

03062
13
29.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL
Y DE POSGRADO DEL CCH

"PARTICIPACION DE LOS AMINOACIDOS LIBRES EN LOS
PROCESOS DE REGULACION DE VOLUMEN EN LINFOCITOS
Y CELULAS RENALES (MDCK)"

Tesis que para obtener el grado de

MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

Presenta el Biólogo:
Roberto Sánchez Olea.

FALLA DE ORIGEN

Febrero de 1991.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

El trabajo experimental de esta tesis se realizó en el laboratorio 202 del Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, bajo la dirección de la Dra. Herminia Pasantes-Nirolas.

JURADO:

DRA. HERMINIA PASANTES-MORALES

DR. ARMANDO GOMEZ PUYOU

DR. EDMUNDO CHAVEZ COSIO

DRA. GRACIELA MEZA RUIZ

DR. JULIO MORAN ANDRADE

AGRADECIMIENTOS

Para la realización del trabajo experimental de esta tesis se recibió apoyo del proyecto de investigación IN-024589 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM a la Dra. Herminia Pasantes-Morales.

Durante el período de estudios de Maestría se recibió una beca nacional de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM, sin la cual la presente investigación no hubiera sido posible.

A la Dra. Herminia Pasantes-Morales, por su excelente capacidad de enseñar a investigar a través de la realización de la investigación. Gracias por el amor tan grande que posee por todo aquello en lo que se encuentre involucrada, tan estimulante para quienes con ella convivimos diariamente.

A mis padres: Carmen Olea Franco y Miguel Sánchez Sánchez, de quienes he recibido un estímulo continuo e incondicional para mi realización como individuo y el conocimiento de que a menudo la vida no es tan difícil como parece.

A mi tío Pedro Olea Franco, por su capacidad de educador y su apego a la verdad aún en situaciones que podrían resolverse sin esta. Gracias también por despertar mi interés en la academia.

A Mónica Raquel Calera Medina, compañera de viaje durante los últimos años quien, con su amor y comprensión, ha hecho posible el despertar de diversas facetas de mi persona y un conocimiento más pleno del significado de la pareja.

1

A mis hermanos: Carmina, Alejandro, Lenin, Armando, Luis, Eva, Florencia y Guadalupe, por sus bromas y peleas, tan necesarias para mantener un balance adecuado de las cosas realmente importantes de la vida.

A mis amigos de toda la vida, Yvette, Luz María, Yara, Roxana, Luis Hector, Arturo y Sergio, por ser como son: los amigos.

A Irma López Martínez, de quien he recibido todo su apoyo y comprensión sin exigir nada a cambio. Gracias por su amplia sonrisa y sus opiniones sin prejuicios.

A mis compañeros de laboratorio: Irma, Rita, Claudia, Clara, Miguel, Francisco y Mario, con quienes comparto prácticamente todas las horas de vigilia.

INDICE

INTRODUCCION.....	1
MECANISMOS DE TRANSPORTE DE AGUA EN LA MEMBRANA CELULAR...	2
PROCESOS DE REGULACION DEL VOLUMEN CELULAR.....	3
VARIACIONES EN EL VOLUMEN CELULAR EN CONDICIONES ISOSMOTICAS.....	6
REGULACION DE VOLUMEN EN CONDICIONES HIPEROSMOTICAS.....	10
COMPONENTE IONICO DE LA RECUPERACION DE VOLUMEN EN SOLUCIONES HIPEROSMOTICAS.....	11
COMPUESTOS ORGANICOS EN LA REGULACION DE VOLUMEN EN CONDICIONES HIPEROSMOTICAS.....	12
REGULACION DE VOLUMEN EN CONDICIONES HIPOSMOTICAS.....	14
MECANISMOS DE LA SALIDA DE POTASIO Y CLORO.....	15
COMPUESTOS ORGANICOS EN LA REGULACION DE VOLUMEN EN CONDICIONES DE HIPOSMOLARIDAD.....	16
TAURINA.....	20
LA TAURINA COMO OSMODEFECTOR.....	21
PROPIEDADES DE LA LIBERACION DE TAURINA SENSIBLE A VOLUMEN	22
MODELOS EXPERIMENTALES.....	24
OBJETIVO GENERAL.....	25
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	26
RESULTADOS Y DISCUSION.....	27
I. TRABAJO I: "HYPOSMOLARITY-SENSITIVE RELEASE OF TAURINE AND FREE AMINO ACIDS FROM HUMAN LYMPHOCYTES"	
TRABAJO II: "TAURINE RELEASE ASSOCIATED TO VOLUME REGULATION IN RABBIT LYMPHOCYTES".	
A) NIVELES ENDOGENOS DE AMINOACIDOS LIBRES.....	29
B) LIBERACION DE AMINOACIDOS ENDOGENOS ESTIMULADA POR UN INCREMENTO EN EL VOLUMEN CELULAR.....	30
C) CURSO TEMPORAL DE LA LIBERACION DE ³ H-TAURINA INDUCIDA POR SOLUCIONES HIPOSMOTICAS.....	31
D) SEÑAL INTRACELULAR MEDIADORA DE LA LIBERACION DE TAURINA SENSIBLE A VOLUMEN.....	32
1) PARTICIPACION DEL CITOSQUELETO.....	33
2) PARTICIPACION DEL CALCIO.....	34
3) PARTICIPACION DEL POTASIO Y DEL CLORO INTRACELULAR.....	36
E) MECANISMO DE LA LIBERACION DE TAURINA SENSIBLE A VOLUMEN.....	38
1) DEPENDENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA LIBERACION DE TAURINA SENSIBLE A VOLUMEN.....	39
2) DEPENDENCIA IONICA DE LA LIBERACION DE TAURINA ESTIMULADA POR SOLUCIONES HIPOSMOTICAS.....	40
RESULTADOS Y DISCUSION.....	43
II. TRABAJO III: "OSMOLARITY-SENSITIVE RELEASE OF FREE AMINO ACIDS FROM CULTURED KIDNEY CELLS (MDCK)".	
A) NIVELES ENDOGENOS DE AMINOACIDOS LIBRES.....	45
B) LIBERACION DE AMINOACIDOS INDUCIDA POR SOLUCIONES HIPOSMOTICAS.....	45
C) CURSO TEMPORAL DE LA LIBERACION DE ³ H-TAURINA INDUCIDA POR UN MEDIO HIPOSMOTICO.....	46

D) SERAL INTRACELULAR MEDIADORA DE LA LIBERACION DE TAURINA SENSIBLE A VOLUMEN.....	47
1) PARTICIPACION DEL CITOSQUELETO.....	47
2) PARTICIPACION DEL CALCIO.....	48
3) PARTICIPACION DEL POTASIO Y DEL CLORO INTRACELULAR.....	49
E) MECANISMO DE LA LIBERACION DE TAURINA SENSIBLE A VOLUMEN.....	54
1) DEPENDENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA LIBERACION DE TAURINA SENSIBLE A VOLUMEN....	53
2) DEPENDENCIA IONICA DE LA LIBERACION DE TAURINA SENSIBLE A VOLUMEN.....	56
DISCUSION GENERAL.....	58
REFERENCIAS.....	66
APENDICE: TRABAJOS OBJETO DE ESTA TESIS.	

INTRODUCCIÓN

Los flujos de agua ocurren siempre que exista un gradiente osmótico entre dos compartimientos separados por una membrana semipermeable y el agua se moviliza del compartimiento de menor al de mayor presión osmótica. La ósmosis es el proceso por el cual el solvente se mueve espontáneamente desde una región de una solución donde su actividad es alta a otra donde su actividad es baja. En la práctica, la ósmosis solo tiene lugar donde una membrana semipermeable separa una solución, bien del solvente puro o bien de una solución con el mismo solvente pero con una concentración distinta de soluto (Morris, 1960).

La presión osmótica de una solución se define como "la presión que se debe ejercer sobre la solución para contrarrestar cualquier movimiento neto de solvente entre la solución y el solvente puro, cuando éstos están separados por una membrana semipermeable perfecta" (Morris, 1960). La molaridad y la osmolaridad de una solución se encuentran relacionadas de la siguiente manera: una solución 1 M de un soluto no disociable es 1 osmolar, (la solución contiene 6.023×10^{23} partículas por litro), mientras que una solución 1 M de una sal disociable es n osmolar, donde n es el número de iones producidos por molécula (Segel, 1974). Las soluciones isotónicas son aquellas que poseen una misma presión osmótica mientras que las que presentan una presión osmótica diferente son anisotónicas: hipotónicas si la presión osmótica es menor o hipertónicas cuando la presión osmótica es mayor.

El movimiento de agua por el proceso de la ósmosis también

se presenta en las células animales y vegetales, debido a que la membrana celular o plasmática separa dos compartimientos acuosos, el intracelular del extracelular. Siempre que se presente un gradiente osmótico entre el citoplasma y el medio extracelular se observará un movimiento de agua asociado a cambios en el volumen celular (Dick, 1970; House, 1974). Esto ocurre a pesar de que la membrana plasmática es un medio altamente hidrofóbico debido a su constitución lipídica.

MEDANISMOS DE TRANSPORTE DE AGUA EN LA MEMBRANA CELULAR

El agua es capaz de cruzar las membranas biológicas a través de diferentes vías, entre las que se incluyen la bicapa lipídica, posiblemente los canales iónicos, y poros membranales inespecíficos por los que el agua es movilizada a través de la membrana celular. En diversos tipos celulares se ha propuesto la existencia de canales específicos por los cuales el agua puede ser movilizada a través de la membrana celular. Estos posibles canales no se han aislado y su existencia se ha propuesto con base en los estudios cinéticos de los flujos de agua. Existen dos tipos de medidas para expresar la permeabilidad de la membrana al agua: 1) El coeficiente de permeabilidad osmótico o de filtración (P_o), que se obtiene del estudio de los movimientos de agua inducidos por un gradiente osmótico; y 2) El coeficiente de permeabilidad difusional (P_d), que se determina a partir de la velocidad de intercambio de agua tritizada en el estado de equilibrio (Macey y Brann, 1969). La relación P_o/P_d es un indicador importante de la vía de transporte del agua. Un

cociente de P_w/P_a igual a 1 sugiere que las moléculas de agua cruzan la membrana exclusivamente por un proceso de difusión simple, a través de la bicapa lipídica. En bicapas lipídicas artificiales (Fettiplace y Haydon, 1980) y en plaquetas humanas (Wong y Verkman, 1987) este cociente es de 1, indicando la ausencia de un mecanismo específico de transporte de agua. En cambio cuando la relación P_w/P_a es mayor que la unidad, el agua es movilizada además del proceso difusional, por un poro acuoso. Este cociente es de 3.4 en eritrocitos (Solomon et al., 1984), 3.5 en bicapas lipídicas con anfotericina (Holz y Finkelstein, 1970), y 16 en vejiga urinaria estimulada con vasopresina (Levine et al., 1984).

Un segundo criterio para evaluar la vía de transporte de agua es determinar la energía de activación (E_a) de este transporte. En los flujos de agua a través de la bicapa lipídica la E_a es generalmente elevada (> 10 kcal/mol). En liposomas la E_a para el transporte de agua es de 12-15 kcal/mol (Fettiplace y Haydon, 1980). En presencia de canales para el agua la energía de activación es baja (< 6 kcal/mol). La E_a es de 4-5 kcal/mol en eritrocitos (Macey, 1984) y en túbulos corticales estimulados con vasopresina (Hebert y Andreoli, 1972), lo que sugiere la presencia de vías específicas para la movilización del agua.

Un tercer criterio para distinguir entre flujos de agua a través de la bicapa lipídica y canales para el agua, es la sensibilidad de los movimientos de agua a fármacos específicos para alterar el funcionamiento de proteínas. El transporte de agua a través de canales es inhibido por compuestos mercurados

como el p-cloromercuribenzoato (PCMB) y el p-cloromercuribenzeno sulfonato (PCMBSS). En eritrocitos la P_{50} se inhibe 90% en presencia de PCMBSS 5 mM; esta inhibición se revierte en presencia de agentes reductores de grupos sulfidrilo, incluyendo al mercaptoetanol y la cisteína (Dix et al., 1985). Estos resultados sugieren que los grupos -SH de alguna proteína son esenciales para el transporte de agua (Meyer y Verman, 1957).

La membrana celular no es capaz de resistir una diferencia de presión hidrostática entre el líquido extracelular y el intracelular (Macknight y Leaf, 1977), por lo que la osmolaridad en los dos compartimientos debe ser la misma. En condiciones isosmóticas el volumen celular permanece constante, lo que indica que la entrada y salida de solutos osmóticamente activos se encuentra en equilibrio, con lo cual se evita la formación de un gradiente osmótico. Al exponer las células a medios anisosmóticos el volumen varía según la osmolaridad de la solución. Sin embargo, las células no se comportan como permeómetros perfectos, es decir su volumen no puede calcularse dividiendo las osmoles intracelulares en condiciones isosmóticas entre la osmolaridad del medio anisosmótico, de tal manera que pierden menos agua que la esperada en medios hiperosmóticos y acumulan menos en soluciones hiposmóticas (Macknight, 1969). Esta conducta osmótica anómala se explica con base en la existencia de sistemas de transporte que movilizan solutos a través de la membrana plasmática y permiten que la osmolaridad intracelular se ajuste a la osmolaridad del medio externo (Eveloff y Warneck, 1987;

Hoffmann, 1967; Larson y Spring, 1967; Stebens, 1968). Además de reducir el movimiento inicial de agua, estos sistemas son capaces de mediar la recuperación del volumen original de la célula una vez que éste ha sido perturbado, independientemente de que haya ocurrido una disminución o un aumento en el contenido intracelular de agua.

PROCESOS DE REGULACION DEL VOLUMEN CELULAR

Cuando las células animales se exponen a un medio hiposmótico inicialmente se observa un aumento rápido en el volumen celular debido a la entrada de agua, seguido de una fase de recuperación más lenta, durante la cual alcanzan un valor muy cercano al volumen original. Este proceso se encuentra mediado por la expulsión de solutos intracelulares osmóticamente activos, con lo cual se reduce la presión osmótica intracelular y por lo tanto el contenido de agua en las células. Entre los solutos importantes en este proceso se encuentran los iones cloruro y potasio (Grinstein et al., 1982; Roy y Sauvé, 1987) y solutos orgánicos como polialcoholes (Wirthssohn et al., 1989), aminoácidos libres (Smith y Fierde, 1987), metilaminas (Nakanishi et al., 1988), urea (Depêche y Schoffeleers, 1970) y azúcares (Sagnacco et al., 1984; Salazar y Burg, 1987).

Igualmente, cuando las células se tratan con soluciones hiperosmóticas se observa una disminución en el volumen, debido a la salida de agua producida en respuesta al gradiente osmótico impuesto. En algunos tipos celulares esta disminución inicial en

el volumen es seguida de una fase de recuperación con la cual incrementan su contenido de agua como consecuencia de la acumulación de solutos osmóticamente activos. Los solutos implicados en este proceso son los iones potasio, sodio y cloro (Kregerow, 1971; Grinstein et al., 1985) así como compuestos orgánicos como los aminoácidos (Fugelli y Zachariassen, 1976; Fyhn, 1976), sorbitol, mio-inositol, betaina y glicerofosforil colina (Makanishi et al., 1985).

La regulación del volumen celular es un proceso complejo que implica varios eventos básicos. Primeramente la célula debe ser capaz de detectar cambios en el volumen. Los sensores del volumen celular no se han identificado pero podrían ser los canales iónicos (generalmente para cationes) activados por el estiramiento de la membrana plasmática (Christensen, 1987; Uhl et al., 1988; Morris y Sigurdson, 1989; Sackin, 1989; Taniguchi y Guggino, 1989) o canales iónicos (selectivos para cationes) inactivados por el estiramiento (Uhl et al., 1988). También se ha sugerido que el volumen celular podría ser detectado indirectamente debido a los cambios en la concentración de algún componente intracelular: como el calcio (Wong y Chase, 1988) o el pH interno (Laur, 1985). En segundo lugar la célula debe iniciar un proceso regulador que modifique el contenido intracelular de solutos. Finalmente debe "recordar" su volumen inicial e inactivar los procesos que se activaron durante el proceso regulador.

VARIACIONES EN EL VOLUMEN CELULAR EN CONDICIONES FISIOLÓGICAS.

En condiciones fisiológicas la mayoría de las células de un organismo multicelular no se encuentran expuestas a situaciones osmóticas. La osmolaridad de los fluidos corporales de mamíferos es de aproximadamente 285 mOsmol/l y este valor se mantiene prácticamente constante, mostrando sólo pequeñas fluctuaciones que no exceden a un 3% de este valor (Hoffmann y Simonsen, 1989). Únicamente en condiciones patológicas la osmolaridad del plasma puede oscilar entre 120 y 350 mOsmol/l, lo que resultaría, en ausencia de mecanismos reguladores de volumen, en un incremento o disminución del volumen de las células sanguíneas de aproximadamente un 30% y un 20%, respectivamente (Macknight, 1983; 1985). En condiciones fisiológicas algunos tipos celulares como las células epiteliales del intestino y las células de la sangre de los capilares intestinales, posiblemente se encuentren en un medio hiposmótico después de una ingesta excesiva de agua (Hoffmann y Simonsen, 1989). Las células renales son otro ejemplo de células que in vivo pueden ser expuestas a soluciones hiposmóticas.

Experimentalmente se puede producir un incremento en el volumen celular por medio de la acumulación intracelular de compuestos no difusibles. En rebanadas de la corteza renal de conejo incubadas en un medio en donde el cloro se sustituye con acetato, el contenido intracelular de agua se aumenta en un 100% (Cooke y Macknight, 1984; Macknight, 1985). Esto se explica con base en que el acetato no disociado es capaz de atravesar la membrana plasmática e internalizarse en la célula; una vez dentro

se disocia y queda atrapado en el interior, puesto que en la forma protonada no puede cruzar la membrana plasmática. El ión hidrógeno es intercambiado por sodio y se observa una entrada de potasio a las células para compensar la acumulación de las cargas negativas del acetato; la acumulación de estos solutos se acompaña necesariamente de una entrada de agua, produciéndose el incremento en el volumen (Couke y Macknight, 1964; Macknight, 1966). Igualmente se ha demostrado que la exposición a ácido láctico induce un incremento de volumen por un mecanismo similar, inhibiéndose en un medio libre de sodio y en presencia de amilorida (Macknight, 1966).

Se ha demostrado que concentraciones elevadas de KCl producen hinchamiento celular en numerosas preparaciones, incluyendo rebanadas de cerebro (Sourke y Tower, 1966; Sourke, 1969; Pappius y Elliott, 1966; Holier et al., 1974), retina (Fasantes-Morales et al., 1966), terminales nerviosas aisladas (Kasino et al., 1973) y astrocitos en cultivo (Walz, 1987). Los mecanismos responsables de este proceso incluyen la activación del sistema de cotransporte $2Cl^-/Na^+/K^+$ (Walz y Riegelberg, 1985) o una alteración del equilibrio de Donnan si se incrementa la concentración de K^+ sin reducir la concentración de Cl^- (Boyle y Conway, 1941).

Existen estudios que señalan que ciertos neurotransmisores son capaces de incrementar el volumen celular. En rebanadas de cerebro la norepinefrina y la adenosina incrementan el contenido de agua de una manera dependiente de cloro extracelular. Este

efecto se previene con antagonistas sinápticos específicos (Bouras et al., 1983), lo que indica que este proceso está ocurriendo en neuronas. El aumento en el volumen celular observado en neuronas en cultivo en presencia de aminoácidos excitadores como el ácido glutámico y el ácido aspártico, así como agonistas de los receptores a estos compuestos, también es prevenido en un medio sin sodio o cloro (Choi, 1987).

En general puede afirmarse que cualquier proceso que conduzca a un incremento en la concentración intracelular de solutos osmóticamente activos (iones inorgánicos o compuestos orgánicos) producirá un aumento en el contenido intracelular de agua. Se ha demostrado que la captura de aminoácidos y azúcares, acoplada con la entrada de sodio, produce una activación de los procesos reguladores de volumen en células epiteliales (Lau et al., 1984; Schultz et al., 1985) y en hepatocitos (Kristensen y Folke, 1984; Kristensen, 1986). Ciertos eventos catabólicos celulares como la glucogenólisis en hepatocitos y la lipólisis en adipocitos también pueden conducir a un incremento en los niveles de solutos intracelulares osmóticamente activos (Kristensen, 1986). Igualmente el metabolismo de las fibras musculares durante el ejercicio aumenta los solutos intracelulares libres y activa los procesos reguladores de volumen (Saltin et al., 1987). Existe evidencia que señala que existen cambios en el volumen asociados con la actividad neuronal en retina (Orkand, et al., 1984) y en rebanadas de corteza cerebral (Lipton, 1973). El aumento de volumen celular es producido por la entrada de iones a la célula inducida por la

despolarización y se previene sustituyendo el cloro por un anión impermeable como el gluconato (Lipton, 1973).

REGULACION DE VOLUMEN EN CONDICIONES HIPEROSMOTICAS

Como se mencionó previamente, al exponer las células a soluciones hiperosmóticas se observa una disminución de volumen relacionada con el grado de hiperosmolaridad. Algunos tipos celulares responden con un incremento en el volumen que lo aproxima a su volumen original, mediante el proceso denominado Aumento Regulador del Volumen. Este proceso de ajuste se ha demostrado en células de amebas: en eritrocitos de Amoeba (Cala, 1980) y células epiteliales de Necturus (Larson y Spring, 1987). Otros tipos celulares se comportan como osmómetros: disminuyen su volumen y no muestran un proceso de recuperación del mismo mientras permanezcan en condiciones hiperosmóticas. Entre éstas se incluyen las células de Ehrlich (Hoffmann y Simonsen, 1969), los linfocitos humanos (Haapling et al., 1977; Grinstein, 1986), y las células epiteliales de rana (Davis y Finn, 1985; Lasing, 1986). Sin embargo la regulación de volumen se observa en prácticamente todos los tipos celulares si las células son preincubadas en un medio hiperosmótico y posteriormente se les regresa a condiciones isosmóticas. En estas condiciones las células han recuperado su volumen después de un incremento inicial a través de una disminución en el contenido intracelular de solutos. De esta manera cuando las células son incubadas en soluciones isosmóticas se observa una disminución en el volumen, que es seguida de una fase reguladora de aumento en el volumen

(Hoffmann y Simonsen, 1969; Grinstein y Feskett, 1990). La recuperación del volumen en un medio hiperosmótico se encuentra mediada por un incremento en los niveles intracelulares de solutos osmóticamente activos. Estos solutos son de dos tipos: iones inorgánicos y compuestos orgánicos (Hoffmann y Simonsen, 1969; Grinstein y Feskett, 1990; Bagnasco et al., 1987).

COMPONENTE IONICO DE LA RECUPERACION DE VOLUMEN EN SOLUCIONES HIPEROSMOTICAS.

Los iones involucrados en la regulación de volumen en soluciones hiperosmóticas son el potasio, el sodio y el cloro. Estos iones se transportan al interior celular por diferentes mecanismos dependiendo del tipo celular de que se trate. El sistema de cotransporte $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$, que es uno de estos mecanismos, se demostró por primera vez en eritrocitos de aves (Orskov, 1954; Parker, 1977). La recuperación del volumen se encuentra mediada por una entrada acoplada de Na^+ , K^+ y Cl^- al interior celular (Bregenow, 1971). La captura de Na^+ y de K^+ en estas condiciones no se afecta por la ouabaina (Bregenow, 1971, 1973) y es inhibida por la furosemida (Schmidt y McGarris, 1977a, 1977b). El Na^+ que se captura por este sistema no permanece en la célula a menos que la ouabaina se encuentre presente, lo que sugiere que este Na^+ es intercambiado por K^+ a través de la ATPasa Na^+/K^+ (Hoffmann et al., 1983).

En eritrocitos de Amphiuma (Cala, 1983a, 1983b, 1985a), y de perro (Parker, 1983, 1986, 1988) así como en linfocitos humanos (Grinstein et al., 1983, 1984), el incremento intracelular de

iones tiene lugar a través de dos sistemas de transporte acoplados: el intercambiador Na^+/H^+ y $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. El sistema Na^+/H^+ , sensible a acetilida, es el mecanismo primario activado por la disminución en el volumen (Kregenow, 1961; Kregenow et al., 1965; Siebens y Kregenow, 1965; Cala, 1960, 1963a, 1966), aunque en condiciones fisiológicas la actividad de este intercambiador se encuentra regulada por el pH interno. La salida de H^+ es impulsada por el gradiente de Na^+ , produciendo un incremento en el pH intracelular y en la concentración de HCO_3^- . El gradiente de HCO_3^- activa al intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, dando como resultado una entrada neta de Cl^- . Esta entrada de cloro y sodio es seguida por una entrada de agua que se traduce en un incremento en el volumen celular (Cala, 1960; Siebens y Kregenow, 1965). Es importante hacer notar que los protones que se intercambian por el sodio son osmóticamente inactivos, ya que se encuentran unidos a macromoléculas intracelulares tales como la hemoglobina. Igualmente el bicarbonato que se intercambia por cloro proviene en su mayoría del CO_2 . Al incrementarse la concentración de sodio en la célula se activa la ATPasa Na^+/K^+ , por lo que parte del sodio entrante se intercambia por potasio (Siebens y Kregenow, 1965). La entrada de potasio en un medio hiperosmótico se inhibe completamente en presencia de ouabaína (Siebens y Kregenow, 1965).

COMPUESTOS ORGANICOS EN LA REGULACION DE VOLUMEN EN CONDICIONES HIPEROSMOTICAS.

Bricteux-Grégoire y colaboradores (1962) fueron los primeros

en señalar la participación de los solutos orgánicos como osmoefectores en tejidos de animales eurihalinos, los cuales habitan naturalmente en medios de osmolaridad cambiante. En el músculo del cangrejo Homarus sinensis, el conjunto de aminoácidos libres (glicina, arginina, taurina, alanina, lisina y el ácido glutámico), betaina y óxido de trimetilamina contribuyen con el 40% de la osmolaridad intracelular total. Al mantener los animales en medios hiperosmóticos los niveles de estos compuestos aumentaron en un 100% (Bricteux-Grégoire et al., 1962).

Posteriormente, se han realizado estudios con resultados similares tanto en invertebrados eurihalinos como en algunos vertebrados. En general los aminoácidos que muestran las mayores variaciones internas en respuesta a los cambios en la osmolaridad son los aminoácidos no esenciales como la prolina, la glicina, la alanina, el ácido aspártico, el ácido glutámico, la serina, el GABA y la taurina (Schoffeniels y Gillies, 1970; Gillies, 1975).

En animales adaptados a condiciones hiperosmóticas (con niveles de NaCl superiores a los normales) el incremento en los niveles intracelulares de aminoácidos es a partir de la activación de los sistemas de transporte membranales. En crustáceos el aumento de los aminoácidos en los tejidos se encuentra asociado a una disminución temporal en las concentraciones de estos compuestos en el plasma (Gillies, 1977). En experimentos in vitro realizados con eritrocitos del lenguado, el aumento intracelular de taurina observado en un medio hiperosmótico también es el resultado de una acumulación del aminoácido del medio externo (Fugelli y Reiersen, 1973).

