 pA respectivamente. La adición de bario (2 mM) inhibe las corrientes sensibles a volumen en un 80 %, se observa un cambio en el potencial reverso en presencia del bloqueador, quedando ahora en -71 mV.

RELACION CORRIENTE- VOLTAJE EN ASTROCITOS DE CEREBELO DE RATA EN CULTIVO EXPUESTAS A UN MEDIO HIPOSMOTICO 50 %

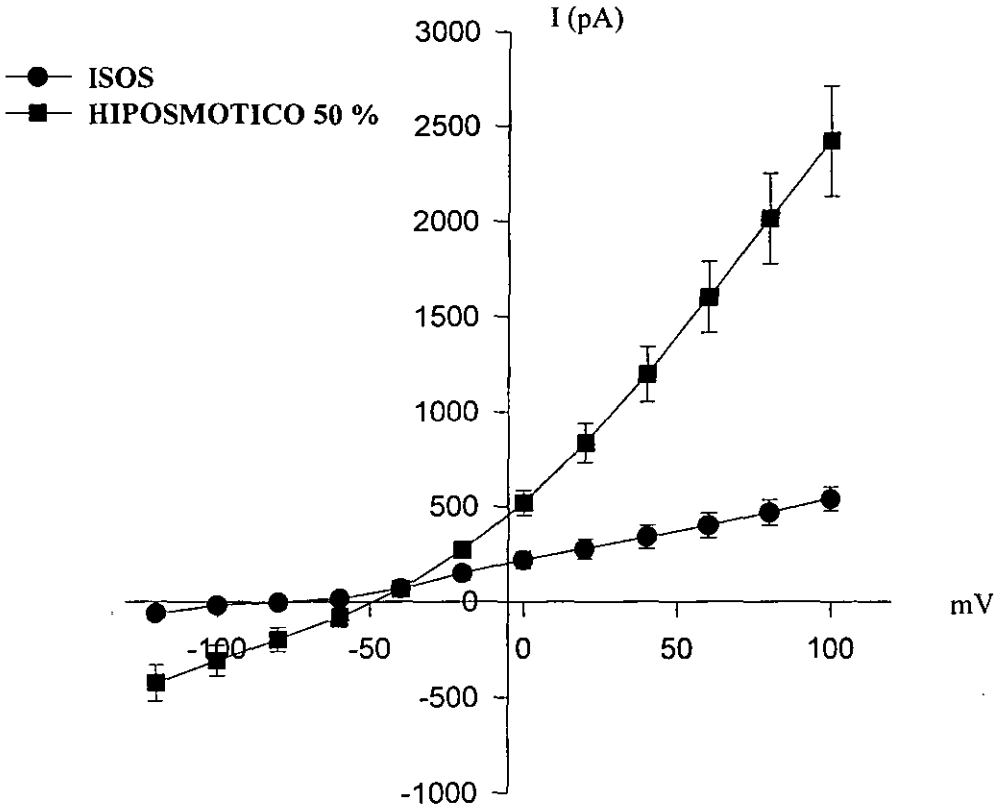


Fig. 8.- Gráfica corriente-voltaje (I-V) de las corrientes iónicas en condiciones basales (círculos) y las activadas por hiposmolaridad (cuadros) en astrocitos en cultivo. Los resultados son el promedio de 10 experimentos \pm ES.

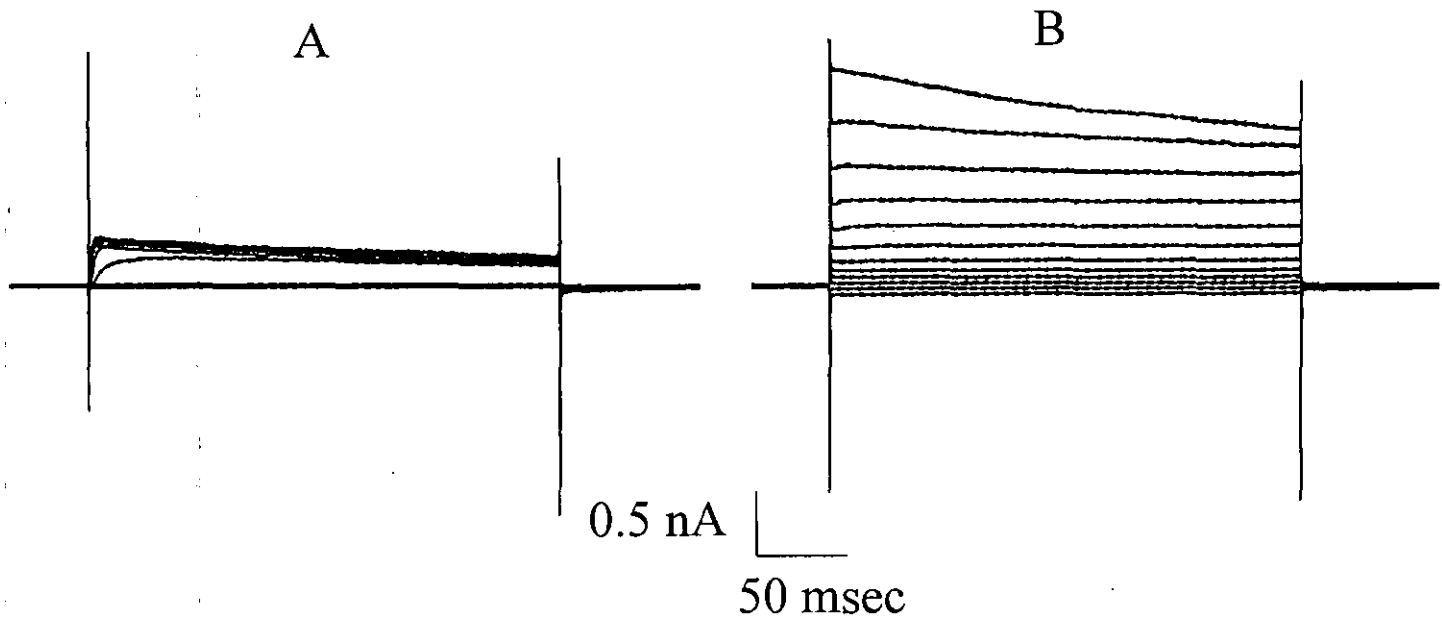


Fig. 9.- Registro electrofisiológico de las corrientes iónicas presentes bajo condiciones isosmóticas (A) y el cambio a un medio Hiposmótico 50% (B) en un astrocito de cerebelo de rata en cultivo. Se utilizó la modalidad de fijación de voltaje en su configuración de célula entera (whole cell). Se fijó el voltaje en -70 mV y se dio pulsos de voltaje desde -120 hasta $+100$ mV En incrementos de 20 mV, ver material y métodos.

