



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM  
POSGRADO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**EDEMA CEREBRAL ISOSMÓTICO:  
RELEVANCIA, MECANISMOS Y  
ESTRATEGIAS DE PROTECCIÓN**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :  
**DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**

**P R E S E N T A :**  
BERTHA ALEJANDRA LÓPEZ DOMÍNGUEZ

Tutor: DRA. HERMINIA PASANTES



MÉXICO, D. F.,

2010.



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue desarrollado bajo la tutoría de la Dra. Herminia Pasantes en el laboratorio BL-301 de la división académica Desarrollo Neuronal y Fisiología del Instituto de Fisiología Celular en la Universidad Nacional Autónoma de México.

Los miembros del Comité tutorial que asesoraron este proyecto son:

Dra. Herminia Pasantes	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Lourdes Massieu Trigo	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. María Eugenia Torres Márquez	Facultad de Medicina, UNAM

El Jurado del examen de titulación estuvo integrado por:

Presidente	Dr. Edmundo Chávez Cosío	Instituto Nacional de Cardiología
Vocal	Dr. Mauricio Díaz Muñoz	Instituto de Neurobiología, UNAM
Vocal	Dr. Miguel A. Morales Mendoza	I. de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Suplente	Dra. Lourdes Massieu Trigo	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Suplente	Dr. Julio Morán Andrade	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Este trabajo fue financiado parcialmente por DGAPA-UNAM (209507) y CONACyT (46465), y por una beca estudiantil otorgada por CONACyT.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco profundamente a la Dra. Herminia Pasantes, no sólo su tiempo, ayuda y enseñanzas, también su paciencia e interés en mi formación.

A la Dra. Lourdes Massieu y la Dra. María Eugenia Torres, por sus colaboraciones en la mejora de este proyecto.

A los miembros del jurado, Dr. Edmundo Chávez, Dr. Mauricio Díaz Muñoz, Dr. Miguel A. Morales Mendoza y Dr. Julio Morán Andrade, por sus valiosos comentarios y sugerencias en la revisión de este trabajo.

A mis compañeros de trabajo, Bióloga Claudia Peña Segura, Rosa Rivera Alvarado y Dr. Gerardo Ramos Mandujano por el apoyo recibido para la elaboración del proyecto.

A todas las chicas y chicos del laboratorio BL-301, que me enseñaron tanto sin darse cuenta.

*A mamá y a papá*

RESUMEN .....	7
ABSTRACT .....	9
1. INTRODUCCIÓN .....	11
1.1. Volumen Celular y su regulación .....	11
1.1.1. Cambios en el volumen celular .....	11
1.1.2. Hinchamiento hiposmótico .....	12
1.1.2.1. Decremento Regulador de Volumen .....	12
1.1.2.1.1. Sensor(es) de volumen .....	14
1.1.2.1.2. Movilización de osmolitos .....	15
1.1.3. Hinchamiento Isosmótico .....	17
1.2. Edema Celular Cerebral .....	18
1.2.1.1. Isquemia cerebral .....	20
1.2.1.2. Encefalopatía hepática .....	21
1.2.1.3. Traumatismo craneoencefálico .....	22
1.2.1.4. Azotemia .....	22
1.2.2. Movilización de osmolitos en condiciones de edema cerebral isosmótico .....	23
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	25
3. HIPÓTESIS .....	26
4. OBJETIVOS .....	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	27
5.1. Cultivo de células .....	27
5.2. Soluciones y fármacos .....	27
5.3. Liberación de [3H]-Taurina y [3H]-Aspártico .....	28
5.4. Estimación de cambios en el volumen celular .....	28

6. RESULTADOS .....	29
6.1. Modelo de concentraciones elevadas de urea .....	29
6.1.1. Hinchamiento y decremento regulador del volumen (DRV) .....	29
6.1.2. Movilización de osmolitos: taurina y D-aspartato .....	31
6.1.3. Corriente de Cl <sup>-</sup> .....	35
6.1.4. Inhibición de la movilización de osmolitos y DRV .....	37
6.2. Modelo de concentraciones elevadas de KCl .....	37
6.2.1. Liberación de osmolitos: glutamato y taurina .....	38
7. DISCUSIÓN .....	40
8. CONCLUSIONES .....	53
8.1. Modelo de acumulación de urea .....	53
8.2. Modelo de acumulación de potasio (K/O) .....	53
8.3. Conclusión general .....	54
9. PERSPECTIVAS .....	55
10. REFERENCIAS .....	56
11. ANEXO (ARTÍCULOS PUBLICADOS) .....	60

## RESUMEN

El incremento en el volumen es una condición de reto extremo para las células animales. Está asociado a numerosas patologías, y aquellas que generan edema celular cerebral son clínicamente muy graves. El edema celular ocurre al disminuir la osmolaridad del plasma, como en la hiponatremia (edema hiposmótico) o por acumulación intracelular de solutos osmóticamente activos y agua, con osmolaridad externa constante (edema isosmótico). En el edema hiposmótico se activan mecanismos adaptativos ya muy estudiados que permiten la recuperación del volumen celular, aún persistiendo la condición hiposmótica. En el edema isosmótico se requiere aún investigar los mecanismos que lo generan, la eficiencia, mecanismos y señales de una posible respuesta adaptativa, y los alcances y mecanismos de movilización de osmolitos potencialmente lesivos para la célula.

Algunos de estos aspectos fueron estudiados en el presente trabajo en dos modelos experimentales de edema isosmótico: 1) el aumento en la urea intracelular al tratar a fibroblastos 3T3 con altas concentraciones de urea y 2) la acumulación intracelular de iones, derivada de exponer a astrocitos corticales de cerebro de rata a niveles altos de  $K^+$  y ouabáína (KO). Estos modelos difieren tanto en su origen como en algunas señales importantes tales como la fuerza iónica intracelular. Tienen el interés adicional de que simulan dos condiciones patológicas: la azotemia (condición patológica caracterizada por niveles sanguíneos anormalmente altos de compuestos nitrogenados) y la isquemia cerebral. Los resultados se compararon con la respuesta al edema hiposmótico.

Los resultados mostraron que la urea se acumula vía transportadores específicos generando un notable aumento en el volumen celular y que las células responden con un mecanismo activo de regulación, basado en los mismos mecanismos que actúan en la condición hiposmótica: la movilización de osmolitos orgánicos (medida como salida de taurina) y la activación de una corriente de  $Cl^-$  sensible a volumen. A concentraciones altas de urea (150 mM) la eficiencia de la regulación es notablemente mayor que en la condición hiposmótica. Igualmente, la salida de taurina es mayor con un menor umbral de hinchamiento que en la condición hiposmótica. Por el contrario, la apertura y amplitud de la corriente de  $Cl^-$  son notablemente menores. Se concluye que en este modelo de edema isosmótico la contribución de los osmolitos orgánicos es mayor que la de los iones, lo que incrementa la eficiencia en la regulación del volumen.



En el modelo de KO, el incremento en volumen es lento y alcanza una meseta, sin evidencia de regulación. El volumen aumenta mayormente por acumulación de  $K^+$  y  $Cl^-$  mediante el cotransportador NKCC sensible a bumetanida, y flujos osmóticos de agua. El tratamiento con KO indujo la salida de glutamato (D-aspartato) y taurina. La salida de glutamato responde a dos estímulos, la despolarización y el incremento en volumen, que ocurren con distinta temporalidad. Los mecanismos de salida de glutamato en respuesta a cada estímulo, evaluados farmacológicamente, son el transportador operando en reversa (despolarización) y la vía de salida de osmolitos sensible a volumen. La salida de taurina responde casi exclusivamente al incremento en volumen. La movilización de glutamato en estas condiciones representa un peligro potencial de muerte neuronal por excitotoxicidad. La salida de taurina puede tener la doble función de atenuar el hinchamiento y de protección de las células expuestas al exceso de glutamato.

## **ABSTRACT**

The cell volume increase is a challenging condition for animal cells. It occurs in a variety of pathologies, and it may be critical when leading to brain cellular edema. Cell swelling occurs upon a decrease in plasma osmolarity as during hyponatremia (hyposmotic swelling) or as consequence of ion or organic osmolyte redistribution increasing intracellular osmolarity. External hyposmolarity results in rapid cell swelling followed by active regulatory mechanisms tending to restore the original volume, even when the hyposmotic condition persists. This cell response has been extensively studied. In contrast, isosmotic swelling is less known. The mechanisms responsible for cell swelling, the occurrence and properties of a regulatory response and the features of osmolyte mobilization remain largely unknown.

The present study addressed to some of these questions in two models of isosmotic swelling: 1) high extracellular urea and accumulation in fibroblasts 3T3 and 2) intracellular accumulation of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  and  $\text{Cl}^-$  [followed by osmotically driven water, in rat cortical astrocytes exposed to high  $\text{K}^+$  levels plus ouabain (KO)]. These two models differ in several aspects, including the swelling inductors and changes in intracellular ionic strength. These models emulate pathological conditions known as azotemia (condition where the patient's blood contains uncommonly high levels of compounds rich in nitrogen) and brain ischemia.

High extracellular urea evoked fibroblast swelling resulting from urea accumulation via specific, phloretin-sensitive transporters. Urea-induced fast swelling followed by a volume regulatory process with a rate and efficiency proportional to the extent of swelling, and more efficient than that evoked by hyposmotic swelling. Volume regulation is likely accomplished by the same mechanisms activated during hyposmotic swelling, i.e. osmolyte efflux and ion fluxes through volume-sensitive channels. Urea induced massive taurine efflux, with a swelling threshold lower than in the hyposmotic swelling. In contrast, the volume-sensitive  $\text{Cl}^-$  current was registered in fewer cells and with lower amplitude than in the hyposmotic model. These results suggest an important contribution of taurine and presumably other organic osmolytes to volume regulation in this model of isosmotic swelling, with a lower contribution of ionic osmolytes.