Los aminoácidos no son el único grupo de compuestos orgánicos que son utilizados para fines de control osmótico. En células epiteliales de las papilas renales cultivadas en un medio hiperosmótico, la concentración intracelular de sorbitol se incrementa hasta alcanzar valores de 240 mM (Bagnasco et al., 1988; Balaban y Burg, 1987). El sorbitol es un polialcohol sintetizado a partir de la glucosa por la enzima aldosa reductasa (Bagnasco et al., 1988). El incremento en los niveles de sorbitol se explica principalmente por un aumento en la síntesis de la aldosa reductasa inducida por la condición hiperosmótica (Bagnasco et al., 1988). En varias líneas celulares renales cultivadas en condiciones hiperosmóticas también se observa un aumento en los niveles de sorbitol, mio-inositol, betaina y glicerofosforil colina (Nakanishi, 1988). La suma de estos compuestos orgánicos es suficiente para compensar el incremento en la osmolaridad externa (Nakanishi, 1988).

REGULACION DE VOLUMEN EN CONDICIONES HIPOSMOTICAS

La recuperación del volumen inicial después de una fase de incremento de volumen producido por soluciones hiposmóticas se ha descrito en una gran variedad de células animales, incluyendo células epiteliales (Beck et al., 1983), eritrocitos (Kregenow, 1981; Cala, 1983), células ascíticas de Ehrlich (Hoffmann et al., 1976), astrocitos en cultivo (Olson y Holtzman, 1982; Kimsberg, 1985), linfocitos humanos (Grinstein et al., 1982) y células MDCK (Foy y Sauvé, 1987). Aunque estos procesos de regulación de volumen se encuentran presentes en la mayoría de las células

animales; no son universales ya que ciertos tipos celulares como las células de túbulo renal distal de *Xenopus* son incapaces de recuperar su volumen original una vez que éste se ha incrementado con soluciones hiposmóticas (Guggino et al., 1985). Asimismo únicamente una fracción muy pequeña de eritrocitos humanos poseen los mecanismos que permiten una regulación eficaz del volumen (O'Neill, 1989).

Como se mencionó anteriormente esta disminución de volumen celular posterior a un incremento debido a la exposición a un ambiente hiposmótico es posible debido a la expulsión de solutos intracelulares. De manera análoga a la regulación de volumen en condiciones de hiperosmolaridad estos solutos son de dos tipos: iones inorgánicos y compuestos orgánicos, principalmente aminoácidos. En células de animales terrestres los solutos de mayor importancia son los iones cloruro y potasio, que se expulsan de las células permitiendo la salida de agua (Spring y Ericson, 1982; Grinstein et al., 1982; Eveloff y Warrack, 1987). En células de animales marinos y eurihalinos los aminoácidos libres y en particular la taurina son los solutos que realizan esta función (Pierce y Greenberg, 1971; Fugelli y Thurmond, 1980; Fincher et al., 1987).

MECANISMOS DE LA SALIDA DE POTASIO Y CLORO.

La disminución en el contenido de potasio y cloro intracelular observada en las células en condiciones hiposmóticas implica que estos iones deben ser expulsados del interior celular. El mecanismo de salida del K^+ y el Cl^- depende del tipo

celular de que se trate. Un sistema de cotransporte K^+/Cl^- participa en expulsión de estos iones en eritrocitos de distintas especies, incluyendo el pato (Hoffman y Schmidt, 1978; Kregenow, 1981; Mayer 1985), al borrego (Dunham / Ellory, 1981; Ellory et al., 1988; Lauf, 1988) y algunos peces (Lauf, 1988; Bourne y Cousins, 1984; Borgese et al., 1987). La activación acoplada de los intercambiadores K^+/H^+ y Cl^-/HCO_3^- parece mediar la salida de cloro y potasio en eritrocitos de Aplysia (Kregenow, 1981; Siebens, 1988; Cala, 1980, 1985a, 1985b). En túbulo proximal de ratón y conejo la salida de potasio durante la regulación de volumen se encuentra asociada con la salida de HCO_3^- y no de Cl^- (Voiki y Lang, 1982).

A pesar de la existencia de sistemas de cotransporte electroneutros para la salida de cloro y potasio, el mecanismo más generalizado para expulsar estos iones es la activación de vías electrogénicas constituidas por canales iónicos presentes en la membrana celular. En las células de Ehrlich se ha demostrado que un aumento en el volumen celular produce un incremento en la permeabilidad de la membrana al cloro y al potasio, mientras que se observa una disminución en la permeabilidad para el sodio (Hendil y Hoffmann, 1974; Hoffmann, 1978). Este aumento en la permeabilidad da como resultado la salida de los iones, disminuyendo el potasio de 560 meq/l/g peso húmedo en condiciones isosmóticas a 450 meq/l/g peso húmedo y el cloro de un valor de 210 a 140 meq/l/g peso húmedo (Hoffmann et al., 1984). Igualmente se ha demostrado que un medio hiposmótico produce la activación de canales iónicos selectivos para cloro y

para potasio en linfocitos humanos (Grinstein et al., 1984), y en la vesícula urinaria de Deidurus (Marson y Spring, 1984).

El mecanismo utilizado para disminuir los niveles intracelulares de cloro y potasio determina el curso temporal de la recuperación del volumen. Cuando se encuentra involucrado el sistema de cotransporte K^+/Cl^- , el proceso es muy lento y tarda alrededor de 1 h; si se activan los sistemas de intercambio Cl^-/HCO_3^- y K^+/H^+ tarda cerca de 10 min y si se activan los canales de potasio y cloro, el volumen se recupera en un tiempo menor a los 10 min (Lauri, 1985).

Hipotéticamente, la salida de cloro y potasio podría ocurrir a través de un mismo canal iónico o por canales separados pero interdependientes. En las células de Ehrlich la evidencia experimental en apoyo a esta última alternativa es la siguiente: 1) al inhibirse la salida de potasio con ouabina se inhibe la recuperación del volumen, sin embargo si se provee una vía alterna para la salida de potasio con valinomicina (Hoffmann et al., 1984) o con gramicidina en un medio sin sodio (Hoffmann et al., 1985) el volumen disminuye normalmente, indicando que la vía alternativa se encuentra activa; 2) el curso temporal de la inactivación del canal de cloro es diferente al del canal de potasio: el primero se activa abruptamente con el aumento de volumen y se inactiva en aproximadamente 10 min, mientras que el canal de potasio permanece activado por más tiempo. La permeabilidad al potasio se encontró duplicada en células con 50 min en un medio hiposmótico (Hendil y Hoffmann, 1974; Sarkadi et al., 1984); 3) la permeabilidad al cloro se incrementa más que al potasio, de tal manera que la salida de potasio es el paso

limitante en la recuperación del volumen puesto que este proceso se incrementa en presencia de valinomicina (Hoffman et al., 1984) o gramicidina (Hoffman et al., 1986); 9) la despolarización (de aproximadamente 10 mV) observada durante la fase reguladora de volumen es consistente con un mayor aumento en la permeabilidad de la membrana para el cloro que para el potasio. Esta despolarización aumenta la fuerza electromotriz para la salida de potasio y puede explicar al menos parte de esta salida (Lang et al., 1987).

COMPUESTOS ORGÁNICOS EN LA REGULACIÓN DE VOLUMEN EN CONDICIONES DE HIPOSMOLARIDAD.

En animales que se encuentran expuestos en forma natural a variaciones amplias en la osmolaridad del medio externo, como los animales marinos y estuarinos, los elementos que funcionan como osmoefectores determinantes son los compuestos orgánicos. Entre éstos se encuentran los aminoácidos y compuestos cuaternarios de amonio (Fugelli y Thorpe, 1986). En el cangrejo azul Callinectes sapidus, los aminoácidos libres contribuyen con el 70% de la osmolaridad interna; la disminución interna de estos aminoácidos es responsable de un 30% de la reducción intracelular total cuando se exponen a medios hiposmóticos (Gerard, 1975). En eritrocitos y corazón del lenguado Platichthys flesus, los aminoácidos contribuyen con el 85% de la disminución en la osmolaridad intracelular al exponerse a una solución hiposmótica (Fugelli y Zachariassen, 1976). En estas células también se observa el componente iónico, esto es la salida de los iones

potasio y cloruro del interior celular, que complementa el proceso de regulación del volumen.

La participación de los iones potasio y cloruro y de compuestos orgánicos se ha demostrado en eritrocitos del poliqueto Sivogea (Costa y Pierce, 1963) y de Noctia (Smith y Pierce, 1967) y en músculo de Cancer (Moran y Pierce, 1964). La importancia relativa del componente iónico y orgánico se observa en eritrocitos del molusco Noctia. En estas células la recuperación del volumen en medio hiposmótico se inhibe en un medio sin calcio. La salida del componente iónico en estas condiciones se observó normalmente (Smith y Pierce, 1967) pero la salida de aminoácidos se redujo drásticamente (Amend y Pierce, 1980; Smith y Pierce, 1967), lo cual sugiere una mayor participación del componente orgánico en la recuperación del volumen. En las células de estos animales marinos el curso temporal de la salida de cloro y potasio es muy distinto al de la salida de los aminoácidos. Los iones salen de la célula inmediatamente después del aumento de volumen, mientras que los aminoácidos muestran un retraso en su liberación (Narren y Pierce, 1962; Moran y Pierce, 1964; Smith y Pierce, 1967).

En las células de animales terrestres el componente iónico se complementa con un componente de osmólitos orgánicos. La presencia del componente orgánico se ha demostrado en células ascíticas de Ehrlich (Hoffmann y Lambert, 1963), en fibras musculares cardíacas (Thurston et al., 1981), cerebro (Thurston et al., 1980) y células de la médula de riñón de mamíferos (Sagnasco et al., 1986; Guillou et al., 1986; Yancey, 1988) así

como en células MDCK (Foy y Sauey, 1987).

TAURINA

La taurina es un aminoácido sulfonado (ácido 2-aminoetanosulfónico) que se encuentra ampliamente distribuido como constituyente universal de los tejidos animales. Se identificó por primera vez en la bilis del toro (Tiedemann y Gmelin, 1827). Posteriormente se ha descrito en la mayoría de los phyla del reino animal: poríferos, sipuncúlidos, equinodermos, moluscos, anélidos, artrópodos, y vertebrados, detectándose en anélidos y moluscos las concentraciones más elevadas (Jacobsen y Smith, 1968). La taurina se encuentra presente en todos los tejidos animales aunque en concentraciones muy diferentes que varían desde valores nanomolares en el hígado de conejo hasta milimolares en la retina y córnea del mismo animal (Awapara, 1958). Los niveles más elevados de taurina se observan en los tejidos excitables: músculo liso, esquelético y cardíaco, glándulas endocrinas y exocrinas y en tejido nervioso (Jacobsen y Smith, 1968). En la retina la taurina se encuentra en concentraciones excepcionalmente elevadas que varían entre 10 y 50 mM (Pasantes-herales, 1986).

Por medio de estudios de fraccionamiento subcelular se ha demostrado que la mayor parte de la taurina se encuentra en la fracción soluble (Rassin et al., 1977).

A pesar de la amplia distribución de la taurina en el reino animal y en los distintos tejidos animales aún no se ha establecido con certeza la función que cumple este aminoácido en

la fisiología del organismo.

LA TAURINA COMO OSMOEFECTOR.

La taurina presenta características que lo señalan como el osmólito ideal: se encuentra presente en concentraciones elevadas en prácticamente todos los tejidos animales, no participa en el metabolismo primario de la célula ni se encuentra como constituyente de macromoléculas (Jacobsen y Smith, 1968). Aunque en general todos los aminoácidos libres se movilizan de acuerdo con la osmolaridad del medio extracelular, la taurina es el aminoácido libre que se encuentra en concentraciones mayores y el que principalmente se emplea como osmoefector. Esto se ha demostrado ampliamente tanto en invertebrados (Lange, 1963; Revisado por Schoffeleers, 1976 y por Gilles, 1979) como en vertebrados eurinalinos, específicamente en células cardíacas de teleosteos (Vielje, 1983) y en eritrocitos de peces eurinalinos (Fugelli y Thorsted, 1986; Finchem et al., 1987).

En células de mamíferos las primeras observaciones que señalan a la taurina como osmoefector se realizaron en las células del tumor sebáceo de Ehrlich (Hoffmann y Handal, 1976). Posteriormente se ha sugerido que la taurina cumple la misma función en robanadas de riñón (Schmitz y Neuhoff, 1983) retina (Dominguez et al., 1989) y astrocitos en cultivo (Fasantes-Morales y Schousboe, 1986). En estudios in vivo efectuados en corazón de ratón se ha demostrado que una condición de hipernatremia incrementa los niveles internos de taurina en las fibras musculares (Thurston et al., 1981). En plaquetas de ratas

Flattlobero (las cuales derivan de las ratas Long-Evans por una mutación espontánea), que carecen de la capacidad de sintetizar vasopresina y por tanto se encuentran crónicamente deshidratadas, los niveles de taurina endógena así como la acumulación de taurina radiactiva se encuentran incrementados (Niemenen et al., 1986). En investigaciones *in vitro* la exposición a condiciones de hiperosmolaridad reduce la liberación basal de taurina en tejido muscular esquelético de rata (Lehmann, 1989) e incrementa la acumulación del aminoácido en las células del corazón de fetos de rata (Atlas et al., 1994). La disminución en los niveles intracelulares de taurina observada en condiciones hiposmóticas parece explicarse exclusivamente debido a una liberación del aminoácido y no a una transformación enzimática puesto que la cantidad que disminuye en la célula es recuperado en su totalidad en el medio extracelular (Hoffmann y Lambert, 1983).

PROPIEDADES DE LA LIBERACIÓN DE TAURINA SENSIBLE A VOLUMEN.

Existe poca información relacionada con los eventos que ocurren entre el aumento de volumen celular y la liberación de taurina y el resto de los aminoácidos libres. Aunque existen pocos datos para formular una generalización la salida de aminoácidos sensible a volumen se inhibe en un medio libre de calcio en células de animales marinos (Gonde y Pierce, 1980) mientras que no se altera en células de animales terrestres (Roy y Sauvé, 1987). El efecto del calcio parece encontrarse mediado por el sistema calcio-calmodulina, puesto que la liberación de los aminoácidos en medios hiposmóticos se reduce en presencia de

los inhibidores clorpromaxina y trifluoperalina (Pierce et al., 1983). La salida de taurina estimulada por un aumento de voltaje en las células de Ehrlich (Goffmann y Lambert, 1980) y en eritrocitos de diversas especies de peces (Fugelli y Thorpeo, 1986; Finchan et al., 1987) parece estar mediada por la activación de un sistema de transporte independiente de sodio y no saturable.

MODELOS EXPERIMENTALES

Para la realización de la primera parte del presente estudio se emplearon linfocitos humanos debido a que se ha demostrado que estas células poseen la capacidad de regular su volumen en condiciones hiposmóticas, y a que existe una base experimental muy amplia con respecto a los mecanismos involucrados en la salida del componente iónico (Grinstein et al., 1985; 1986; 1987; Grinstein y Foskett, 1990). Posteriormente se utilizaron linfocitos de conejo por la facilidad de obtención de estas células.

La segunda parte de este trabajo se realizó en una línea de células renales en cultivo (MDCK) porque posiblemente son las únicas células de mamífero que fisiológicamente pueden ser expuestas a condiciones anisosmóticas. Estas células también poseen los mecanismos de regulación de volumen en condiciones hiposmóticas (Simons, 1984) y se ha demostrado que los aminoácidos, son empleados como osmólitos en soluciones hiposmóticas (Roy y Sauvé, 1987).

OBJETIVO GENERAL:

En el presente trabajo se pretende contribuir a elucidar la importancia de los aminoácidos libres como osmoefectores durante el proceso de regulación de volumen observado en soluciones hiposmóticas. Para cumplir con este objetivo se utilizaron dos modelos experimentales:

- 1) Linfocitos humanos debido a que estas células poseen la capacidad de regular su volumen en condiciones de hiposmolaridad y a que existe un conocimiento amplio de la participación iónica en este proceso. Posteriormente se emplearon linfocitos de conejo por la ventaja de ser una preparación más accesible.
- 2) Células MDCK, una línea celular derivada de la porción distal de túbulo distal de cerdo, porque las células renales continuamente son expuestas a condiciones de anisosmolaridad de manera fisiológica.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- 1) Determinar si los aminoácidos libres son empleados en los linfocitos con fines de control osmótico en condiciones hiposmóticas.
- 2) Identificar los aminoácidos que son utilizados como osmoreceptores en condiciones hiposmóticas en células MDCK.
- 3) Analizar en linfocitos y en células MDCK las características de los movimientos de taurina y otros aminoácidos libres en respuesta a incrementos en el volumen celular producidos por soluciones hiposmóticas, por lo que se estudiará:
 - a) El curso temporal.
 - b) La farmacología.
 - c) La dependencia iónica.
 - d) La sensibilidad a la temperatura.
 - e) La dependencia de pH.
- 4) Examinar una posible relación entre la salida de potasio y cloro y la liberación de aminoácidos asociados con los procesos de regulación de volumen.
- 5) Determinar la señal y el mecanismo involucrados en la salida sensible a volumen de los aminoácidos.

RESULTADOS Y DISCUSION

TRABAJO I:

"HYPOSMOLARITY-SENSITIVE RELEASE OF TAURINE AND FREE AMINO ACIDS FROM HUMAN LYMPHOCYTES". H. Pasantes-Morales, J. Jesús García y R. Sánchez Olea. Biochem. Pharm. 41:303-307, 1991.

TRABAJO II:

"TAURINE RELEASE ASSOCIATED TO VOLUME REGULATION IN RABBIT LYMPHOCYTES". J. Jesús García, R. Sánchez Olea y H. Pasantes-Morales. J. Cell. Biochem. 45:1-6, 1990.

Los linfocitos son células que poseen la capacidad de regular su volumen en soluciones isosmóticas. Inicialmente se observa un aumento o una disminución en el volumen celular en soluciones hiposmóticas o hiperosmóticas, respectivamente, seguida de una fase reguladora en la que los linfocitos alcanzan un volumen muy cercano a su valor original (Grinstein et al., 1984). La recuperación del volumen en soluciones hiposmóticas es posible debido a la expulsión de solutos intracelulares, principalmente potasio y cloro, lo cual disminuye el gradiente osmótico e induce la salida de agua de las células (Grinstein et al., 1984; Sarkadi et al., 1984). En linfocitos se ha descrito una correlación directa entre la capacidad de regulación de volumen y la densidad de canales de potasio presentes en la membrana plasmática. Los linfocitos T humanos (Deutsch et al., 1986) y líneas en cultivo (DeCoursey et al., 1985) derivadas de estas células, poseen una gran densidad de canales de potasio, así como la capacidad de regulación del volumen en soluciones hiposmóticas (Lee et al., 1988; Gelfand et al., 1984). En cambio los linfocitos E, que poseen una baja densidad de canales de potasio, muestran una capacidad muy limitada para regular su volumen en soluciones hiposmóticas (Cheung et al., 1982).

El potasio y el cloro son los solutos más importantes en los procesos reguladores del volumen en la mayoría de los tipos celulares estudiados; sin embargo, los aminoácidos libres contribuyen con una fracción importante para la presión osmótica intracelular total y podrían ser utilizados también con fines de control osmótico. Los aminoácidos libres y, en particular la

taurina, son empleados como osmoefectores en células de animales marinos (Fugelli y Thorced, 1966). En células de vertebrados existen pocos estudios sobre este aspecto, pero la función de osmoefectores para los aminoácidos se ha sugerido en las células de Ehrlich (Hoffman y Simpson, 1969), cerebro de rata (Solis et al., 1968), retina de pollo (Dominguez et al., 1969), astrocitos (Fuentes-Morales y Schousboe, 1969) y células granulares (Schousboe et al., 1990), entre otras. En el presente trabajo se examinó la posibilidad de que los aminoácidos sean utilizados con fines de control osmótico en linfocitos humanos y de conejo, debido a que son células que son capaces de regular su volumen en condiciones hiposmóticas y existe abundante información sobre los mecanismos iónicos de la regulación de volumen en linfocitos humanos (Deutch, 1968). Respecto a los linfocitos de conejo se demuestra en este estudio que son células con capacidad de regular su volumen (Fig. 1, Trabajo II) y posiblemente empleen los mismos mecanismos iónicos que los linfocitos humanos.

A) NIVELES ENDOGENOS DE AMINOACIDOS LIBRES

Los niveles de aminoácidos libres en linfocitos humanos y linfocitos de conejo se muestran en la tabla I del trabajo I y en la tabla 3 del trabajo II, respectivamente. En los linfocitos la taurina es el aminoácido más abundante, constituyendo entre el 65 y el 70% de la peso total de aminoácidos libres de estas células. El contenido de taurina en los linfocitos humanos es de 234 nmol/mg proteína y en los linfocitos de conejo este valor es de

315 $\mu\text{moles/mg prot.}$ El aminoácido más abundante después de la taurina es el ácido glutámico (44 $\mu\text{moles/mg prot.}$) en los linfocitos humanos y la β -alanina (77 $\mu\text{moles/mg prot.}$) en los linfocitos de conejo. Otros aminoácidos presentes en los linfocitos humanos son β -alanina, alanina y glicina, con valores entre 20 y 2a $\mu\text{moles/mg prot.}$ y, con menos de 10 $\mu\text{moles/mg prot.}$, a la serina, histidina, valina, isoleucina y leucina. En los linfocitos de conejo también se encuentran la glicina, con una concentración de 23 $\mu\text{moles/mg prot.}$, la alanina con 13 $\mu\text{moles/mg prot.}$ y, con menos de 10 $\mu\text{moles/mg prot.}$, al ácido glutámico, serina, valina, histidina y fenilalanina. La concentración de taurina en los linfocitos humanos, considerando un volumen de 0.19×10^{-6} $\mu\text{l/célula}$ y 43×10^4 células/mg prot., se calculó en 27.5 mM y la concentración total de aminoácidos libres es de 42.7 mM.

B) LIBERACION DE AMINOACIDOS ENDOGENOS ESTIMULADA POR UN INCREMENTO EN EL VOLUMEN CELULAR.

Los niveles celulares de aminoácidos libres se reducen drásticamente al incubar los linfocitos en soluciones hiposmóticas (Fig. 16, trabajo I; tabla 3, trabajo II). La mayoría de los aminoácidos se libera en respuesta a soluciones hiposmóticas en relación directa con el grado de hiposmolaridad del medio de incubación, aunque existen diferencias en cuanto a la cantidad liberada y a la sensibilidad de esta liberación. De acuerdo con estas diferencias los aminoácidos pueden dividirse en tres grupos: 1) Los muy sensibles a cambios en la osmolaridad.

incluye a la taurina, el ácido glutámico y la histidina, que son liberados en los linfocitos en respuesta a disminuciones pequeñas en la osmolaridad. Los niveles celulares se reducen en un 70-90% cuando la reducción en la osmolaridad es del 50% (Fig. 1A, trabajo I; Fig. 3, trabajo II); 2) Los menos sensibles a cambios en la osmolaridad incluye a la glicina, la alanina y la β -alanina, cuyos niveles iniciales se reducen en un 60-65% en respuesta a una disminución del 50% en la osmolaridad del medio de incubación (Fig. 1B, trabajo I); y 3) Los insensibles a cambios en la osmolaridad, que comprenden a la valina, isoleucina y serina, que prácticamente no son liberados en respuesta a soluciones hiposmóticas (Fig. 1C, trabajo I).

Debido a que la taurina es el aminoácido libre más abundante y a que es el que se libera de los linfocitos con la mayor sensibilidad y en mayor cantidad en respuesta al aumento en el volumen celular, los estudios subsiguientes se centraron principalmente en este aminoácido.

C) CURSO TEMPORAL DE LA LIBERACIÓN DE ^3H -TAURINA INDUCIDA POR SOLUCIONES HIPOSMÓTICAS.

El curso temporal de la liberación de taurina estimulada por soluciones hiposmóticas se analizó estudiando la liberación de ^3H -taurina. Tanto en linfocitos humanos (Fig. 2, trabajo I) como en linfocitos de conejo (Fig. 2, trabajo II), el valor máximo en la liberación de ^3H -taurina se observa en el primer minuto de perfusión con un medio con una reducción del 50% en la

osmolaridad y posteriormente esta liberación disminuyó hasta los valores previos al período de estimulación, a pesar de continuar en presencia de la solución hiposmótica (Fig. 2, trabajo I y II). Los medios hiposmóticos se prepararon reduciendo la concentración de NaCl, sin embargo un medio con la misma concentración de NaCl que el medio hiposmótico pero llevado a isosmolaridad con sacarosa no estimuló la liberación de taurina, lo cual demuestra que efectivamente, la reducción en la osmolaridad y no en la concentración de NaCl es la condición que desencadena la liberación del aminoácido (Fig. 2, trabajo I y II). El curso temporal del proceso de regulación de volumen en los linfocitos de conejo se muestra en la figura 1, trabajo II. Se observa que el volumen máximo se alcanza a los 30 segundos de incubación en el medio hiposmótico y que posteriormente el volumen disminuye gradualmente hasta que prácticamente se recupera el valor inicial en aproximadamente 6 minutos (Fig. 1, trabajo II). De esta manera, se observa una asociación muy clara entre el curso temporal de la liberación de taurina y el curso temporal de la recuperación de volumen, lo cual sugiere una participación del aminoácido en los procesos reguladores del volumen en estas células.

D) SEÑAL INTRACELULAR MEDIADORA DE LA LIBERACION DE TAURINA SENSIBLE A VOLUMEN.

Existe una relación directa entre el aumento en el volumen celular producido por soluciones hiposmóticas y la liberación de taurina, sin embargo aún no se determina si la distensión de la

membrana producida por el cambio en volumen directamente induce la liberación del aminoácido, o si esta liberación es resultado directo de algún evento producido como consecuencia del incremento en volumen. A continuación se examinó la posibilidad de que eventos tales como cambios en la organización del citoesqueleto (Van Sossun y Ruseo, 1981), aumento en la concentración intracelular de calcio (Suzuki et al., 1980) o una disminución en los niveles internos de potasio y cloro (Grinstein et al., 1984) pudieran actuar como señal intracelular estimuladora de la liberación de laurina sensible a volumen.

1) Participación del citoesqueleto.