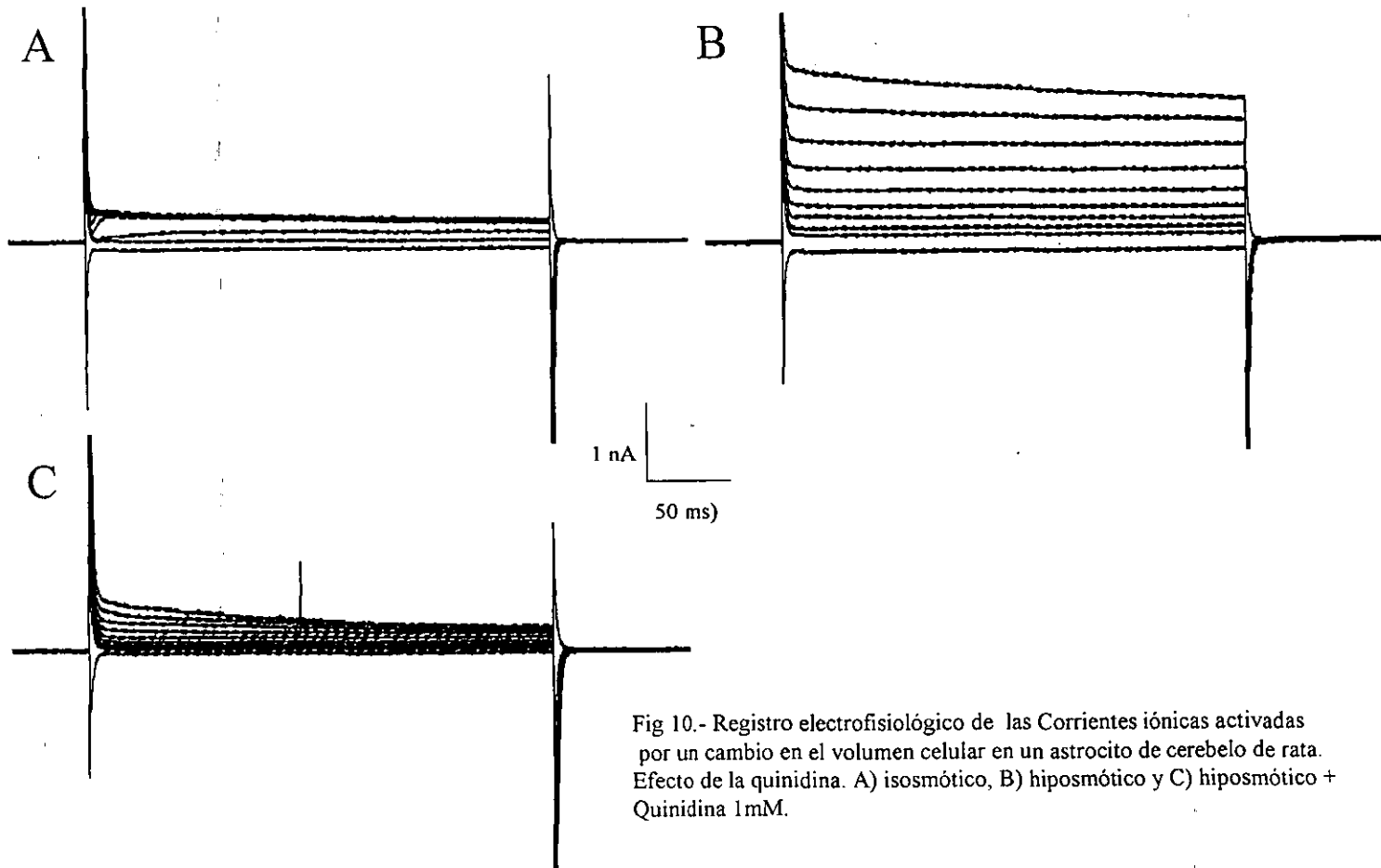


Fig 10.- Registro electrofisiológico de las Corrientes iónicas activadas por un cambio en el volumen celular en un astrocito de cerebelo de rata. Efecto de la quinidina. A) isosmótico, B) hiposmótico y C) hiposmótico + Quinidina 1mM.

RELACION CORRIENTE/VOLTAJE ASTROCITO DE CEREBELO DE RATA, MEDIO ISOSMOTICO E HIPOSMOTICO 50 % EN PRESENCIA DE QUINIDINA

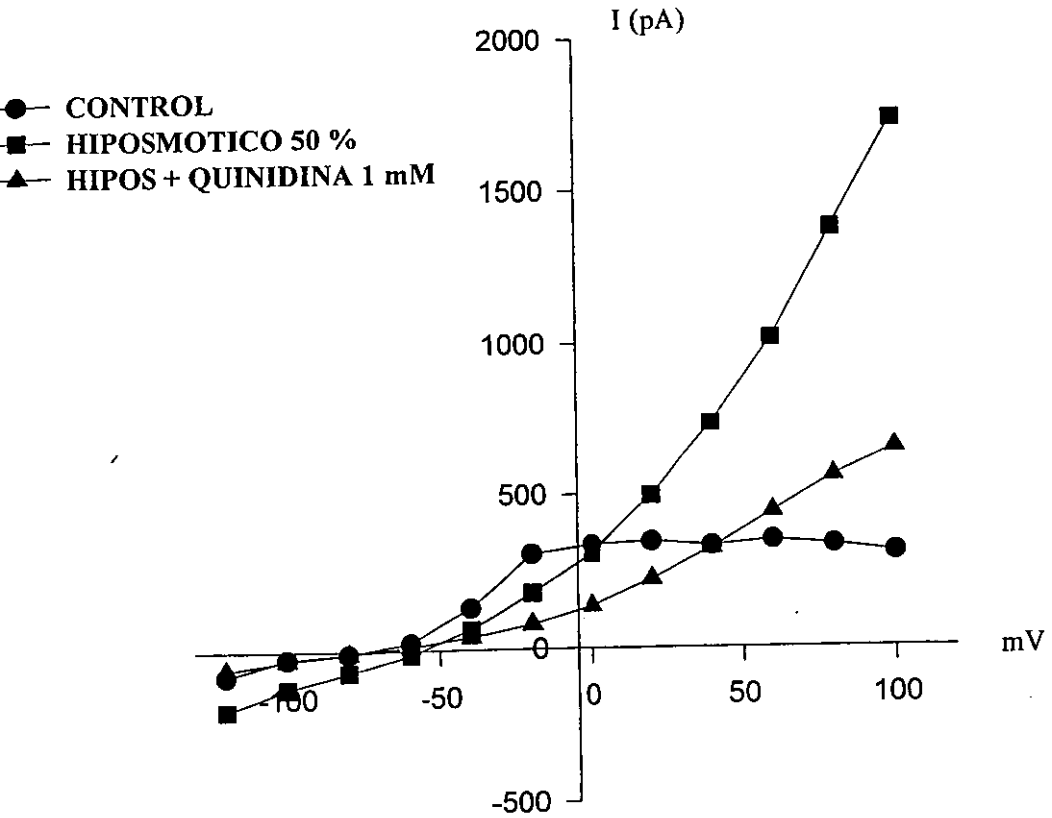


Fig. 11.- Gráfica I-V de las corrientes iónicas activadas por hiposmolaridad en presencia de quinidina. Isosmótico (círculos), hiposmótico (cuadros) e hiposmótico + quinidina 1 mM (triángulos).

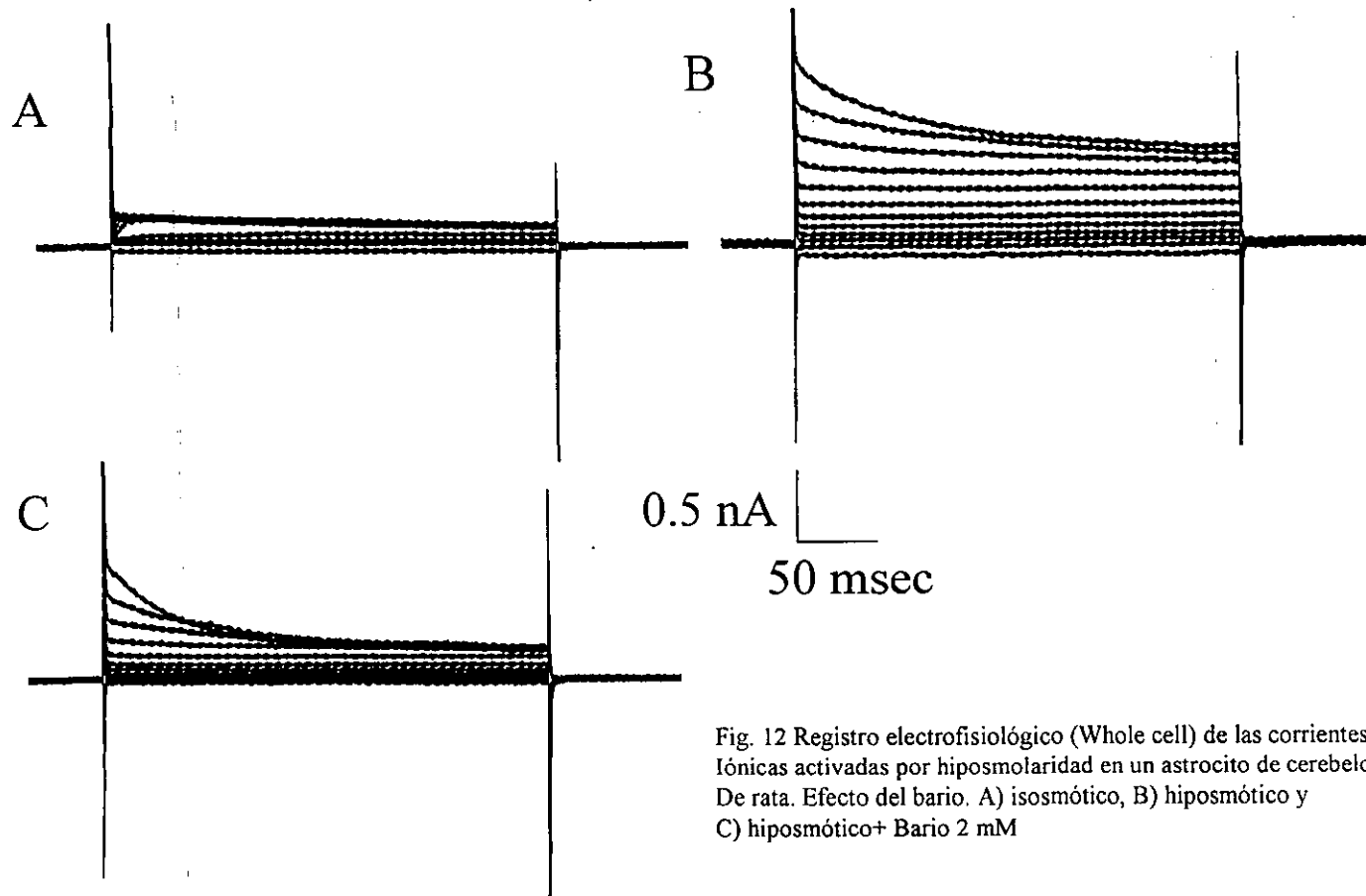


Fig. 12 Registro electrofisiológico (Whole cell) de las corrientes iónicas activadas por hiposmolaridad en un astrocito de cerebelo De rata. Efecto del bario. A) isosmótico, B) hiposmótico y C) hiposmótico+ Bario 2 mM