In the KO model, cell swelling was slow, with no evidence of volume regulation, though a plateau is reached at a certain time. Swelling resulted from bumetanide-sensitive  $\text{K}^+$  and  $\text{Cl}^-$  accumulation, likely carried by KCC cotransporters and followed by osmotically driven water. KO evoked a biphasic glutamate (D-aspartate) efflux: an initial phase, of fast activation and

inactivation, and a second phase, of delayed and progressive efflux, sustained as long as the KO condition persisted. The first phase, likely evoked by depolarization seems mediated by the transport reversal operation, while the second phase elicited by swelling occurs via a volume-sensitive pathway. Taurine efflux, in contrast, is only volume-sensitive. KO-induced glutamate efflux may contribute to excitotoxicity, while taurine efflux may have a dual role relieving swelling and protecting cells from excitotoxic damage.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. *Volumen Celular y su regulación*

Las células animales se enfrentan a un problema crítico: el mantenimiento constante de su volumen. La capacidad de las células para regularlo es uno de los mecanismos homeostáticos más importantes y un hito en la escala evolutiva (Chamberlin y Strange, 1989). Esta regulación le permite a la célula recuperar su volumen después de un cambio que pudo haberse producido por modificaciones en la osmolaridad externa o por gradientes osmóticos generados durante el funcionamiento normal de la célula. Los mecanismos de regulación de volumen celular implican el flujo transmembranal de osmolitos en la dirección necesaria para contrarrestar la pérdida o ganancia neta de agua intracelular (Lang et al, 1998).

Las membranas de las células animales son altamente permeables al agua, por lo que el volumen celular está determinado por las osmolaridades intracelular y extracelular y por los flujos de agua requeridos para alcanzar el equilibrio osmótico. A diferencia de las bacterias y plantas que cuentan con una estructura rígida para contrarrestar la presión hidrostática, las células animales desarrollaron ciertos mecanismos dinámicos para regular la homeostasis celular. Estos mecanismos incluyen (1) la síntesis celular y la secreción no difundible de macromoléculas; (2) el gradiente por flujo facilitado de moléculas orgánicas pequeñas; (3) el funcionamiento de una variedad de bombas iónicas que restablecen la composición iónica de los fluidos interno y externo; y (4) el bombeo (transporte activo) de agua contra gradiente.

### 1.1.1. *Cambios en el volumen celular*

En condiciones fisiológicas estas células están expuestas a un líquido intersticial isotónico de composición finamente regulada por mecanismos de salida y entrada de agua y electrolitos. Su volumen, que está definido genéticamente, puede modificarse en condiciones fisiológicas, por establecimiento de microgradientes, o patológicas, debido a una redistribución de iones y otros osmolitos que finalmente llevan a la acumulación intracelular de agua. Los cambios en los contenidos de solutos intra y extracelulares generan un gradiente osmótico transmembrana, que deriva en un flujo inmediato de agua, hacia o desde la célula, hasta que se alcanza el equilibrio, dada la permeabilidad de la membrana celular al agua. Puesto que las membranas de las células animales son incapaces de generar o mantener gradientes significativos de presión hidrostática, el flujo de agua produce hinchamiento o encogimiento celular. Esto lleva a una situación crítica para la homeostasis celular, pues al cambiar la concentración de iones y

moléculas se envía información equívoca al sistema de señales que es la base de la función celular y de la comunicación intercelular. Además del cambio en el volumen celular inducido por cambios en la osmolaridad externa, también puede ocurrir un incremento en volumen en condiciones isotónicas. La acumulación intracelular de iones y osmolitos orgánicos que tiene lugar en diversas patologías, genera flujos de agua osmóticamente impuestos.

Cuando ocurren cambios en el volumen celular en respuesta a alteraciones en la osmolaridad externa, la mayoría de las células tienen la capacidad de activar mecanismos reguladores mediante los procesos conocidos como Decremento Regulador de Volumen (DRV), en respuesta al hinchamiento e Incremento Regulador de Volumen (IRV), en respuesta al encogimiento. Mientras que los mecanismos reguladores del hinchamiento hiposmótico están relativamente bien estudiados, se conoce muy poco acerca de lo que ocurre en el hinchamiento en condiciones isotónicas. No se sabe siquiera si las células son capaces de responder en forma adaptativa, recuperando al menos en parte, su volumen original ni si esta respuesta puede ser diferente al mecanismo que causa el hinchamiento en condiciones hiposmóticas.

### *1.1.2. Hinchamiento hiposmótico*

#### *1.1.2.1. Decremento Regulador de Volumen*

Al proceso por el que las células recuperan su volumen después de un hinchamiento hiposmótico se le llama decremento regulador de volumen (DRV) y consiste básicamente en la salida de osmolitos inorgánicos y orgánicos. Estos movimientos crean un nuevo gradiente osmótico que lleva al eflujo de agua y a la recuperación de volumen (Fig. 1).

En este proceso activo se identifican tres componentes básicos: (1) la célula detecta el cambio en volumen mediante un 'sensor', que además servirá como patrón para detener la respuesta una vez que se ha regresado al tamaño original, (2) activación de cascadas de transducción que amplifican la señal iniciada por el sensor y la conectan con las vías de movilización de los osmolitos, y (3) salida de los osmolitos o solutos osmóticamente activos (Fig. 2).

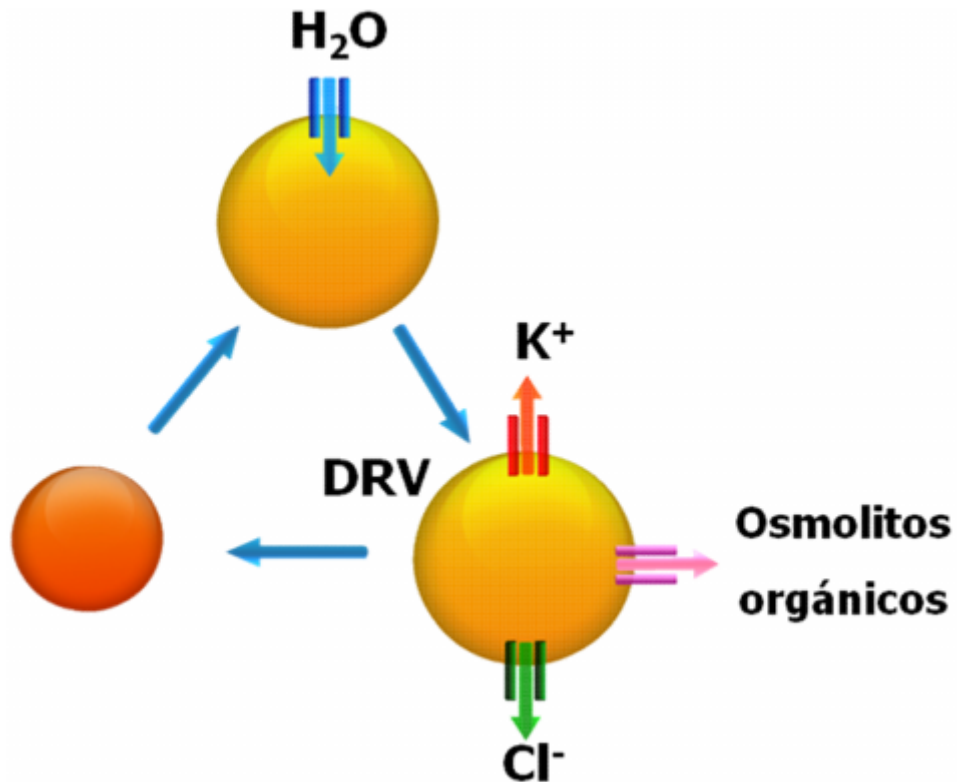


Figura 1. Al hinchamiento inducido por hiposmolaridad le sigue un proceso activo de ajuste de volumen (DRV) que involucra la salida de  $K^+$ ,  $Cl^-$  y osmolitos orgánicos intracelulares

Los solutos osmóticamente activos son esencialmente de dos tipos: iones inorgánicos, principalmente  $Cl^-$  y  $K^+$ , y compuestos orgánicos de bajo peso molecular. Los osmolitos orgánicos son un grupo heterogéneo de pequeñas moléculas que están presentes en concentración alta dentro de las células. Los que comúnmente participan en la regulación del volumen son los compuestos metilados (metilaminas, glicerofosforilcolina y betaína), polialcoholes (sorbitol, inositol, mio-inositol), aminoácidos libres y sus derivados (glutamina, glutamato, glicina, GABA y taurina). Algunos de éstos tienen la propiedad de no alterar significativamente la estructura y función de las macromoléculas intracelulares, por lo que su acumulación es hasta cierto punto inocua. En general la velocidad en que ocurre la movilización de los iones es más rápida que la de los osmolitos orgánicos, pero éstos muestran una movilización más persistente.

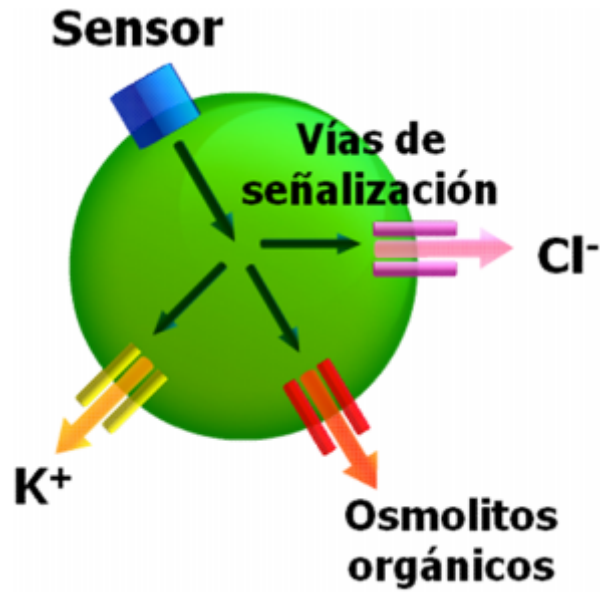


Figura 2. Componentes del Decremento Regulator de Volumen: sensor (detector de cambios en el volumen), sistema de osmotransducción y efector (modulador o activador de las vías de movilización de osmolitos).