Existen evidencias que señalan cambios en la organización del citoesqueleto asociados con la regulación de volumen en condiciones de hiposmolaridad. En células de vejiga urinaria de Necturus la recuperación del volumen en un medio hiposmótico se inhibe 75% en presencia de citocalasina B, mientras que la colchicina no mostró ningún efecto, descartando la participación de los microtubulos (Westert y Spring, 1984, 1985). La citocalasina B inhibe también la regulación de volumen en axones de Callinectes marginatus (Gilles et al., 1986), y aunque no se midieron los niveles de aminoácidos, el efecto de la citocalasina podría deberse a una inhibición en la salida de estos compuestos, puesto que la salida de potasio ocurrió normalmente (Gilles et al., 1986). En eritrocitos de Neotia, la cantidad de actina sedimentable disminuye de manera coincidente con el inicio de la salida de los aminoácidos (Pierce y Politis, 1990). A pesar de

que existe evidencia de que el citoesqueleto participa en procesos asociados con la regulación de volumen, el efecto no siempre es inhibitor, puesto que en eritrocitos de Noctia, la citocalasina D, que inhibe la polimerización de actina, acelera el proceso de regulador de volumen a través de una estimulación de la salida de aminoácidos, sin afectar la salida de potasio (Smith, 1985). Con estos antecedentes se exploró la posible participación del citoesqueleto en la liberación de taurina observada en presencia de un medio hiposmótico 50%. En los linfocitos de conejo el citoesqueleto no parece encontrarse involucrado en la liberación de taurina sensible a volumen, puesto que la colchicina (0.5 μ M) y la citocalasina B (10 μ M) no afectaron esta liberación (Tabla 2, Trabajo II). Los resultados del presente trabajo demuestran que en linfocitos de conejo, la liberación de taurina sensible a volumen no se altera en presencia de agentes que interfieren con la estructura del citoesqueleto.

2) Participación del calcio y del sistema calcio-calmodulina.

Uno de los eventos primarios asociados con el incremento en volumen producido por soluciones hiposmóticas es un aumento en los niveles intracelulares de calcio. Esto se ha descrito en eritrocitos de Ampelisca (Cala et al., 1986), células de vejiga urinaria de sapo (Wong y Chase, 1986; Shirley et al., 1990), eritrocitos de Noctia y Glycera (Pierce et al., 1986) y células de túbulo proximal de conejo (Suzuki et al., 1990), entre otras. En las células de vejiga urinaria (Wong y Chase, 1986), y en

eritrocitos de Noctia y Glycera (Pierce et al., 1988), el aumento en el calcio intracelular es debido a un aumento en la entrada del cation desde el medio extracelular. En los eritrocitos de Noctia un medio libre de calcio inhibe el proceso regulador de volumen y reduce marcadamente la excreción de aminoácidos, sin afectar la salida del componente iónico (Amende y Pierce, 1980; Smith y Pierce, 1987). Con estos antecedentes se investigó la participación del calcio extracelular en la liberación de taurina sensible a volumen en linfocitos de conejo.

En linfocitos de conejo la liberación de taurina estimulada por soluciones hiposmóticas no se afecta cuando el calcio es omitido del medio de incubación (Tabla 1, Trabajo II). En linfocitos humanos una disminución de los niveles intracelulares de calcio inhibe la regulación de volumen (Grinstein et al., 1982); sin embargo un medio libre de calcio no altera el proceso regulador de volumen en condiciones hiposmóticas (Grinstein et al., 1982). Los resultados obtenidos con la liberación de taurina sensible a volumen demuestran que este proceso es independiente de la presencia de calcio extracelular pero no puede descartarse la participación de calcio procedente de los reservorios intracelulares.

En linfocitos humanos la trifluoperazina, clorpromazina y piscozida inhiben la regulación de volumen en soluciones hiposmóticas (Grinstein et al., 1982, 1983). En eritrocitos de Noctia la clorpromazina y la trifluoperazina inhiben la regulación de volumen a través de una reducción en la salida de

asociación, sin afectar la salida de potasio (Pierce et al., 1980). En linfocitos el proceso liberador de taurina podría encontrarse también asociado con el complejo calcio-calmodulina, activado por la liberación de calcio de los reservorios internos. En los linfocitos de conejo el sistema calcio-calmodulina no participa en la liberación de taurina sensible a volumen, ya que ni la pinocida (3 μ M) ni la trifluoroperazina (10 μ M) mostraron ningún efecto en la salida del aminoácido en condiciones de hiposmolaridad (Tabla 2, Trabajo II). Estos resultados demuestran que en linfocitos de conejo la liberación de taurina en estas condiciones no se encuentra asociada con mecanismos dependientes de calcio.

3) Participación del potasio y del cloro intracelular.

Los componentes iónicos intracelulares más importantes, son el potasio y el cloro, que participan de manera activa en la regulación del volumen celular en linfocitos humanos. Al exponer los linfocitos humanos a condiciones de hiposmolaridad se observó una disminución en los niveles celulares de potasio y cloro debido a la activación de vías conductivas presentes en la membrana plasmática (Grinstein et al., 1984). La salida de potasio y cloro es interdependiente, de tal manera que si se inhibe la salida de uno de estos iones también se inhibe la salida del otro (Sarkadi et al., 1984). Con el fin de explorar una posible interdependencia entre la liberación de aminoácidos inducida por medios hiposmóticos y la salida de potasio y cloro observada en estas condiciones, se examinó el

efecto de inhibidores de los canales iónicos activados por un incremento en el volumen celular sobre la salida de taurina sensible a volumen.

Tanto en linfocitos humanos y como en linfocitos de conejo la liberación de taurina no se modificó en presencia de los inhibidores de los canales de potasio: quinidina (75 μ M), bario (15 mM), tetraetilamonio (15 μ M) y gadolinio (10 y 100 μ M) (Tabla 1, Trabajos I y II). En presencia del ácido 4,4'-diisocianobenzilbenceno-2,2'-disulfónico (DIDS) 100 μ M, un inhibidor de los canales de cloro, la liberación de taurina se redujo un 54% en linfocitos humanos (Fig. 3, Trabajo I) y un 24% en linfocitos de conejo (Tabla 2, Trabajo II). Los resultados obtenidos con los inhibidores de los canales de potasio sugieren que no existe una conexión entre la salida de potasio y la liberación de aminoácidos sensible a volumen, ya que estos inhibidores no alteraron la salida de taurina en soluciones hiposmóticas. El efecto inhibitor del DIDS sobre la liberación de taurina podría explicarse con base en una interdependencia entre la salida del aminoácido y la salida de cloro, o alternativamente en una acción directa de este fármaco sobre la vía intrínseca de salida de la taurina o una interdependencia con la salida de cloro.

En los linfocitos humanos los iones hidrógeno constituyen un factor muy importante en los procesos de regulación de volumen en condiciones hiposmóticas. La recuperación del volumen es función del pH, inhibiéndose completamente a valores ácidos (pH= 5.5) y

acelerándose a valores alcalinos (pH 8.5) (Deutsch y Lee, 1968). Esta acción del pH se explica con base en un efecto sobre los canales de potasio, que presentan una modulación por los iones hidrógeno, inhibiéndose a valores ácidos de pH (Deutsch y Lee, 1968). Con el fin de determinar si la salida de taurina se encuentra asociada con la salida de potasio se estudió el efecto del pH sobre la liberación del aminoácido sensible a volumen.

En linfocitos de conejo la liberación de taurina estimulada por soluciones hiposmóticas fué independiente del pH extracelular en el rango de 6 a 7.8. Estos resultados apoyan la propuesta de una independencia entre la salida de potasio y la liberación de taurina sensible a volumen, ya que a un pH 6.0 se esperaría una reducción notable en la salida de potasio (Deutsch y Lee, 1968), mientras que la liberación de taurina procede normalmente. Igualmente estos resultados indican que la vía por la que la taurina atraviesa la membrana plasmática no es modulada por los iones hidrógeno.

E) MECANISMO DE LA LIBERACION DE TAURINA SENSIBLE A VOLUMEN

La disminución en los niveles celulares de taurina observada como consecuencia del aumento en volumen es resultado de la activación de algún sistema de transporte del aminoácido localizado en la membrana plasmática, ya que los niveles de taurina que se disminuyen en la célula son recuperados en el medio de incubación (Fig. 1, Trabajo I). Sin embargo el mecanismo responsable del transporte del aminoácido en estas condiciones aún no se conoce.

Existe la posibilidad de que el acarreador de taurina encargado de transportar el aminoácido al interior celular se activara invirtiendo el transporte hacia el exterior. Con el objeto de estudiar esta posibilidad se examinaron condiciones que se conoce interfieren con la actividad del transportador del aminoácido, como son la dependencia de sodio y de cloro, así como la dependencia de temperatura (Talian et al., 1980) y la presencia de un sistema de homointercambio del aminoácido.

1) Dependencia de la temperatura en la liberación de taurina sensible a volumen.

En células linfoblastoides humanas la captura de taurina ocurre a través de un transportador que muestra una dependencia notable de la temperatura (Talian et al., 1983). Con el propósito de examinar la posible participación de este acarreador en la liberación de taurina sensible a volumen se analizó la dependencia de temperatura de este proceso.

En linfocitos humanos la liberación de taurina inducida por un medio hiposmótico no se alteró al reducir la temperatura a 15°C, sin embargo esta liberación se inhibió 60% cuando el experimento se realizó a 4°C (Trabajo I). Igualmente en linfocitos de conejo la liberación de taurina a 15°C y a 25°C no fué diferente de la observada a 37°C y se inhibió 50% a 4°C (Trabajo II). Estos resultados señalan que el proceso de salida de taurina es menos dependiente de la temperatura que el proceso de captura del aminoácido, por lo que resulta poco probable la existencia de un mecanismo común.

2) Dependencia iónica de la liberación de taurina estimulada por soluciones hiposmóticas.

Otra manera de investigar si el transportador de taurina participa en la liberación sensible a volumen del aminoácido es analizar la dependencia iónica del proceso. En células linfoblastoides humanas este acarreador es impulsado por el gradiente electroquímico del sodio (Tallen et al., 1983). En diversas preparaciones, como las células de Ehrlich (Lambert et al., 1985), membranas de vesículas sinápticas (Iwata, 1989) y células astrogliales (Shein et al., 1989) el transportador de taurina también requiere de cloro para su activación.

En linfocitos de conejo la liberación de taurina sensible a volumen no se modifica en un medio libre de sodio y se reduce 30% cuando el cloro se sustituye por el anión impermeante gluconato (Tabla 1, Trabajo II). En linfocitos humanos esta liberación es independiente tanto de sodio como de cloro extracelular (Tabla 2, Trabajo I). Estos resultados tampoco permiten proponer al transportador de taurina como el mecanismo responsable de la liberación del aminoácido sensible a volumen. Sin embargo, en linfocitos de conejo la dependencia de cloro en esta liberación señala una posible conexión entre la salida de este anión y la de taurina en condiciones de hiposmolaridad.

Otra forma de evaluar si el acarreador de taurina es capaz de funcionar del interior al exterior celular es examinar la posible presencia de un mecanismo de homointercambio entre la

taurina interna y la externa. La existencia de un sistema de homointercambio se pone de manifiesto cuando la taurina en el medio externo estimula significativamente la liberación de taurina interna. Tanto en linfocitos humanos como en los de conejo la liberación de ^3H -taurina no se incrementa en presencia de taurina no radiactiva externa en condiciones isosmóticas ni hiposmóticas, indicando que no existe ningún mecanismo de homointercambio para la taurina en estas células.

Los resultados obtenidos en este estudio indican que el mecanismo de salida de taurina involucrado en la liberación del aminoácido sensible a volumen es diferente del transportador responsable de internalizar al aminoácido en condiciones isosmóticas. En primer lugar, la reducción en la liberación de taurina sensible a volumen se observa sólo a bajas temperaturas, debido posiblemente a cambios en la fluidez de la membrana, lo cual podría limitar algún proceso difusional. En segundo término la liberación de ^3H -taurina no se aumenta en un medio libre de sodio (Tabla 2, Trabajo I; Tabla I, trabajo II), condición que incrementa el gradiente del catión hacia el exterior celular. Finalmente, la ausencia de un sistema de homointercambio para la taurina indica que el transportador para este aminoácido no es capaz de funcionar del interior al exterior en los linfocitos.

En eritrocitos de lenguado (Fugelli y Thorow, 1986) y en células escurticas de Ehrlich (Hoffmann y Lambert, 1983) un aumento en el volumen celular induce la activación del mecanismo de captura de taurina no saturable presente en estas células. En

células linfoblastoides humanas la taurina es acumulada por un transportador dependiente de sodio, sensible a temperatura y saturable, y por un proceso difusional, no saturable (Talian et al., 1983). Posiblemente este mecanismo difusional es el responsable de la liberación de taurina sensible a volumen tanto en linfocitos humanos como en los linfocitos de conejo.

RESULTADOS Y DISCUSION

TRABAJO III:

"OSMOLARITY-SENSITIVE RELEASE OF FREE AMINO ACIDS FROM CULTURED KIDNEY CELLS (MDCK)". R. Sánchez Olay, H. Pazantes-Morales, A. Lázaro y M. Cerejidos. J. Membrane Biol. 1991.

Las células renales son posiblemente las únicas células del organismo que fisiológicamente son expuestas a soluciones anisotónicas. La capacidad de las células renales para regular su volumen en soluciones hiposmóticas se encuentra ampliamente documentada en preparaciones de distintas regiones del riñón tales como túbulo proximal (Carpi-Medina et al., 1983), túbulo distal (Suggino, 1983), rebanadas de corteza renal (Cooke, 1978) y células renales en cultivo (Simmons, 1984; Roy y Sauvé, 1987). Las células MDCK, que son una línea celular derivada de la región distal de túbulo renal de perro (Hadley y Darby, 1988) aumentan rápidamente su volumen en soluciones hiposmóticas mostrando a continuación una fase de reducción en la que se alcanza un valor muy cercano al volumen original (Simmons, 1984). Como en otros tipos celulares este proceso se encuentra mediado principalmente por la expulsión de potasio y cloro de las células (Simmons, 1984), lo cual produce una salida de agua debido a la reducción del gradiente osmótico. Roy y Sauvé (1987) reportaron que además de esta disminución en el contenido intracelular de potasio y cloro, se observa también una reducción en los niveles de aminoácidos libres. En esta investigación no se determinó la naturaleza de los aminoácidos involucrados, puesto que la detección se realizó como sustancias positivas a ninhidrina. En el presente estudio se analiza la composición de aminoácidos libres en células MDCK así como su comportamiento en respuesta a incrementos en el volumen celular y las características de la liberación sensible a volumen.

A) NIVELES ENDOGENOS DE AMINOACIDOS LIBRES

El patrón de aminoácidos libres de las células MDCK (Tabla 1, Trabajo III) es muy diferente al observado en los linfocitos. En las células MDCK la glicina es el aminoácido más abundante (85 nmolas/mg prot), seguido por el ácido glutámico (77 nmolas/mg prot), la alanina (73 nmolas/mg prot), la taurina (41 nmolas/mg prot), y la glucosamina (25 nmolas/mg prot). También se encuentran presentes la serina, la lisina, la treonina, la β -alanina, la arginina y la histidina (11-71 nmolas/mg prot), así como la valina, la leucina, la fenilalanina, la isoleucina y el triptófano (2-6 nmolas/mg prot). Los niveles totales de aminoácidos libres es de 426 nmolas/mg prot. Considerando un valor de 360 pg/célula y un volumen promedio de 2.3 μ l/célula (McSorbert et al., 1985; Roy y Sauve, 1987; Nills, 1987), resulta un volumen de 6 μ l/mg prot, de tal manera que la concentración total de aminoácidos libres es de 69.8 μ M.

B) LIBERACION DE AMINOACIDOS INDUCIDA POR SOLUCIONES HIPOSMOTICAS.

Al incubar las células MDCK en soluciones hiposmóticas se induce la liberación de prácticamente todos los aminoácidos. Al igual que en los linfocitos se pueden distinguir tres grupos de aminoácidos de acuerdo a la magnitud de la liberación a una hiposmolaridad determinada: 1) Los muy sensibles a la hiposmolaridad, en donde la liberación del ácido glutámico, la β -alanina y la taurina es de 20%-30%, 40%-50% y 75%-80% cuando la

osmolaridad se reduce a 0.85, 0.75 y 0.5 de la osmolaridad normal (110 mosmoles/l) (Fig. 3A, Trabajo III); 2) Los aminoácidos sensibles que en las mismas condiciones de hiposmolaridad la liberación de alanina, glicina y serina es de 18%-20%, 30%-40% y 57%-60%, respectivamente; 3) Los insensibles, grupo constituido por la isoleucina, la fenilalanina y la valina, mostrará una liberación pequeña en respuesta al medio hiposmótico.

La ^3H -taurina se comporta en forma idéntica a la taurina endógena. La liberación de ^3H -taurina se incrementa de 9% en un medio isosmótico a 24%, 52% y 76% cuando la osmolaridad se reduce a 0.85, 0.75 y 0.5 del valor isosmótico (Fig. 2, Trabajo III).

Considerando que la taurina es un compuesto metabólicamente inerte, puesto que no participa en reacciones del metabolismo primario de la célula ni forma parte de la estructura primaria de proteínas, se estudió principalmente el comportamiento de este aminoácido como representativo de la poza total de aminoácidos. Esto permite realizar un examen comparativo con los resultados obtenidos en los linfocitos y en otras células en las que la taurina se libera en respuesta a cambios en el volumen.

D) CURSO TEMPORAL DE LA LIBERACION DE ^3H -TAURINA INDUCIDA POR UN MEDIO HIPOSMOTICO.

Al perfundir las células MDCK con una solución con el 50% de la osmolaridad del medio isosmótico se observa un incremento inmediato en la liberación de ^3H -taurina, que alcanza su valor máximo a los 10 min y posteriormente disminuye a pesar de

continuar en presencia del medio hiposmótico (Fig. 1, Trabajo III). Al igual que en los linfocitos la liberación de taurina no se incrementa con un medio con la misma concentración de NaCl que el medio hiposmótico pero llevado a isosmolaridad con sacarosa (Fig. 1, Trabajo III), lo que demuestra que es la reducción en la osmolaridad y no en la concentración de NaCl la condición estimulante de la liberación del aminoácido.

O) SEÑAL INTRACELULAR MEDIADORA DE LA LIBERACIÓN DE TAURINA SENSIBLE A VOLUMEN.

La liberación de taurina observada en soluciones hiposmóticas puede ser el resultado de la activación de un sistema de transporte membranar para el aminoácido como consecuencia directa del aumento en el volumen celular o alternativamente, este incremento en la salida de taurina puede deberse a algún evento secundario asociado con el incremento en volumen. Al igual que en los linfocitos se investigó la participación del citoesqueleto, aumento en los niveles intracelulares de calcio o una disipación en el contenido intracelular de potasio y cloro como posibles señales responsables de la liberación de taurina sensible a volumen.

1) Participación del citoesqueleto.

En diversas preparaciones la desorganización del citoesqueleto inhibe la regulación de volumen en medios hiposmóticos (Gilles et al., 1986; Van Rossum y Russo, 1991). En

células MDCK, existe evidencia indirecta que "señala" la participación del citoesqueleto en el control del volumen celular. En condiciones isotónicas la citocalasina B y D producen una disminución en el volumen (Mills, 1987), así como una reducción en el contenido iónico intracelular (Allen et al., 1986). Debido a que un incremento en el volumen celular muy probablemente modifica la organización del citoesqueleto, se investigó su posible participación en el proceso de liberación de taurina sensible a volumen.

En las células MDCK la distensión del citoesqueleto no participa en la liberación de taurina estimulada por un medio hipotónico, puesto que la colchicina (0.5 μ M) y la citocalasina B (20 μ M) no mostraron ningún efecto sobre esta liberación. (Pag. 7, Trabajo III). Estos resultados indican que en las células MDCK la salida de taurina sensible a volumen ocurre de manera independiente de los cambios en la organización de microtúbulos y microfilamentos.

2) Participación del calcio.

Un aumento en el volumen celular produce un incremento en la concentración intracelular de calcio tanto en células de invertebrados (Amende y Pierce, 1980; Smith y Pierce, 1987; Pierce et al., 1988), como de vertebrados (Cala et al., 1986; Wong y Chase, 1986). En eritrocitos de Megalia la salida de aminoácidos sensible a volumen es dependiente de la entrada de calcio extracelular (Smith y Pierce, 1987). En el presente estudio se exploró la dependencia de calcio de la liberación de

taurina observada en condiciones de hiposmolaridad.

La liberación de 35 S-taurina estimulada por un medio hiposmótico (50% de la osmolaridad del medio isotónico) no se altera cuando se omite el calcio y en presencia de cobalto $1 \mu\text{M}$. Con el fin de determinar una participación del calcio intracelular en el proceso de liberación de taurina, las células crecidas a confluencia se preincubaron en un medio libre de calcio durante 24 horas antes de ser expuestas al medio hiposmótico. La liberación de taurina en estas condiciones no se modificó respecto a las células con calcio. Estos resultados demuestran que ni el calcio extracelular ni el intracelular participan en el proceso de liberación de taurina sensible a volumen.

3) Participación del potasio y del cloro intracelular.

En células MDCK el incremento en el volumen celular produce la activación de canales de potasio y cloro presentes en la membrana plasmática, con lo que el contenido intracelular de estos iones se disminuye en función del grado de hiposmolaridad (Roy y Sauvé, 1987). Los canales de potasio activados como consecuencia del aumento de volumen son inhibidos por la quinidina $1 \mu\text{M}$ (Roy y Sauvé, 1987) y los canales de cloro se inhiben en presencia de DIDS (Rothstein y Neck, 1989). La salida de potasio y cloro se inicia inmediatamente después de la exposición a un medio hiposmótico, mientras que la salida de aminoácidos ocurre únicamente hasta que los niveles intracelulares de estos iones han alcanzado los niveles

correspondientes a esa osmolaridad determinada (Roy y Sauvé, 1967). La magnitud de la salida de potasio, cloro y aminoácidos se incrementa con reducciones progresivas en la osmolaridad (Roy y Sauvé, 1967). De los resultados obtenidos por Roy y Sauvé (1967), se puede deducir una relación estequiométrica de 2:1:1 para la salida de K^+ :Cl $^-$:aminoácidos, a todas las osmolaridades examinadas. Con el fin de examinar una posible conexión entre la salida del componente iónico y la salida de aminoácidos, se estudió el efecto de la quinidina y el DIDS en la liberación de taurina inducida por soluciones hiposmóticas.

La liberación de 3H -taurina estimulada por un medio hiposmótico se inhibió en presencia de quinidina de una manera dependiente de la concentración, inhibiéndose 38% y 78% con 0.2 y 1.0 μM , respectivamente (Fig. 7, Trabajo III). El efecto de la quinidina (1 μM) fué aún mayor en la liberación de taurina producida por un medio hiposmótico 25%, mostrando un efecto inhibitorio de 67% (Fig. 8, Trabajo III). En presencia de DIDS (100 μM) la liberación de taurina estimulada por un medio con el 50% y el 75% de la osmolaridad se redujo un 50% y 17%, respectivamente (Fig. 9, Trabajo III). El efecto del DIDS (0.1 μM) y la quinidina (0.2 μM) fueron totalmente aditivos (Fig. 5, Trabajo III). El DIDS (0.1 μM) y la quinidina (1.0 μM) inhibieron también la liberación de aminoácidos endógenos estimulada por un medio hiposmótico 50% en un rango de 33-67% y 36-77%, respectivamente (Tabla 2, Trabajo III). La acción diferencial de estos fármacos en la liberación de taurina inducida por diferentes grados de hiposmolaridad así como los efectos aditivos sugieren que la acción inhibitoria del DIDS y la quinidina se

ocurren en sitios diferentes.

En células MDCK la salida de potasio producida por el aumento en volumen se inhibe por la quinidina pero no por el tetracilammonio ni por el bario (Foy y Saucé, 1987); la salida de cloro en estas condiciones es inhibida por el DIDS pero no por el difenilamino-2-carboxilato (Retrocein y Hack, 1985). El tetracilammonio (10 mM), el bario (15 mM) y la apamita (0.1 μ M), así como el difenilamino-2-carboxilato (100 μ M) no afectaron la liberación de taurina sensible a volumen (Figura 5 y 7, Trabajo III). Estos resultados sugieren una posible conexión entre la salida del componente iónico y la salida de aminoácidos sensible a volumen en células MDCK, puesto que los fármacos que inhiben la salida de potasio y cloro estimulada por un aumento en volumen, reducen notablemente la liberación de aminoácidos, mientras que inhibidores de otro tipo de canales de potasio y cloro, diferentes a los activados por cambios en volumen, resultan ineficaces para alterar la salida de aminoácidos en estas condiciones.

Para discriminar si el efecto de la quinidina es debido a la rotación de potasio en el interior celular, se examinó si la creación de una vía alterna para la salida de potasio, insensible a la quinidina, revertía la acción inhibitoria de este fármaco. Con este fin se determinó si el efecto de la quinidina se observaba en presencia de valinomicina. El efecto de la quinidina se revierte sólo parcialmente en presencia de valinomicina (1 μ M) durante el choque hiposmótico (Fig. 7, Trabajo III). Este resultado no descarta la posibilidad de una relación entre la

salida de potasio y taurina en condiciones hiposmóticas. En linfocitos humanos (Sardadi et al., 1995) y en células renales en cultivo (Knoblauch et al., 1999) la quinidina inhibe la salida de cloro, y por tanto la capacidad de regulación de volumen, a través de inhibir los canales de cloro. Con el fin de esclarecer si el efecto de la quinidina es a través de inhibir la salida de potasio se tendría que probar, en experimentos futuros, una vía alterna para la salida de este catión con gramicidina, que se ha demostrado aumenta la velocidad de recuperación del volumen en medios hiposmóticos (Deutsch y Lee, 1988).

Mondríguez y Castillo (1960), demostraron que la quinidina inhibe el transporte de aminoácidos en hepatocitos. Este antecedente sugiere que el efecto inhibitorio de la quinidina en la liberación de taurina sensible a volumen podría ser directamente sobre algún sistema de transporte del aminoácido. En la Tabla I (Trabajo III) se muestra que la quinidina, pero no el DIDS, inhibe la captura de ^3H -taurina en condiciones isosmóticas. Estos resultados apoyan la propuesta de que los efectos inhibitorios del DIDS y la quinidina son a través de diferentes mecanismos. Por otra parte también señalan que el efecto de la quinidina podría ser directamente sobre el sistema de transporte membranar para la taurina y no necesariamente a través de inhibir la salida de potasio de las células.

La relación entre la salida del componente iónico y la liberación de taurina en medios hiposmóticos puede estudiarse a través de un enfoque experimental distinto al farmacológico. Los

iones hidrógeno modulan de una manera importante los canales de potasio activados por un aumento en volumen en linfocitos humanos, inhibiéndose estos canales a valores ácidos y estimulándose a valores alcalinos de pH (Deutsch y Lee, 1985). En células HDCK también se ha reportado una sensibilidad similar de los canales de potasio a los iones hidrógeno (Oberleitner, 1989). Si la liberación de taurina sensible a volumen se encuentra relacionada con la salida de potasio, entonces se esperaría que esta liberación de taurina se afectara en función del pH extracelular. En la figura 5 (Trabajo III) se muestra que en células HDCK la liberación de ^3H -taurina sensible a volumen es un proceso que depende del pH extracelular, observándose una inhibición de 25% y 39% a valores de pH de 5.3 y 6.0, respectivamente, comparada con la liberación a pH de 7.6. Este resultado sugiere que efectivamente existe una conexión entre la salida de potasio y taurina sensible a volumen. Alternativamente el sistema de transporte de taurina involucrado en la liberación del aminoácido sensible a volumen se podría modular por los iones hidrógeno de manera similar a los canales de potasio. Otra posibilidad para explicar el efecto inhibitorio de la quinidina y los iones hidrógeno sobre la salida de taurina sensible a volumen es que el aminoácido atraviese la membrana plasmática por el canal de potasio.