RELACION CORRIENTE/VOLTAJE ASTROCITO DE CEREBELO DE RATA, MEDIO ISOSMOTICO E HIPOSMOTICO 50% EN PRESENCIA DE BARIO 2 mM

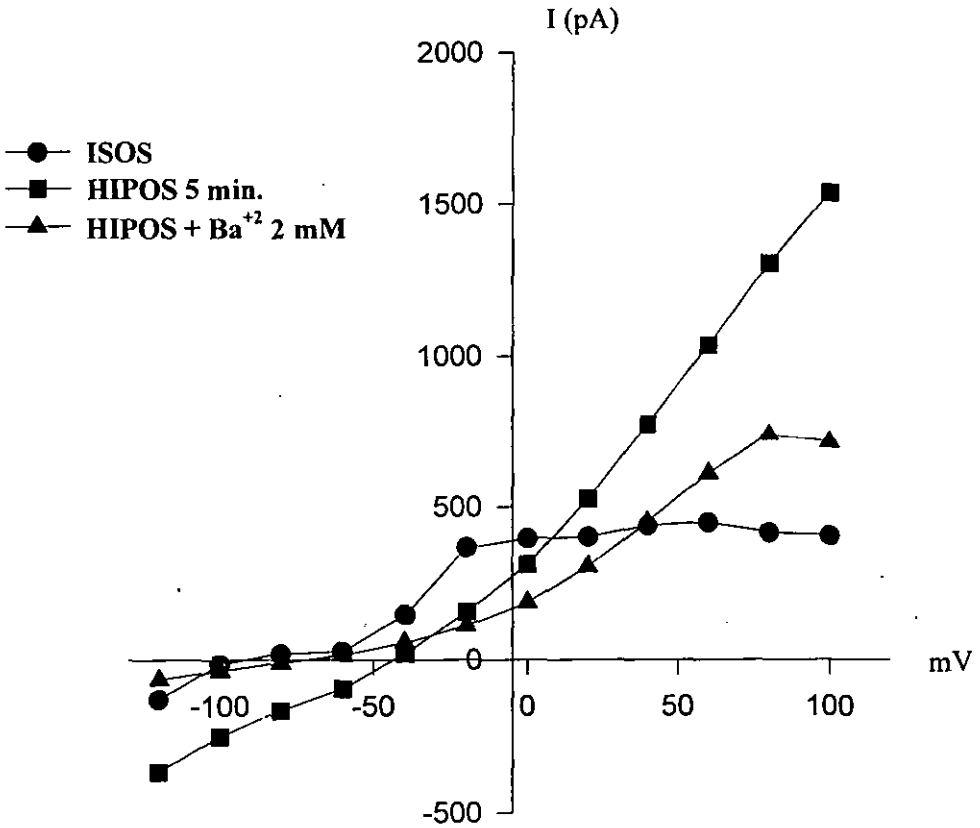


Fig. 13.- Gráfica I-V de las corrientes iónicas activadas por hiposmolaridad en un astrocitos de rata en cultivo, efecto del bario. Isosmótico (círculos), hiposmótico (cuadros) e hiposmótico + Bario 2 mM (triángulos).

DISCUSION

En diferentes tipos celulares, hay diversa evidencia que indica que uno de los fenómenos primarios asociados con el aumento en el volumen celular producido por soluciones hiposmóticas, es un incremento en la concentración intracelular de calcio $[Ca^{2+}]_i$. En tanto que se ha descrito en múltiples y variados sistemas, efectos activadores del Ca^{2+} sobre proteínas cinasas y fosfatasas, que a su vez pueden activar o desactivar canales iónicos y elementos del citoesqueleto, resulta lógica su postulación como señal traductora del cambio de volumen en la activación de las vías de permeabilidad de los osmolitos. En general, puede decirse que en las células epiteliales, el proceso regulador del volumen inducido por soluciones hiposmóticas requiere de la presencia de Ca^{2+} en el medio extracelular; que durante el aumento en el volumen celular hay una entrada de Ca^{2+} , lo cual conlleva a un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ y a la activación del DRV (ver revisión en McCarty y O'Neil, 1992). Por ejemplo, en células MDCK, el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por hiposmolaridad es proporcional a la $[Ca^{2+}]$ extracelular (Rothstein y Mack, 1992). En células epiteliales de intestino de la línea 407, la omisión de Ca^{2+} y la adición de EGTA ocasiona la inhibición completa del DRV (Hazama y Okada; 1988). En fibroblastos el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ es bloqueado por completo cuando las células se mantienen en un medio sin Ca^{2+} y en presencia de EGTA o bien, en un medio con Ca^{2+} y la adición de Gd^{3+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , nifedipina o verapamil, todos ellos conocidos bloqueadores de la entrada de Ca^{2+} a la célula (Bibby y McCulloch 1994). Estos estudios proponen que la hiposmolaridad induce la entrada de Ca^{2+} a la célula, probablemente, a través de canales catiónicos activados por la distensión de la membrana plasmática (SACS) y/o por canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, incrementando así, los niveles de Ca^{2+} citosólico. (Flake y Mislner, 1989, Kimelberg, 1988; Lambert, 1989)

Pocas son las investigaciones en las que se ha realizado un estudio paralelo del incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ y el DRV en la misma preparación y bajo las mismas condiciones experimentales, por lo que existe aún controversia con respecto a la participación de este catión como una señal de transducción en el proceso regulador.

Por otra parte, en estudios realizados en otros tipos celulares se establece que el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ asociado al aumento en volumen, no sólo se debe a la entrada de Ca^{2+} , sino que

está relacionado con la liberación de Ca^{2+} de almacenes intracelulares. Estas investigaciones han demostrado que la omisión de Ca^{2+} del medio extracelular en algunas preparaciones no tiene ningún efecto sobre el DRV (Hoffmann, 1984).

En otros estudios en los que el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se cuantificó mediante colorantes fluorescentes, se ha determinado la persistencia de un componente transitorio de Ca^{2+} libre, aún en un medio ausente de este catión, lo cual sugiere la intervención de pozas endógenas de Ca^{2+} . Sin embargo, existen discrepancias entre los mecanismos propuestos mediante los cuales el Ca^{2+} es liberado a partir de dichos almacenes. En algunos tipos celulares, el vaciamiento del retículo endoplásmico con tapsigargina, impide el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por hiposmolaridad (Ishii, 1996), o bien cuando las células se tratan con TMB-8, un bloqueador de la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (Tinell, 1994).

Otro tipo de evidencia propone que la reducción en la osmolaridad interna induce la movilización de Ca^{2+} de compartimentos intracelulares no mitocondriales, a través de vías de fuga pasiva, una propiedad inherente de estos organelos. Es decir, que posiblemente el retículo endoplásmico esté funcionando como un osmosensor capaz de detectar la dilución del citosol cuando las células se encuentran en un medio hiposmótico. Así, el Ca^{2+} sería liberado de estos compartimentos mediante canales que normalmente dejan fugarse Ca^{2+} , pero que además son sensibles a la distensión de su membrana. (Misiaen, 1996; Jena, 1997.) La dependencia al Ca^{2+} de la activación de conductancias de K^+ y Cl^- involucradas en el DRV, también ha sido un tema de controversia. Se ha reportado que la activación de la corriente de K^+ asociada al aumento en el volumen celular en soluciones hiposmóticas es dependiente de Ca^{2+} (Hoffman, 1984; Ling, 1992; Perry, 1992; Bender y Norenberg, 1994). No obstante, también se ha descrito que el Ca^{2+} no es necesario para que esta corriente se active (Beck, 1991; Azouz, 1997).

En el caso particular de las neuronas, las investigaciones acerca del papel del Ca^{2+} en el DRV son escasas. Falke y Misler (1989) trabajando en la línea celular de neuroblastoma N1E115 y utilizando la técnica de patch-clamp, mostraron la actividad de canales SACS asociada al aumento en el volumen celular inducido por la reducción de la osmolaridad externa; esta actividad fue bloqueada en ausencia de Ca^{2+} extracelular, lo cual indica una vez más la probable intervención de estos canales en la regulación del volumen celular.

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

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

Con respecto a la participación del Ca^{2+} proveniente de pozas endógenas existe evidencia que sustenta la intervención de receptores activados por inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) en la movilización de Ca^{2+} durante el estímulo de hiposmolaridad. Bender y colaboradores (1993) reportaron un incremento en la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2) asociado al aumento en el volumen celular bajo condiciones hiposmóticas. Estos autores describieron además que el DRV es bloqueado cuando la hidrólisis de PIP_2 es prevenida con U-73122, un inhibidor de la fosfolipasa C (PLC). En otros estudios sin embargo, se ha

demostrado que este mismo inhibidor no tiene ningún efecto sobre el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por hiposmolaridad (Fisher, 1997; Sinning, 1997).