#### 1.1.2.1.1. *Sensor(es) de volumen*

A pesar de la importancia del mecanismo sensor del aumento en volumen, hasta el momento no se ha podido identificar su naturaleza. Aún no se sabe si esta tarea se encuentra a cargo de un sólo tipo de molécula o de un grupo de moléculas que interactúan para finalmente detectar el cambio en volumen y poner en marcha los procesos correctores. Han sido postuladas diversas señales como posibles mecanismos sensores del cambio en volumen: moléculas de adhesión como las integrinas, receptores a factores de crecimiento con actividad de cinasa de tirosinas (TKR) que funcionen como osmorreceptores y los canales receptores a potenciales transitorios (TRP). En el medio intracelular, los cambios en el citoesqueleto, la reducción del agrupamiento macromolecular por dilución o la disminución en la fuerza iónica, todos producidos a consecuencia de la entrada de agua al medio intracelular, han sido las señales sugeridas para detectar el cambio en volumen. Los TKR son proteínas transmembranales que tienen un dominio extracelular con el sitio para el reconocimiento de su ligando y un dominio intracelular en el que se encuentran tanto sitios con actividad de cinasa de tirosinas como sitios de fosforilación. Es esta característica constitutiva la que les proporciona la capacidad de tener contacto con el medio y la composición extracelular, a nivel de membrana y con el medio intracelular, lo que sugiere la idea de que pueden estar involucrados en el paso inicial. Otra

característica que sustenta su posible función como sensor es su capacidad de desencadenar señales hacia diferentes vías, pues los TKR son el sitio de convergencia de una gran variedad de cascadas de señalización que finalmente conducen a la expresión de múltiples funciones celulares. Un ejemplo de este tipo de conexiones es la interrelación entre TKR e integrinas y otras moléculas de adhesión como p125FAK que se encuentra ligada a la vía de fosforilación del TKR. Otras vías de señalización que convergen en los TKR incluyen la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la vía antiapoptótica conformada por PI3K y Akt. Aún cuando no se ha comprobado la función de los TKR como moléculas sensoras de cambios en el volumen, sí se ha demostrado que desempeñan un papel importante en las señales tempranas de osmotransducción.

Los mecanismos por los que el cambio en volumen de la célula se traduce en una respuesta reguladora incluyen cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, actividad de la GTPasa, fosforilación-desfosforilación de serina-treonina y tirosina y niveles de eicosanoides. Recientemente se ha puesto énfasis en la participación de cinasas de tirosina (TK) como elemento clave en la recuperación de volumen celular, pues varias proteínas se fosforilan por hinchamiento. Aunque no se han identificado las enzimas específicas involucradas, se sabe que una enzima blanco de las TK es la cinasa de fosfoinosítidos (PI3K), que tiene un papel clave en la movilización de taurina y  $\text{Cl}^-$  en respuesta al incremento en volumen.

#### *1.1.2.1.2. Movilización de osmolitos*

La salida de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{K}^+$  en la mayoría de las células ocurre a través de la apertura selectiva de canales activados por el incremento en volumen *per se* o por la conjunción de elementos asociados a dicho incremento. Los canales de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{K}^+$  funcionan de manera selectiva e independiente, a fin de mantener la electroneutralidad.

Los canales de  $\text{Cl}^-$  regulados por volumen ( $\text{Cl}^-_{\text{vol}}$ ) han sido identificados en varios tipos celulares y la mayoría muestran características electrofisiológicas y biofísicas semejantes, lo que sugiere la existencia de un solo tipo de canal de  $\text{Cl}^-$  involucrado en el DRV (Okada, 1997; Nilius et al, 1997). Los canales  $\text{Cl}^-_{\text{vol}}$  son típicamente canales de rectificación saliente, con una conductancia intermedia de 40 a 78 pS a potenciales positivos y de 10 a 20 pS a potenciales negativos, muestran inactivación dependiente de voltaje generalmente por encima de +60 mV; exhiben una alta selectividad por los aniones sobre los cationes y son permeables a la mayoría



de los aniones monovalentes, incluyendo los de gran tamaño como el gluconato, benzoato, tiocianato y metanosulfonato ( $\text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{F}^- > \text{gluconato}$ ).

La activación de los  $\text{Cl}^-_{\text{vol}}$  requiere de ATP más no de su hidrólisis. Su actividad es sensible a los bloqueadores generales de canales de  $\text{Cl}^-$  tales como DIDS, SITS, 9-AC, DPC, DCPIB, NPPB, DDFK, ácido niflúmico y ácido flufenámico. La naturaleza molecular del  $\text{Cl}^-_{\text{vol}}$  aún no se conoce pues de los varios canales de  $\text{Cl}^-$  que han sido clonados hasta el momento, aún siendo algunos de ellos sensibles a osmolaridad, ninguno exhibe todas las propiedades descritas para éste. Durante la búsqueda de la identidad del canal  $\text{Cl}^-_{\text{vol}}$  se ha sugerido que juegan un papel importante como reguladores o propiamente como la vía de salida del  $\text{Cl}^-$  la glicoproteína-P y el canal CIC-2 de la familia de canales dependientes de voltaje, sin embargo, se ha demostrado recientemente que aunque este canal es activado por hinchamiento, el perfil farmacológico y biofísico que presenta es diferente a los que se han descrito.

El fosfoleman (PLM), una proteína con un sólo dominio membranal, permite flujos tanto de aniones como de cationes, haciendo transiciones instantáneas, dependientes del voltaje en su conformación, con características drásticamente diferentes en cuanto a la selectividad iónica. El hecho de presentar sitios de unión a fracciones positiva y negativamente cargadas lo han ubicado como un posible candidato en el transporte de taurina. Este aminoácido presenta características de zwitterion (compuesto químico que presenta cargas positivas y negativas, que lo hacen eléctricamente neutro), lo que lo hace una molécula extremadamente polar. La cercanía de los grupos amino y sulfonato, de cargas opuestas, complica el transporte selectivo a través de canales iónicos, pues éstos emplean sitios de unión para discernir entre aniones y cationes. Sin embargo, sus propiedades biofísicas difieren de las propiedades descritas del canal  $\text{Cl}^-_{\text{vol}}$ .

En contraste con el  $\text{Cl}^-_{\text{vol}}$ , que presenta características similares en los diferentes tipos celulares, la salida de  $\text{K}^+$  tiene múltiples vías. En algunos casos los canales que participan son canales implicados en otras funciones celulares, pero que se activan por estímulos concurrentes con la hiposmolaridad y el cambio en volumen (e.g., aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular o despolarización iniciada por la activación inicial de canales de  $\text{Cl}^-$ ). En la mayor parte de las células epiteliales los canales de  $\text{K}^+$  activados por volumen son dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , del tipo BK (canales de  $\text{K}^+$  de conductancia grande activados por  $\text{Ca}^{2+}$ ). Estos canales se activan a concentraciones micromolares de  $\text{Ca}^{2+}$ , presentan una conductancia de 100 a 300 pS, presentan activación por la liberación de ATP y son inhibidos por iberiotoxina y caribdotoxina.

En astrocitos, algunas neuronas y linfocitos T, la activación de la corriente de  $\text{Cl}^-$  precede a la de  $\text{K}^+$ , lo que conduce a una despolarización, la cual estaría activando canales  $\text{K}_v$  (canales de  $\text{K}^+$  activados por voltaje). Estos canales son bloqueados por tetraetilamonio (TEA), un inhibidor típico de canales de  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje y argitoxina. En relación con un canal de  $\text{K}^+$  exclusivamente activado por hinchamiento, se sabe que las células tumorales ascíticas presentan un miembro de la familia de canales de  $\text{K}^+$  de dos poros, TASK-2, de conductancia intermedia, independiente a las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y que es inhibido por clofilio. Este canal parece responder únicamente al cambio en volumen.

El mecanismo de salida de osmolitos orgánicos consiste en una vía de tipo difusional con flujo molecular bidireccional, dependiente del gradiente electroquímico presente, no saturable, inmutable a la transestimulación e independiente de  $\text{Na}^+$  y energía. Una observación interesante es que el movimiento de los osmolitos orgánicos en respuesta al cambio en el volumen es inhibido consistentemente por diversos tipos de bloqueadores generales de canales de  $\text{Cl}^-$  tales como el DIDS, NPPB, DCPIB, DDFK, dipiridamol, ácidos grasos poliinsaturados y ácido niflúmico. Esta última característica y la alta permeabilidad que presenta el canal de  $\text{Cl}^-_{\text{vol}}$  a aniones orgánicos y zwitteriones, como la taurina, gluconato y aspartato, sugieren la posibilidad de que la vía de salida de osmolitos orgánicos sea muy parecida al propio canal de  $\text{Cl}^-$  activado por hiposmolaridad. Sin embargo, algunos estudios han demostrado la diferencia de los perfiles farmacológicos, cursos temporales, sensibilidad a algunos bloqueadores y la regulación de ambas vías, por lo que cada vez con más sustento se descarta la posibilidad de una vía común, lo que no excluye que ambas vías, la del  $\text{Cl}^-_{\text{vol}}$  y la de los osmolitos orgánicos, estén estrechamente interconectados, por lo que la inhibición de una de ellas, el canal de  $\text{Cl}^-$  en este caso, inhibe secundariamente el flujo a través de la otra.