Para confirmar una conexión entre la salida del componente iónico y taurina en soluciones hiposmóticas se tendrá que examinar en el futuro el efecto de otros fármacos que inhiben los

flujos iónicos activados por un aumento en volumen sobre la liberación de taurina. Específicamente los canales de potasio son inhibidos por la carbodotexina y la oligomicina A, y los canales de cloro por el dipiridamol y la oligomicina C (Deutsch y Lee, 1988). Si se corroborara una relación entre la salida del componente iónico y la de taurina sensible a volumen, entonces es posible que una disminución en la concentración de potasio y cloro actúen como señal para desencadenar la liberación del aminoácido o bien, que la taurina atraviese la membrana plasmática por la misma vía que el potasio o el cloro.

E) MECANISMO DE LA LIBERACIÓN DE TAURINA SENSIBLE A VOLUMEN.

Como en los linfocitos humanos, la taurina que desaparece de las células en presencia de soluciones hiposmóticas se recupera en el medio de incubación. Esto es indicativo de que la taurina atraviesa la membrana plasmática por algún sistema de transporte que se activa con el aumento en el volumen. Se exploró la posibilidad de que el transportador responsable de acumular la taurina en las células MDCK se encuentre involucrado en el proceso de liberación del aminoácido sensible a volumen. Con este objetivo se estudió el efecto de condiciones que alteran el funcionamiento de este transportador sobre la liberación de taurina estimulada por un medio hiposmótico. Entre estas condiciones se encuentran la dependencia de sodio (Fig. 9, Trabajo III) y cloro (Lambert et al., 1985) y de temperatura (Talian et al., 1983), así como la existencia de un mecanismo de homointercambio para la taurina en células MDCK.

1) Dependencia de la temperatura en la liberación de taurina sensible a volumen.

La actividad del transportador de taurina es dependiente de la temperatura a la que se realiza el experimento, inhibiéndose a bajas temperaturas (Tallan et al., 1983). Se esperaría que si este transportador se encuentra involucrado en la liberación de taurina sensible a volumen, entonces este proceso debe inhibirse igualmente a bajas temperaturas.

En células MDCK la liberación de taurina estimulada por un medio hiposmótico ocurre por un proceso dependiente de la temperatura. La liberación de ^3H -taurina se inhibe en 21%, 48% y 95% cuando el experimento se realiza a 25 °C, 15 °C y 4 °C, respectivamente, comparada con los resultados obtenidos a 37 °C (Fig. 4, Trabajo III). Estos resultados no permiten descartar la participación del transportador de taurina en el proceso de liberación del aminoácido sensible a volumen, pero para afirmar que se trata del mecanismo involucrado en esta liberación se requiere examinar la dependencia de temperatura a intervalos más cortos para calcular la temperatura de transición y asegurarse que se trata de la misma temperatura de la del transportador encargado de internalizar la taurina en estas células. Alternativamente la dependencia de temperatura en la liberación de taurina sensible a volumen podría deberse a la disminución de algún proceso difusional de taurina a través de la membrana o a una reducción de algún evento asociado con la liberación, como

por ejemplo, la salida de potasio intracelular.

2) Dependencia iónica de la liberación de taurina sensible a volumen.

El transportador de taurina requiere de la presencia de un gradiente de sodio (Tallan et al., 1983) así como de cloro (Shain et al., 1989) para su completa activación. Una manera de investigar si este transportador es el mecanismo por el que la taurina es expulsada de las células en respuesta al incremento en el volumen celular es examinar el efecto tanto de cloro como de sodio en el proceso de liberación. Sin embargo la salida de taurina observada en un medio hiposmótico no se alteró en un medio libre de sodio o cloro (Trabajo III), condiciones que favorecen un gradiente de estos iones del interior al exterior celular.

Otra manera de evaluar si el transportador de taurina es capaz de funcionar del interior al exterior celular es examinar la existencia de un mecanismo de homodirigibilidad. En condiciones isotónicas la liberación de PH-taurina no se incrementó en presencia de taurina externa no radiactiva (Trabajo III), indicando que en las células MDCK el transportador de taurina no puede activarse del interior al exterior celular.

Se ha reportado que en eritrocitos de pescado (Fincham et al., 1987) y en las células ascíticas de Ehrlich (Hoffmann y Lambert, 1983), la hiposmolaridad incrementa la magnitud de un

componente difusional para la taurina, presente en condiciones isosmóticas. Se ha sugerido que este sistema de transporte para la taurina, poco estudiado aún, es el responsable de la liberación sensible a volumen del aminoácido. Si efectivamente es un mecanismo difusional el involucrado en la liberación sensible a volumen de taurina entonces la magnitud de esta liberación deberá disminuir en presencia de niveles extracelulares crecientes de taurina, puesto que se estaría disminuyendo la magnitud del gradiente de concentración para el aminoácido. De hecho, a concentraciones extracelulares de taurina mayores a la intracelular se esperaría una entrada en lugar de una salida de taurina como consecuencia del incremento en el volumen celular. Esta es una hipótesis que se probará en un futuro cercano.

En condiciones isosmóticas se encuentra presente este componente difusional para los flujos de taurina, sin embargo las células son capaces de mantener un gradiente de concentración entre el interior (concentraciones milimolares) y el exterior celular (en el rango de micromolares). Esto indica que este sistema de transporte de taurina presenta cierta polaridad y el aminoácido puede utilizarlo para internalizarse en la célula pero no para salir de la misma, puesto que el gradiente de concentración desaparecería con el tiempo. Pareciera que durante el aumento de volumen esta barrera para la salida de la taurina desaparece y permite que el aminoácido abandone el interior celular. Es claro que la señal para la liberación del aminoácido se inactiva cuando las células han recuperado su volumen inicial, puesto que la liberación de taurina disminuye a pesar de que existen aún niveles endógenos elevados (al final de un periodo de

incubación de 15 minutos en un medio con el 50% de la osmolaridad permanece en las células aún el 20% del contenido inicial). Sin embargo poco se conoce aún de este proceso de inactivación de la salida de taurina sensible a volumen.

DISCUSION GENERAL

En la mayoría de las preparaciones experimentales estudiadas hasta ahora la regulación del volumen celular en condiciones hiposmóticas se encuentra mediada principalmente por la movilización de los solutos intracelulares más abundantes: los iones potasio y cloro (Grinstein et al., 1984). La salida de estos solutos del interior celular disminuye el gradiente osmótico entre el compartimento intra y extracelular e induce la salida de agua de la célula, permitiendo la recuperación del volumen inicial. Sin embargo los aminoácidos libres son solutos intracelulares que contribuyen de manera importante para la presión osmótica intracelular total y se ha demostrado que sus niveles celulares se modifican en función de la osmolaridad del medio extracelular (Figueroa y Tharion, 1983).

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que tanto en los linfocitos humanos y de conejo como en células MDCK, los aminoácidos libres son parte de los solutos que se movilizan durante el proceso de regulación de volumen celular. En las preparaciones estudiadas los aminoácidos libres son fuertemente retenidos por las células en condiciones de isosmolaridad pero al ser expuestas a soluciones hiposmóticas los

aminoácidos son rápidamente expulsados del interior celular. El curso temporal de la liberación de aminoácidos estimulada por el incremento en volumen, monitoreada a través de la salida de ^3H -taurina, es similar al curso temporal de los cambios en el volumen celular observados en soluciones hiposmóticas. Los valores máximos tanto en el volumen como en la liberación de taurina se alcanzan en el primer minuto de exposición en el medio hiposmótico, y posteriormente se observa una disminución en ambos parámetros a pesar de continuar en condiciones de hiposmolaridad. La magnitud de la liberación sensible a volumen de los aminoácidos se incrementa con reducciones progresivas en la osmolaridad en todas las preparaciones estudiadas, lo cual demuestra una relación muy estrecha entre el aumento en el volumen celular y la salida de los aminoácidos. A continuación se realizará una aproximación para determinar la contribución de la salida de aminoácidos para la recuperación del volumen celular en condiciones hiposmóticas.

En los linfocitos humanos la concentración total de aminoácidos se calculó en 43 mM, y en respuesta a una disminución de 150 mosmoles en el medio de incubación se libera el 60% del contenido de aminoácidos, lo que disminuye la presión osmótica intracelular en 25.8 mosmoles. Suponiendo que para recuperar el volumen inicial las células tienen que reducir la presión osmótica interna en la misma magnitud de la disminución en la presión osmótica externa, deben perderse 150 mosmoles intracelulares en un medio hiposmótico 50%. La salida de aminoácidos en estas condiciones representarían el 17.2% del

total de solutos perdidos durante la fase reguladora. En linfocitos de conejo en respuesta a la misma reducción en la osmolaridad (130 mosmoles/l) se libera el 54% de un total de aminoácidos libres de 45 mM, lo que significa una reducción de 24.3 mosmoles y una contribución del 18% del total de solutos que deben perderse para la regulación del volumen en esa osmolaridad. En los linfocitos humanos y de conejo la taurina representa el 64%-70% del total de aminoácidos libres, por lo que un solo aminoácido es el responsable del modesto papel que estos compuestos desempeñan en los procesos reguladores de volumen. En las células MDCK se libera el 64% de una concentración total de aminoácidos de 67 mM, contribuyendo con 44 mosmoles, lo cual representa un 29% del total de solutos que deben perderse en un medio hiposmótico 50%. La contribución de los aminoácidos en los procesos de regulación del volumen celular es limitada en las preparaciones estudiadas, constituyendo entre un 16% y un 29% del total de solutos expulsados de la célula. La participación de los aminoácidos resulta más importante si se considera que la recuperación del volumen en soluciones hiposmóticas no es total, indicando que las células expulsan menos solutos de los necesarios para desaparecer por completo el gradiente osmótico, lo que incrementaría el porcentaje de los aminoácidos respecto al total de solutos perdidos durante la fase reguladora. Estos resultados coinciden con los obtenidos en otros tipos celulares de animales terrestres (Hoffman y Simonsen, 1989; Roy y Sauvé, 1987; Fasantes-Morales y Schousboe, 1989), en los iones potasio y cloro son los solutos responsables de la mayor parte del proceso

regulador de volumen y los aminoácidos desempeñan un papel complementario de este proceso. En los animales vertebrados, que normalmente se enfrentan a cambios en la osmolaridad del medio, los aminoácidos son los solutos de mayor importancia en los ajustes de volumen en condiciones hiposmóticas, y los iones potasio y cloro cumplen con un papel secundario (Warren y Pierce, 1982; Smith y Pierce, 1987).

Existen algunas diferencias en los resultados obtenidos en los linfocitos comparados con los obtenidos en las células renales en cultivo. En primer lugar el curso temporal de la liberación de taurina es similar en los linfocitos humano y los de conejo, obteniéndose el pico en la liberación en el primer minuto de perfusión con el medio hiposmótico (descontando el espacio muerto en el sistema de perfusión); sin embargo en las células MDCK esta liberación se encuentra muy retardada, alcanzando el máximo en liberación a los 10 minutos de exposición al medio hiposmótico. Este retraso en la liberación sensible a volumen de los aminoácidos coincide con el observado por Roy y Sauve (1987) en células MDCK. El curso temporal de los cambios en el volumen celular es muy similar en ambas preparaciones (Erinstein et al., 1984; Roy y Sauve, 1987), por lo que las diferencias en el patron temporal de la liberación de taurina podrían explicarse con base en diferencias en la señal o en el mecanismo vinculado con la salida del aminoácido. En apoyo a esta propuesta se encuentran la falta de efecto de la quinidina, de la temperatura y de los iones hidrógeno en la liberación de taurina en los linfocitos, mientras que en las células MDCK la

saliva de taurina se modificó por todas estas condiciones. Es importante mencionar que los resultados obtenidos en presencia de quinidina no son comparables entre células MDCK y linfocitos, debido a que en estas últimas células no pueden utilizarse concentraciones mayores a 75 μ M por el efecto tóxico que produce; por otra parte la menor concentración examinada en las células MDCK fué de 200 μ M.

En los linfocitos y en las células MDCK prácticamente todos los aminoácidos libres son expulsados de las células en respuesta a un incremento en el volumen celular. Entre los aminoácidos la taurina merece una mención especial. Este aminoácido presenta características que lo señalan como un osmorefactor ideal: se encuentra presente en concentraciones elevadas en todos los tipos celulares, no participa en reacciones del metabolismo primario de la célula ni forma parte de la estructura de proteínas ni de ninguna otra macromolécula. Frecuentemente es el aminoácido libre más abundante o uno de los más abundantes. En el presente estudio la taurina constituye el 42-70% del total de aminoácidos libres en los linfocitos, por lo que la mayor parte de la contribución de los aminoácidos libres para la regulación de volumen es aportada por la taurina. En las células MDCK los niveles de taurina son bajos (alrededor de 3 μ M), pero esto posiblemente no refleja la condición fisiológica, debido a que el medio de cultivo contiene niveles inferiores (aproximadamente 20 μ M) de taurina a los encontrados normalmente en el plasma (aproximadamente 200 μ M) (Prime et al., 1982).

Las células renales son probablemente las únicas células de un animal terrestre que fisiológicamente puede ser expuestas a un medio ambiente de osmolaridad cambiante y por lo tanto se espera que se encuentren presentes los mecanismos que permitan un ajuste de volumen en condiciones anisosmóticas. Sin embargo los mecanismos que permiten la regulación de volumen se encuentran presentes en la mayoría de los tipos celulares de animales terrestres examinados, tales como astrocitos (Kimmelberg y Frangasi, 1965), células de Ehrlich (Hoffman y Simonsen, 1969), hepatocitos (Corasanti et al., 1970), linfocitos humanos (Grinstein et al., 1964) y linfocitos de conejo (en el presente estudio). Deutch y Lee (1985) han propuesto que los mecanismos de regulación de volumen en linfocitos pueden requerirse debido a la formación de condiciones anisosmóticas locales, generación de condiciones anisosmóticas intracelulares o gradientes osmóticos originados como consecuencia de un transporte iónico muy activo. Otras condiciones que producen aumento en el volumen celular en condiciones isosmóticas incluyen una concentración elevada de oxígeno (Bourke y Tower, 1966; Kamino et al., 1973; Salt, 1987), exposición a ciertos neurotransmisores como la nor epinefrina y la adenosina (Bourke et al., 1980) o aminoácidos excitadores (Choi, 1987). Se ha demostrado que la captura de aminoácidos y azúcares, acoplada con la entrada de sodio (y en ocasiones de cloro), activa los mecanismos reguladores de volumen en células epiteliales (Lau et al., 1984; Schultz et al., 1985) y en hepatocitos (Kristensen et al., 1984; Kristensen, 1986). Las reacciones catabólicas aceleradas, tales como la glucogenólisis

en hepatocitos y la lipólisis en adipocitos, también podrían llevar a la acumulación de solutos osmóticamente activos y por lo tanto a la creación de un gradiente osmótico a través de la membrana celular (Kristensen, 1966). Los mecanismos de regulación del volumen celular se requieren para el mantenimiento de un volumen constante a pesar de que no existan variaciones en la la osmolaridad del medio extracelular.

Aunque en células de animales terrestres los aminoácidos muestran una participación secundaria en los procesos de regulación de volumen en condiciones hiposmóticas, es posible especular que tal vez en circunstancias específicas la contribución de los aminoácidos en la recuperación de volumen pueda ser más importante que la del componente iónico. Una de las funciones propuestas para los astrocitos es la de disminuir la concentración extracelular de potasio cuando ésta se incrementa como consecuencia de la actividad neuronal (Walz, 1967); por otra parte se ha descrito que la exposición a concentraciones elevadas de potasio producen un incremento en el volumen celular en astrocitos en cultivo (Walz y Linde, 1965). En estas condiciones es poco probable que los astrocitos regulen su volumen a través de la expulsión de potasio y posiblemente la salida de aminoácidos permita una regulación de volumen limitada en estas células. Además los astrocitos in vivo muestran un aumento de volumen en diversas condiciones patológicas, tales como hipoglucemia, isquemia, anoxia, epilepsia y encefalopatía hepática (Kinsberg y Ranom, 1966). En estas condiciones la

liberación de un aminoácido como la taurina, que muestra un efecto depresor de la actividad neuronal (Mandel y Casantes-Morales, 1978), puede ser benéfico tanto para los procesos de regulación de volúmenes como para restablecer los niveles normales de la excitabilidad neuronal (Benveniste et al., 1984).

REFERENCIAS

- Allen, J.D., Coffey, A.K., Mills, G.W. 1986. Involvement of cytoskeletal organization and Na/H exchange in dibutyryl cyclic AMP induced alterations of MDCK cell volume. In: Alvarado, F., van Os, C.H. (eds) "Ion Gradient-Coupled Transport, INSERM Symp. No. 26", Elsevier, Amsterdam, pp. 415-419.
- Amende, L.M., Pierce, S.K. 1984. Free amino acid mediated volume regulation of isolated *Neotoma pennsylvanica* red blood cells: Control by Ca^{2+} and ATP. *J. Comp. Physiol.* 138:291-298
- Atlas, M., Fahl, J.J., Rozeka, W., Bressler, R. 1984. *In vitro* osmoregulation of taurine in fetal mouse hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol* 16:311-320.
- Awapara, J. 1955. Taurine content of some animal organs. *Fed. Proc.* 14:175.
- Bagnasco, S.M., Uchida, S., Balaban, R.S., Kador, P.F. 1987. Induction of glucose reductase and sorbitol in renal inner medullary cells by elevated extracellular NaCl. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 64:1718-1720
- Balaban, R.S., Burg, W. 1987. Osmotically active solutes in the renal inner medulla. *Kidney Int.* 31:562-564.
- Benveniste, H., Dreier, J., Schousboe, A., Diemer, N.R. 1984. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J. Neurochem.* 43:1369-1374.
- Borgesio, F., Garcia-Rosou, F., Molais, R. 1987. Control of cell volume and ion transport by β -adrenergic catecholamines in erythrocytes of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Physiol. Lond.* 382:123-144
- Bourke, R.S., Tower, D.S., 1980. Fluid compartmentation and electrolytes of cat cerebral cortex: *in vitro* I. Swelling and solute distribution in mature cerebral cortex. *J. Neurochem.* 13:1071-1077.
- Bourke, R.S., 1969. Studies of the development and subsequent reduction of swelling of mammalian cerebral cortex under isosmotic conditions *in vitro*. *Exp. Brain Res.* 6:232-248.
- Bourke, R.S., Kinsberg, H.H., Daze, M., Church, G. 1983. Swelling and ion uptake in cat cerebrocortical slices: Control by neurotransmitters and ion transport mechanisms. *Neurochem. Res.* 8:5-24.

- Bourne, P.K., Cossins, A.R. 1984. Sodium and potassium transport in trout (*Salmo gairdneri*) erythrocytes. *J. Physiol. Lond.* 347:361-378
- Bovis, P.J., Conway, E.J. 1941. Potassium accumulation in muscle and associated changes. *J. Physiol. (London)* 100:1-63.
- Bricheux-Féguère, S., Auchincloss-Benson, G., Jeunissen, Ch., Fiorin, M. 1982. Constituants osmotiquement actifs des muscles de crabe chinois *Erinaceus asperus*. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 70:273-285
- Cala, P.M. 1980. Volume regulation by *Amphiuma* red blood cells. The membrane potential and its implications regarding the nature of the ion-flux pathways. *J. Gen. Physiol.* 75:683-708
- Cala, P.M. 1983. Cell volume regulation by *Amphiuma* red blood cells. The role of Ca^{2+} as a 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.* 5:197-219
- Cala, P.M. 1985b. Volume regulation by *Amphiuma* red blood cells: strategies for identifying alkali metal/H⁺ transport. *Federation Proc.* 44:2500-2507
- Cala, P.M., Mandel, L.J., Murphy, E. 1986. Volume regulation by *Amphiuma* red blood cells: cytosolic free Ca and alkali metal-H exchange. *Am. J. Physiol.* 250:C423-C432.
- Cala, P.M. 1986. Volume-sensitive alkali metal-H transport in *Amphiuma* red blood cells. *Curr. Top. Membr. Transp.* 26:79-99
- Carpi-Medina, P., González, E., Whitesbury, S. 1983. Cell osmotic water permeability of isolated rabbit proximal convoluted tubules. *Am. J. Physiol.* 244:F534-F538.
- Chuang, T.K., Grinstein, S., Gelfand, E.W. 1982. Volume regulation by human lymphocytes: identification of differences between the two major lymphocytes subpopulations. *J. Clin. Invest.* 70:652-658.
- Choi, J.W. 1987. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.* 7:359-375.
- Christensen, O. 1987. Mediation of cell volume regulation by Ca^{2+} influx through stretch-activated channels. *Nature* 330:66-68
- Cooke, K.R. 1976. Effects of ouabain and potassium-free media on cellular volume regulation in rat renal cortical slices. *J. Physiol.* 279:375-384.
- Cooke, K.R., Macnight, A.D.C. 1984. Effects of sodium acetate on

- cellular volume in rabbit renal cortical slices. *J. Physiol.* (London) 349:133-156.
- Corasanti, C.T., Gleason, G., Beyer, J.L., 1990. Effects of osmotic stresses on isolated rat hepatocytes I. Ionic mechanisms of cell volume regulation. *Am. J. Physiol.* 259:G290-G299.
- Costa, C.J., Pierce, S.K. 1983. Volume regulation in the red colloidocytes of Elveta dibranchiata: An interaction of amino acids and K^+ effluxes. *J. Comp. Physiol. B* 131:133-140
- Davis, C.W., Finn, A.L. 1985. Cell volume regulation in frog urinary bladder. *Federation Proc.* 44:2320-2325
- DeCoursey, T.E., Chandy, K.G., Gupta, S., Cahalan, M.D., 1985. Voltage-dependent ion channels in T lymphocytes. *J. Neuroimmun.* 10:71-75.
- Dépêche, J., Schoffeniels, E. 1975. Changes in electrolytes, urea and free amino acids of Escherichia reticulata embryos, following high salinity adaptation of the viviparous female. *Biochim. System. Ecol.* 3:111-112.
- Deutsch, C., Krause, D., Lee, S.C. 1986. Voltage-gated potassium conductance in bovine T lymphocytes stimulated with phorbol ester. *J. Physiol.* 373:403-423.
- Dick, D.A.T. 1970. Water movements in cells. In: Bitar, E.E. (ed) "Membranes and Ion Transport". Bitar, E.E. (ed.). Wiley, vol. 3
- Dix, J.A., Ausiello, D.A., Jung, C.Y., Vertman, A.S. 1965. Target analysis studies of red cell water and urea transport. *Biochim. Biophys. Acta* 321:243-252.
- Dominguez, L., Montenegro, J., Pasantos-Morales, H. 1987. A volume-dependent chloride sensitive component of taurine release stimulated by potassium from retina. *J. Neurosci. Res.* 22:326-341.
- Dunham, P.B., Ellory, J.C. 1981. Passive potassium transport in low potassium sheep red cells: dependence upon cell volume and chloride. *J. Physiol. Lond.* 319:511-530
- Ellory, J.C., Hall, A.C., Stewart, S.W. 1985. Volume-sensitive passive potassium fluxes in red cells. In: Gilles, R., Gilles-Paillien, M. (eds) "Transport Processes, Ions and Osmoregulation. Current Comparative Approaches". Springer-Verlag, pp. 401-410
- Fottinacci, R., Haydon, D.A. 1980. Water permeability of lipid membranes. *Physiol. Rev.* 60:510-550.
- Foskett, J.K., Spring, K.R. 1984. Ca and microfilaments in

- epithelial cell volume regulation. Fed. Proc. 43:117.
- Foskett, J.K., Spring, H.R. 1983. Involvement of calcium and cytoskeleton in gall bladder epithelial cell volume regulation. Am. J. Physiol. 248:C27-30a.
- Friarier, G.H., Herwith, M., Furth, E., Fellows, R.S., Thomson, D.D. 1965. Inulin and endogenous amino acid renal clearances in diabetes: Evidence for tubular secretion. J. Clin. Invest. 41:231-235.
- Fugelli, K., Lachariassen, K.E. 1973. The distribution of taurine, gamma-aminobutyric acid and inorganic ions between plasma and erythrocytes in flounder (*Platichthys flesus*) at different plasma osmolalities. Comp. Biochem. Physiol. 55A:173-177.
- Fugelli, K., Reiersen, L.O. 1973. Volume regulation in flounder erythrocytes. The effect of osmolality on taurine influx. In: Barker Jørgensen, C., Skrahaug, S. (eds) "Osmotic and Volume Regulation". Munksgaard, pp. 418-425.
- Fyhn, F.J. 1976. Homeurynality and its mechanisms in a decapod crustacean, *Libinia imbrovisus*. Comp. Biochem. Physiol. 53A:19-30.
- Gelfand, E.W., Cheung, P.K., Kyungsoi, H., Grinstein, S. 1984. Volume regulation in lymphoid leukemia cells and assignment of cell lineage. New Engl. J. Med. 311:937-944 (1984).
- Gerard, J.F. 1975. Volume regulation and alanine transport. Response of isolated axons of *Callinectes sapidus* Rathbun to hypo-osmotic conditions. Comp. Biochem. Physiol. 51A:225-229.
- Gilles, R. 1975. Mechanisms of lung and osmoregulation. In: Kinne, D (ed). Wiley-Liss, pp. 259-347.
- Gilles, R. 1977. Effects of osmotic stress on the protein concentration and pattern of *Limulus polyphemus* blood. Comp. Biochem. Physiol. 56A:107-114.
- Gilles, R. 1979. Intracellular organic effector. In: Gilles R. (ed): "Mechanisms of Osmoregulation in Animals: Maintenance of Cell Volume." New York: John Wiley, pp. 111-154.
- Gilles, R., Despire, E., Duchene, G., Cornet, R., Focucoux, A. 1985. The effect of cytochalasin B on the volume regulation response of isolated axons of the green crab *Carcinus maenas* submitted to hypo-osmotic media. Comp. Biochem. Physiol. 6 55:523-525.
- Grinstein, S., Clarke, D.A., Potstern, A. 1983. Activation of Na^+/H^+ exchange in lymphocytes by osmotically induced volume changes and by cytoplasmic acidification. J. Gen. Physiol. 52:619-636.