Por su parte, la salida de ^{86}Rb (utilizado como trazador de los movimientos de K^+) en condiciones hiposmóticas se ve incrementada en medios libres de Ca^{2+} (Fig. 2B). Más aún, dicha estimulación se observa en medios isosmóticos, es decir, en ausencia de hinchamiento celular (Fig.3A).

Nuestros resultados muestran un incremento tanto en el calcio intracelular como en la salida de ^{86}Rb inducida por hiposmolaridad (50%) en astrocitos cerebelares (Fig. 1, 2). Cuando el medio externo se sustituye por un medio libre de calcio, aún se observa un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ que no alcanza los valores obtenidos con calcio presente en el medio. Esto indicaría una contribución tanto de pozas endógenas como de calcio externo, en el incremento del $[Ca^{2+}]_i$ inducido por hinchamiento celular. Por el contrario, la salida de ^{86}Rb en condiciones isosmóticas e hiposmóticas se ve incrementada en medios libres de Ca^{2+} (Fig. 2b, 3a,b).

El mecanismo por el cual se activan estos flujos de ^{86}Rb no ha sido establecido. En células epiteliales se han descrito canales catiónicos no específicos que se activan por la omisión de cationes divalentes del medio (Van Driessche, 1994; Van Driessche and Erlj, 1994) con características muy semejantes a las del flujo de ^{86}Rb activado en ausencia de Ca^{2+} en astrocitos: sensibilidad a pH bajos, bloqueo por Ba^{2+} , verapamil y dihidropiridinas. Estos canales podrían estar presentes en astrocitos, en donde movilizarían K^+ en ausencia de Ca^{2+} externo.

Lo anterior viene a explicar lo observado en astrocitos corticales (Bender y Noremborg, 1994), en donde se vio que la salida de ^{86}Rb sensible a volumen se inhibe en presencia de BAPTA-AM y se revierte cuando se sustituye el medio por uno libre de Ca^{2+} . Así mismo este movimiento de K^+ activado en ausencia de Ca^{2+} , incrementando la salida de K^+ , vendría a explicar la aparente aceleración del DRV observada bajo estas condiciones (Morales-Mulia, 1998).

En astrocitos de cerebelo en cultivo, la salida de ^{86}Rb sensible a volumen se ve reducida en un 30% cuando se depleta a la célula de calcio intracelular (Fig. 4). Para identificar la fuente de aporte de Ca^{2+} involucrada en este componente de ^{86}Rb osmosensible

dependiente de Ca^{2+} , se utilizaron bloqueadores generales de canales de Ca^{2+} como Cd^{2+} y Ni^+ , así como inhibidores de canales activados por estiramiento, como el La^{3+} y el Gd^{3+} , los cuales no tuvieron efecto alguno en esta salida de ^{86}Rb activada por hiposmolaridad, de donde se infiere que la entrada de Ca^{2+} externo no influye en el mecanismo de liberación de la fracción de ^{86}Rb dependiente de calcio. En presencia de verapamil y nitrendipina, pero no de diltiazem, se observa una inhibición de dicho movimiento (fig. 5), pero éste no puede atribuirse a un bloqueo de la entrada de Ca^{2+} , ya que estos bloqueadores no disminuyen los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, además de observarse el mismo grado de inhibición sobre la salida osmosensible de ^{86}Rb en presencia o ausencia de Ca^{2+} extracelular, por lo que probablemente estos bloqueos se deban a un efecto *per se* de estos fármacos. Estos efectos al parecer directos del verapamil y de dihidropiridinas se han visto sobre canales de K^+ dependientes de voltaje y maxi-canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} (Fagni, 1994; Armstrong y Miller, 1990). Estos últimos autores señalan que en estos canales de K^+ , el sitio de unión al Ca^{2+} queda por fuera de la región del poro; una vez que el calcio se une a este sitio estabiliza la proteína, preservando la función normal en el canal (Armstrong y Miller, 1990). Este sitio de unión al calcio es en donde probablemente, estén interactuando el verapamil y las dihidropiridinas.

La poza endógena que libera Ca^{2+} bajo condiciones hiposmóticas parece ser el retículo endoplasmico. Aunque es claro la participación del retículo endoplasmico durante DRV (Bender, 1993, Fischer, 1997, Morales-Mulia, 1998), no necesariamente ocurre a través de la activación de receptores a IP_3 (Bender, 1993). En un estudio de astrocitos corticales (Bender, 1994) utilizando un bloqueador de la fosfolipasa C (PLC) el U-73122, se observó un decremento de la liberación de ^{86}Rb activada por volumen; en nuestro estudio este mismo bloqueador sólo tuvo un efecto marginal sobre la salida de ^{86}Rb .

Se ha postulado una serie de mecanismos por los cuales se podría dar la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplasmico. Bender (1994) involucra la participación de los receptores a rianodina por un decremento en la liberación de ^{86}Rb osmosensible en presencia de cafeína, Tinel, (1997) propone un efecto directo del ácido araquidonónico sobre la liberación de Ca^{2+} . Asimismo se ha sugerido la participación de canales de Ca^{2+} osmosensibles en el retículo endoplasmico, la activación de canales sensibles a voltaje, los cuales sensarían un

cambio en el voltaje después del hinchamiento celular, entre el retículo endoplásmico y el citosol (Jena, 1997; McCarthy and O'neil, 1992, Missiaen, 1996).

La participación de proteínas activadas por un aumento en el calcio intracelular bajo condiciones hiposmóticas se ha establecido en astrocitos corticales (Bender, 1994). Entre estas proteínas se ha sugerido la participación del sistema calcio/calmodulina (Ca/CaM) con base en los efectos que se observan en presencia de bloqueadores de dicho sistema, como el KN-93 y el W-7. Su presencia bloquea completamente la salida de ^{86}Rb (Bender, 1994). Este efecto es difícil explicarlo en términos de dependencia de calcio, ya que en este mismo estudio, con todo el calcio intracelular quelado con BAPTA-AM, la salida de ^{86}Rb se disminuye solo 45%. El bloqueo total con el W-7 sugiere un efecto adicional en las reacciones mediadas por el complejo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$.

En nuestros resultados, la salida de ^{86}Rb activada por hiposmolaridad fue parcialmente sensible (50%) a ambos bloqueadores, mientras que se observó un efecto similar cuando se quela todo el calcio intracelular con EGTA-AM lo cual indica la participación de la $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ en el mecanismo de la activación de la fracción dependiente de Ca^{2+} (Fig. 6).

Una observación considerada por el grupo de Bender como evidencia de la dependencia al Ca^{2+} de la salida de ^{86}Rb sensible a volumen, fue la de un gran incremento de ésta inducido por ionomicina (1994). Nuestros resultados midiendo la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ con diferentes concentraciones de Ca^{2+} extracelular en presencia de ionomicina (Fig. 7), muestran que sólo cuando los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ han sobrepasado los niveles alcanzados por el hinchamiento celular, se observa un incremento en la salida de ^{86}Rb activada por volumen (Fig. 7b). En estos resultados no se habla de una dependencia de Ca^{2+} como tal, sino de una potenciación por un gran incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ provocada por el ionóforo. Esto quizá se debe a la contribución de vías adicionales cuyos umbrales se activan a esos niveles de Ca^{2+} . Como probables candidatos se encuentran los maxi-canales de K^+ activados por Ca^{2+} , quienes tienen un requerimiento dual para su activación; despolarización y grandes concentraciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (1-2 μM). La potenciación de la salida de ^{86}Rb por ionomicina en astrocitos en cultivo se observa únicamente cuando los niveles en el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se incrementan cerca o por arriba de 1 μM y sólo bajo condiciones de hinchamiento celular, lo

que en astrocitos confiere una marcada despolarización (Kimelberg, 1990b; Olson y Li, 1998).

Electrofisiología.

Estudios previos con técnicas electrofisiológicas han descrito las respuestas de astrocitos en cultivo inducidas por cambios en el volumen celular, en todos los casos durante su exposición a medios hiposmóticos (Kimelberg, 1988,1990a; O'Connor y Kimelberg, 1993, Olson y Li, 1998). Kimelberg y O'Connor en 1988 trabajando con astrocitos en cultivo, realizaron registros intracelulares para medir los cambios en el potencial de membrana que subyace a la exposición a un medio hiposmótico. Se observaron despolarizaciones que eran proporcionales al grado de hinchamiento celular, alcanzando un desplazamiento máximo del potencial reverso de aproximadamente 60 mV. Los efectos fueron reversibles cuando las células regresaban a un medio isosmótico; dos minutos después de la exposición se observó una repolarización, retornando el potencial de membrana su valor original. Olson y Li (1998) trabajando con astrocitos en cultivo, observaron que partiendo de un potencial de membrana de -66 mV en condiciones isosmóticas, el cambio a una solución hiposmótica (25 %) causa una despolarización de ≈ 23 mV, 6 minutos después de la exposición al medio hiposmótico. Dicha despolarización fue progresivamente mayor cuando se utilizaron medios con un grado mayor de hiposmolaridad (40 y 50%). En nuestra preparación, cuando los astrocitos son mantenidos en un medio isosmótico y se da un cambio súbito a un medio hiposmótico, se observa una despolarización, similar a la reportada para los astrocitos de corteza de rata (Kimelberg, 1988, Olson y Li 1998). Esta despolarización de la membrana es consistente con la activación de una conductancia al cloro (Olson y Li, 1998). Además se ha observado que las permeabilidades para el sodio y calcio, también aumenta el influjo de estos cationes durante condiciones de hinchamiento celular en estas células (Bender y Noremborg, 1994, Olson y Evers, 1992). Esto sugiere que, bajo condiciones hiposmóticas parte de esta despolarización, quizá se deba a la activación de estas vías.