### *1.1.3. Hinchamiento Isosmótico*

Para mantener sus funciones metabólicas, las células acumulan un número de sustancias (proteínas, aminoácidos, metabolitos y sus derivados) que son osmóticamente activas y que determinan la presión osmótica intracelular que debe estar en equilibrio con el medio extracelular por medio de cambios en el volumen.

Esta condición de equilibrio puede alterarse por ejemplo durante el transporte transepitelial de iones, por la acumulación de nutrientes y productos de desecho del metabolismo. Los cambios en la osmolaridad extracelular también ocurren bajo condiciones fisiológicas, por

ejemplo, cuando las células epiteliales y sanguíneas del capilar intestinal se enfrentan a una osmolaridad extracelular baja después de la ingesta de agua o alimento, o cuando las células renales o sanguíneas de la médula son expuestas a osmolaridades elevadas durante la antidiuresis.

El gradiente electroquímico del  $\text{Na}^+$  lo dirige hacia el interior celular, a pesar de la baja permeabilidad de la membrana al  $\text{Na}^+$ , y existe cierta acumulación que lleva a un aumento en el volumen y a la disipación de su gradiente, lo que es evitado por la función de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . En condiciones fisiológicas gradualmente existen mecanismos que corrigen estas alteraciones pero estos pueden ser sobrepasados en condiciones patológicas.

A diferencia del gran número de estudios referentes al edema celular hiposmótico, se conoce mucho menos acerca de la respuesta celular ante un incremento en el volumen celular en condiciones de osmolaridad externa constante.

### ***1.2. Edema Celular Cerebral***

El aumento del volumen celular ocasionado por la acumulación de agua en las células es un cambio que cobra especial relevancia a nivel cerebral, ya que sus consecuencias pueden ser muy graves. Esto es debido a la resistencia que impone el cráneo rígido a la expansión tisular. Además de este efecto puramente mecánico, se ejerce una fuerte presión del tejido sobre el cráneo, lo que puede conducir a la compresión y ruptura de los vasos sanguíneos que irrigan al cerebro, llevándolo a una condición de privación de oxígeno y nutrientes. En casos extremos, puede ocurrir la muerte por paro respiratorio y cardíaco debido a la opresión de núcleos del tallo cerebral,

El edema celular cerebral se presenta particularmente en los astrocitos, las células gliales más abundantes, que cumplen una variedad de acciones de soporte funcional para las neuronas (Landis, 1994). Entre las funciones más importantes está su contribución en la formación de la barrera hematoencefálica. Los astrocitos tienen una acción protectora de la mayor importancia, controlar el exceso en la generación de radicales libres a través de una concentración elevada de antioxidantes, al tiempo que proveen a las neuronas de substratos como el glutatión (Stewart et al, 2002). Asimismo, proporcionan a las neuronas nutrientes y factores de crecimiento, controlan el metabolismo y la captura de neurotransmisores, incluyendo de manera importante al glutamato, con lo que protegen a las neuronas de la muerte por excitotoxicidad (Anderson y Swanson, 2000).

Una función crítica de los astrocitos es el mantenimiento de la composición normal del medio extracelular, de manera importante el de los niveles de  $K^+$  y  $Cl^-$  (Walz, 2000), con lo que juegan un papel clave en el mantenimiento de la excitabilidad neuronal. Al ocurrir una condición que modifique los niveles de  $K^+$  extracelular, como en el caso de la epilepsia y la isquemia, se requiere de un mecanismo rápido y eficiente para controlar esta situación. Esto está a cargo precisamente de los astrocitos, a través del proceso conocido como *propagación espacial del  $K^+$* . La primera etapa de este proceso es la remoción del  $K^+$  externo mediante su acumulación en los astrocitos, para lo cual están provistos de mecanismos de captura localizados preferentemente en estas células. Se trata de los transportadores electroneutros de la familia del NKCC (Su et al, 2002), así como de canales de rectificación entrante denominados Kir. La isoforma Kir 4 parece estar involucrada de manera preferente (Olsen y Sontheimer, 2008).

El  $K^+$  acumulado en los astrocitos en aquellas regiones en las que sus niveles son muy altos, difunde a través del sincicio glial y es liberado progresivamente en áreas distantes. Este es el proceso conocido como *propagación espacial del  $K^+$*  y es una de las funciones más importantes de los astrocitos. Cuando los niveles de  $K^+$  son excesivos, de forma que excedan la capacidad de amortiguamiento de los astrocitos, el  $K^+$  acumulado, junto con  $Cl^-$  y agua, induce un incremento en el volumen. Esta situación puede tener un efecto adverso en la excitabilidad neuronal, ya que la reducción en el espacio extracelular permitiría la conducción efáptica (tipo de transmisión entre células o neuronas no mediadas por contacto sináptico sino por contactos directo entre membranas de células yuxtapuestas a través de uniones comunicantes; transmisión eléctrica; excitación producida entre axones vecinos que se encuentran desmielinizados), favoreciendo por ejemplo la hipersincronía de descarga neuronal tal como ocurre en la epilepsia (Hochman et al, 1995).

Otra función de crucial importancia en relación con la protección neuronal a cargo de los astrocitos es la remoción del glutamato del espacio extracelular. Esto se lleva a cabo mediante transportadores específicos de los cuales hay dos isoformas (EAAT1 y EAAT2 también denominados GLAST y GLT1) en los astrocitos (Anderson y Swanson, 2000). Estas funciones relacionadas con el control de los niveles de  $K^+$  y de glutamato en el espacio extracelular pueden verse sobrepasadas, sobre todo en patologías en las que se presenten situaciones de hipoglucemia y/o anoxia e isquemia.

El edema cerebral es una respuesta del cerebro a diversos episodios patológicos y puede ser vasogénico (asociado al daño en la barrera hematoencefálica) o celular, aunque frecuentemente concurren los dos tipos. El edema celular cerebral a su vez, es de dos tipos: i) el edema hiposmótico (generalmente está asociado a hiponatremia, que es una baja concentración en el sodio del plasma sanguíneo), durante el cual decrece la osmolaridad del medio extracelular induciendo la entrada de agua a las células; y ii) el edema isosmótico, también llamado citotóxico, que se debe a una redistribución iónica y un incremento intracelular de osmolitos seguido por agua para alcanzar el equilibrio osmótico, pero en condiciones de osmolaridad externa constante (Kimelberg, 1995).

El edema hiposmótico ocurre en patologías tales como (1) falla hepática o renal, (2) secreción inapropiada de la hormona antidiurética, (3) deficiencia en glucocorticoides, (4) abuso de diuréticos de tiazidas, y por (5) polidipsia causada ya sea por una condición psicótica, o asociada a pruebas de resistencia física extrema y al consumo de la droga “éxtasis” (Fraser y Arief, 1990).

El edema isosmótico ocurre a consecuencia de patologías como la isquemia, la encefalopatía hepática y el trauma craneoencefálico. Los mecanismos que generan el edema son diferentes en cada caso, pero en la mayor parte, la entrada de  $\text{Cl}^-$  y/o la acumulación de lactato son factores causales (Pasantes-Morales y Franco, 2005).

#### *1.2.1.1. Isquemia cerebral*

En la fase temprana de la isquemia, la interrupción en el suministro de glucosa y oxígeno produce una falla energética, disminución en los niveles de ATP y el colapso progresivo de gradientes iónicos transmembranales como resultado de la inhibición de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Todo esto lleva a una despolarización glial y neuronal y al aumento extracelular de  $\text{K}^+$ , que puede alcanzar niveles de 50-80 mM, y a la liberación al espacio extracelular de aminoácidos excitadores (Leis et al, 2005), particularmente el glutamato. El aumento en los niveles de  $\text{K}^+$  lleva a su acumulación masiva en los astrocitos, tal como se describió antes, que asociado a la entrada de  $\text{Cl}^-$ , impulsa flujos entrantes de agua e induce un cambio considerable en el volumen celular. Asimismo, la falla en la función de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  lleva al colapso de los gradientes iónicos, con lo cual la energía de los cotransportadores de glutamato que trabajan para su eliminación del espacio extracelular desaparece e incluso es favorecido su funcionamiento en el sentido opuesto, es decir, moviendo al glutamato del interior celular hacia el espacio

extracelular (Rossi et al, 2000). Cuando esto ocurre, se presenta un gran riesgo de muerte neuronal por excitotoxicidad, debido a la hiperfunción de los receptores al glutamato, en particular, los del tipo ionotrópico como los activados por NMDA y AMPA/kainato. En estas condiciones se generan flujos de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  a través del canal del receptor, lo que lleva, por una parte, a una nueva fase de hinchamiento por la entrada de  $\text{Cl}^-$  y flujos de agua, y por otra a disparar la cadena de muerte celular activada por el exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  (Hansson et al, 2000). En este momento se alcanza la cascada excitotóxica e inevitablemente aumenta la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, hay degradación de fosfolípidos, liberación de ácidos grasos y formación de más especies reactivas del oxígeno y otros radicales libres a través de los cuales se produce una nueva fase de edema debido a la sobrecarga de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Ca}^{2+}$  a través de las membranas dañadas por la lipoperoxidación, con lo que el daño entra en una cadena autopropagada de despolarización y excitotoxicidad que causa nuevos episodios de muerte neuronal y disminución de la actividad bioeléctrica neuronal, depresión propagada, impidiendo asimismo la recuperación del área isquémica perifocal (Doyle et al, 2008). En la condición de isquemia incompleta o en sus fases iniciales, la vía glicolítica anaeróbica permanece operando en astrocitos en condiciones hipóxicas mientras exista un remanente de glucosa. Esta ruta alterna, considerada una respuesta de emergencia, puede, sin embargo, contribuir al incremento en volumen por la generación de protones y lactato.