- Grinstein, S., Furuya, W., Dragos, E.J. Jr. 1986. Volume changes in activated human neutrophils: The role of Na^+/H^+ exchange. *J. Cell. Physiol.* 126:37-46
- Grinstein, S., Clarke, C.A., Dupre, A., Rothstein, A. 1987. Volume-induced increase of anion permeability in human lymphocytes. *J. Gen. Physiol.* 50:801-823
- Grinstein, S., Fockett, J.K. 1990. Ionic mechanisms of cell volume regulation in leukocytes. *Annu. Rev. Physiol.* 52:399-414
- Guggino, W.B., Oberleithner, H., Giebisch, G. 1985. Relationship between cell volume and ion transport in the early distal tubule of the Amphioxus kidney. *J. gen. Physiol.* 85:31-56.
- Gullans, S.R., Blumenfeld, J.D., Baloch, J.R., Karetz, M., Brenner, R.M. 1986. Accumulation of major organic anions in rat renal inner medulla in dehydration. *Am. J. Physiol.* 255:F613-F634
- Hempling, H.G., Thompson, S., DuFre, A. 1977. Osmotic properties of human lymphocytes. *J. Cell. Physiol.* 93:293-303
- Hendil, K.B., Hoffmann, E.K. 1974. Cell volume regulation in Ehrlich ascites tumor cells. *J. Cell. Physiol.* 84:119-125
- Hebert, S.C., Andreoli, T.E. 1972. Interactions of temperature and ADH on transport processes on cortical collecting tubules. *Am. J. Physiol.* 233:F470-F480.
- Hoffmann, E.K. 1978. Regulation of cell volume by selective changes in the leak permeabilities of Ehrlich ascites tumor cells. In: Jorgensen, C.B., Skadhauge, E. (eds) "Osmotic and Volume Regulation". Munksgaard, pp. 377-417
- Hoffmann, E.K., Sjonin, C., Simonsen, L.O. 1983. Na^+ , Cl^- co-transport in Ehrlich ascites tumor cells activated during volume regulation (regulatory volume increase). *J. Membr. Biol.* 76:269-280
- Hoffmann, E.K., Lambert, I.H., Simonsen, L.O. 1986. Separate, Ca^{2+} -activated H^+ and Cl^- transport pathways in Ehrlich ascites tumor cells. *J. Membr. Biol.* 91:237-244
- Hoffmann, E.K. 1987. Volume regulation in cultured cells. *Curr. Top. Membr. Transp.* 30:25-150
- Hoffmann, E.K., Simonsen, L.O. 1989. Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells. *Physiol. Rev.* 69(2):315-332
- Holz, R., Finkelstein, A. 1970. The water and nonelectrolyte permeability induced in thin lipid membrane by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B. *J. Gen. Physiol.*

- House, C. 1974. Water transport in cells and tissues. *Physiol. Soc. Monographs*, London: Arnold, No. 24.
- Iwata, H., Kobayashi, Y., Demura, K., Tanaka, H., Noda, M., Baba, R. 1990. Chloride-dependent amino acid transport in synaptic membrane vesicles. In: Fasano-Morales, H., Martin, D.L., Shain, W., Martin del Rio, R. (eds) "Taurine: Functional Neurochemistry, Physiology, and Cardiology. Wiley-Liss, Inc. pp. 255-266.
- Kasino, K., Inouye, K., and Inouye, S. 1970. Potassium ion-induced swelling of nerve-ending particles by light-scattering measurement. *Biochim. Biophys. Acta* 30:59-62.
- Kimelberg, H.K., Ransom, B.R. 1986. Physiological and pathological aspects of astrocytic swelling. In: *Astrocytes*. Vol. 3. S. Fedoroff y A. Vornadakis (eds), Academic Press, New York, pp. 127-156.
- Kregenow, F.M. 1971. The response of duck erythrocytes to hypertonic media. Further evidence for a volume-controlling mechanism. *Gen. Physiol.* 38:396-412
- Kregenow, F.M. 1973. The response of duck erythrocytes to norepinephrine and an elevated extracellular potassium: volume regulation in isotonic media. *J. Gen. Physiol.* 61:509-527
- Kregenow, F.M., Carys, T., Siebers, A.W. 1980. Further studies of the volume-regulatory response of *Amphiuma* red cells in hypertonic media. Evidence for anionide-sensitive Na/H exchange. *J. Gen. Physiol.* 36:565-584
- Kristensen, L.O., Folke, H. 1984. Volume-regulatory K⁺ efflux during concentrative uptake of alanine in isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.* 221:265-266
- Kristensen, L.O. 1986. Association between transports of alanine and cations across cell membrane in rat hepatocytes. *Am. J. Physiol.* 251:G572-G584
- Lang, F., Paulmichl, M., Vozicki, H., Estrein, E., Friedrich, F. 1967. Electrophysiology of cell volume regulation. In: *Molecular Nephrology, Biochemical aspects of Kidney Function*. Kovacevic, I., Guder, W.G. (eds.). Berlin: de Gruyter, pp. 133-139
- Lange, R. 1963. The osmotic functions of amino acids and taurine in the mussel *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 10:173-179.
- Larson, M., Spring, K. S. 1984. Volume regulation by *Necturus* gallbladder: basolateral KCl exit. *J. Membr. Biol.* 21:219-232

- Lenson, M., Spring, K.R. 1987. Volume regulation in epithelia. *Curr. Top. Membr. Transp.* 30:105-123
- Lau, K.R., Hudson, R.L., Schultz, E.E. 1981. Cell swelling increases a barium-inhibitable potassium conductance in the basolateral membrane of Neclunus small intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:3391-3394
- Lauf, P.K. 1960. Evidence for chloride dependent potassium and water transport induced by hyposmotic stress in erythrocytes of the marine teleost, Menanus lae. *J. Comp. Physiol.* 14a: 7-16
- Lauf, P.K. 1965. On the relationship between volume- and thioi-stimulated K^+ Cl^- fluxes in red cells membrane. *Mol. Physiol.* 8:215-234
- Lee, S.C., Sabato, D.E., Deutsch, C. 1983. Volume response of quiescent and interleukin 2-stimulated T-lymphocytes to hypotonicity. *Am. J. Physiol.* 254:C266-C276.
- Lehmann, A. 1989. Effect of microdialysis-perfusion with anisomsmotic media on extracellular amino acids in the rat hippocampus and skeletal muscle. *J. Neurochem* 54:325-330.
- Levine, S.D., Jacoby, M., Finkbein, A. 1984. The water permeability of rod urinary bladder. II. The value of $P_i/P_o(w)$ for the antidiuretic hormone-induced water permeation pathway. *J. Gen. Physiol.* 83:543-561.
- Lipton, P. 1973. Effects of membrane depolarization on light scattering by cerebral cortical slices. *J. Physiol.* 231:365-383
- Macey, R.I. 1984. Transport of water and urea in red blood cells. *Am. J. Physiol.* 246:C153-C203.
- Macey, R.I., Brahe, J. 1989. Osmotic and diffusional water permeability in red cells: methods and interpretations. *En: Water Transport in Biological Membranes, Vol. II.* S. Benga (ed). CRC Press, Florida, pp. 20-39.
- MacKnight, A.D.C., Leaf, A. 1977. Regulation of cellular volume. *Physiol. Rev.* 57:510-575
- MacKnight, A.D.C. 1980. Volume regulation in mammalian kidney cells. *Mol. Physiol.* 11:7-31
- MacKnight, A.D.C. 1985. Cellular responses to extracellular osmolality. In: *The kidney Physiology and Pathophysiology.* Seidlin, D.W., Giebisch, G. (eds.). New York: Raven, pp. 117-132
- Mandel, P., Pasantes-Morales, H. 1976. Taurine in the nervous system. *Rev. Neurosci.* 3:157-194.

- Nayer, M.L.A. 1985. A calcium-activated chloride current generates the after-depolarization of rat sensory neurons in culture. *J. Physiol. Lond.* 364:217-239
- McManus, T.J., Schaidt, K.F., III. 1976. Ion and co-ion transport in avian red cells. In: Hoffman, E.K. (ed) "Membrane Transport Processes". Raven, vol. 1, pp. 79-106
- Nayer, M.H., Verkman, A.S. 1987. Evidence for water channels in proximal tubule cell membranes. *J. Membr. Biol.* 96:107-119
- Noller, M., Møllgaard, K., Lund-Andersen, H., and Hertz, L., 1974. Concordance between morphological and biochemical estimates of fluid spaces in rat brain cortex slices. *Exp. Brain Res.* 22:299-334.
- Moran, W.H., Pierce, G.H. 1967. The mechanism of crustacean salinity tolerance: cell volume regulation by K^+ and glycine fluxes. *Mar. Biol.* 8:43-46
- Morris, C.E., Sigurdson, M.J. 1969. Stretch-inactivated ion channels coexist. *Science* 243:907-909
- Morris, J.G. 1980. *Fisiocquímica para Biólogos*. 2a. ed. Reverte, España, pp. 325.
- Niemiinen, M.L., Tuomisto, L., Sclatanturi, E., Eriksson, L., Paasonen, M.K. 1988. Taurine in the osmoregulation of the Baltic herring. *Life Sci.* 42:2137-2143.
- Oberleithner, H., Kersting, U., Silbermayr, G., Steigner, W., Vogel, U. 1989. Fusion of cultured dog kidney (MDCK) cells: II. Relationship between cell pH and K^+ conductance in response to aldosterone. *J. Membrane Biol.* 111:49-56.
- O'Neill, W.C. 1989. Cl-dependent K transport in a pure population of volume-regulating human erythrocytes. *Am. J. Physiol.* 256:C853-C864.
- Orskov, R.K., Dietzel, I., Colas, J.A. 1984. Light-induced changes in extracellular volume in the retina of the dros, *Axis galliard, Neurosci. Lett.* 45:273-278.
- Orskov, S.L. 1954. The potassium absorption by pigeon blood cells. A considerable potassium absorption by pigeon- and hen blood cells is observed when a hypertonic sodium chloride solution is added. *Acta Physiol. Scand.* 31:221-227
- Pappius, H.M., and Elliot, K.A.C., 1956. Factors affecting the potassium content of incubated brain slices. *Can. J. Biochem. Physiol.* 34:1053-1067.
- Parker, J.C. 1977. Solute and water transport in dog and rat red blood cells. In: *Membrane transport in red cells*. Ellory, J.C., Lew, V.L. (eds.). London: Academic, pp. 427-445

- Parker, J.C. 1983. Volume-responsive sodium movements in dog red blood cells: anion effects. *Am. J. Physiol.* 244:R712-R717.
- Parker, J.C. 1986. Na-proton exchange in dog red blood cells. *Curr. Top. Membr. Transp.* 26:101-114.
- Parker, J.C. 1986. Volume-activated transport systems in dog red blood cells. *Comp. Biochem. Physiol.* 90:539-542.
- Pasantes-Moraies, H. 1986. Current concepts on the role of taurine in the retina. *Prog. Ret. Res.* 5:207-229.
- Pasantes-Moraies, H., Dominguez, L., Montenegro, V., and Morán, J., 1986. A chloride-dependent component of the release of labeled GABA and taurine from the chick retina. *Brain Res.* 459:120-130.
- Pasantes-Moraies, H., Schousboe, A. 1988. Volume regulation in astrocytes: a role for taurine as an osmoregulator. *J. Neurosci. Res.* 20:505-509.
- Pierce, S.K., Greenberg H.J. 1972. The nature of cellular volume regulation in marine bivalves. *J. Exp. Biol.* 37:651-692.
- Pierce, S.K., Politis, A.D., Smith, L.H. Jr., Rowland, L.M. 1985. A Ca^{2+} influx in response to hypo-osmotic stress may alter osmolyte permeability by a phenothiazine-sensitive mechanism. *Cell Calcium* 7:129-140.
- Pierce, S.K., Politis, A.D. 1990. Ca^{2+} -activated cell volume recovery mechanisms. *Annu. Rev. Physiol.* 52:27-42.
- Rassin, D.K., Sturman, J.A., Saul, G.E. 1977. Taurine in developing rat brain: Subcellular distribution and association with synaptic vesicles of (35-S) taurine in maternal, fetal and neonatal rat brain. *J. Neurochem.* 28:41-50.
- Sackin, H. 1989. A stretch-activated K^{+} channel sensitive to cell volume. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:1731-1735.
- Saltin, B., Sjogaard, G., Strange, S., Juel, C. 1987. Redistribution of K^{+} in the human body during muscular exercise: 1st role to maintain whole body homeostasis. *Ex. Shiraki, K., Yousef, M.K. (eds) "Man in Stressful Environments Thermal and Work Physiology". Springfield, pp. 247-267*
- Sarkadi, B., Chung, R., Mack, E., Grinstein, S., Seifand, E.W., Rothstein, A. 1985. Cation and anion transport pathways in volume regulatory response of human lymphocytes to hypoosmotic media. *Am. J. Physiol.* 248:C650-C657.
- Shain, W., Madelian, V., Nahorski, R.A., Martin, D.L. 1990. Characteristics of taurine release from astroglial cells. *Ex. Pasantes-Moraies, H., Martin, D.L., Shain, W., Martin del Rio, R. (eds) "Taurine: Functional Neurochemistry, Physiology, and*

- Schmidt, W.F., III, McManus, T.S. 1977. Ouabain-insensitive salt and water movements in duck red cells. I. Kinetics of cation transport under hyperosmotic conditions. *J. Gen. Physiol.* 70:39-79
- Schmidt, W.F., III, McManus, T.S. 1977. Ouabain-insensitive salt and water movements in duck red cells. II. Norepinephrine stimulation of sodium plus potassium cotransport. *J. Gen. Physiol.* 70:81-97
- Schoffeleers, E., Gillen, Y. 1970. Osmoregulation in aquatic arthropods. En: Florkin, M., Scarrer, B. (eds) "Chemical Zoology" Academic Press, vol. 4, pp. 153-256
- Schoffeleers, E. 1976. Biochemical approaches to osmoregulatory processes in crustacea. En: Davies P.B. (ed): "Perspectives in Experimental Biology." Pergamon Press, pp. 107-174.
- Schultz, S.G., Hodson, R.L., Lapointe, J.-Y. 1985. Electrophysiological studies of sodium cotransport in epithelial toward a cellular model. *Can. J. Physiol. Sci.* 63:127-135
- Schulze, E., Neuhoff, V. 1983. Uptake, autoradiography and release of taurine and homotaurine from retinal tissue. *Neuroscience* 16:157-168.
- Segal, I.R. 1982. *Cálculos de bioquímica*. 2a. ed. Acribia, España, pp. 364.
- Siebens, A.W. 1985. Cellular volume control. En: Seldin, D.W., Siebens, G. (eds) "The Kidney. Physiology and Pathophysiology", Raven Press, vol. 1, pp. 71-118
- Siebens, A.W., Kruganov, P.N. 1985. Volume-regulatory responses of *Acanthina* red cells in osmotic media. The effect of amiloride. *J. Gen. Physiol.* 85:327-364
- Smith, L.H. Jr. 1985. Osmolyte permeability in *Neocilia ponderosa* erythrocytes during hypoosmotic stress: control by Ca^{2+} and the cytoskeleton. PhD thesis, Univ. Maryland, College Park. 84 pp.
- Smith, L.H. Jr., Pierce, S.K. 1987. Cell volume regulation by molluscan erythrocytes during hypoosmotic stress: Ca^{2+} effects on ionic and organic osmolyte effluxes. *Biol. Bull.* 172:407-418
- Solomon, A.K., Shaver, B., Dix, J.A., Lukacovic, M.F., Toco, M.P., Verkman, A.S. 1984. The aqueous pore in the red cell membrane: Band 3 as a channel for anions, cations, nonelectrolytes and water. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 414:79-124.
- Suzuki, M., Kawahara, K., Ogawa, A., Morita, T., Kawaguchi, Y.,

- Kurihara, G., Sakai, D. 1990. Ca^{2+} rises via G protein during regulatory volume decrease in rabbit proximal tubule cells. *Am. J. Physiol.* 259:F490-F496.
- Teiguchi, J., Suggins, W.B. 1987. Membrane stretch: a physiological stimulator of Ca^{2+} -activated K^+ channels in secondary thick ascending limb cells. *Am. J. Physiol.* 257:F347-F352.
- Thurston, J.H., Haubart, R.E., Dippo, S.A. 1980. Taurine: A role in osmotic regulation of mammalian brain and possible clinical significance. *Life Sci.* 26:1561-1568.
- Thurston, J.H., Haubart, R.E., Macerato, E.E. 1981. Taurine: Possible role in osmotic regulation of the mammalian heart. *Science* 214:1373-1374.
- Tiedemann, F., Gaelein, L.H. 1937. Einige neue bestandteile der galle des schen. *Ann. Physik. Chem.* 9:326-337.
- Ussing, H.H. 1966. Epithelial cell volume regulation: illustrated by experiments in frog skin. *Renal Physiol.* 9:38-46.
- van Rossum, S.D.V., Russo, M.A. 1981. Ouabain-resistant mechanism of volume control and the ultrastructural organization of liver slices recovering from swelling in vitro. *J. Membrane Biol.* 59:191-209.
- Vislie, T. 1985. Cell volume regulation in fish heart ventricles with special reference to taurine. *Comp. Biochem. Physiol.* 76A:507-514.
- Voigt, H., Lang, F. 1968. Ionic requirement for regulatory cell volume decrease in renal straight proximal tubules. *Pfluegers Arch.* 412:1-7.
- Waiz, W. 1987. Swelling and potassium uptake in cultured astrocytes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65:1051-1057.
- Waiz, W., Hinks, R.C. 1985. Carrier-mediated NaCl accumulation accompanied by water movements is involved in the control of physiological K^+ levels by astrocytes. *Brain Res.* 340:44-51.
- Waiz, W., Kieselberg, H. 1985. Differences in cation transport properties of primary astrocyte cultures from mouse and rat brain. *Brain Res.* 340:333-340.
- Warren, M.K., Pierce, G.K. 1982. Two cell volume regulatory systems in the Limulus myocardium: An interaction of ions and quaternary ammonium compounds. *Biol. Bull.* 163:504-506.
- Wirthensohn, G.E., LeFrank, B., Scholke, M., Guder, W.G. 1989. Regulation of organic osmolyte concentration in tubules from rat renal inner medulla. *Am. J. Physiol.* 256:F122-F135.

Wong, S.H.E., Chase, H.C. 1986. Role of intracellular calcium in cellular volume regulation. *Am. J. Physiol.* 250:C841-C852.

Wong, K.P., Verimian, A.B. 1987. Human platelet diffusional water permeability: measured by nuclear magnetic resonance. *Am. J. Physiol.* 252:C320-C328.

Yancey, P.H. 1985. Osmotic effectors in kidneys of xeric and mesic rodents: corticoadullary distributions and changes with water availability. *J. Comp. Physiol.* B 158:367-390.

APENDICE: TRABAJOS OBJETO DE ESTA TESIS.

TRABAJO I:

"HYPOSMOLARITY-SENSITIVE RELEASE OF TAURINE AND FREE AMINO ACIDS FROM HUMAN LYMPHOCYTES". R. Pasantes-Morales, J. Jesús García y R. Sánchez Olea. *Biochem. Pharmac.* 41:303-307, 1991.

not mediated by known detoxification mechanisms [2]; (ii) the activity is not affected by the multidrug resistance family of proteins with a molecular weight of approximately 170,000 [5]; and (iii) formation of cytotoxic metabolites of FUra such as FdUMP was at least not decreased upon *ras* transformation since cytotoxicity of FUra was the same or even not significantly increased in *c-H-ras* transformed and control cells. It is not yet known whether this newly demonstrated dFUrd activity enhancement can be exploited optimally in *c-H-ras* transformed cells.

It is frequently stated that continuous dFUrd treatment might be more effective than bolus dFUrd [6]. Nude mice bearing NIH 3T3 cells transformed with *ras* and other oncogenes as discussed above offer an interesting model to define optimal treatment with dFUrd. This is especially true for colorectal tumours since *ras* involvement was frequently demonstrated in this tumour type [3] and dFUrd has proven efficacy in the treatment of this tumour. Since activated *ras* oncogenes have also been associated with resistance to cisplatin and to ionizing radiation [4, 10], the present data add to the understanding of the rather unique efficacy of fluoropyrimidines in the treatment of colorectal cancer.

In summary, transformation of NIH 3T3 cells with *c-H-ras* has been demonstrated to result in significantly increased activation of 5'-deoxy-5-fluorouridine and significantly increased cytotoxicity *in vitro* as compared to non-transformed NIH 3T3. FUra cytotoxicity appeared to be increased also *in vitro* upon transformation; the level of significance however was beyond that of accepted significance ($0.05 < P < 0.01$). Furthermore dFUrd proved to be less active *in vivo* in nude mice bearing *v-fos* transformed NIH 3T3 cells than in nude mice bearing *c-H-ras* transformed cells.

Acknowledgements—This work was supported by Saal van Zwabenberg grant SZ 89-92 to E. A. De Bruijn.

Laboratory of Cancer
Research & Clinical
Oncology

University of Antwerp
Universiteitsplein 1 (S-4)
B-2610 Wilrijk
Belgium;

*Affiliated Hospital
Shandong Medical University
Jinan, Shandong Province
P. R. China

YI GENG*
ERIC GHEUGENS
ERNST A. DE BRUIJN†

REFERENCES

1. American Cancer Society. Cancer Statistics. *Cancer J Clin* 36: 16-17, 1986.
2. Klohs WD and Steinkamp RW. Possible link between the intrinsic drug resistance of colon tumors and a detoxification mechanism of intestinal cells. *Cancer Res* 48: 3025-3030, 1988.
3. Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, Van Boom JH, Van der Eb AJ and Vogelstein B. Prevalence of *ras* gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 327: 293-297, 1987.
4. Sklar MD. Increased resistance to cis-diammine-dichloroplatinum (II) in NIH 3T3 cells transformed by *ras* oncogenes. *Cancer Res* 48: 793-797, 1988.
5. Juranka PF, Zastawny RL and Ling V. P-glycoprotein: multidrug-resistance and a superfamily of membrane-associated transport proteins. *FASEB J* 3: 2583-2592, 1989.
6. De Bruijn EA. The pharmacology of 5'-deoxy-5-fluorouridine and its possible role in regional cancer treatment. *Reg Cancer Treat* 2: 61-76, 1989.
7. Southern E. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517, 1975.
8. De Bruijn EA, Van Oosterom AT, Tjaden UR, Reeuwijk HJEM and Pinedo HM. Pharmacology of 5'-deoxy-5-fluorouridine in patients with resistant ovarian cancer. *Cancer Res* 45: 5931-5935, 1985.
9. De Bruijn EA, Leclercq PA, Van Oosterom AT, Tjaden UR, Van de Velde CJH, De Brauw LM and Von Marinelli A. Capillary gas chromatography in cancer research. In: *Eighth International Symposium on Capillary Chromatography* (Ed. Sandra P), pp. 754-763. Hueting, Verlag, Heidelberg, 1987.
10. Sklar MD. The *ras* oncogenes increase the intrinsic resistance of NIH 3T3 cells to ionizing radiation. *Science* 239: 645-647, 1988.

† To whom requests for reprints should be sent at: ArtScience Amsterdam, Galileiplantsoen 113 hs, 1098 LZ Amsterdam, The Netherlands.

Hyposmolarity-sensitive release of taurine and free amino acids from human lymphocytes

(Received 12 December 1989; accepted 1 August 1990)

The ability of human lymphocytes to regulate their volume in anisotonic conditions is well documented [for recent reviews see Refs. 1 and 2]. When exposed to hypotonic media, human lymphocytes show rapid initial swelling followed by a regulatory phase in which cells return to near normal volume. The regulatory volume decrease following osmotic swelling results from the loss of intracellular osmotically active solutes, mainly K^+ and Cl^- . In human lymphocytes these ionic regulatory fluxes occur through separate K^+ and Cl^- pathways [1, 3, 4], whereas in other

cells they are carried by K^+/Cl^- cotransport systems, activated by the osmotic stress [5].

Although the reduction in the amount of intracellular solutes leading to cell volume regulation corresponds largely to the loss of K^+ and Cl^- , some amino compounds also behave as intracellular osmolytes and may contribute to some extent to the regulatory process. The involvement of free amino acids (FAA) in osmoregulation in aquatic vertebrates and invertebrates naturally exposed to fluctuations in external osmolarity is well recognized [6, 7].

Less information exists about a similar role for FAA in mammalian cells although it is known that a number of these cells possess mechanisms for cell volume adjustment. FAA, notably taurine, are released from Ehrlich ascites cells [8], superfused rat brain [9, 10] and cultured astrocytes [11] upon hypotonic stimulation. Human lymphocytes contain high concentrations of taurine, around 35 mM, and other FAA [12, 13], which may contribute as volume regulatory osmolytes. In the present work, changes in FAA content of human lymphocytes in response to hypotonic stress were examined in order to evaluate its involvement in the mechanisms of cell volume adjustment. Properties of the release of [3 H]taurine were also examined to obtain insight into the mechanism of the volume-sensitive release of FAA in human lymphocytes.

Methods

Lymphocyte isolation. Blood was collected from a constant group of human donors, in sterile syringes containing EDTA (10%), and the blood sample was diluted 1:1 with Krebs-bicarbonate medium (KBM) containing (in mM): 118 NaCl, 4.7 KCl, 1.1 KH_2PO_4 , 1.0 CaCl₂, 1.2 MgSO_4 , 25 NaHCO_3 and 5 glucose, pH 7.4, adjusted by bubbling with O_2/CO_2 (95%/5%). Cells were isolated by the procedure of Boyum [14] as follows: 4 mL of diluted blood sample was layered carefully on 3 mL of Hystopaque (Sigma) in 15-mL conical centrifuge plastic tubes, and centrifuged at 400 g for 40 min. The interface containing lymphocytes was separated and washed once with KBM and the pellets were resuspended in KBM. The suspension obtained contained negligible contamination of platelets and polymorphonuclear cells and was free of erythrocytes. Cell viability, estimated by trypan blue exclusion, was about 98%.

Release of [3 H]taurine. Cells were preincubated in KBM containing [3 H]taurine (5 μM final concentration) at 37° for 1 hr. After this loading period, cells were filtered in Millipore filters (0.65 μm pore). For the time-course experiments, filters were transferred to glass superfusion chambers of 0.25 mL and superfused at a flow rate of 0.8 mL/min with KBM at 37°. Fractions of the perfusate were collected at 1-min intervals directly into scintillation vials. After a washing period of 8 min, the baseline efflux was attained and cells were then stimulated for 8 min with media of reduced osmolarity. At the end of the superfusion, radioactivity remaining in cells and that of collected samples was measured by scintillation spectrometry. In other experiments, filters were transferred to vials containing 1 mL of the different experimental media and incubated during 8 min at 37°. At the end of this incubation period, radioactivity was measured in incubation media and filters. Results are expressed as fractional release, i.e. the radioactivity in fractions as percent of total radioactivity in the cells at the start of superfusion or incubation, excluding the washing period. The drugs to be tested were added 15 min before the end of the loading period and were present during all the superfusion or incubation periods. When drugs were dissolved in solvents other than water, controls were exposed to the same concentration of the solvent used.

Determination of endogenous free amino acids. Free amino acids were extracted with 70% ethanol and derivatized with *O*-phthalaldehyde. The amino acid content was determined by reversed phase HPLC in a Beckman chromatographic system, equipped with an Ultrasphere column.

Results and Discussion

The concentration of FAA of human lymphocytes is shown in Table 1. Taurine, with a concentration of 239 nmol/mg protein was the most abundant FAA, confirming previous observations by Fukuda *et al.* [13]. Taurine accounted for more than 65% of the total FAA pool. Other

Table 1. Free amino acid content of human lymphocytes

Amino acid	nmol/mg protein
Glutamic acid	44.5 \pm 0.40
Histidine	7.8 \pm 0.69
Glycine	19.5 \pm 1.5
Taurine	238.7 \pm 7.3
β -Alanine	26.2 \pm 1.6
Alanine	20.2 \pm 2.1
Serine	8.3 \pm 0.5
Valine	2.8 \pm 0.19
Leucine	1.8 \pm 0.09
Isoleucine	2.1 \pm 0.09

FAA content was determined in ethanol extracts by reversed phase HPLC. Results are means \pm SE of 6 separate determinations.