En registros de patch-clamp (whole cell) (Kimelberg, 1988, Olson y Li 1998) en astrocitos en cultivo, el incremento en el volumen celular inducido por soluciones hiposmóticas induce características similares. El hinchamiento celular produce una despolarización y un gran incremento en las corrientes iónicas que van desde los 100 pA hasta 1 nA (Kimelberg, 1990) y terminan con un potencial reverso final de -42 mV. En experimentos de sustitución iónica - para determinar la especie iónica participante en el proceso regulatorio- se muestra que el potencial reverso se desplaza hacia valores más positivos cuando se aumenta el potasio extracelular, pero que no se afecta cuando el Na^+ y el Cl^- fueron sustituidos por N-metil D-glucamina (NMDG) y gluconato respectivamente. Cuando se pone cloruro de cesio (100 mM) en la pipeta de registro (para bloquear todos los canales de K^+) se observa una disminución en la corriente saliente y el potencial reverso se sitúa cercano a 0 mV. Estos experimentos sugieren la participación de canales de potasio tanto en condiciones iso e hiposmóticas. No obstante en este estudio (Kimelberg, 1990), los periodos de registro se limitaban solo a un minuto posterior a la exposición al medio hiposmótico.

Olson y Li (1998) trabajando con astrocitos en cultivo, observaron incrementos en los niveles de conductancia para el potasio, cloro y taurina durante la exposición a diferentes medios hiposmóticos (20, 40 y 50 % respectivamente). El incremento en la conductancia después del estímulo osmótico fue dependiente de tiempo. Las células expuestas a medios hiposmóticos 40 y 50 %, incrementan su conductancia a los 3 minutos posteriores al estímulo, mientras que en un medio hiposmótico 30%, la conductancia empieza a incrementarse hasta los 6 minutos. La máxima conductancia guarda cierta proporcionalidad con el grado de hiposmolaridad. No se observaron cambios en la capacitancia celular con ninguno de los tratamientos osmóticos. Usando cloruro de cesio (CsCl) en la solución de registro intracelular, se observaron incrementos similares en la conductancia de membrana con 30 % de hiposmolaridad, mientras que en un medio 50% hiposmótico, se observa un enorme incremento en las corrientes. Cuando estos mismos autores usan gluconato en lugar de cloro en la pipeta no se observa incremento alguno en la conductancia en un medio 30% hiposmótico, mientras que en un medio hiposmótico 50% se observa una conductancia más pequeña que la vista en presencia de KCl en la pipeta de registro. El incremento en las conductancias sensibles a hiposmolaridad (30%) mostró sensibilidad al ácido niflúmico

(200 μM) el cual inhibió completamente la conductancia, mientras que el bario (5 mM) no tuvo efecto alguno. En un medio hiposmótico (50%) las conductancias activadas por hiposmolaridad fueron sensibles al ácido niflúmico en un 60% mientras que el bario inhibe un 80% respectivamente.

Finalmente, cuando el electrodo de registro es llena con una solución de taurina aniónica, los cambios en la conductancia a taurina se incrementan enormemente al cambiar a un medio hiposmótico y este efecto fue sensible a ácido niflúmico (200 μM).

De acuerdo con Olson y Li la conductancia al cloro activada por volumen es más sensible a disminuciones menores en la osmolaridad externa, mientras que la conductancia al potasio se activa a grados de hiposmolaridad mayores. Además, estos autores han descrito también una gran despolarización en condiciones hiposmóticas (30%) comenzando con un potencial reverso de -80 mV (isosmótico) y terminando con un potencial de -30 mV (hiposmótico). Los autores finalmente concluyen que la sensibilidad diferencial osmótica mostrada por ambas vías iónicas es un hecho importante para establecer los umbrales de activación del proceso regulatorio.

Por otro lado, diversas evidencias mencionan que no se observan cambios netos en la concentración de potasio intracelular cuando los astrocitos son expuestos a un medio hiposmótico 35 % (Olson y Kimelberg, 1995), mientras que cuando son expuestos a un medio hiposmótico 50 % se observa una disminución importante en el contenido de potasio intracelular en un periodo de 30 minutos (Bender y Noremborg, 1994).

En nuestros resultados, las corrientes basales que se observan en condiciones isosmóticas, denotan una posible participación de canales de potasio de rectificación saliente (K_d). Lo anterior se sustenta, primero, con las características de su cinética y segundo, por el potencial reverso mostrado (-74 mV). Cuando los astrocitos se les expone a un medio hiposmótico 50%, observamos un gran incremento en las corrientes iónicas, tanto salientes como entrantes, así como una gran despolarización evidenciada por un cambio en el potencial reverso (-40 mV Fig. 8). La activación de las corrientes salientes y entrantes es muy similar a las reportadas por Kimelberg y colaboradores (1990), a pesar de que estos autores utilizaron un estímulo osmótico menor.

Las corrientes activadas por el estímulo hiposmótico parecen estar mediadas principalmente por el ion potasio, puesto que la inhibición mostrada con la quinida y bario (45 y 80 %). La inhibición mostrada por el bario es similar a la reportada por Olson y Li, (1998), quienes observaron que la conductancia al potasio se incrementa cuando las células son expuestas a un medio hiposmótico agudo (50%) y muestran ser sensible a bario.

En cuanto a los canales iónicos que podrían estar mediando las corrientes activadas por hiposmolaridad en astrocitos en cultivo, se ha avanzado notablemente para el ion cloro, por cuyo canal se cree que pudiesen permear la taurina y otros aminoácidos. (Jackson y Strange, 1995; Roy Y Banderelli, 1994). La naturaleza de la conductancia al Cl⁻ ha avanzado notablemente y ha sido estudiada en muchas preparaciones celulares (Jackson y Strange, 1995; Valverde, 1992; Nillius, 1995); se han establecido sus propiedades cinéticas y farmacológicas y se han postulado la identidad de varias especies moleculares.

Para el caso de la (s) vía (s) de conductancia al potasio se desconoce la naturaleza de la entidad molecular responsable de dicha movilización, pocos reportes establecen el tipo de canal de K⁺ participante el DRV. Para el caso del canal de K⁺ en el sistema nervioso se desconoce mucho acerca, sin embargo las primeras aproximaciones electrofisiológicas (Olson y Li, 1998, Grinstein, 1992, Deustch y Chen, 1993) vislumbran una participación de canales de K⁺ dependiente de voltaje, mientras que otros autores reportan la activación de canales de K⁺ activados por estiramiento (Vanoye y Reuss, 1999). Otros grupos reportan la participación de canales de K dependientes de Ca²⁺, presentes en células epteliales con diversa conductancia (Stoner, 1995; Nillius, 1995; Rothstein, 1992; Hazama, 1988). Christensen y Hoffmann (1992) reportan canales de K⁺ y Cl⁻ así como canales catiónicos no selectivos.

Para el caso de la corriente de potasio activada por cambios en el volumen celular, otros estudios han involucrado una posible participación de mecanismos dependientes de calcio/calmodulina que quizá activarían a los canales de potasio (Bender y Noremborg, 1994). Esta salida podría estar mediada por canales de potasio activados por calcio, que se sabe están presentes en estas células (Quandt y McVicar, 1986). En nuestra preparación la caribdotoxina tuvo un efecto inhibitor significativo en la salida de K⁺ activada por

volumen, la cual sugiere la participación parcial de este tipo de canales en el proceso regulatorio de volumen; por otra parte la inhibición observada con quinidina y bario en los registros electrofisiológicos sugiere la participación de canales de potasio, sin embargo, dado que estos agentes son bloqueadores generales de canales de K^+ , limita la posibilidad de identificar el (los) canal(es) de K^+ involucrados en la respuesta regulatoria.

En el caso del sistema nervioso, con énfasis especial en los astrocitos, salvo los pocos estudios realizados y el presente estudio, se desconoce el tipo de canal responsable de la movilización de potasio bajo condiciones hiposmóticas. Sin embargo se coincide en que el ion K^+ se moviliza a través de un canal, dada la sensibilidad farmacológica con los inhibidores de canales de potasio. No obstante, queda en duda si es un solo tipo de canal o es la respuesta de los diversos tipos de canales de potasio que presentan estas células.

La elección de la entidad molecular responsable para movilizar al ion potasio ante cambios en el volumen celular inducido por soluciones hiposmóticas se dificulta debido a la poca especificidad de los inhibidores utilizados. No obstante, los resultados aquí presentados muestran una participación importante de los canales de potasio en el proceso regulatorio.