#### *1.2.1.2. Encefalopatía hepática*

La encefalopatía hepática es un síndrome neurológico y neuropsiquiátrico complejo que ocurre como consecuencia de una falla hepática aguda o una enfermedad hepática crónica. En ambos casos la neuropatología se manifiesta por una marcada disfunción neuronal derivada de numerosas alteraciones en canales iónicos, transportadores y receptores de neurotransmisores (Butterworth, 2003). El hinchamiento de astrocitos en la falla hepática aguda presenta como factor inicial y causal un incremento en los niveles de amonio cerebral, y por consiguiente un aumento en la sangre, debido en parte al aumento de permeabilidad a través de la barrera hematoencefálica. El edema cerebral en estas condiciones se debe a que el cerebro carece de las enzimas necesarias para completar el ciclo de la urea, por lo que la detoxificación del amonio ocurre casi por completo a través de su conversión en glutamina, mediada por la glutamina sintetasa (Martinez-Hernandez et al, 1977). Los astrocitos son el tipo celular en el que se lleva a cabo preferentemente esta reacción. Cuando ocurre producción de nitrógeno en forma

excesiva, como es en el caso de las patologías que llevan a hiperamonemia, el exceso de amonio en los astrocitos lleva a una falla en el metabolismo oxidativo, incremento en los niveles de lactato y a la generación de un estado de estrés oxidativo (Blei y Larsen, 1999). Estas circunstancias conducen al daño mitocondrial expresado como la inducción del poro de transición mitocondrial (MPT), que es un mecanismo dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , inducible por estrés oxidativo y óxido nítrico, que activa los flujos de agua a través de la acuaporina 4 (AQP4), presente en los astrocitos (Bai et al, 2001). El propio estrés oxidativo provoca cambios en la estabilidad membranal debidos a la lipoperoxidación de sus componentes, lo que conduce a una sobrecarga iónica, que genera flujos de agua tendientes a restablecer el equilibrio osmótico. Todo esto lleva a un marcado incremento en el volumen celular y al cuadro de edema cerebral asociado a la encefalopatía hepática.

#### *1.2.1.3. Traumatismo craneoencefálico*

El trauma craneoencefálico es una patología desencadenada por una lesión física o deterioro funcional del contenido craneal, en el que concurren un gran número de eventos mecánicos y bioquímicos, estrechamente interrelacionados. Entre los factores potencialmente inductores del hinchamiento están la despolarización postraumática generalizada, asociada con un incremento en los niveles intracelulares de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  y la entrada de agua (Di et al, 2000). Otros factores causales de hinchamiento en esta condición derivan de las fuerzas “de desplazamiento” que deforman la membrana mecánicamente, llevando a cambios en la permeabilidad iónica (Di et al, 2000). Asociadas a este cuadro se presentan las reacciones características de la isquemia cuando hay una restricción en el flujo sanguíneo cerebral asociado al trauma. Un mecanismo indirecto de hinchamiento posterior al trauma craneoencefálico es la hiponatremia que se presenta como consecuencia de la liberación excesiva de hormona antidiurética (ADH).

#### *1.2.1.4. Azotemia*

La azotemia es una patología en la que hay un exceso de urea, creatinina y otras sustancias nitrogenadas en sangre, plasma o suero. Es causada por una alta producción de compuestos nitrogenados no-proteicos (ingesta alta de proteína, sangrado gastrointestinal o catabolismo acelerado de proteínas endógenas), una tasa baja de filtración glomerular (causada por perfusión renal reducida -azotemia prerrenal-, insuficiencia renal, falla renal debida a alguna

enfermedad primaria -azotemia renal- u obstrucción urinaria -azotemia postrenal-) o por la reabsorción de orina en la sangre (por alguna fuga de orina en las vías excretoras). La uremia es el síndrome tóxico polisistémico que ocurre como resultado de una disfunción renal en animales con azotemia y puede estar relacionada con los efectos metabólicos y sistémicos tóxicos producidos por la retención de productos de desecho debido a una falla en la excreción renal, a una alteración en la regulación renal de fluidos, electrolitos y del balance ácido-base, o a una producción renal fallida de hormonas y otras sustancias (eritropoyetina y dihidroxicolecalciferol).

### *1.2.2. Movilización de osmolitos en condiciones de edema cerebral isosmótico*

El edema celular, particularmente el que ocurre en los astrocitos en condiciones isosmóticas, activa la salida de aminoácidos y otros osmolitos, principalmente el aspartato, el glutamato, el GABA y la taurina, cuya salida es de 4 a 12 veces mayor a la basal. Esta movilización se ha observado de manera consistente, tanto *in vivo* como *in vitro*, en distintos modelos de edema celular isomótico (Benveniste et al, 1984; Saraansari y Oja, 1999; Phillis y O'Reagan, 2003).

En condiciones de un incremento en el  $K^+$  extracelular, como ocurre durante la epilepsia y la isquemia, se observa un aumento muy considerable en los niveles extracelulares de osmolitos. Esta respuesta se observa tanto en modelos *in vivo* (Phillis y O'Regan, 2003) como en rebanadas de cerebro y en cultivos celulares (Saransaari y Oja, 1999). En estas patologías se liberan preferentemente aspartato, glutamato, GABA, taurina, fosfoetanolamina y N-acetil-aspartato. Los mecanismos de salida de estos aminoácidos pueden no ser los mismos para todos ellos. Así, la taurina se libera predominantemente como respuesta al hinchamiento, en tanto que los flujos de glutamato y GABA tienen lugar por mecanismos mediados por transportadores, operando en sentido inverso al de la acumulación intracelular, debido al colapso de los gradientes iónicos transmembranales que proporcionan la energía para el transporte (Anderson y Swanson, 2000; Rossi et al, 2000; Hansson et al, 2000). Los movimientos del N-acetil-aspartato parecen ser una consecuencia del daño neuronal. En el caso del glutamato se ha propuesto la posibilidad de un transportador operando en reversa, como se describirá en detalle más adelante en relación con su participación en respuesta a concentraciones altas de  $K^+$  (Benveniste et al, 1984; Szatkowski y Atwell, 1994; Basarsky et al, 1999; Seki et al, 1999; Rossi et al, 2000; Nelson et al, 2003).



En pacientes con daño craneoencefálico se ha encontrado que los niveles de glutamato y taurina se encuentran elevados en el fluido cerebroespinal, lo que sugiere que en las células cerebrales la salida de estos aminoácidos está potenciada. Cuando ocurre un trauma en la médula espinal aumenta considerablemente la salida de varios aminoácidos, principalmente glutamato, GABA, glicina y taurina, con su correspondiente decremento en los contenidos tisulares (Bullock et al, 1998; Stover y Unterberg, 2000).

En un modelo experimental de daño hepático que simula la encefalopatía hepática, cuyo agente causal inicial es la hiperamonemia, se observó un aumento de más de tres veces en los niveles de glutamina cerebral (Martínez-Hernández et al, 1977), mientras que las concentraciones de mioinositol, urea y taurina disminuyeron entre 30 y 50% (Zielinska et al, 2003). En estudios *in vitro* con células gliales también se observó un aumento en los niveles de glutamina y una disminución en los niveles celulares de fosfocreatina, mioinositol, taurina, colina y glicina del 72, 30, 60-65, 50-60 y 30% respectivamente. Consecuente con estas observaciones en cultivos de astrocitos se detecta un incremento en la movilización de taurina y mioinositol (Haussinger et al, 2000).

En tanto que se observa una consistencia en la expulsión de los principales osmolitos orgánicos en condiciones de edema cerebral asociado a patologías en las que no disminuye la osmolaridad del plasma, esta movilización no parece ser suficiente para prevenir el edema cerebral. Esta situación subraya la importancia para la regulación del volumen celular de los iones  $K^+$  y  $Cl^-$ , que no están contribuyendo a la rectificación en estas condiciones. Sin embargo, la contribución de los osmolitos orgánicos puede atenuar la magnitud del edema.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El incremento en el volumen celular es una condición de reto extremo para las células animales, siendo particularmente grave en el caso del edema cerebral, que se presenta asociado a numerosas patologías. El edema celular se presenta en respuesta a un decremento en la osmolaridad del plasma, generalmente debido a hiponatremia (edema hiposmótico) o por una acumulación intracelular de solutos osmóticamente activos y agua, en condiciones de osmolaridad externa constante (edema isosmótico). Los mecanismos que generan el edema celular hiposmótico y la respuesta de las células a esta situación se conocen con detalle, en tanto que los mecanismos y el desarrollo del edema isosmótico se han estudiado poco. Se desconocen aspectos esenciales tales como la existencia de un proceso adaptativo para recuperar el volumen, su posible eficiencia y los mecanismos involucrados así como los alcances y mecanismos de movilización de osmolitos, como el glutamato y la taurina, inducida por hinchamiento. Siendo el edema celular isosmótico el de mayor prevalencia y gravedad, este conocimiento es de un gran interés.

### 3. HIPÓTESIS

Los mecanismos que se activan como respuesta al edema isosmótico para contrarrestar el hinchamiento celular pueden parecerse, al menos en parte, a los que se presentan en un edema hiposmótico.

### 4. OBJETIVOS

Implementar dos modelos experimentales de edema citotóxico isosmótico que difieren en los mecanismos que los generan y en el cambio en la fuerza iónica intracelular:

1. Acumulación de urea, un modelo en el que hay disminución de la fuerza iónica intracelular, como en el caso del hinchamiento hiposmótico.
2. Acumulación intracelular de iones, al exponer a las células a una condición de niveles altos de  $K^+$  extracelular y ouabaína. En este modelo las células acumulan  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Cl^-$ , seguido de un influjo de agua osmóticamente dirigida. No hay una disminución en la fuerza iónica intracelular.