FAA present in lymphocytes included glutamic acid, at a concentration of 44.5 nmol/mg protein, glycine, alanine and β -alanine at concentrations ranging from 20 to 26 nmol/mg protein (Table 1). The cellular volume/mg protein was calculated to be 8.17 μL , considering an average cell volume of 190 μm^3 (0.19 \times 10⁻⁶ μL) [2, 15] and 43 \times 10⁶ cells/mg protein. Accordingly, the concentration of taurine was found to be 27.5 mM, which is within the range reported [12], and that of total FAA was 42.7 mM. These values may be even higher, since the osmotically active water in human lymphocytes corresponds to only 68% of the cellular volume [3].

Upon incubation in media of decreasing osmolarity, the FAA content of cells decreased. Most FAA responded to hypotonicity, but differences were observed in the amount released by cells and in the sensitivity to the stimulus. According to these differences, FAA may be grouped as follows: (1) Taurine, glutamate and histidine were tightly retained by the cells in isotonic conditions but were released in response to reductions in osmolarity, even to small decreases (Fig. 1A). The cellular content of these amino acids decreased 70–90% by reducing osmolarity to 150 mOsmol (Fig. 1A). The largest decrease (almost 90%) was observed for taurine. (2) Glycine, alanine and β -alanine were also strongly retained by cells in isotonic conditions but upon stimulation with hypotonic medium (150 mOsmol), cells still retained 35–40% of their initial content (Fig. 1B). (3) Valine, isoleucine and serine were released in isotonic conditions and were practically unresponsive to hypotonicity (Fig. 1C). Reduction in the intracellular content of FAA was due to an activation of efflux since the decrease in cellular content was quantitatively accounted for by the concentration found in the medium (Fig. 1).

The time-course of taurine release in response to hypotonicity was examined by following the efflux of [3 H]taurine in hypototically stressed cells. Figure 2 shows that decreasing osmolarity to 150 mOsmol resulted in a rapid release of [3 H]taurine which attained a maximum within the first minute (after subtracting the dead space of the superfusion system) and then declined despite the persistence of the stimulus. Reduction in osmolarity was obtained by decreasing the Na^+ concentration of the medium, but it is the hypotonic condition and not the reduction of Na^+ concentration which induces taurine release, since a solution with low Na^+ but made isotonic with sucrose did not elicit the release of [3 H]taurine.

The hypotonicity-sensitive release of [3 H]taurine was unaffected by decreasing the temperature to 15°, but it was reduced by 60% at 4°. This observation suggests that the release of taurine is not energy dependent. The inhibition observed at low temperature may be due to changes in membrane fluidity that may affect diffusional processes.

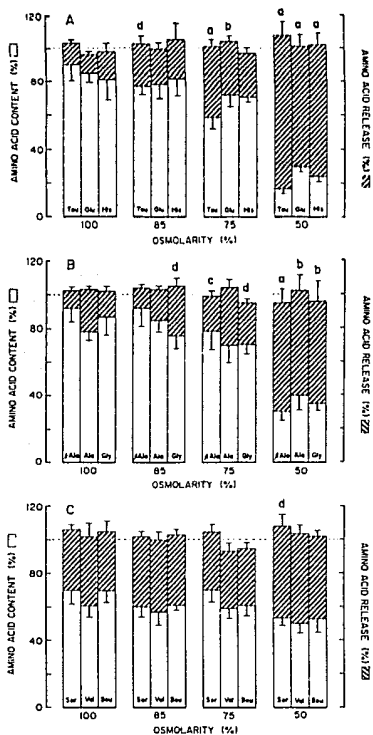


Fig. 1. Effect of decreased osmolarity on FAA content in human lymphocytes. Cells were incubated in isotonic medium (300 mOsmol) or in media of decreased osmolarity: 0.85, 0.7 or 0.5 of the isotonic medium, during 8 min. After incubation, cells were centrifuged and washed, and FAA were extracted with 70% ethanol. FAA content in cell extracts (white bars) or in incubation media (dashed bars) was measured by reversed phase HPLC. Results are expressed as percent change in cells or in incubation media, with respect to the endogenous FAA content in non-incubated cells (100%, broken line). (A) Changes in taurine, and FAA were extracted with 70% ethanol. (B) Changes in β -alanine, alanine and histidine. (C) Changes in valine, serine and isoleucine. Results are the means \pm SE of 4-6 experiments. FAA release in hypotonic media was significantly different from isotonic medium by: * $P < 0.001$; $^{\dagger}P < 0.01$; $^{\ddagger}P < 0.02$; and $^{\S}P < 0.05$.

Volume regulation in human lymphocytes is associated with losses of cellular K^+ and Cl^- [4, 5]. The change in K^+ efflux activated by hypotonicity seems to be conductive at least in part [4, 5]. K^+ fluxes associated with cell swelling are inhibited by antagonists of Ca^{2+} -dependent K^+ channels

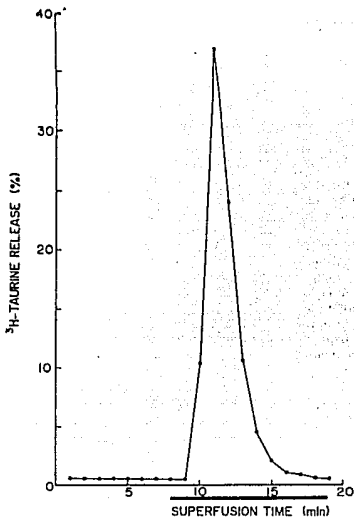


Fig. 2. Time-course of [3H]taurine release stimulated by decreased osmolarity. Loading and release conditions were as described in Methods. During the time indicated by the bar, the superfusion medium (isotonic) was replaced by a hypotonic medium (150 mOsmol, 35 mM NaCl). Results are expressed as fractional release as defined in Methods. The graph corresponds to a representative experiment from a total of 4.

such as quinine, tetraethylammonium and 4-aminopyridine, and by agents interfering with the Ca^{2+} -calmodulin system like chlorpromazine and trifluoperazine [1, 3, 4]. The volume-induced increase in Cl^- efflux occurs simultaneously but independently of the K^+ fluxes. Cl^- conductances associated with volume changes in human lymphocytes is blocked by dipyrindamol and by the disulfonic stilbene derivatives 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) and 4-acetamido-4'-isothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (SITS) [4]. To investigate whether the hypotonicity-induced release of FAA was associated with the ionic fluxes activated by swelling, the effects of quinidine, barium, tetraethylammonium (TEA) and gadolinium on the release of [3H]taurine were examined. The concentrations used were those reported to inhibit ionic fluxes [1, 3, 4], i.e. 75 μ M quinidine, 15 mM barium, and 15 mM tetraethylammonium. Gadolinium was used at concentrations of 10 and 100 μ M. None of these compounds modified taurine efflux (Table 2). Higher concentrations, particularly those of quinidine, were toxic to cells. DIDS showed an inhibitory effect on the hypotonicity-sensitive release of taurine. The effect of DIDS was examined on the release of labeled as well as of endogenous taurine due to some quenching produced by DIDS at high concentrations in the experimental procedure used for measuring radioactivity. The inhibitory effect of DIDS was concentration dependent, with a maximal inhibition of about 40% at 200 μ M (Fig. 3). Inhibition close to

Table 2. Effect of omission of Na⁺ or Cl⁻ and of inhibitors of ionic fluxes on the release of [³H]taurine evoked by hyposmolarity

Conditions	[³ H]Taurine release (%)	
	Isosmotic	Hyposmotic
Control	6.1 ± 0.8	72.7 ± 6.2
Na ⁺ -free	5.9 ± 0.3	71.0 ± 5.8
Cl ⁻ -free	5.0 ± 0.1	67.9 ± 1.7
TEA, 15 mM	6.4 ± 0.3	69.7 ± 5.9
Barium, 15 mM	7.0 ± 0.8	71.0 ± 3.5
Quinidine, 75 μM	5.1 ± 0.9	73.7 ± 2.1
Gadolinium, 10 μM	6.8 ± 0.7	71.7 ± 2.9

Cells were loaded with [³H]taurine and incubated as described in Methods, with isosmotic medium or with a medium of reduced osmolarity (150 mOsmol). The ionic composition was modified in both, isosmotic and hyposmotic media. Na⁺ and Cl⁻ in the experimental solutions were replaced by the corresponding salts of choline and gluconate. Drugs were present during the last 15 min of the loading period and in media during all incubation periods. When solvents other than water were used, controls were exposed to the same amount of solvent. Results are expressed as fractional release (%) and are the means ± SE of 4–12 experiments.

maximal was observed in the presence of 50–100 μM DIDS. A noticeable inhibition was observed at 10 μM DIDS (Fig. 3). The inhibition of DIDS increased in a Cl⁻-free medium. No effect on the release of [³H]taurine was observed in the presence of pimoide (10 μM) or trifluoperazine (10 μM) (results not shown). All these observations suggest that the hyposmolarity-sensitive release of FAA occurs independently of the ionic fluxes activated during the volume regulatory process and of Ca²⁺-mediated transduction reactions. In further support to this notion is the observation that activating K⁺-fluxes in isosmotic conditions by A23187 did not elicit [³H]taurine release (results not shown). It has been observed in human lymphocytes that K⁺-fluxes in isotonic conditions are activated in the presence of the ionophore [3].

The mechanism responsible for the release of FAA in response to hyposmolarity is unclear at present. The hyposmolarity-sensitive efflux may result from a stimulation of the Na⁺-dependent, carrier-mediated transport system for amino acids or from an activation of leak pathways. To investigate whether taurine efflux might occur through the carrier transport system working outwards, the effect of removal of external Na⁺ was examined on the spontaneous and the hyposmolarity-sensitive release of taurine. Under these conditions a Na⁺ gradient inside > outside is imposed, which should drive taurine efflux in that direction. Also, evidence of the ability of the carrier to operate transporting intracellular taurine to the extracellular space was tested by measuring in an isosmotic medium the release of [³H]taurine upon increasing the concentration of extracellular unlabeled taurine. Results of these experiments showed that neither the spontaneous nor the hyposmolarity-sensitive release of [³H]taurine were affected by Na⁺ omission (Table 2). Also, the efflux of previously accumulated [³H]taurine was not activated by hemoexchange (results not shown). These results argue against the involvement of the Na⁺-dependent carrier on the swelling-associated release of taurine. Moreover, the insen-

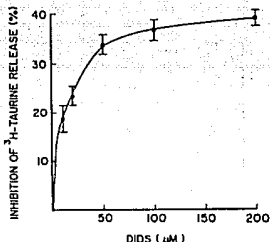


Fig. 3. Effect of DIDS on the hyposmolarity-sensitive release of endogenous taurine. Lymphocytes obtained as described in Methods were incubated in isosmotic medium containing the concentration of DIDS indicated for each point for 30 min. After this time, cells were incubated for 8 min in hyposmotic medium (0.75 osmolarity) containing the same concentration of DIDS as in the isosmotic medium. Controls were incubated in isosmotic and hyposmotic media without DIDS. Taurine released to the incubation medium and that remaining in cells at the end of the experiment was measured by HPLC. Results are expressed as percent inhibition of taurine released by hyposmotic medium in the absence of DIDS. Results are mean ± SE of 3–8 experiments.

sitivity of taurine release to decreases in temperature supports this conclusion since the temperature-dependence of the taurine carrier is well established [16].

Results of the present study indirectly suggest that FAA, particularly taurine, participate in volume regulatory processes in human lymphocytes. As compared to ionic osmolytes, the contribution of FAA may be relatively small, since 60%, on the average, of a total FAA pool of about 43 mM leaves the cell in response to large decreases in osmolarity (150 mOsmol). Lymphocytes, as many other cells, have an anionic deficit with respect to cation concentration. The potassium concentration in human lymphocytes is about 140–170 mM [3, 17], whereas the Cl⁻ content of cells is much lower. There are large discrepancies in the values reported for intracellular Cl⁻ in lymphocytes, varying from 30 to 90 mM [3, 18, 19]. Moreover, the free cytoplasmic concentration of Cl⁻ may be significantly different from the total cellular concentration reported, since compartmentation is suggested by the several components observed in the kinetics of Cl⁻ efflux [19]. These observations suggest that not all Cl⁻ in the cell may be available for volume regulation. In these conditions the contribution of non-electrolyte solutes, especially FAA, may be important to compensate for the ionic deficit.

In summary, this study has shown that human lymphocytes possess a hyposmolarity-sensitive release of FAA, particularly of the most abundant one, taurine. This release may contribute to the volume regulatory decrease in lymphocytes.

Acknowledgements—This research was supported by grants from PRDCyT from the Organization of American States and CoNaCyT (Mexico) and from the Programa Universitario de Investigación en Salud (UNAM).

Institute of Cell Physiology HERMINIA PASANTES-MORALES*
National A. University of MORALES*
Mexico JOSÉ DE JESÚS GARCÍA
Mexico City, Mexico ROBERTO SÁNCHEZ OLEA

* Correspondence: Dr. Herminia Pasantes-Morales, Instituto de Fisiología Celular, Apartado Postal 70-600, 04510 México D.F.

REFERENCES

- Grinstein S and Dixon J, Ion transport, membrane potential, and cytoplasmic pH in lymphocytes: Changes during activation. *Physiol Rev* 69: 417-481, 1989.
- Deutsch C and Lee SC, Cell volume regulation in lymphocytes. *Renal Physiol Biochem* 11: 260-276, 1988.
- Grinstein S, DuPré A and Rothstein A, Volume regulation by human lymphocytes: Role of calcium. *J Gen Physiol* 79: 849-868, 1982.
- Grinstein S, Rothstein A, Sarkadi B and Gelfand EW, Responses of lymphocytes to anisotonic media: Volume-regulating behavior. *Am J Physiol* 246: C204-C215, 1984.
- Hofmann EK, Anion transport systems in the plasma membrane of vertebrate cells. *Biochim Biophys Acta* 864: 1-31, 1986.
- Clarke ME, Non-Donnan effects of organic osmolytes in cell volume changes. *Curr Top Membr Transp* 30: 251-271, 1987.
- Gilles R, Volume regulation in cells of euryhaline invertebrates. *Curr Top Membr Transp* 30: 205-207, 1987.
- Hoffman EK and Lambert III, Amino acid transport and cell volume regulation in Ehrlich ascites tumour cells. *J Physiol (Lond)* 338: 613-625, 1983.
- Wade JV, Olson JP, Samson FE, Nelson SR and Pazdernik TL, A possible role for taurine in osmotic regulation within the brain. *J Neurochem* 45: 335-344, 1988.
- Solis JM, Herranz AS, Herreras O, Lerma J and Martin del Rio R, Does taurine act as an osmoregulatory substance in the rat brain? *Neurosci Lett* 91: 53-58, 1988.
- Panantz-Morales H and Scheuaboe A, Volume regulation in astrocytes: A role for taurine as an osmoeffector. *J Neurosci Res* 20: 505-509, 1988.
- Jacobsen JG and Smith LH, Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. *Physiol Rev* 48: 424-511, 1968.
- Fukuda K, Hirai Y, Yoshida H, Nakajima T and Usui T, Free amino acid content of lymphocytes and granulocytes compared. *Clin Chem* 28: 1758-1761, 1982.
- Boyum A, Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 21: 77-83, 1968.
- Sarkadi B, Mack E and Rothstein A, Ionic events during the volume response of human peripheral blood lymphocytes to hypotonic media. II. Volume- and time-dependent activation and inactivation of ion transport pathways. *J Gen Physiol* 83: 513-527, 1984.
- Tallan HH, Jacobson E, Wright CE, Schneiderman K and Gault GE, Taurine uptake by cultured human lymphoblastoid cells. *Life Sci* 33: 1853-1860, 1983.
- Negendank W, Studies of ions and water in human lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 694: 123-161, 1982.
- Felber SM and Brand MD, Factors determining the plasma-membrane potential of lymphocytes. *Biochem J* 204: 577-585, 1982.
- Negendank W, The permeability of human lymphocytes to chloride. *Biochem Biophys Res Commun* 122: 522-528, 1984.

Cholesteryl-succinyl-N-hydroxysuccinimide as a cross-linking agent for the attachment of protein to liposomes

(Received 17 April 1989; accepted 30 August 1990)

Immunoglobulin-coated liposomes containing drugs have been examined (i) for their ability to specifically interact with cognate surface antigen on tumour cells and (ii) for targeting to tumours in animals [1]. Antibody coated liposomes have been prepared by Hashimoto *et al.* [1] who incorporated *N*-(*m*-maleimido benzoyl) dipalmitoyl-phosphatidyl ethanolamine into liposomes which were then reacted with immunoglobulin. Covalent attachment occurs via protein sulphhydryl-SH groups to the maleimido area of the modified phospholipid. Attachment of immunoglobulins has also been achieved through a disulphide sulphhydryl group exchange reaction using liposomes containing dipalmitoyl phosphatidyl-ethanolamine-3-(2-pyridyldithio) propionate [2]. Less-specific cross-linking procedures have made use of the coupling reagents toluene-2,4-diisocyanate and 1-ethyl-3-(dimethylaminopropyl) carbodiimide [3, 4].

In the present communication we describe an alternative procedure for attaching proteins and amino group-containing molecules to liposomes. The method makes use of cholesteryl-succinyl-*N*-hydroxysuccinimide incorporated into membrane structures of liposomes (Fig. 1). The resulting liposomes were found to be capable of interacting with amino group-containing substances to give molecules covalently attached to the surface.

Materials and Methods

Chemicals. Cholesteryl hemisuccinate, *N*-hydroxysuccinimide and *N,N'*-dicyclohexyl carbodiimide were purchased from the Sigma Chemical Co., Pool, U.K.). [³H]Puromycin (5 Ci/mmol) was supplied by Amersham (Bucks, U.K.). All other reagents were of analytical grade.

Preparation of cholesteryl hemisuccinyl-*N*-hydroxysuccinimide (Fig. 1). Cholesteryl hemisuccinate (97.4 mg, 0.2 mmol) and *N*-hydroxysuccinimide (25.3 mg, 0.02 mmol) were dissolved in 1 mL of dioxane. To this solution was added *N,N'*-dicyclohexyl carbodiimide (41.3 mg, 0.2 mmol) dissolved in 0.3 mL dioxane. The reaction mixture was allowed to stand at room temperature overnight. Dicyclohexylurea was removed by filtration and the clear filtrate taken to dryness at 37° under vacuum. The residue was taken up in 2 mL dioxane and allowed to stand at room temperature for 2 hr until no further crystallization of dicyclohexylurea occurred. Following filtration the final solution was concentrated to dryness and the residue recrystallized from isopropanol. m.p. 151-152°. Chromatography on silica gel 60F₂₅₄ TLC plates developed in CHCl₃:methanol (9:1, v/v) gave a single spot (hydroxylamine/FeCl₃ for active ester and 1% HClO₄ with

TRABAJO II:

"TAURINE RELEASE ASSOCIATED TO VOLUME REGULATION IN RABBIT LYMPHOCYTES", J. Jesús García, R. Sánchez Olea y H. Pasantes-Morales. J. Cell. Biochem. 45:1-6, 1990.

11

ARTICLES

Taurine Release Associated to Volume Regulation in Rabbit Lymphocytes

J. Jesús García, R. Sánchez Olea, and H. Pasantes-Morales

Institute of Cell Physiology, National A. University of Mexico, 04510 México D.F., Mexico

Rev. Sci. Quim., M.S. 1

Abstract Rabbit lymphocytes exposed to hypotonic media first swell and then recover their initial volume within 6 min. During volume recovery, free amino acids (FAA) decrease from 451.1 to 208 nmoles/mg protein. Taurine was the dominating FAA, accounting for 70% of the FAA pool. The time course of ³H-taurine release induced by hypotonicity followed that of volume recovery. Efflux of ³H-taurine in an 8 min period was 17.8% (of total labeled taurine accumulated during loading) in an isosmotic medium. Reducing osmolarity to 0.87, 0.75, 0.62, and 0.5 increased this release to 24.8%, 38.1%, 56.4% and 70.9%, respectively. The volume-sensitive release of ³H-taurine was unaffected by omission of external Na⁺ or Ca²⁺ and was reduced by 23% in the absence of Cl⁻. It was unaffected by agents disrupting the cytoskeleton or by tetraethylammonium, barium, quinidine, and gadolinium, but was 26% reduced by DIDS. Taurine release was inhibited at 4°C, but was unchanged at 15°C or 25°C. An involvement of FAA, particularly taurine, in lymphocyte volume regulation is suggested.

Key words: hypotonicity, swelling, free amino acids, DIDS

Rev. Sci. Quim., M.S. 3

Cell volume regulation is a process described in several animal cell types exposed to anisotonic media [1,2]. In hypotonic conditions, cells rapidly swell because of their high permeability to water. Swelling is followed by a slower recovery phase in which cells return to near-normal volume. This process is known as regulatory volume decrease (RVD) and is mediated by a reduction in the internal solute content. Volume regulation has been observed in epithelial cells [3,6], red blood cells [7,8], Ehrlich ascites tumor cells, astrocytes [10,11], and human lymphocytes [12]. In vertebrate cells, the RVD is mainly supported by a net loss of intracellular K⁺ and Cl⁻ [8,12,13]. In blood cells of euryhaline invertebrates and fishes, free amino acids (FAA), particularly taurine, also contribute to the regulatory process [14-16]. This occurs through the activation of amino acid efflux, thus reducing the osmotic gradient. In mammalian cells, the involvement of taurine and free amino acids in volume adjustment has been described in bird erythrocytes [17], Ehrlich ascites cells [9], and cultured MDCK cells [18] and astrocytes [19]. Mammalian lymphocytes contain large amounts of taurine, in the millimolar range [20,21], and also possess the ability to regulate cell volume

[22,23]. In order to investigate whether taurine and other FAA participate in the process of volume regulation in lymphocytes, in the present work, the release of taurine and FAA in response to decreases in external osmolarity was examined in rabbit lymphocytes.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Solutions

A23187, DIDS, quinidine, tetraethylammonium, furosemide, colchicine, and cytochalasin B were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). Bumetanide was a gift from Leo Laboratories, Denmark.

Krebs-bicarbonate medium contained (in mM) NaCl 118, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.17, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 25, and glucose 10, pH 7.4, adjusted by bubbling with O₂/CO₂ (95%:5%). Solutions with decreased osmolarity were prepared by reducing the concentration of NaCl without modifying the concentration of other solutes, as follows: 100% osmolarity, NaCl 118 mM; 75% osmolarity, NaCl 79 mM; 62.5% osmolarity, NaCl 57.5 mM; 50% osmolarity, NaCl, 38.5 mM. Drugs were dissolved in water (boiling water for quinidine), except bumetanide and A23187, which were dissolved in ethanol and cytochalasin B, in dimethylsulfoxide.

Received February 28, 1990 accepted September 1, 1990.

Lymphocyte Isolation

Lymphocytes were obtained from adult albino rabbits (2–3 kg weight). A constant population of rabbits was used through all the experiments. The procedure of Boyum [24] was used for isolation of lymphocytes. Peripheral blood was obtained by cardiac puncture with sterile syringes containing 10% EDTA. The blood sample (20 ml) was diluted 1:1 with Krebs-bicarbonate medium, and 4 ml of this dilution was carefully layered on 3 ml of Hystopaque (Sigma) in conical centrifuge tubes of 15 ml. After centrifugation at 400g for 40 min, the interphase containing lymphocytes was separated, washed once, and resuspended in Krebs-bicarbonate medium. This preparation contained negligible contamination of platelets and polymorphonuclear cells and was free of erythrocytes. Cell viability, estimated by trypan blue exclusion, was about 98%.

Cell Volume Measurements

Cell volume changes were followed by changes in the optical properties of the lymphocyte suspension incubated in media of different osmolarity. Absorbance at 700 nm was measured in a double-beam spectrometer equipped with a magnetic stirrer and temperature controller. A cell suspension in Krebs-bicarbonate medium was diluted with water to obtain the desired osmolarity in 1 ml final volume. Changes in absorbance were followed during 10 min at 37°C. Except as otherwise indicated, volume measurements were carried out in a calcium-free medium to avoid cell aggregation. Volume regulation is unaffected under these conditions [12].

Release of ³H-Taurine

For release experiments, cells were preincubated in a Krebs-bicarbonate medium containing ³H-taurine (5 μM, 2 μCi/650 μl) at 37°C. After this loading period, cells were filtered in Millipore filters (0.65 μm pore). Filters were then transferred to glass superfusion chambers of 0.25 ml and superfused at a flow rate of 0.8 ml/min with Krebs-bicarbonate medium at 37°C. Fractions of the perfusate were collected at 1 min intervals directly into scintillation vials. After a washing period of 18 min, the baseline efflux was attained and cells were then stimulated during 8 min with media of reduced osmolarity. At the end of the superfusion, radioactivity remaining in cells and that of collected samples was measured by scintillation spectrom-

etry. Results were expressed as fractional release, i.e., the radioactivity in fractions as percent of total radioactivity in the cells at the start of the superfusion, excluding the washing period. In some experiments, filters were transferred to vials containing 1 ml of the different experimental media and incubated during 8 min at 37°C. No difference was found between results of these two experimental procedures. Except when otherwise indicated, the tested drugs were added at the end of the loading period (15 min) and were present during the whole superfusion period. When drugs were dissolved in a solvent other than water, controls were exposed to the same concentration of the solvent used. Cell viability was examined in all experiments with drugs.

Determination of Endogenous Amino Acids

The FAA content of lymphocytes exposed to media of different osmolarity and FAA released by hyposmotic conditions were determined by reversed-phase HPLC in a Beckman chromatograph equipped with an Ultrasphere column. FAA from cells were extracted with 70% ethanol and derivatized with *O*-phthalaldehyde. FAA in the superfusate were measured directly after derivatization.

RESULTS

Lymphocytes exposed to a medium with reduced osmolarity (159 m Osmoles) rapidly swell, reaching the highest volume within 30 s. Then the volume decreased and almost recovered the initial value after 6 min (Fig. 1).

Decreasing osmolarity of the superfusion medium resulted in a massive release of ³H-taurine accumulated by cells during the loading period. The fractional release of ³H-taurine that in isosmotic conditions corresponded to 17.8% in 8 min increased to 70.9% in the same period upon exposure to a medium with 50% reduction in osmolarity. The time course of the release process is shown in Figure 2. The peak release was attained within the first minute, after subtracting the dead space of the superfusion system, and then the efflux declined to reach prestimulation values, despite the persistence of the hyposmotic conditions. A medium containing the reduced amount of NaCl was required to decrease osmolarity, but when made isosmotic with sucrose, was unable to stimulate ³H-taurine release (Fig. 2).

(1)

Fig. 2 and reaction 2

(2)

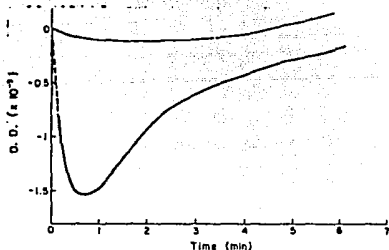


Fig. 1. Regulatory volume decrease in rabbit lymphocytes. Cells were suspended in Isosmotic Krebs medium (upper line) or in hypotonic (0.5) solution (lower line). Changes in absorbance were followed as described in Materials and Methods. Results correspond to a representative experiment from four separate experiments.