A pesar de esta aproximación, se necesitan más estudios electrofisiológicos para poder identificar las propiedades biofísicas de el (los) canal (es) de K^+ como sustituciones iónicas, uso de bloqueadores más específicos así como el determinar la (s) vía (s) de señalización intracelular que están regulando la actividad de estos canales tanto en condiciones isosmóticas como hiposmóticas

CONCLUSIONES

ESTUDIOS BIOQUÍMICOS

1) LA SALIDA DE ^{86}Rb ACTIVADA POR HIPOSMOLARIDADEN ASTROCITOS EN CULTIVO ES INDEPENDIENTE DE Ca^{2+} EN UN 70%

2) LA FRACCIÓN DEPENDIENTE DE Ca^{+2} (30%) ES SUSTENTADA POR Ca^{+2} PROVENIENTE DEL RETICULO ENDOPLÁSMICO Y PROBABLEMENTE MEDIADO POR UN MECANISMO QUE INVOLUCRA AL COMPLEJO $\text{Ca}^{+2}/\text{CAM}$.

3) FARMACOLÓGICAMENTE, LA SALIDA DE ^{86}Rb ES SENSIBLE A BARIO, QUINIDINA Y CARIBDOTOXINA, E INSENSIBLE A TEA Y 4AP

4) EN MEDIOS LIBRES DE Ca^{+2} , LA LIBERACION DE ^{86}Rb SE INCREMENTA. ESTO SE DEBE A UNA SALIDA SIMULTÁNEA DE ^{86}Rb ACTIVADA POR LA OMISIÓN DE Ca^{+2} EXTRACELULAR. ESTA LIBERACION SE OBSERVA EN MEDIOS ISOSMÓTICOS

5) FARMACOLÓGICAMENTE ES SENSIBLE A NITRENDIPINA, BARIO, VERAPAMIL, MAGNESIO Y A PROTONES.

- ES INSENSIBLE A 4-AP, TEA Y CESIO EXTRACELULAR.

- ES DESCRITA POR PRIMERA VEZ EN TEJIDO NERVIOSO

6) TODAS LAS CARACTERÍSTICAS CORRESPONDEN A LAS DE CANALES DE K BLOQUEABLES POR Ca^{+2} , PREVIAMENTE DESCRITOS EN CELULAS EPITELIALES.

ESTUDIOS ELECTROFISIOLÓGICOS

1) ELECTROFISIOLÓGICAMENTE, LOS ASTROCITOS MUESTRAN UNA CORRIENTE BASAL CON RECTIFICACIÓN SALIENTE. DE APROXIMADAMENTE 500 pA. CON UN POTENCIAL DE INVERSIÓN DE -72mV .

2) EL ESTIMULO HIPOSMOTICO ACTIVA A UNA CORRIENTE RECTIFICADORA SALIENTE CON UN POTENCIAL REVERSO DE -48 mV .

3) LA CORRIENTE ACTIVADA POR EL ESTIMULO HIPOSMOTICO ES SENSIBLE A Ba^{2+} Y A QUINIDINA, LO CUAL SUGUIERE QUE ES MEDIADA POR K^+ .

BIBLIOGRAFIA

- Armstrong CM. and Miller C. 1990. Do voltage-dependent K^+ channels require Ca^{2+} ? A critical test employing a heterologous expression system Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Oct. 26, 102 (20) 7579-82.
- Azous, R., Alroy G., Yaari Y. 1997. Modulation of endogenous firing patterns by osmolarity in rat hippocampal neurones. J. Physiol. Jul;1: 502(pt1) 175-87.
- Balaban, R.S. and Burg, M.B. 1987. Osmotically active solutes in the renal inner medulla Kidney Int. 31: 562-564
- Basavappa, S., Chartouni, V., Kirk, K., Prpic, V., Ellory, J.C. and Mangel, A.W. 1995. Swelling-induced chloride currents in neuroblastoma cells are calcium dependent. J. Neurosci. 15: 3662-3666.
- Beck, J.S., Breton, S., Mairbaur, H., Laprade, R., and Giebisch, G. 1991. Relationship between sodium transport and intracellular ATP in isolated perfused rabbit proximal convoluted tubule. Am. J. Physiol. 261:F634-F639.
- Bender, A.S., Neary, J.T., and Norenberg, M.D. 1993. Role of Phosphoinositide hydrolysis in astrocyte volume regulation. J. Neurochem 61: 1506-1514
- Bender, A.S. and Norenberg, M.D. 1994. Calcium dependence of hypoosmotically induced potassium release in cultured astrocytes. J. Neurosci. 14: 4237-4243.
- Bibby, K.J. and McCulloch, C.A.G. 1994. Regulation of cell volume and $[Ca^{2+}]_i$ in attached human fibroblasts responding to anisotonic buffers. Am. J. Physiol. 266: C1639-C1649.
- Cala, P. M. 1983. Cell volume regulation by *Amphiuma* red blood cells. The role of Ca^{2+} as modulator of alkali metal/ H^+ exchange. J. Gen. Physiol. 82: 761-784.
- Cala, P.M. 1985a. Volume regulation by *Amphiuma* red blood cells: Characteristics of volume-sensitive K^+ /H^+ and Na^+ /H^+ exchange. Mol. Physiol. 8:199-214.
- Chamberlin, M.E., and Strange, K. 1989. Anisotonic cell volume regulation: a comparative view. Am. J. Physiol. 257: C159-173.
- Davis, C.W. and Finn, A.L. 1985. Cell volume regulation in frog urinary bladder. Fed. Proc. 44: 2520-2525.

- Deutsch, C. And Chen, L.Q. 1993. Heterologous expression of specific K⁺ channel in T lymphocytes: functional consequences for volume regulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10036-10040.
- Eveloff, S.L. and Warnock, D.G. 1987. Activation of ion transport systems during cell volume regulation. Am. J. Physiol. 252: F1-F10.
- Falke, L. C., y Mislser, S. 1989. Activity of ion channels dudring volume regulation by clonal N1E115 neuroblastoma cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 86: 3919-3923.
- Fagni, L., Bossu, J.L., and Bockaret, J. 1994. Inhibitory effects of dihydropyridines on macroscopic K⁺ currents and on the large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel in cultured cerebellar granule cells. Plügers Arch. 429:176-182.
- Fisher, R., Schliess, F. and Häussinger, D. 1997. Characterization of the Hypo-Osmolarity-Induced Ca²⁺ Response in Cultured Rat Astrocytes. Glia, 20: 51-58.
- Fincham, D.A., Wolowyk, M.W., Young, J.D. 1987. J. Volume-sensitive taurine transport in fish erythrocytes. J. Membr. Biol. 96: 45-56.
- Foskett, J.K. 1994. The role of calcium in the control of volume-regulatory transport pathways. In : Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation, Cap. 15. K. Strange, eds. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida., pp. 259-277.
- Fugelli, K., y Thoroed, S. M. 1986. Taurine transport associated with cell volume regulation in flounder erythrocytes under anisotonic conditions. J. Physiolo. 374:245-261.
- García-Romeu, F., Borgese, F., Guizoarn, H., Fievet, B. and Motais, R. 1996. A role for the anion exchanger AE1 (band 3 protein) in cell volume regulation. Cell Mol. Biol. 42: 985-994.
- Goldberg MP, Choi DW. 1993. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. J. Neurosci. 13(8):3510-24.
- González, E., Sánchez-Olea, R. and Pasantes-Morales, H. 1995. Inhibition by Cl⁻ channels blockers of the volume-activated, diffusional mechanism of inositol transport in primary astrocytes in culture. Neurochem. Res. 20: 986-900.
- Grinstein, S., Dupré, A., Rothstein, A. 1982. Volume regulation by human lymphocytes: Role of calcium. J. Gen. Physiol. 79:849-868.
- Grinstein, S., Rotshein, A., Sarkadi, B., Gelfand, E.W. 1984. Responses of lymphocytes to anisotonic media: Volum-regulating behavior. Am. J. Physiol. 246: C204-C215.