En estos dos modelos se investigarán los siguientes aspectos:

- Los mecanismos que inducen el incremento celular en cada condición de hinchamiento.
- La capacidad o incapacidad de las células para regular su volumen después de un incremento producido en condiciones de isosmolaridad.
- Las características de la movilización de los osmolitos iónicos y los osmolitos orgánicos en ambas condiciones.
- La contribución relativa de los distintos tipos de osmolitos en la regulación del volumen celular.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. *Cultivo de células*

Los cultivos stock de fibroblastos Swiss 3T3 (American Tissue Type Culture Collection, Manassas, Va., USA) fueron mantenidos en Medio Basal Eagle (Gibco), suplementado con un 10% de suero fetal bovino, en atmósfera húmeda a 37° C con un 5% de contenido en CO<sub>2</sub>. Las células fueron cultivadas en Medio Basal Eagle con 10% de suero fetal bovino, glutamina 2mM, 50 U ml<sup>-1</sup> de penicilina y 50 µg ml<sup>-1</sup> de estreptomicina y usados después de 2-3 días cuando las células estuvieran confluentes. Para propósitos experimentales los fibroblastos Swiss 3T3 usados para medir el flujo de taurina y aspartato radiomarcados, se montaron en cubreobjetos redondos a una densidad de 1 x 10<sup>4</sup> células ml<sup>-1</sup> para los ensayos de inmunofluorescencia. Las cajas de cultivo fueron incubadas a 37° C con un 5% de contenido en CO<sub>2</sub>.

Los cultivos de astrocitos corticales fueron obtenidos de ratas Wistar de 1 día de edad. Una suspensión de células disociadas fue colocado a una densidad de 3.0 x 10<sup>6</sup> células ml<sup>-1</sup>, en cajas de 35 mm y mantenido en Medio Basal Eagle (Gibco), suplementado con un 10% de suero fetal bovino, glutamina 2mM, 50 U ml<sup>-1</sup> de penicilina y 50 µg ml<sup>-1</sup> de estreptomicina en atmósfera húmeda a 37° C con un 5% de contenido en CO<sub>2</sub>. Los cultivos fueron usados después de 7 días cuando las células estuvieron confluentes.

### 5.2. *Soluciones y fármacos*

Al medio isosmótico, cuya concentración final (mM) de sales es 135 NaCl, 5 KCl, 1.17 MgSO<sub>4</sub> 1 CaCl<sub>2</sub>, 10 glucosa y 10 HEPES, a pH de 7.4 y 300 mOsm, a la solución isosmótica con urea (100,150,200 Urea, 85,60,35 NaCl, 5 KCl, 1.17 MgSO<sub>4</sub> 1 CaCl<sub>2</sub>, 10 glucosa y 10 HEPES, a pH de 7.4 y 300 mOsm), y a la solución con concentraciones altas de potasio (40 NaCl, 100 KCl, 1.17 MgSO<sub>4</sub> 1 CaCl<sub>2</sub>, 10 glucosa y 10 HEPES, a pH de 7.4 y 300 mOsm), se le verificaron sus osmolaridades con un osmómetro de punto de congelamiento (Osmette A, Precision Systems Natick, Mass., USA). Las soluciones stock de NPPB (mM), *o*-vanadato (mM), AG18 (mM), ácido niflúmico (mM), floretina (mM), DCPIB (mM), ouabaína (mM) se hicieron de acuerdo a su especificación. Para el tratamiento con fármacos, cuya presencia es necesaria durante todo el experimento, el tiempo de incubación se indica en cada figura.

### 5.3. *Liberación de [<sup>3</sup>H]-Taurina y [<sup>3</sup>H]-Aspártico*

Los fibroblastos Swiss 3T3 y los astrocitos fueron incubados con [<sup>3</sup>H]-Taurina (0.1 μCi ml<sup>-1</sup>) o [<sup>3</sup>H]-D-Aspártico (0.1 μCi ml<sup>-1</sup>) por una hora en medio isosmótico. Al término de esa hora las células fueron lavadas por 8 minutos con medio isosmótico y perfundidas con 1 ml min<sup>-1</sup> durante 5 minutos, después de lo cual se alcanza un eflujo estable. Posteriormente, el medio fue reemplazado por medio con urea (70, 100 y 150 mM) o K<sup>+</sup> (100 mM)/ouabaína (1mM), y las muestras fueron colectadas durante 13 ó 30 minutos más. Al final del experimento las células fueron lisadas y la radiactividad remanente en las células y en las muestras colectadas fue determinada en un contador de centelleo líquido. La radiactividad liberada por minuto se expresa como el por ciento del total incorporado durante la carga.

### 5.4. *Estimación de cambios en el volumen celular*

Las mediciones de cambio en el volumen celular fueron realizadas por estimación de cambios en el volumen celular relativo empleando un sistema de difusión de luz (Pedersen et al, 2002). Los cubreobjetos fueron colocados en un ángulo relativo de 50° con respecto a la luz de excitación en una cámara dentro de una celda con medio isosmótico en un espectrómetro luminiscente Aminco-Bowman Series 2. Las células fueron excitadas a 585 nm con una lámpara de Argón y la emisión fue detectada a la misma longitud de onda, la intensidad de la luz se correlaciona inversamente con el volumen celular. Los cambios en el volumen celular fueron calculados obteniendo el cociente de la razón  $I_0/I_t$ , donde  $I_0$  es la señal de emisión promedio durante los primeros 100 segundos del experimento, y  $I_t$  es la señal obtenida de emisión a tiempo t después del estímulo.

## 6. RESULTADOS

Los resultados del estudio que se muestran a continuación, se refieren a (1) la caracterización del incremento en el volumen, (2) la movilización de taurina y D-aspartato como representativos de los osmolitos orgánicos, (3) la corriente de Cl<sup>-</sup> activada por volumen y (4) la regulación del volumen subsecuente al hinchamiento en dos modelos experimentales que generan hinchamiento en condiciones isosmóticas. En uno de los modelos se emplean altas concentraciones de urea extracelular (en donde la fuerza iónica disminuye) en cultivos celulares de fibroblastos. En el otro modelo se emplean concentraciones altas de KCl (que implica el mantenimiento de la fuerza iónica intracelular) en cultivos primarios de astrocitos. En los dos casos, el modelo contempla la reducción equiosmolar de NaCl.

### 6.1. Modelo de concentraciones elevadas de urea

#### 6.1.1. Hinchamiento y decremento regulador del volumen (DRV)

La Fig. 3 muestra el incremento en el volumen de las células expuestas a 70, 100 y 150 mM de urea. El incremento en el volumen fue proporcional a la concentración de urea, observándose aumentos de 8.2, 10.6 y 15.7%, respectivamente (Fig. 3A, C). El incremento en volumen inducido por urea en las células 3T3 se inhibió de manera muy importante por la fletina, un bloqueador de los transportadores unidireccionales incluyendo los de la urea (UTA y UTB). La Fig. 3A muestra que en presencia de este compuesto se previene prácticamente por completo el incremento en el volumen celular. El hinchamiento celular inducido por urea fue seguido por un proceso de regulación activa del volumen, (decremento regulador de volumen; DRV), de magnitud proporcional al hinchamiento. Así, la recuperación del volumen en células expuestas a 70, 100 y 150 mM de urea, fue de 27.6, 38.9 y 74.1%, respectivamente (Fig. 3D).

Las características del hinchamiento y el ulterior DRV en respuesta a niveles altos de urea se examinaron, con fines comparativos, con los que ocurren en respuesta a una condición hiposmótica (H30%), cuyas propiedades han sido estudiadas en detalle (Fig. 3B). Se encontraron diferencias claras entre los dos modelos en los siguientes parámetros: 1) la magnitud del incremento en el volumen, 2) el tiempo en el que se alcanza el máximo incremento y 3) la eficiencia en el decremento en la regulación del volumen.

El tiempo en el que alcanza el máximo incremento es notablemente menor en la condición hiposmótica que en la de urea; en la primera, el pico de incremento se observa de manera inmediata, en tanto que en el caso del hinchamiento inducido por urea, el tiempo necesario

para alcanzar este máximo es de 4 min en promedio; la magnitud del incremento en el volumen celular es mayor en la condición hiposmótica (25%) que en el modelo de urea, en el que aún usando la máxima concentración de 150 mM, el incremento en el volumen es de 15.7%; el DRV es más eficiente en la condición de urea que en la de hiposmolaridad; la recuperación del volumen en el primer caso fue del 33%, en tanto que en el de urea 150 mM fue de 75%.