The efflux of ^3H -taurine from lymphocytes was clearly associated to reductions in osmolarity. The fractional release of ^3H -taurine in media of 318, 270, 238, 197, and 159 Osmoles corresponded to 17.8%, 24.8%, 38.1%, 56.4%, and 70.9% of total accumulated ^3H -taurine, respectively (Fig. 3).

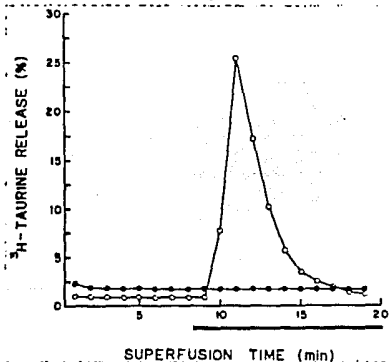


Fig. 2. The time course of ^3H -taurine release stimulated by decreased osmolarity. Loading and release conditions are as described in Materials and Methods. During the time indicated by the bar, the superfusion medium (isosmotic) was replaced by a hypotonic medium (O), (159 mosmoles, 38.5 mM NaCl) or by a medium with reduced NaCl but made isosmotic with sucrose (●). Results are expressed as fractional release as described in Materials and Methods. Results are means of 4-6 separate experiments. S.E.M. range 2%-13%.

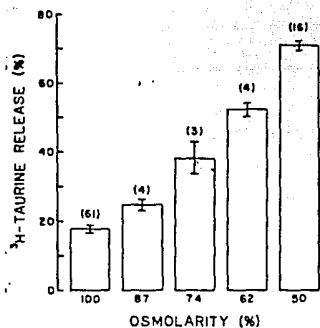


Fig. 3. The effect of decreasing osmolarity on ^3H -taurine release from rabbit lymphocytes. Cells were loaded with ^3H -taurine and superfused with solutions of decreasing osmolarities as indicated. Bars correspond to the release (%) during 8 min of superfusion. Results are means \pm S.E.M. of the number of experiments indicated in parentheses.

The efflux of ^3H -taurine stimulated by reduction in osmolarity was unaffected when NaCl was omitted from the superfusion medium and replaced by choline chloride. The osmotically induced ^3H -taurine release was significantly reduced (30%) by replacing chloride with the impermeant anion gluconate. Removal of external calcium had no effect on the osmolarity-sensitive release of taurine (Table I).

The release of ^3H -taurine evoked by hyposmolarity was independent of pH in the range of 6.0-7.8. Taurine release induced by hyposmotic conditions examined at temperatures of 15°C

Table I. Effect of Replacing External Ions on the Release of ^3H -Taurine Evoked by Hyposmolarity

Conditions	^3H -taurine Release (%)	
	Isosmotic	Hyposmotic
Control	9.08 \pm 0.82 (38)	68.0 \pm 7.17 (38)
Na ⁺ -free	6.02 \pm 1.3 (4)	72.5 \pm 2.5 (4)
Cl ⁻ -free	5.70 \pm 1.31 (10)	52.5 \pm 4.58 (6)
Ca ²⁺ -free	8.40 \pm 2.0 (3)	72.7 \pm 0.46 (3)

Cells were loaded with ^3H -taurine and superfused as described in Materials and Methods with isosmotic medium or with a medium of reduced osmolarity (0.5). The ionic composition was modified in both isosmotic and hyposmotic media. Na⁺ and Cl⁻ in the experimental solutions were replaced by the corresponding salts of choline and gluconate. Calcium-free medium contains no calcium and 200 μM EGTA. Results are means \pm S.E.M. of the number of experiments indicated in parentheses.

Ann. Soc. Exptl. Med. 14

Table II. Effect of Inhibitors of Ionic Fluxes and Other Compounds on ³H-Taurine Release Stimulated by Hyposmolarity

Drug	Concentration	³ H-taurine Release (%)	
		Isoosmotic	Hyposmotic
Control		9.1 ± 0.8	68.0 ± 7.1
TEA	15 mM	5.4 ± 1.0	74.3 ± 0.1
Barium	15 mM	10.3 ± 0.8	67.1 ± 0.4
Gadolinium	10 μM	3.3 ± 0.3	69.6 ± 3.4
DIDS	100 μM	10.5 ± 2.6	50.2 ± 1.4
Quinidine	75 μM	9.2 ± 1.6	66.1 ± 12.0
Bumetanide	20 μM	8.8 ± 0.8	69.4 ± 4.8
	100 μM	10.9 ± 0.8	65.7 ± 3.0
Furosemide	1 μM	9.2 ± 0.4	66.3 ± 5.9
Pimozide	3 μM	8.5 ± 1.5	69.2 ± 5.2
Trifluoperazine	10 μM	9.8 ± 0.8	64.6 ± 12.1
Colchicine	0.5 mM	16.0 ± 3.0	69.5 ± 3.0
Cytochalasin B	10 μM	6.3 ± 1.3	68.5 ± 2.1

Cells were incubated with the drugs during 15 min at the end of the loading period and in the media during the whole superfusion period. When solvents other than water were used, controls were exposed to the same amount of solvent. Results are means ± S.E.M. of 3-38 experiments.

and 25°C was not different from that observed at 37°C. At 4°C, the volume-sensitive release of taurine was markedly inhibited to only 20% of control at 37°C (results not shown).

The influence of the cytoskeleton on the volume-sensitive release of ³H-taurine was examined by exposing cells to colchicine (0.5 mM) or cytochalasin B (10 μM). None of these drugs affected ³H-taurine efflux (Table II).

The effects of compounds affecting ionic fluxes activated during the regulatory volume process on the release of ³H-taurine evoked by hyposmolarity were examined in order to investigate a possible link between these two processes. Table I shows that the inhibitors of K⁺/Cl⁻ cotransport furosemide and bumetanide had no effect on the volume-sensitive release of ³H-taurine. From inhibitors of Cl⁻ channels, DIDS (100 μM) reduced ³H-taurine release by 26%, whereas gadolinium had no effect. The K⁺ channel blockers, tetraethylammonium (TEA), barium, and quinidine all failed to modify ³H-taurine release (Table II). In complementary experiments, potassium channels were activated in isoosmotic conditions by increasing intracellular calcium concentration with the ionophore A23187 [12]. Taurine release was not stimulated under these conditions (results not shown). Pimozide and trifluoperazine did not affect ³H-taurine release.

Table III. Effect of Decreased Osmolarity on FAA Content of Rabbit Lymphocytes

Amino acid	Concentration (nmoles/mg protein)	
	Isoosmotic	Hyposmotic ^a
Taurine	314.8 ± 26.3	134.6 ± 25.4
Glycine	22.9 ± 1.9	10.4 ± 1.0
β-Alanine	77.2 ± 4.2	39.0 ± 1.6
α-Alanine	12.2 ± 1.4	7.7 ± 0.5
Glutamic acid	8.2 ± 2.6	3.6 ± 0.4
Serine	7.0 ± 1.0	4.9 ± 0.7
Valine	4.6 ± 1.5	4.1 ± 0.9
Phenylalanine	2.6 ± 0.6	2.5 ± 0.3
Histidine	1.6 ± 0.4	1.2 ± 0.1

^aCells were incubated in isoosmotic medium or in medium with reduced osmolarity (50%) at 37°C during 8 min. After incubation, cells were centrifuged and washed and FAA extracted with 70% ethanol. FAA content was measured by reversed-phase HPLC. Results are means ± S.E.M. of four separate experiments.

Taurine was the most abundant free amino acid in rabbit lymphocytes and accounts for 70% of the total FAA pool (Table III). Other components of the FAA pool include glutamic acid, glycine, serine, α- and β-alanine, and histidine (Table III). Following stimulation with a hyposmolar medium, taurine content in cells fell from 314.8 to 134.6 nmoles/mg, i.e., a reduction of more than 58% (Table III). Similar decreases were observed in the intracellular concentration of glycine, glutamate, and β-alanine, whereas the concentration of α-alanine, serine, and histidine decreased only by 37%, 30%, and 13%, respectively. The concentration of valine, phenylalanine, and other non-identified FAA was unaffected by decreases in osmolarity (Table III). The concentration of FAA and taurine found in the extracellular medium after the hyposmotic stimulus was practically equivalent to that lost from the cellular pool.

DISCUSSION

Results of the present study showed that rabbit lymphocytes possess the mechanisms for cell volume regulation that have been described in other blood cells, including human lymphocytes [12,23]. Cell swelling in rabbit lymphocytes exposed to hyposmotic conditions is very rapid, and volume restoration is also rapid, somewhat faster than in human lymphocytes. Rabbit lymphocytes respond to the hyposmotic challenge by a massive release of FAA, particularly tau-

rine, which is the predominant component of the FAA pool. The time course of taurine release closely follows that of the volume regulatory process. The magnitude of taurine release is proportional to the intensity of the stimulus and is quite sensitive, responding to small changes in osmolarity.

In most cells with the ability for volume adjustment, a loss of K^+ and Cl^- largely contributes to cell volume recovery in response to hyposmolar stimulus [1,13]. As previously mentioned, in many cells of marine invertebrates and vertebrates and in avian and mammalian tissues, FAA contribute also to the volume regulatory process. A possible link between the volume-sensitive release of FAA and the ionic fluxes activated by hyposmolarity has not been investigated. The results of the present study suggest that FAA efflux and K^+ conductance associated to volume recovery are unconnected events since anyone of the blockers of K^+ fluxes affected FAA release. The complementary observation that activating K^+ fluxes in isosmotic conditions did not elicit FAA release further supports this notion. A possible connection between Cl^- movements and FAA efflux is suggested by the inhibitory effect of DIDS, a blocker of Cl^- channels, and of the omission of Cl^- , on the volume-sensitive release of taurine. Taurine release evoked by hyposmolarity in rabbit lymphocytes seems unrelated to intracellular calcium concentration or to calcium-dependent transduction mechanisms. This is in contrast to that observed in Ehrlich ascites tumor cells, in which release of FAA stimulated by hyposmolarity is inhibited by anticalmodulin drugs [25].

The mechanism of taurine and FAA release associated with volume regulation is still unclear. Taurine, as many amino acids, enters the cell by a Na^+ -dependent, energy-mediated, specific, and saturable transport system. This mechanism apparently is not involved in the release of taurine evoked by hyposmolarity since taurine efflux is not affected by removal of Na^+ and the release of endogenous taurine is not stimulated by an increase in external taurine concentration ([25,26] and the present results). In flounder and eel red cells, a Na^+ -independent, non-saturable process of taurine accumulation is highly activated in hyposmolar conditions. These observations suggest that a simple leak pathway, independent of the saturable uptake system, is responsible for the net loss of taurine during the regulatory volume decrease. This

seems to be the mechanism also in rabbit lymphocytes as suggested by the Na^+ and temperature independence of the taurine release process. The inhibitory effect of very low temperatures on the volume-sensitive efflux of taurine may be due to changes in the fluidity of membrane constituents that could affect diffusional processes.

FAA and taurine contribute only a minor fraction to volume restoration in hypotonically swollen lymphocytes since the loss of FAA is 54% of an endogenous pool of approximately 45 mM. It has been assumed that in human lymphocytes K^+ and Cl^- are the only osmotically active solutes involved in volume regulation [27], but the present observations on the magnitude and the temporal course of taurine release in hyposmotically challenged rabbit lymphocytes suggest a contribution, although modest, of this organic compound to the regulatory process. Early observations of Hoffmann and Handel [28] have also pointed to the involvement of FAA, particularly taurine and glycine, in volume regulation in Ehrlich ascites cells. Moreover, Deutsch and Lee [23] have stressed the requirement of an efflux of osmolytes other than K^+ and Cl^- to underlie regulatory volume decreases in lymphocytes, particularly in conditions of large reductions in osmolarity. This consideration is based on the amount of chloride [Cl^-], in lymphocytes being entirely exhausted under conditions of large decreases in osmolarity in which, however, a regulatory volume decrease still occurs. Taurine and other FAA may then contribute to cell volume adjustment in these stringent situations.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported in part by grants PCALCNA 050281 (CoNaCyT) and PRDCyT (OEA). The authors wish to thank the help provided by Ms. Claudia Diaz in the initial part of this study.

REFERENCES

1. Lauf PK: *J Membr Biol* 88:1-13, 1985.
2. Macknight AD: *Renal Physiol Biochem* 3-5:114-141, 1988.
3. Spring KR, Ericson AC: *J Membr Biol* 69:167-176, 1982.
4. Ussing HH: *Acta Physiol Scand* 114:363-369, 1982.
5. Spring KR: *Fed Proc* 44:2528-2529, 1985.
6. Beck FK, Dörge A, Thurau K: *Renal Physiol Biochem* 6:174-186, 1988.
7. Kroganow FM: *Annu Rev Physiol* 43:493-505, 1981.
8. Cala PM: *Mol Physiol* 4:83-82, 1983.

9. Hoffmann EK, Lambert IH, Simonsen LO: Renal Physiol Biochem 3-5:221-247, 1988.
10. Olson J, Holtzman D: Brain Res 246:273-279, 1982.
11. Kimelberg HK, Frangakis MV: Brain Res 361:125-134, 1985.
12. Grinstein S, Dupré A, Rothstein A: J Gen Physiol 79: 849-868, 1982.
13. Eveloff SL, Warnock DG: Am J Physiol 252:F1-F10, 1987.
14. Pierce SK, Greenberg MJ: J Exp Biol 67:681-692, 1972.
15. Fincham DA, Wolowyk MW, Young JD: J Membr Biol 96:45-56, 1987.
16. Fugelli K, Thoroeed SM: J Physiol 374:245-261, 1986.
17. Shihabi ZK, Goodman HO, Holmes RP, O'Connor ML: Comp Biochem Physiol 92A:545-549, 1989.
18. Roy G, Sauvé R: J Membr Biol 100:83-96, 1987.
19. Pasantes-Morales H, Schouboe A: J Neurosci Res 20: 505-509, 1988.
20. Fukuda K, Hirai Y, Yoshida H, Nakajima T, Ugai T: Clin Chem 28:1758-176, 1982.
21. Vinton NE, Laidlaw SA, Ament ME, Kopple JD: J Clin Nutr 44:398-404, 1986.
22. Grinstein S, Rothstein A, Sarkadi B, Gelfand EW: Am J Physiol 246:204-215, 1984.
23. Deutch C, Lee SC: Renal Physiol Biochem 3-5:260-276, 1988.
24. Boyum A: Scand J Clin Lab Invest 21:77-83, 1968.
25. Lambert IH: Mol Physiol 7:323-332, 1985.
26. Lambert IH: Mol Physiol 6:233-246, 1984.
27. Grinstein S, Dixon J: Physiol Rev 69:417-481, 1989.
28. Hoffmann EK, Handel KB: J Comp Physiol 108:279-286, 1976.

Al: Same just 11, m 5, 17

TRABAJO III:

"OSMOLARITY-SENSITIVE RELEASE OF FREE AMINO ACIDS FROM CULTURED KIDNEY CELLS (MDCK)", R. Sánchez Olea, H. Pasantes-Morales, A. Lázaro y M. Carejido. J. Membrane Biol. 1991.

Osmolarity-Sensitive Release of Free Amino Acids from Cultured Kidney Cells (MDCK)

R. Sánchez Olea, H. Pasantes-Morales, A. Lázaro†, and M. Cerejido†

Institute of Cell Physiology, University of Mexico, Mexico City, and †Department of Physiology and Biophysics, Center of Research and Advanced Studies, Mexico City, Mexico

Summary. The amino acid pool of MDCK cells was essentially constituted by alanine, glycine, glutamic acid, serine, taurine, lysine, β -alanine and glutamine. Upon reductions in osmolarity, free amino acids were rapidly mobilized. In 50% hyposmotic solutions, the intracellular content of free amino acids decreased from 69 to 25 mM. Glutamic acid, taurine and β -alanine were the most sensitive to hyposmolarity, followed by glycine, alanine and serine, whereas isoleucine, phenylalanine and valine were only weakly reactive. The properties of this osmolarity-sensitive release of amino acids were examined using ^3H -taurine. Decreasing osmolarity to 85, 75 or 50% increased taurine efflux from 0.6% per min to 1.6, 3.5 and 5.06 per min, respectively. The time course of ^3H -taurine release closely follows that of the regulatory volume decrease in MDCK cells. Taurine release was unaffected by removal of Na^+ , Cl^- or Ca^{2+} , or by treating cells with colchicine or cytochalasin. It was temperature dependent and decreased at low pH. Taurine release was unaffected by bumetanide (an inhibitor of the $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ carrier); it was inhibited 16 and 67 by TEA and quinidine (inhibitors of K^+ conductances), unaffected by gadolinium or diphenylamine-2-carboxylate (inhibitors of Cl^- channels) and inhibited 50% by DIDS. The inhibitory effects of DIDS and quinidine were additive. Quinidine but not DIDS inhibited taurine uptake by MDCK cells.

Key Words MDCK cells · amino acid release · taurine · volume regulation · quinidine · DIDS

Introduction

Cultured cells from the MDCK line are able to regulate cell volume in anisotonic conditions. MDCK cells exposed to a medium of reduced osmolarity respond initially by marked swelling followed by a slower phase of volume restoration, which occurs despite the persistence of the hyposmotic condition. This process of volume adjustment is accomplished by the extrusion of osmotically active solutes, mainly K^+ and Cl^- (Simmons, 1984; Roy & Sauvé, 1987; Völkl, Paulmichl & Lang, 1988). It has been reported that the intracellular concentration of ninyhydrin-positive compounds also decreases as a con-

sequence of hyposmotic stimulus, suggesting that amino acids may contribute to the volume regulatory process (Roy & Sauvé, 1987). The specific free amino acids implicated in cell volume regulation and the features of the osmotically activated amino acid efflux in MDCK cells have not been investigated. In the present study we examined the free amino acid content in MDCK cells and their release in response to decreases in external osmolarity. The properties of the volume-sensitive release of free amino acids were examined using labeled taurine, which due to its metabolic inertness is particularly convenient for this purpose.

Materials and Methods

SOLUTIONS

Krebs-HEPES (isosmotic solution) contained (in mM): NaCl 118, KCl 4.7, KH_2PO_4 1.2, CaCl_2 2.5, MgSO_4 1.17, glucose 10, HEPES 25, adjusted to pH 7.6 with NaOH. Hyposmotic solutions were prepared by reducing the concentration of NaCl to obtain the required osmolarity. In some experiments solutions with reduced osmolarity (38.5 mM NaCl) were made isosmotic with sucrose.

CELL CULTURES

The MDCK line was obtained from the American Type Culture Collection (MDCK, CCL-34) (Madin & Darby, 1958) and cloned. Cells were grown at 36°C in disposable plastic tissue culture flasks (Costar 3150, Cambridge, MA), with air 5%/CO₂ 95% in humid atmosphere and Dulbecco's Modified Eagle Medium with Earle's salt (GIBCO, 430-1600, Grand Island, NY), 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of streptomycin and 10% calf fetal serum (GIBCO 617). Cells were harvested with trypsin-EDTA (GIBCO 540) and plated at confluence on 35-mm plastic petri dishes or in multidishes of 24 wells (Linbro Chemical, New Haven, CT). In most experiments, cells were between 60–80th passage.

AMINO ACID CONTENT

The endogenous free amino acid content of MDCK cells was measured in extracts prepared in 70% ethanol. The analysis was carried out after amino acid derivatization with O-phthalaldehyde by reversed phase HPLC, according to Geddes and Wood (1984) and to Rajendra (1987) in a Beckman chromatographer equipped with an Ultrasphere column.

RELEASE

For release experiments using ^3H -taurine, cells were preloaded with the labeled amino acid (1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) in the culture medium. After 30 min of incubation, the medium was replaced by Krebs solution. For studies on the time course of ^3H -taurine release, cells grown in petri dishes were superfused according to the procedure of Drejer, Honore and Schouboe (1987). Cells were superfused at a rate of 0.1 ml/min. After a wash period of 8 min at which time ^3H -taurine efflux baseline was attained, samples were collected every min. At the time indicated at each experiment, the superfusion medium was replaced by analogous medium with reduced osmolarity. At the end of the superfusion, radioactivity in samples and that remaining in cells was measured by scintillation spectrometry. Results are expressed as fractional rate constants calculated according to the equation

$$f = \frac{A}{t + At}$$

where A represents the radioactivity lost in the interval t and At represents the difference between total radioactivity accumulated by cells during loading and radioactivity released at a given perfusion time (Hopkin & Neal, 1971).

For experiments to measure the release of endogenous free amino acids and all other experiments with ^3H -taurine, cells grown in 24-well plates were used. Cell loading was carried out as described above and after 30 min of incubation with labeled taurine, the culture medium was replaced by Krebs-HEPES solution. Cells were washed three times with Krebs-HEPES isosmotic solution and incubated for 15 min (three periods of 5 min each). Media from this incubation period were pooled and corresponded to basal stimulation. Cells were then incubated with medium of reduced osmolarity for a period of 15 min. Results are expressed as a percentage of total radioactivity accumulated during loading, excluding the washing period, i.e., radioactivity in basal and stimulated release plus radioactivity remaining in the cells at the end of the experiment.

To examine the effect of drugs, the tested compounds were added at the end of the loading period and were present throughout the washing and incubation periods. When solutions of drugs were prepared using solvents different from water, controls were exposed to the same concentration of the solvent used.

Results

FREE AMINO ACID CONTENT

The free amino acid content of MDCK cells cultured in an Eagle's medium is shown in Table 1. Glycine was the most abundant, followed by glutamic acid

Table 1. Free amino acid content of MDCK cells grown in the presence of 5 mM taurine

Amino acid	Control	
	nmol/mg protein	Taurine, 5 mM
Gly	84.9 \pm 4.8	61.5 \pm 3.62
Glu	79.4 \pm 3.0	58.3 \pm 3.38
Ala	72.8 \pm 3.29	56.0 \pm 7.50
Tau	41.2 \pm 0.92	254.6 \pm 16.3
Gln	25.2 \pm 0.42	24.8 \pm 0.32
Ser	21.4 \pm 1.60	
Lys	19.8 \pm 0.94	16.9 \pm 1.06
Thr	16.8 \pm 1.00	
β -Ala	12.4 \pm 0.35	9.53 \pm 0.32
Arg	12.0 \pm 0.60	
His	10.8 \pm 0.64	
Val	8.4 \pm 0.54	8.7 \pm 0.46
Leu	7.3 \pm 0.42	
Phe	6.2 \pm 0.34	6.1 \pm 0.66
Ile	5.4 \pm 0.55	5.6 \pm 0.26
Tryp	2.1 \pm 0.098	2.0 \pm 0.11

Cells were cultured in Eagle's medium for two days. At this time 5 mM taurine was added to the medium. One day later, the free amino acid content of cells grown in the presence or absence of taurine was determined by HPLC. Results are means \pm SEM of eight experiments.

and alanine. Taurine concentration in cells grown in the culture medium without taurine was 41.5 nmol/mg protein, but when cells were cultured in a medium containing taurine, the endogenous levels of taurine markedly increased. Addition of taurine to the culture medium at a concentration of 150 μM , which is within the range of plasma levels, resulted in a threefold increase of intracellular taurine. When the concentration of external taurine was 5 mM, an increase of about sixfold was observed after 24 hr (Table 1). Coincident with the increase in taurine content, a decrease in the major free amino acids occurred. Reductions in glycine, alanine glutamic acid and β -alanine levels were observed, whereas the concentration of other amino acids did not change (Table 1).

The initial endogenous concentration of free amino acids was 426 nmol/mg protein (Table 1), and the protein content of 360 pg/cell was found in our cultures. Assuming an average volume of 2.2 pL/cell (McRoberts, Tran & Saier, 1983; Mills, 1987; Roy & Sauvé, 1987), a figure of 6 μM /mg protein was calculated as cell volume. The concentration of the free amino acid pool is therefore 69.8 mM.

VOLUME-SENSITIVE RELEASE OF TAURINE AND AMINO ACIDS

Cells superfused with isosmotic medium (310 mOsmol) released previously accumulated ^3H -tau-

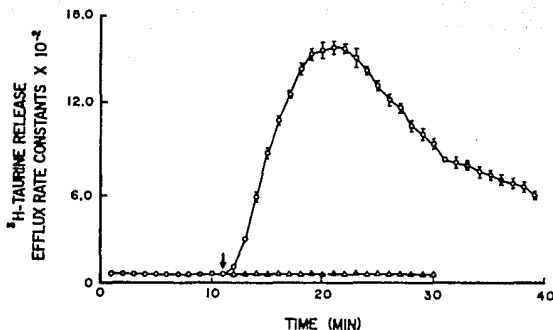


Fig. 1. Time course of ^3H -taurine release from MDCK cells evoked by reduced osmolarity. Cells were preloaded, washed and superfused as described in Materials and Methods. At the time indicated by the arrow, the superfusion medium (isotonic Krebs-HEPES) was replaced by a medium with reduced osmolarity (150 mosmol, 38 mM NaCl) (O), or with a medium with the same NaCl concentration but made isotonic with sucrose (Δ). Results are expressed as efflux rate constants as defined in Materials and Methods and correspond to means \pm SEM of four experiments

rine at an efflux rate of 0.6% per min. Superfusion with a medium of reduced osmolarity (50%) evoked an immediate and dramatic increase in the rate of taurine efflux (Fig. 1). The peak release was attained after 10 min of superfusion, and then ^3H -taurine efflux declined despite the persistence of the hypotonic stimulus (Fig. 1). The release of ^3H -taurine from MDCK cells was clearly associated with reductions in osmolarity. A release of 9.0% of accumulated ^3H -taurine was observed during incubation in isotonic medium (310 mOsmol) for 15 min. Decreasing osmolarity from 310 to 263 mOsmol, which represents a reduction of only 15%, induced an increase in the efflux of ^3H -taurine to 24% in the same period. Lowering osmolarity by 25%, to 232 mOsmol, enhanced taurine efflux to 52.5%, and in solutions of 150 mOsmol (50% hypotonic) the release of taurine increased to 75.9% (Fig. 2).

Reductions in osmolarity were obtained by decreasing the concentration of NaCl in the solutions, but the release of taurine in hypotonic conditions was not due to the reduction in NaCl, since no increase in taurine efflux occurred in solutions with low NaCl but made isotonic with sucrose (Fig. 1).

Endogenous free amino acids and taurine were also released as a result of decreased osmolarity. All amino acids responded to hypotonicity, but the magnitude of the release differed considerably. Glutamic acid, β -alanine and taurine showed the largest response. Reducing osmolarity to 0.85, 0.75 or 0.5, resulted in the release of 20–30%, 40–50% and 75–80%, respectively, of the endogenous concentration (Fig. 3A). In the same conditions of reduced osmolarity, the release of alanine, glycine and serine corresponded to 18–22%, 30–40% and 57–60% of the original content in cells (Fig. 3B). A third group of amino acids, which includes isoleucine, phenylalanine and valine, was much less sensitive to hypotonicity (Fig. 3C).