- Grinstein, S., Woodside, S.M., Sardet, C., Pouyssegur, J., and Rotin, D. 1992. Activation of the Na⁺/H⁺ antiporter during cell volume regulation. Evidence for a phosphorylation-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* 267:23823-23828.
- Grüder, S., Thiemann, S., Pusch, M. and Jentsch, T.J. 1992. Regions involved in the opening of ClC-2 chloride channel by voltage and cell volume. *Nature* 360:759-762
- Hallows, K.R. and Knauf, P.A. 1994. Principles of cell volume regulation. Cap. 1: Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation. K. Strange eds. CRC press. Boca Raton, Florida. pp 3-29.
- Hazama, A. and Okada, Y. 1988. Ca²⁺ sensitivity of volume-regulatory K⁺ and Cl⁻ channels in cultured human epithelial cells. *J. Physiol. Lond.* 402: 687-702.
- Hille, B. 1992. Ionic Channels of Excitable Membranes. Sunderland associates, Inc., Sunderland MA. pp 312.
- Hoffman, E.K. 1978. Regulation of cell volume by selective changes in the leak permeabilities of Ehrlich ascites tumor cells. En: Osmotic and Volume Regulation. Jorgensen, C.B., and Skadhauge, E. (eds), pp 397-417.
- Hoffman, E.K., Simonsen, L.O. 1989. Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells. *Physiol. Rev.* 69:315-382
- Hoffman, E.K., Simonsen, L.O., Lambert, I.H. 1984. Volume-induced increase of K⁺ and Cl⁻ permeabilities in Erlich ascites tumor cells. Role of internal Ca²⁺. *J. Membr. Biol.* 78: 211-222.
- Hougaard C, Niemeyer MI, Hoffmann EK, Sepulveda FV. 2000. K⁺ currents activated by leukotriene D4 or osmotic swelling in Ehrlich ascites tumour cells. *Pflugers Arch.* 440(2):283-94.
- Ishii, T., Hashimoto, T. and Ohmori, H. 1996. Hypotonic stimulation induced Ca²⁺ release from IP₃-sensitive internal stores in a Green monkey kidney cell line. *J. Physiol. Lond.* 493: 371-384.
- Jacobsen, J.G., and Smith, L.H. 1968. Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. *Physiol. Rev.* 48: 424-511.
- Jackson, P.B. and Strange, K.1993. Volume-sensitive anion channel mediate swelling-activated inositol and taurine efflux. *Am. J. Physiol.* 265 (Cell Physiol. 34). 1498-1500.
- Jackson PS, Strange K.1995. Characterization of the voltage-dependent properties of a volume-sensitive anion conductance. *J Gen Physiol.* 105(5):661-76.

- Jena, M., Minore, J.F., and O'Neil, W.C. (1997) A volume-sensitive, IP₃-insensitive Ca²⁺ store in vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol.*, 42:C316-C322.
- Kimelberg, H.K., and Frangakis, M.V. 1985. Furosemide- and bumetanide- sensitive ion transport and volume control in primary astrocyte cultures from rat brain. *Brain Res.* 361:125-134.
- Kimelberg H. K., Ranson B. R. 1986. Physiological aspects of astrocytic swelling. En: Fedoroff S., Vernadakis A., editores. *Astrocytes*, Vol 3. San Diego: Academic Press. p 129-166
- Kimelberg HK, O'Connor E.1988. Swelling of astrocytes causes membrane potential depolarization. *Glia.* 1(3):219-24.
- Kimelberg HK, Anderson E, Kettenmann H. 1990a. Swelling-induced changes in electrophysiological properties of cultured astrocytes and oligodendrocytes. II. Whole-cell currents. *Brain Res.* 8;529(1-2):262-8.
- Kimelberg HK, Kettenmann H.1990b Swelling-induced changes in electrophysiological properties of cultured astrocytes and oligodendrocytes. I. Effects on membrane potentials, input impedance and cell-cell coupling. *Brain Res.* 8;529(1-2):255-61.
- Kimelberg, H.K., Goderie, S.K, Higman, S., Pang, S. and Waniewskie. 1990. Swelling-induced, release of glutamate, aspartate, and taurine from astrocyte cultures. *J. Neurosci.* 10:1583-1591.
- Kregenow, F:M. 1981. Osmoregulatory salt transporting mechanisms: control of cell volume in anisotonic media. *Annu. Rev. Physiol.* 43:493-505.
- Kirk, K.,L., Buku, A., and Eggena, P. 1987. Cell specificity of vasopressin binding in renal collecting duct: computer-enhanced imaging of a fluorescent hormone analog. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:6000-6004
- Kirk, K.L., Ellory, J.C. and Young, J.D. 1992. Transport of organic substrates via a volume-activated channel. *J. Biol. Chem.* 267: 23475-23478.
- Kirk, K.L., and Kirk, K. 1992. Inhibition of volume-activated Γ and taurine efflux from HeLa cells by P-glycoprotein blockers correlates with calmodulin inhibition. *J.Biol. Chem.* 267:23475-23478.
- Klaerke DA, Jorgensen PL. 1988. Role of Ca²⁺-activated K⁺ channel in regulation of NaCl reabsorption in thick ascending limb of Henle's loop. *Comp Biochem Physiol A.* 90(4):757-65. Review.
- Lang, F., Busch, L.G., Völkl, H., 1998. The diversity of volume regulatory mechanisms. *Cell Physiol. Biochem.* 8, 1-45.

- Lang, F. and Paulmich, M. 1995. Properties and regulation of ion channels in MDCK cells. *Kidney Int.* 48: 1200-1205.
- Ling, B.N., Webster, C.I., and Heaton, D.C. 1992. Eicosanoids modulate apical Ca^{2+} -dependent K^+ channels in cultured rabbit principal cells. *Am. J. Physiol.* 263:F116-F126.
- Livne A, Grinstein S, Rothstein A. 1987. Volume-regulating behavior of human platelets. *J Cell Physiol.* 131(3):354-63.
- Lhor, J.W., and Yohe, L.A. 1994. Mechanisms of hyposmotic volume regulation in glioma cells. *Brain Res.* 677:263-268.
- McCarty, N. A., and O'Neil, R.G. 1992. Calcium signaling in cell volume regulation. *Physiol. Rev.* 72(4): 1037-1061
- McLeod, R.J. and Hamilton, J.R. 1991. Separate K^+ and Cl^- transport pathways are activated for regulatory volume decrease in jejunal villus cells. *Am. J. Physiol (Gastrointest. Liver Physiol.* 23) 260: G405-415.
- McManus, M.L., and Churchwell, K.B. 1994. Clinical significance of cellular osmoregulation. En: *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation*, by Strange, K. (ed), Boca Raton FL: CRC, pp 63-77.
- Mills, J.W., Schiewebert, E.M. and Staton, B.A. 1994. The cytoskeleton and cell volume regulation. In (K. Strange, ed.) *Cellular and Molecular physiology of cell volume regulation*. CRC Boca Raton, F.L., U.S.A pp 241-258.
- Missiaen L, De Smedt H, Parys JB, Sienaert I, Vanlingen S, Droogmans G, Nilius B, Casteels R. 1996. Hypotonically induced calcium release from intracellular calcium stores. *J. Biol Chem.* 271(9):4601-4.
- Morales-Mulia S, Ordaz B, Quesada O, Pasantes-Morales H. 1998 Ca^{2+} changes and ^{86}Rb efflux activated by hyposmolarity in cerebellar granule neurons. *J Neurosci Res.* 1;53(5):626-35.
- Moorman, J.R., Ackerman, S.J., Kowdley, G.C., Friffin, M.P., Chen, Z., et al. 1995. Unitary anion currents through phospholemman channel molecules. *Nature.* 377:737-740.
- Mountain I, Declercq P. E., Van Driessche W. 1996. Volume regulation in rat brain glial cells: lack of a substantial contribution of free amino acids. *Am. J. Physiol.* 270: C1319-C1325.

- Nakanishi, T., Balaban, R.S., Burg, M.B. 1988. Survey of osmolytes in renal cell lines. *Am. J. Physiol.* 255:C181-C191.
- Nilius, B., Seher, J., De Smet, P., Van Driessche W. and Droogmans G. 1995. Volume regulation in a toad epithelial cell line: coactivation of K^+ and Cl^- channels. *J. Physiol. (Lond)* 487: 367-378.
- Nilius, B., Eggermont, J., Voets, T., Buyse, G., Manolopoulos, V., Droogmans, G. 1997. Properties of volume-regulated anion channels in mammalian cells. *Prog. Biophys. molec. Biol.* 68, 69-119.
- Nilius, B., Prenen, J., Szűcs, G., Wei, L., Tanzi, F., Voets, T., and Droogmans, G. 1997. Calcium-activated chloride channels in bovine pulmonary artery endothelial cells. *J. Physiol.* 498:381-396.
- O'Connor, E.R., and Kimelberg, H.K. 1993. Role of Calcium in astrocyte volume regulation and in the release of Ions and amino acids. *J. Neurosci.* 13: 2638-2650.
- Ohtsuyama, M., Suzuki, Y., Samman, G., Sato, F., and Sato K. 1993. Cell volume analysis of gramicidin-treated eccrine clear cells to study regulation of Cl^- channels.
- Olson, J.E., Sankar, R., Holtzman, D., James, A., and Fleischhaker, D. 1986. Energy-dependent volume regulation in primary cultured cerebral astrocytes. *J. Cell. Physiol.* 128:209-215..
- Olson JE. and Evers JA. 1992. Correlation between energy metabolism, ion transport and water content in astrocyte. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 70 suppl: 5350-5
- Olson JE. and Kimelberg HK. 1995. Hypoosmotic volume regulation and osmolyte transport in astrocyte is blocked by an anion transport inhibitor, L-644, 71. *Brain Res.* 1999; 5, 682 (1-2):197-202
- Olson JE, Li GZ. 1997. Increased potassium, chloride, and taurine conductances in astrocytes during hypoosmotic swelling. *Glia.* 20(3):254-61.
- Pasantes-Morales H., Schousboe A. 1988. Volume regulation in astrocytes: a role for taurine as an osmoeffector. *J. Neurosci. Res.* 20:503-509.
- Pasantes-Morales, H., Morán, J. y Schousboe, A. 1990. Volume-sensitive release of taurine from cultured astrocytes: properties and mechanism. *Glia* 3:427-432.
- Pasantes.Morales, H., Maar, T.E. and Moran J. 1993 a. Cell volume regulation in cultured cerebellar granule neurons. *J. Neurosci. Res.* 18: 445-452