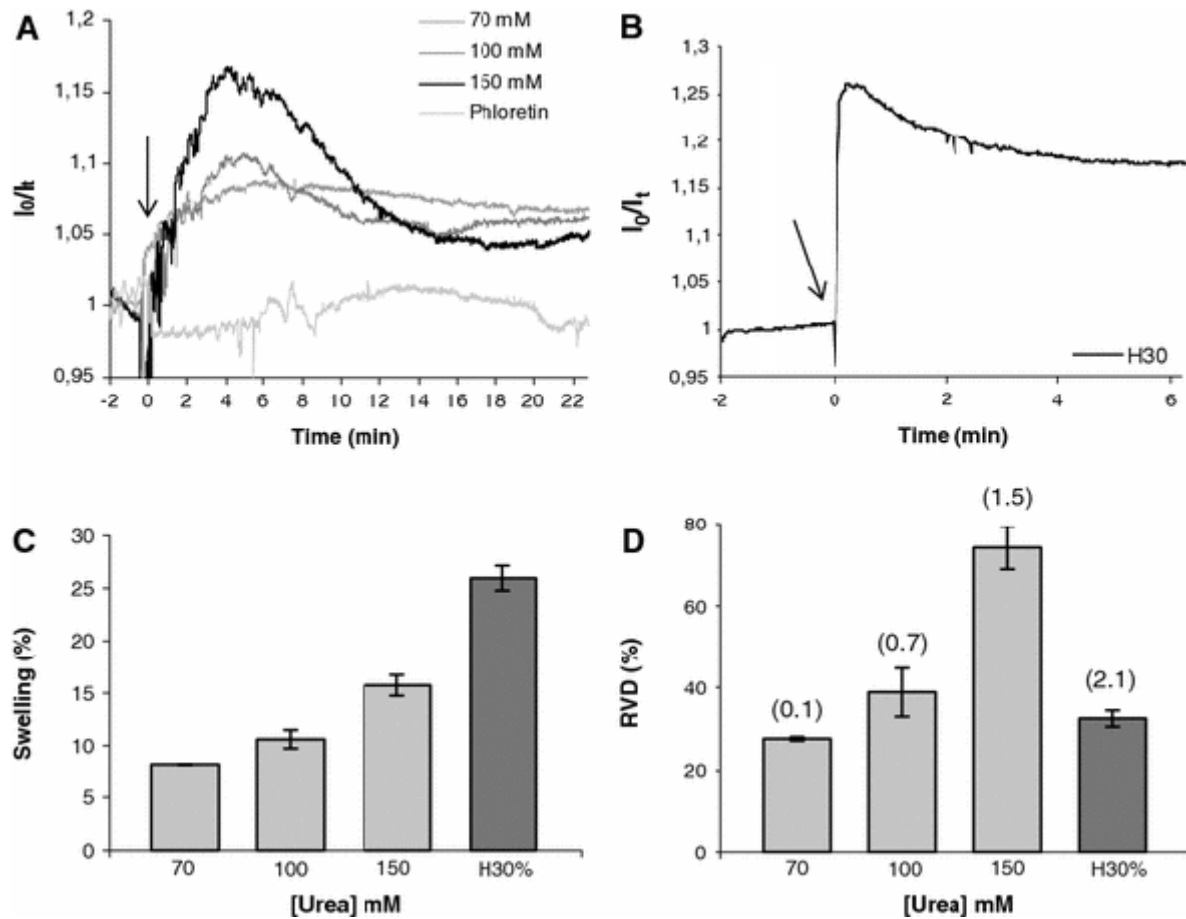


Figura 3. Hinchamiento y DRV en fibroblastos 3T3 expuestos a urea (70, 100 y 150 mM) o medio hiposmótico (H30%). El volumen se midió usando un sistema de dispersión de luz. **A.** Trazos representativos de los cambios en volumen inducidos por urea. **B.** Trazo representativo de los cambios en volumen inducidos por hiposmolaridad. **C.** Volúmenes máximos expresados como el porcentaje sobre el volumen en condiciones basales. **D.** RVD calculado como porcentaje del volumen recuperado. La velocidad del DRV, expresada como la pendiente se muestra entre paréntesis. Promedios  $\pm$  ES de 6-12 experimentos.

En condiciones hiposmóticas, las células de prácticamente todos los tejidos en todas las especies, llevan a cabo el DRV a través de la activación de vías de expulsión de osmolitos intracelulares, presentes en concentraciones elevadas. Los iones  $K^+$  y  $Cl^-$  y los osmolitos orgánicos son los más importantes, aunque su contribución relativa puede variar en las distintas células y puede ser distinta dependiendo de las condiciones que inducen el hinchamiento. La movilización de osmolitos orgánicos del grupo de los aminoácidos, la taurina y el glutamato, así como las corrientes de  $Cl^-$  activadas por volumen, se examinaron en el modelo de urea

#### 6.1.2. *Movilización de osmolitos: taurina y D-aspartato*

La Fig. 4 A, B muestra el efecto de la urea sobre la liberación de taurina, medida usando  $^3H$ -taurina como trazador. Las células expuestas a urea mostraron una rápida liberación de taurina en forma dependiente no-lineal de la concentración de urea. En respuesta a una concentración de 100 mM la salida de taurina se activa rápidamente, y aumenta de manera progresiva incrementándose a partir de una liberación basal de 0.2% hasta un máximo de 1.85%, que es el pico de liberación que se alcanza en aproximadamente 8 min. A partir de este tiempo, el eflujo de taurina comienza a inactivarse aunque no llega a alcanzar los niveles basales durante el tiempo de seguimiento (20 min). El total de taurina liberada durante este periodo fue de 19% (Fig. 4A). La Fig. 4B muestra el efecto de la urea 150 mM sobre la salida de taurina. El curso temporal fue similar al evocado por una concentración de 100 mM pero la magnitud del eflujo de taurina fue marcadamente más elevado, alcanzando un pico de liberación de más del 10% y una movilización total de más del 70% de la poza intracelular de  $^3H$ -taurina. A concentraciones de urea más elevadas 200-300 mM, esencialmente toda la poza de taurina es movilizada. La Fig. 4C muestra una gráfica de la salida total de taurina en función de la concentración de urea, en la que puede observarse que la cantidad de taurina liberada sigue un patrón sigmoide, con una diferencia cuantitativa importante entre 100 y 150 mM de urea y con poco cambio entre las concentraciones de urea más elevadas.



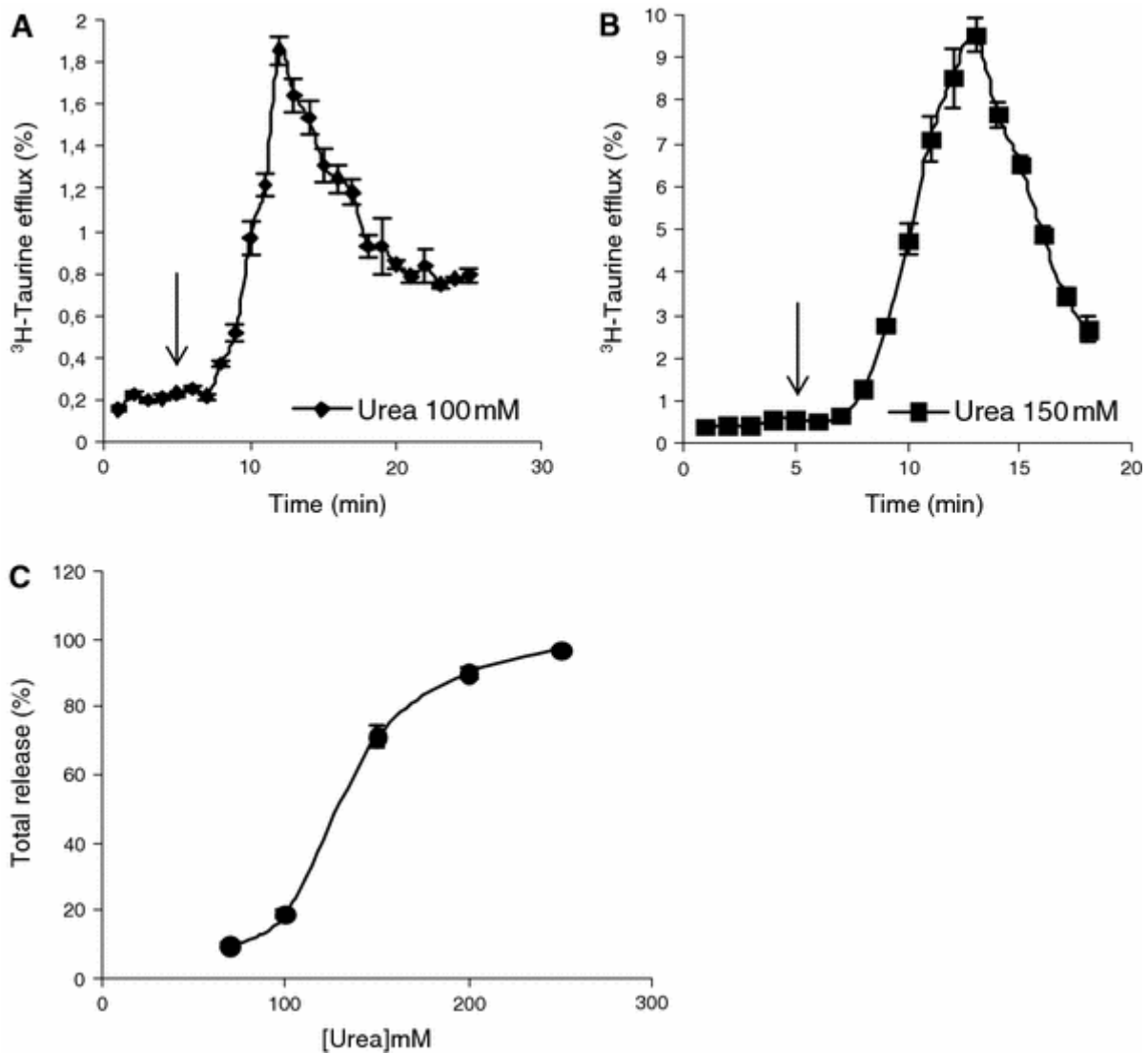


Figura 4. Liberación de taurina inducida por urea. Las células precargadas con <sup>3</sup>H-taurina fueron perfundidas con medio isomótico durante cinco minutos y posteriormente el medio fue reemplazado por uno con urea 100 (A) ó 150 mM (B). C. Los puntos corresponden al total liberado durante el experimento (fracciones 6-18) a distintas concentraciones de urea. Promedios ± ES de 6-12 experimentos.