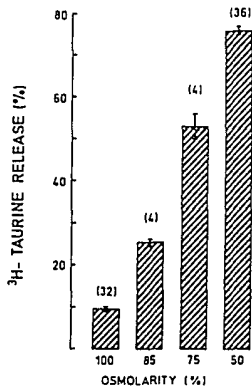


Fig. 2. Effect of decreasing osmolarity on the release of ^3H -taurine from MDCK cells. Cells grown in 24-well plates were preloaded, washed and incubated in isotonic Krebs-HEPES (100% osmolarity) for 15 min. Then this medium was replaced by a medium of reduced osmolarity: 85, 75 and 50% of the original 100% isotonic solution. Results represent ^3H -taurine released in 15 min of exposure to the hypotonic conditions, expressed as a percentage of total radioactivity accumulated by cells as described in Materials and Methods. In this and the following figures, results are means \pm SEM of the number of experiments indicated

EFFECT OF EXTERNAL IONS ON THE RELEASE OF ^3H -TAURINE

Removal of external calcium and addition of cobalt to the incubation solutions did not affect the release of taurine either in isotonic or in hypotonic conditions. Also, calcium-depleted cells grown in a calci-

1 line long

(2)

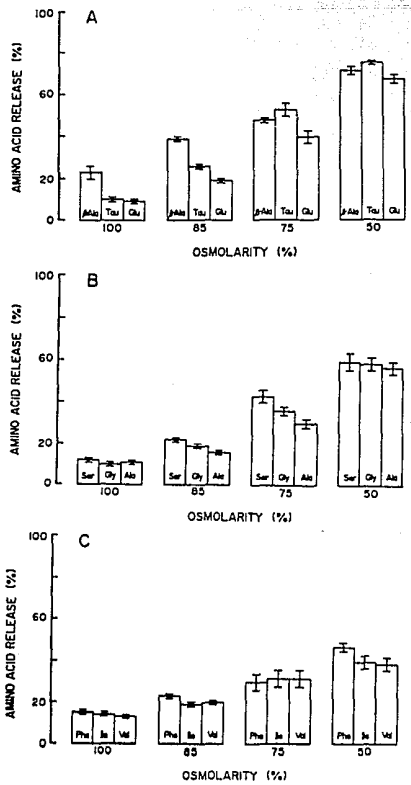


Fig. 3. Effect of decreased osmolarity on free amino acid release from MDCK cells. Cells were incubated in isosmotic medium (100% osmolarity) or in media of decreased osmolarity as indicated for 15 min. The concentration of free amino acid released during incubation was determined by HPLC as described in Materials and Methods. Results are expressed as a percentage of the amino acid concentration present in nonincubated cells. (A) Release of β -alanine, taurine and glutamic acid. (B) Release of serine, glycine and alanine. (C) Release of phenylalanine, isoleucine and valine. Results are means \pm SEM of four experiments

um-free culture medium showed responses identical to those of nondepleted cells. Replacement of sodium by choline and of chloride by gluconate had no effect on the volume-sensitive release of taurine (results not shown).

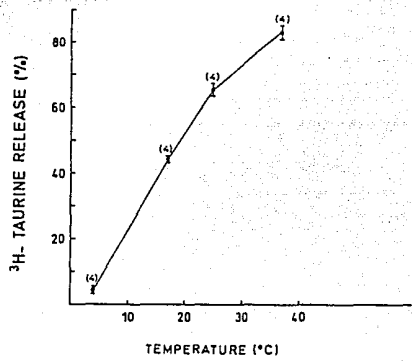


Fig. 4. Effect of temperature on ^3H -taurine release evoked by hyposmolarity. Cells were loaded, washed and incubated as described in Fig. 2 in hyposmolar medium (50%) at the temperatures indicated. Results are expressed as a percentage of total radioactivity accumulated by cells

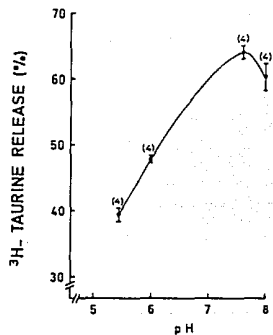


Fig. 5. Effect of pH on ^3H -taurine release evoked by hyposmolarity. Cells were loaded, washed and incubated as described in Fig. 2 in hyposmolar medium (50%) at the pH indicated

EFFECT OF TEMPERATURE AND EXTERNAL pH

The release of taurine in response to hyposmotic conditions was clearly temperature dependent (Fig. 4). At 25°C the release was 78.6% of that observed at 37°C. At 15 and 4°C taurine release was only 52 and 5%, respectively, from the release occurring at 37°C (Fig. 4). Taurine efflux evoked by a decrease in osmolarity was reduced at low pH values and increased at high pH values (Fig. 5).

EFFECT OF AGENTS DISRUPTING THE CYTOSKELETON

The effect of colchicine (0.5 μM) and cytochalasin B (20 μM) on the volume-sensitive release of taurine was examined by preincubating cells in the presence of the drugs for 30 min, followed by exposure to the disrupting agents throughout the experimental procedure. This treatment had no effect on the release of taurine evoked by decreased osmolarity, which was $78.4 \pm 1.41\%$ ($n = 12$) in controls, $81.7 \pm 1.18\%$ ($n = 8$) in the presence of colchicine and $75.4 \pm 1.76\%$ ($n = 12$) in the presence of cytochalasin B.

EFFECT OF INHIBITORS OF IONIC FLUXES ASSOCIATED WITH REGULATORY VOLUME DECREASE

The effects of compounds or conditions known to inhibit ionic fluxes associated with volume adjustment were examined on the volume-sensitive release of taurine in order to investigate a possible link between these ionic fluxes and the swelling-evoked efflux of taurine. The inhibitors of the $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter furosemide and bumetanide did not influence the volume-sensitive release of taurine (*data not shown*). The stilbene derivative inhibitor of Cl^- channels, DIDS, at a concentration of 100 μM , markedly reduced the release of taurine evoked by 50% hyposmolar solutions. A less marked effect of DIDS was observed in 75% hyposmolar solutions (Figs. 6 and 8). Other inhibitors of chloride channels, or of stretch-activated channels, gadolinium, DPC and apamine did not influence the volume-sensitive release of taurine (Fig. 6).

Barium, tetraethylammonium (TEA) and quinidine, blockers of potassium channels, are known to inhibit the regulatory volume decrease in some cells (Grinstein et al., 1983; Hoffmann, Simonsen & Lambert, 1984; Hazama & Okada, 1988) and K^+ conductances in MDCK cells (Bolivar & Cerejido, 1987). None of these compounds affected the release of ^3H -taurine in isosmotic conditions, but the release induced by decreasing osmolarity to 150 mOsmol was inhibited by TEA (16%) and particularly by quinidine (67%) (Fig. 7). Contrary to that observed for DIDS, the inhibitory effect of quinidine was higher in 75% hyposmotic solutions, in which quinidine practically abolished the volume-sensitive release of taurine (Fig. 8). The inhibitory actions of DIDS and quinidine were additive (Fig. 8). These drugs also inhibited the release of endogenous amino acids evoked by hyposmolarity (50%) (Table 2).

Since quinidine but not other K^+ -channel blockers inhibited taurine release, experiments were de-

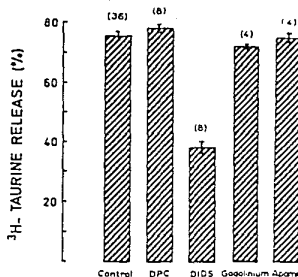


Fig. 6. Effect of inhibitors of Cl^- and stretch-activated channels on the release of ^3H -taurine evoked by decreased osmolarity. Cells were loaded and incubated as described in Materials and Methods. Drugs used were DIDS (100 μM), diphenylamino-2-carboxylate (100 μM), gadolinium (10 μM) and apamine (0.1 μM). Cells were treated with drugs at the end of the loading period for 15 min and were present in isosmotic and hyposmotic media. Bars represent the release of ^3H -taurine (%) evoked by exposure to hyposmotic medium (50%)

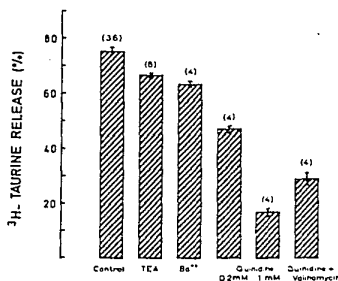


Fig. 7. Effect of K^+ -channel blockers on the release of ^3H -taurine evoked by decreased osmolarity. The experimental procedure was as described in Fig. 6. Drugs used were TEA (10 mM), barium (15 mM) and quinidine (0.2 and 1 mM), and quinidine (1 mM) plus valinomycin (1 μM). Bars represent the release of ^3H -taurine (%) evoked by hyposmolar solutions (50%)

vised to investigate the possible mechanism of this inhibition. A decrease in intracellular K^+ subsequent to swelling-activated K^+ channels may be the signal for taurine release, and therefore, the inhibition of K^+ fluxes by quinidine with subsequent maintenance of high K^+ levels may reduce taurine efflux. To investigate this possibility the K^+ gradient was dissipated with valinomycin (1 μM), thus creating an alternate K^+ efflux pathway insensitive to quinidine.

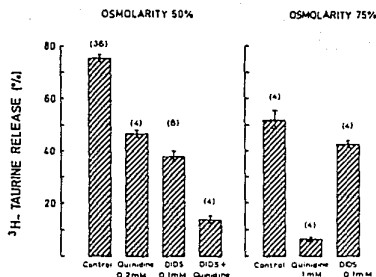


Fig. 8. Effect of DIDS and quinidine on the release of ^3H -taurine evoked by hyposmolar 50 and 75 media. Loading, washing and incubation with drugs were as described in Fig. 6. Concentration of drugs was as indicated. When DIDS and quinidine were used together, their concentration was 0.1 and 0.2 mM, respectively

Table 2. Effect of DIDS and quinidine on the release of free amino acids from MDCK cells evoked by hyposmolarity

Amino acid	Release (%)		
	Control	DIDS	Quinidine
Taurine	76.0 \pm 1.3	38.0 \pm 2.0	17.3 \pm 1.3
β -Alanine	72.2 \pm 2.0	48.2 \pm 1.3	46.1 \pm 1.2
Glutamic acid	68.3 \pm 1.5	39.3 \pm 1.7	39.4 \pm 0.9
Serine	60.3 \pm 4.2	25.3 \pm 2.5	27.4 \pm 0.8
Alanine	57.4 \pm 2.8	23.2 \pm 1.0	21.8 \pm 1.0
Glycine	58.6 \pm 2.9	31.5 \pm 1.4	20.2 \pm 0.9
Phenylalanine	47.3 \pm 1.8	15.4 \pm 1.2	30.0 \pm 3.4
Isoleucine	39.6 \pm 3.4	13.2 \pm 2.0	13.6 \pm 1.5
Valine	39.0 \pm 2.9	17.1 \pm 0.4	

Cells were incubated with DIDS (100 μM) or quinidine (1 mM) for 20 min and then exposed to media of reduced osmolarity (50%) containing the same concentration of the drugs. Amino acid release is expressed as a percentage of the endogenous content of cells. Results are means \pm SEM of four experiments.

Under these conditions quinidine still inhibited taurine release by 53% (Fig. 7).

It has been reported that quinidine decreases amino acid transport in hepatocytes (Wundergem & Castillo, 1988), and therefore, the inhibitory action of quinidine on taurine release may be exerted on a transport mechanism associated with taurine release. Taurine is accumulated by a Na^+ -dependent process. Reduction in external Na^+ concentration from 118 to 6 mM resulted in an inhibition of ^3H -taurine uptake of more than 70% (Fig. 9). Quinidine (1 mM) reduced ^3H -taurine uptake by MDCK cells

by about 60%, whereas DIDS and TEA had no effect on this process (Table 3).

Discussion

The results of the present study confirm the observation of Roy and Sauvé (1987) on the loss of ninhydrin-positive compounds from MDCK cells exposed to hyposmotic solutions. All the main constituents of the free amino acid pool, i.e., glycine, alanine, taurine, serine and glutamic acid, appear to be involved in the volume regulatory process. Taurine concentration is relatively low in cells grown in current culture media that do not contain taurine. This condition, however, may not reflect the physiological situation, since plasma and extracellular fluids always contain taurine, which is avidly accumulated by cells. Cell taurine pool results from both biosynthesis and active uptake, which contribute in proportions varying in the different tissues (Huxtable & Lippincott, 1982). The present results show that MDCK cells are able to synthesize taurine to some extent, but the taurine pool is substantially increased by active accumulation. A decrease in the concentration of other free amino acids is observed as taurine accumulates, suggesting the existence of an exchangeable pool of the main free amino acids in MDCK cells. This pool is probably the one involved in cell volume regulation.

The intracellular content of free amino acids decreases in response to hyposmotic stimulation. Upon exposure to a 50% hyposmotic solution the initial endogenous content of about 70 mM decreases to less than 25 mM. Therefore, the release of free amino acids contributes with about 40 mOsmol to the volume adjustment of MDCK cells facing an osmolarity reduction of 150 mOsmol.

The release of labeled taurine, taken as representative of free amino acid release evoked by hyposmolarity, is rapid and proportional to reductions in osmolarity. The time course of taurine release closely follows the volume change in the cells, both in onset and offset. The declining phase of taurine efflux is not due to depletion of the intracellular pool since at the end of the volume regulatory process cells still contain about 20% of taurine. Also, taurine efflux in the decreasing phase for the interval of 20–30 min has a constant slope despite the large differences in intracellular taurine between the first and last points of the curve at this interval. This is an indication of a signal terminating the release process. Roy and Sauvé (1987) reported that no loss of ninhydrin-positive compounds is observed when osmolarity is reduced by 20%. Using labeled taurine or HPLC for determination of free amino acid levels,

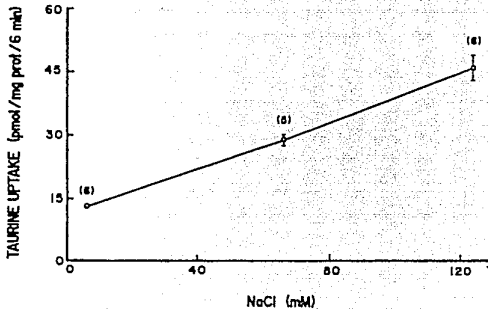


Fig. 9. Effect of Na^+ on ^3H -taurine uptake by MDCK cells. The concentration of Na^+ in the medium was decreased, replacing NaCl by choline chloride. Incubation conditions were as described in Table 3. Results are means \pm SEM of four experiments

Table 3. Effect of inhibitors of the volume-sensitive release of taurine on ^3H -taurine uptake by MDCK cells

	$\text{cpm} \times 10^3/\text{mg protein}$
Control	75.1 ± 0.07
Quinidine 1 mM	30.6 ± 0.29
TEA 10 mM	76.4 ± 1.92
DIDS 0.1 mM	81.2 ± 0.80

Cells were incubated for 30 min with ^3H -taurine (1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) in the presence or absence of the drugs. After incubation cells were washed and accumulated radioactivity was measured by scintillation spectrometry. Results are means \pm sem of four experiments.

a volume-sensitive release could be observed in media containing 263 mOsmol with a reduction of only 15% in the osmolarity, although the magnitude of the response of the various amino acids was different and this difference persisted at all the osmolarities examined. The reason for this difference is still unclear. The largest release observed for some amino acids may be due to the accessibility of endogenous pools to the volume-sensitive efflux process, or alternatively, release of amino acids may occur through more than one mechanism with a different threshold to activation by volume changes.

Free amino acids, together with K^+ and Cl^- , are the main osmolytes mobilized during volume regulation in most cells (Gilles, 1988; Macknight, 1988), and this also seems to be the case for MDCK cells (Roy & Sauvé, 1987). Ion transport systems proposed to be directly involved in volume regulation are either electroneutral ion cotransporters or conductive K^+ and Cl^- channels. Although this question has not been clarified in MDCK cells, the failure of furosemide to modify K^+ and Cl^- changes in cells after hyposmotic challenge (Roy & Sauvé, 1987) seems to exclude the involvement of K^+/Cl^- or

$\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ electroneutral carriers which are sensitive to this drug, suggesting the involvement of channel-mediated fluxes.

The possibility of a connection between ionic and organic osmolytes has been addressed in the present study by investigating effects of blockers of volume-associated ionic fluxes on free amino acid release. Antagonists of K^+ channels excluding quinidine had only marginal effects on taurine efflux. In MDCK cells, quinidine inhibits the swelling-activated K^+ efflux, whereas other blockers of K^+ channels were ineffective (Roy & Sauvé, 1987). Similarly, quinidine but not barium, inhibits the volume-sensitive fluxes of sorbitol in cultured renal cells (Sienbens & Spring, 1989). All these observations suggest the involvement of a quinidine-sensitive mechanism in the release of osmolytes during the volume regulatory process. This may be the activation of a channel which, however, would be insensitive to blockers of other well-characterized K^+ channels. A number of stretch-activated channels has been recently described, although none in MDCK cells, but they have not been pharmacologically characterized. It cannot be excluded, therefore, that one of those channels sensitive to quinidine is directly or indirectly involved in the release of taurine. The observation that stimulating K^+ efflux with valinomyacin does not counteract the inhibitory effect of quinidine on taurine release supports the notion that a coupled K^+ -taurine release occurs through a quinidine-sensitive pathway. In this respect it should be noted that besides the inhibition of K^+ channels, quinidine has numerous other effects, which include decreases in membrane fluidity (Needham, Dodd & Houslay, 1987), blockade of Na^+ and Ca^{2+} channels (Honerjager et al., 1986) and inhibition of Na^+/H^+ or $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangers (Parker, 1981).

Since quinidine inhibited the Na⁺-dependent taurine uptake, its effect on taurine release may be alternatively explained through an action on the Na⁺-dependent carrier working outwards. However, the failure of Na⁺ omission to affect taurine release observed in the present study would argue against the involvement of such a carrier on the osmolarity-sensitive release of taurine. Also the absence of homoexchange, i.e., the stimulation of labeled taurine release by external unlabeled taurine (*results not shown*), does not support the idea of a mechanism for release involving the transport carrier. Activation of taurine leak pathways by hyposmolarity has been suggested in Ehrlich ascites tumor cells (Hoffmann & Lambert, 1983) and in fish erythrocytes (Fincham, Wolowyk & Young, 1987).

The inhibitory effect of DIDS on the osmolarity-sensitive release of taurine suggests an association of taurine efflux also with DIDS/SITS-inhibitable conductances. An ionic transport system with relatively low equilibrium potential activated upon exposure to hyposmotic conditions in MDCK cells (Völkl et al., 1988), may correspond to a SITS-inhibitable unselective ion channel of the type that has been described in cultured opossum kidney cells (Uhl, Murer & Kolb, 1988) or in mouse B lymphocytes (Bosma, 1989). The lack of effect of other inhibitors of chloride channels or of stretch-activated channels in different cells (Yang & Sachs, 1989) may be interpreted either as considering that the effect of DIDS on taurine release does not reflect its connection with chloride channels or stretch-activated pores or, alternatively, that these channels, if present in MDCK cells, are only sensitive to DIDS. Along this line, a recent report describes a volume-evoked Cl⁻ efflux sensitive to DIDS but not to DPC in MDCK cells (Rothstein & Mack, 1989). This restricted sensitivity to distibene compounds has also been observed in the multiple conductance pore of mice lymphocytes (Bosma, 1989). A definite answer to this question must await the identification and pharmacological characterization of ionic conductances associated with volume regulatory processes in MDCK cells. The effects of DIDS and quinidine were additive, suggesting that two different mechanisms may be involved in the efflux of taurine induced by swelling. The different sensitivity of the two drugs to decreases in osmolarity suggest that these mechanisms may be activated at a different stimulus intensity.

Besides inorganic ions, organic osmolytes are also involved in volume regulation in renal cells. Volume-sensitive sorbitol fluxes have been characterized, exhibiting many similarities with the hyposmolarity-stimulated taurine efflux (Bagnasco et al., 1988; Nakanishi, Balaban & Burg, 1988). The results

of the present study strongly support a contribution of free amino acids to this process in MDCK cells. Free amino acids are involved in mechanisms of volume control in cells and tissues of vertebrates and invertebrates naturally facing changes in osmolarity, but it is only recently that their implication in such a role in mammalian tissues has been considered. The structure, function and antigenicity of MDCK cells are remarkably similar to those of cells from the distal nephron (Cerejido et al., 1988), a segment intimately involved in osmotic regulation. Furthermore, plasma membrane of MDCK cells contains a large (220-pS) potassium channel (Bolívar & Cerejido, 1987) of the type that participate in the response to cell swelling (Sachs, 1990). Therefore, MDCK cells represent a very convenient model for further exploring the role of free amino acids in cell volume regulation.

This work was supported in part by a grant from the Organization of American States (PRCyT) and DGAPA (Grant No. IN-024589) to H.P.M. and from COSBEL and CONACYT to M.C.

References

- Bagnasco, S.M., Murphy, H.R., Bedford, J.J., Burg, M.B. 1988. Osmoregulation by slow changes in aldose reductase and rapid changes in sorbitol flux. *Am. J. Physiol.* 254:C788-C792
- Bolívar, J.J., Cerejido, M. 1987. Voltage and Ca²⁺-activated K⁺ channel in cultured epithelial cells (MDCK). *J. Membrane Biol.* 97:43-51
- Bosma, M.M. 1989. Anion channels with multiple conductance levels in a mouse B lymphocyte cell line. *J. Physiol.* 410:67-90
- Cerejido, M., Gonzalez-Mariscal, L., Avila, G., Contreras, R.G. 1988. Tight junctions. *CRC Crit. Rev. Anat. Sci.* 1:171-192
- Drejer, J., Honore, T., Schousboe, A. 1987. Excitatory amino acid induced release of ³H-GABA from cultured mouse cerebral cortex interneurons. *J. Neurosci.* 7:2910-2916
- Fincham, D.A., Wolowyk, M.W., Young, J.D. 1987. Volume-sensitive taurine transport in fish erythrocytes. *J. Membrane Biol.* 96:45-56
- Geddes, J.W., Wood, J.D. 1984. Changes in the amino acid content of nerve endings (synaptosomes) induced by drugs that alter the metabolism of glutamate and *n*-aminobutyric acid. *J. Neurochem.* 42:16-24
- Gilles, R. 1988. Comparative aspects of cell osmoregulation and volume control. *Renal Physiol. Biochem.* 3:5:277-288
- Grinstein, S., Clarke, C.A., Rothstein, A., Gelfand, E.W. 1983. Volume-induced anion conductance in human B lymphocytes is cation independent. *Am. J. Physiol.* 245:C160-C163
- Hazama, A., Okada, Y. 1988. Ca²⁺ sensitivity of volume regulatory K⁺ and Cl⁻ channels in cultured human epithelial cells. *J. Physiol.* 402:687-702
- Hoffmann, E.K., Lambert, I.H. 1983. Amino acid transport and cell volume regulation in Ehrlich ascites mouse tumour cells. *J. Physiol.* 338:613-625
- Hoffmann, E.K., Simonsen, L.O., Lambert, I.H. 1984. Volume-induced increase of K⁺ and Cl⁻ permeabilities in Ehrlich ascites tumor cells. Role of internal Ca²⁺. *J. Membrane Biol.* 78:211-222

- Honerjager, P.E., Löbl, I., Steidl, G., Schonsteiner, G., Ulm, K. 1986. Negative inotropic effects of tetrodotoxin and seven class antiarrhythmic drugs in relation to sodium channel blockade. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 332:184-195
- Hopkin, J., Neal, M.J. 1971. Effect of electrical stimulation and high potassium concentrations on the efflux of ^{14}C -glycine from slices of spinal cord. *Br. J. Pharmacol.* 42:215-223
- Huxtable, R.J., Lippincott, S.E. 1982. Sources and turnover rates of taurine in newborn, weanling and mature rats. *Adv. Exp. Med. Biol.* 139:23-46
- Macknight, A.D.C. 1988. Principles of cell volume regulation. *Renal Physiol. Biochem.* 5:114-141
- Madin, S.H., Darby, N.B. 1958. *As catalogued in: The American Type Culture Collection Catalog of Strains.* 2:574-576
- McRoberts, J.A., Tran, C.T., Saier, M.H., Jr. 1983. Characterization of low potassium-resistant mutants of the Madin-Darby canine kidney cell line with defects in NaCl/NaCl Symport. *J. Biol. Chem.* 258:12320-12326
- Mills, J.W. 1987. The cell cytoskeleton: Possible role in volume control. *Curr. Top. Membr. Transp.* 30:75-101
- Nakanishi, T., Balaban, R.S., Burg, M.B. 1988. Survey of osmolytes in renal cell lines. *Am. J. Physiol.* 255:C181-C191
- Needham, L., Dodd, N.J., Houslay, M.D. 1987. Quinidine and melatin both decrease the fluidity of liver plasma membranes and both inhibit hormone-stimulated adenylate cyclase activity. *Biochim. Biophys. Acta* 12:44-50
- Parker, J.C. 1981. Effects of drugs on calcium-related phenomena in red blood cells. *Fed. Proc.* 40:2872-2876
- Rajendra, W. 1987. High performance liquid chromatographic determination of amino acids in biological samples by precolumn derivatization with O-phthalaldehyde. *J. Liq. Chromatogr.* 10:941-955
- Rothstein, A., Mack, E. 1989. Net efflux of chloride from cell suspensions measured with a K^+ electrode. *Biochim. Biophys. Acta.* 987:239-242
- Roy, G., Sauvé, R. 1987. Effect of anisotonic media on volume, ion and amino acid content and membrane potential of kidney cells (MDCK) in culture. *J. Membrane Biol.* 100:83-96
- Sachs, F. 1990. Mechanical transduction in biological systems. *CRC Crit. Rev. Biomed. Eng. (in press)*
- Siebens, A.W., Spring, K.R. 1989. A novel sorbitol transport mechanism in cultured renal papillary epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 257:F937-F946
- Simmons, N.L. 1984. Epithelial cell volume regulation in hypotonic fluids: Studies using a model tissue culture renal epithelial cell system. *J. Physiol.* 69:83-95
- Ubl, J., Murer, H., Kolb, H.A. 1988. Ion channels activated by osmotic and mechanical stress in membranes of opossum kidney cells. *J. Membrane Biol.* 104:223-232
- Völkl, H., Paulmichl, M., Lang, F. 1988. Cell volume regulation in renal cortical cells. *Renal Physiol. Biochem.* 5:158-173
- Wolff, N.A., Kinne, R. 1988. Taurine transport by rabbit kidney brush-border membranes: Coupling to sodium, chloride, and the membrane potential. *J. Membrane Biol.* 102:131-139
- Wundergem, R., Castillo, L.V. 1988. Quinine decreases hepatocyte transmembrane potential and inhibits amino acid transport. *Am. J. Physiol.* 254:G795-G801
- Yang, X., Sachs, F. 1989. Block of stretch-activated ion channels in *Xenopus* oocytes by gadolinium and calcium ions. *Science* 243:1068-1071

Received 6 February 1990; revised 19 September 1990

align