- Pasantes-Morales, H., Alavez, S., Sánchez-Olea, R., Morán, J. 1993 b. Contribution of organic and inorganic osmolytes to volume regulation in rat brain cells in culture. *Neurochem. Res.* 18: 445-452.
- Pasantes-Morales, H., Murray, R.A., Lilja, L., and Morán, J. 1994 a. Regulatory volume decrease in cultured astrocytes I. Potassium- and chloride-activated permeability. *Am. J. Physiol.* 266:C165-C171.
- Pasantes-Morales, H., H. Murray, R.A., Sánchez-Olea, R., and Morán, J. 1994 b. Regulatory volume decrease in cultured astrocytes: II. Activated permeability to amino acids and polyalcohols. *Am. J. Physiol.* 266:C172-178.
- Pasantes-Morales H., Sanchez-Olea R., Miranda D., Moran J., 1997 Volume regulation in NIH/3T3 cells not expressing P-glycoprotein I. Regulatory volume decrease. *Am. J. Physiol.* 272: C1798-C1803
- Paulmich, M., Li, Y., Wickman, K., Ackerman, M. Peralta, E., and Clapman, D. 1992. New mammalian chloride channel identified by expression cloning. *Nature* 356:238-241.
- Perry, P.B. and O'Neill, W.C. 1993. Swellign-activated K fluxes in vascular endothelial cells: volume regulation via K-Cl cotransport and K channels. *Am. J. Physiol.* 265 (Cell Physiol, 34): C763-769.
- Perry, P.B. and O'Neill, W.C. 199 . Swelling-activated K⁺ fluxes in vascular endothelial cells: role of intracellular calcium. *Am. J. Physiol.* Dec; 267 (6pt1): C1535-42.
- Pierce, S.K., and Greenberg, M.J. 1972. The nature of cellular volume regulation in marine bivalves. *J. Exp. Biol.* 57:681-692.
- Quandt, F. And MacVicar B.A. 1986. Calcium Activated potassium channels in cultured astrocyte. *Neuroscience* 19:29-41.
- Rothstein, A. and Mack, E. 1990. Volume-activated K⁺ and Cl⁻ pathways of dissociated epithelial cells (MDCK):role of Ca⁺². *Am. J. Physiol.* 258 (cell physiol.):c287-c834.
- Rothstein, A., and Mack, E. 1992. Volume-activated calcium uptake: its role in cell volume regulation of Madin-Darby canine kidney cells. *Am. J. Physiol.* 262:C339-C347.
- Roy, G., and Sauve, R. 1987. Effect of an anisotonic medium on volume ion and amino acid content and membrane potential of kidney cells (MDCK) in culture. *J. Membr. Biol.* 100:83-96.
- Roy, G. And Banderali U. 1994. Channles for ions and aminoacids in kidney cultured cells (MDCK) during volume regulation. *J. Exp. Zool.* 268: 121-126.
- Rudy B. 1988. Diversity and ubiquity of K channels. *Neuroscience.*25(3):729-49.

- Sachs, F. 1991. Mechanical transduction by membrane ion channels: a mini review. *Mol. Cell. Biochem.* 104: 57-60.
- Sackin, H. 1989. A stretch-activated K⁺ channel sensitive to cell volume. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:1731-1735.
- Saly, V., and Andrew, R.D. 1993. CA3 neuron excitation and epileptiform discharge are sensitive to osmolarity. *J. Neurophysiol.* 69:1-9.
- Sánchez-Olea, R., Moran, J., Schousboe, A. and Pasantes-Morales, H. 1991. Hyposmolarity-activated fluxes of taurine in astrocytes are mediated by diffusion. *Neurosci. Lett.* 130:233-236.
- Sánchez-Olea, R., Moran, J., Martínez, A. and Pasantes-Morales, H. 1993. Volume-activated ⁸⁶Rb transport in astrocytes in culture. *Am. J. Physiol.* 264: C836-842.
- Sánchez-Olea, R., Morales-Mulia M., Morán, J., and Pasantes-Morales, H. 1995. Inhibition by dihydropyridines of regulatory volume decrease and osmolyte fluxes in cultured astrocytes is unrelated to extracellular calcium. *Neurosci. Lett.* 20:165-168.
- Sarkadi, B., and Parker, J.C. 1991. Activation of ion transport pathways by changes in cell volume. *Biochem. Biophys. Acta.* 1071:407-427.
- Sinning, R., Schliess, F., Kubitz, R. and Häussinger, D. 1997. Osmosignalling in C6 Glioma cells. *FEBS Lett.* 400:163-167.
- Smith, L. H. Jr. and Pierce, S.K. 1987. Cell volume regulation by molluscan erythrocytes during hypoosmotic stress: Ca⁺² effects on ionic and organic osmolytes efflux. *Biol. Bull.* 172:407-408.
- Strange, K., and Morrison, Shrode, L., and Putman, R. 1992. Volume regulation during recovery from chronic hypertonicity in brain glial cells. *Am. J. Physiol.* 263:C412-C419.
- Strange, K. (Editor) 1994. *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation*. Boca raton, Fl: CRC.
- Stoner LC, Morley GE. 1995. Effect of basolateral or apical hyposmolarity on apical maxi K channels of everted rat collecting tubule. *Am J Physiol.* 268(4,Pt 2):F569-80.
- Szirmai M, Sarkadi B, Szasz I, Gardos G. 1988. Volume regulatory mechanisms of human platelets. *Haematologia (Budap)*.21(1):33-40.

- Szücs, G., Heinke, S., De Greef, C., Raeymaekers, L., Eggermont, J., Droogmans, G., Nilius, B. 1996. The volume-activated chloride current in endothelial cells from bovine pulmonary artery is modulated by phosphorylation. *Pflügers Arch.* 431:540-548.
- Tinel, H., Wehner, F., and Sauer, H. 1994. Intracellular Ca^{2+} release and Ca^{2+} influx during regulatory volume decrease in IMCD cells. *Am. J. Physiol.* 267:F130-F138.
- Tinel, E., Wehner, F., and Kinne, R.K.H. 1997. Arachidonic acid as a second messenger for hypotonicity induced calcium transient in rat IMCD cells. *Pflügers Arch.* 433:245-253.
- Valverde, M.A., Diaz, M., Sepúlveda, F.V., Gill, D.R., Hyde, S.C., and Higgins, C.F. 1992. Volume-regulated chloride channels associated with the human multidrug-resistance P-glycoprotein. *Nature* 355:830-833.
- Vandriessche W. and Erlj D. 1994. Cell swelling activates a poorly selective monovalent cation channel in the apical membrane of toad urinary bladder. *Pflügers Arch.* Aug. 428, 1: 1-8.
- Vandriessche W., De Smet P. and De Smet H. 1994. Poorly selective cation channel in the apical membrane of A6 cell. *Pflügers Arch.* March 426(5):387-95.
- Vanoye CG, Reuss L. 1999. Stretch-activated single K^+ channels account for whole-cell currents elicited by swelling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(11):6511-6.
- Vitarella, D., DiRisio, D.J., Kimelberg, H.K., and Aschner, M. 1994. Potassium and taurine release are highly correlated with regulatory volume decrease in neonatal primary rat astrocyte cultures. *J. Neurochem.* 63:1143-1149.
- Yamaguchi, DT., Green J., Kleeman CR., Muallen, S. 1989. Characterization of volume-sensitive, calcium-permeating pathways in the osteosarcoma cell line UMR-106-01. *J. Biol. Chem.* 264: 4383-4390.
- Welling, L.W., Welling, D.J., and Ochs, T. 1983. Video measurements of basolateral membrane hydraulic conductivity in the proximal tubule. *Am. J. Physiol.* 245:F123-F129.
- Welling PA, Linshaw MA, Sullivan LP. 1985. Effect of barium on cell volume regulation in rabbit proximal straight tubules. *Am J Physiol.* 249(1 Pt 2):F20-7.
- Wiener H. and Turnheim K. 1990. Calcium-activated potassium channels in basolateral membranes of colon epithelial cells; reconstitution and functional properties. *Wien Klin Wochenschr.* Oct. 26, 102 (20): 622-8.

Ziyadeh, F.N., Mills, J.W., and Kleinzeller, A. 1992. Hypotonic and cell volume regulation in shark rectal gland: role of organic osmolytes and F-actin. *Am. J. Physiol. (Renal fluid electrolyte physiol 31.)* F468-F479.