La movilización de taurina evocada por urea se comparó con la inducida por una solución 30% hiposmótica (Fig. 5A). El curso temporal muestra que el pico de liberación en esta condición se alcanza mucho más rápidamente, al min 2, que en el caso de la urea (Fig. 4). Esta diferencia coincide con la observada en el curso temporal de de hinchamiento en las dos condiciones. La magnitud de la liberación de taurina en respuesta a hiposmolaridad semeja la evocada por urea 100 mM, con un pico máximo de 1.75% y una liberación total de 10.8%, bastante menor a la que se libera por hinchamiento evocado por urea (Fig. 5B).

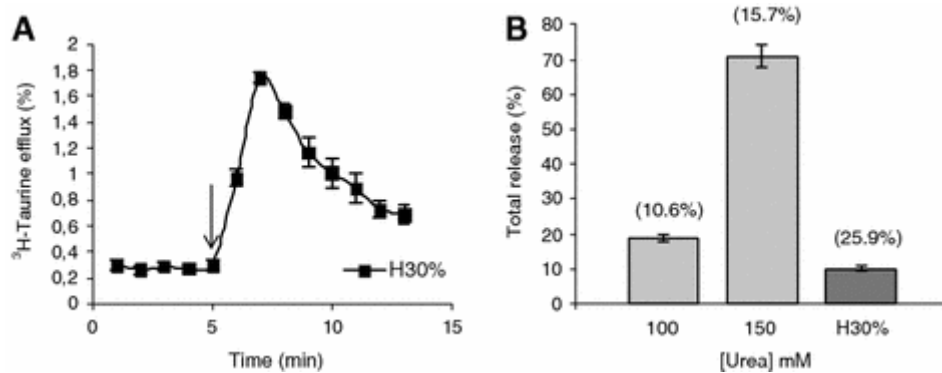


Figura 5. Liberación de taurina inducida por hiposmolaridad. **A.** Curso temporal de salida de taurina evocada por una reducción del 30% en la osmolaridad. **B.** Total liberado durante el experimento a dos concentraciones de urea e hiposmolaridad 30%. El incremento en volumen en cada condición se indica entre paréntesis. Promedios  $\pm$  ES de 6-12 experimentos.

Una característica de la liberación de taurina activada por hiposmolaridad es su sensibilidad al estado de fosforilación de cinasas de tirosina. La movilización de taurina inducida por urea se vio igualmente modulada por esta condición, ya que, como se muestra en la Fig. 6 la inhibición de las cinasas con un bloqueador general como es el AG18 disminuyó la salida de taurina, en tanto que la reducción en la actividad de las fosfatasa, inducida por el *o*-vanadato, incrementó la liberación.

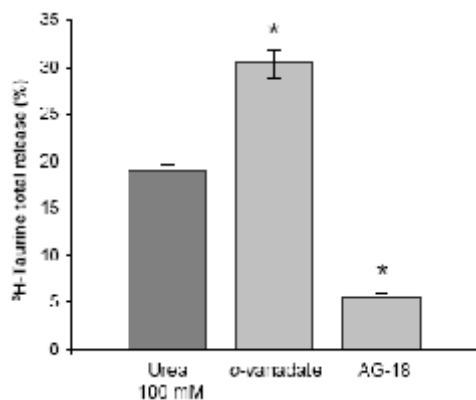


Figura 6. Efecto de *o*-vanadato (100  $\mu$ M) y AG18 (50  $\mu$ M) en la liberación de taurina en el modelo de hinchamiento por urea. Los datos se expresan como en la Fig. 1B. Promedios  $\pm$  SE de 8-12 experimentos. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control \* $P < 0.05$ .

Otro rasgo característico del mecanismo de liberación de taurina evocado por urea, es el de su sensibilidad a los bloqueadores generales de canales de Cl<sup>-</sup>, los cuales se sabe que tienen un profundo efecto inhibitorio de la liberación osmosensible de taurina.

Se investigó el efecto del NPPB, el DIDS y el ácido niflúmico en la salida de taurina. La Fig. 7A muestra que, al igual que en la condición hiposmótica, la movilización de taurina inducida por urea se vio claramente reducida por estos agentes, siendo el NPPB el más potente, al reducir en más del 90% la salida de taurina a una concentración de 100  $\mu$ M. El DIDS (100  $\mu$ M) y el ácido niflúmico (500  $\mu$ M) la redujeron 80% y 75%, respectivamente. El cálculo de la  $K_i$  para el NPPB arrojó un valor de 26.7  $\mu$ M (Fig. 7B).

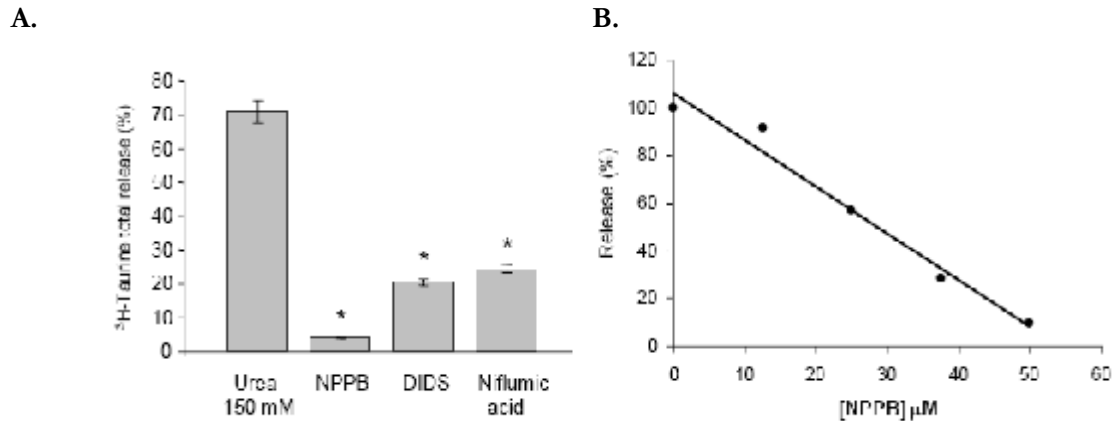
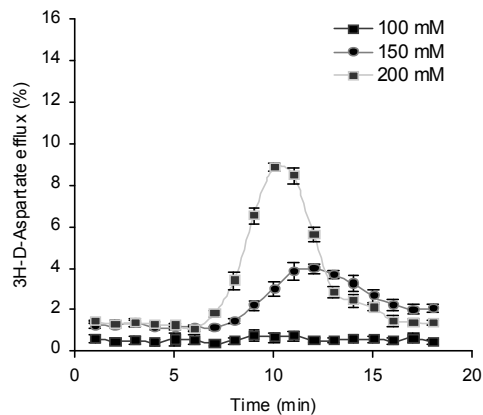


Figura 7. **A.** Efecto de bloqueadores de canales de  $\text{Cl}^-$  en la liberación de taurina inducida por urea 150 mM en células expuestas a NPPB (100  $\mu$ M), DIDS (100  $\mu$ M) o ácido niflúmico (500  $\mu$ M). **B.** Curva dosis-respuesta para el NPPB. Promedios  $\pm$  SE de 8-12 experimentos. Diferencias estadísticamente significativas del control \* $P < 0.05$ .

Estos agentes son inhibidores generales de los canales de  $\text{Cl}^-$ , incluyendo el canal de  $\text{Cl}^-$  activado por volumen, pero en condiciones hiposmóticas se ha observado de manera muy consistente que también inhibe los flujos de osmolitos orgánicos en numerosos tipos celulares.

Además de la taurina, otros aminoácidos funcionan también como osmolitos, entre ellos el ácido glutámico. La respuesta de los fibroblastos liberando glutamato fue examinada en este estudio usando como trazador el análogo no metabolizable del glutamato, el D-aspartato, en la forma de  $^3\text{H-D-aspartato}$ . La Fig.8 muestra una respuesta semejante a la de la taurina, es decir, que el incremento en el volumen evoca la liberación de D-aspartato con un curso temporal similar al de la taurina. La magnitud de la liberación es, sin embargo, considerablemente menor, con un total liberado de 8% y 32% en presencia de urea 100 y 150 mM, respectivamente.

A.



B.

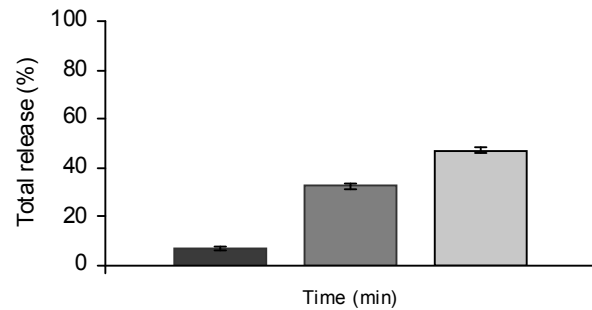


Figura 8. Liberación de D-aspártico inducida por urea. **A.** Total liberado durante el experimento (fracciones 6-18) a distintas concentraciones de urea. **B.** Las barras corresponden al total liberado durante el experimento a distintas concentraciones de urea. Promedios  $\pm$  ES de 6-12 experimentos.

### 6.1.3. Corriente de $Cl^-$

En la mayor parte de las células animales, la condición hiposmótica activa una corriente de  $Cl^-$  con propiedades electrofisiológicas muy semejantes en los distintos tipos celulares. Como se describió con detalle en la Introducción, se trata de una corriente de rectificación saliente, con una conductancia unitaria media y altamente selectiva a los aniones. En nuestro laboratorio se ha caracterizado esta corriente en los fibroblastos 3T3 y uno de los objetivos del presente estudio es el de caracterizar la corriente evocada por urea y compararla con la estimulada por hiposmolaridad.

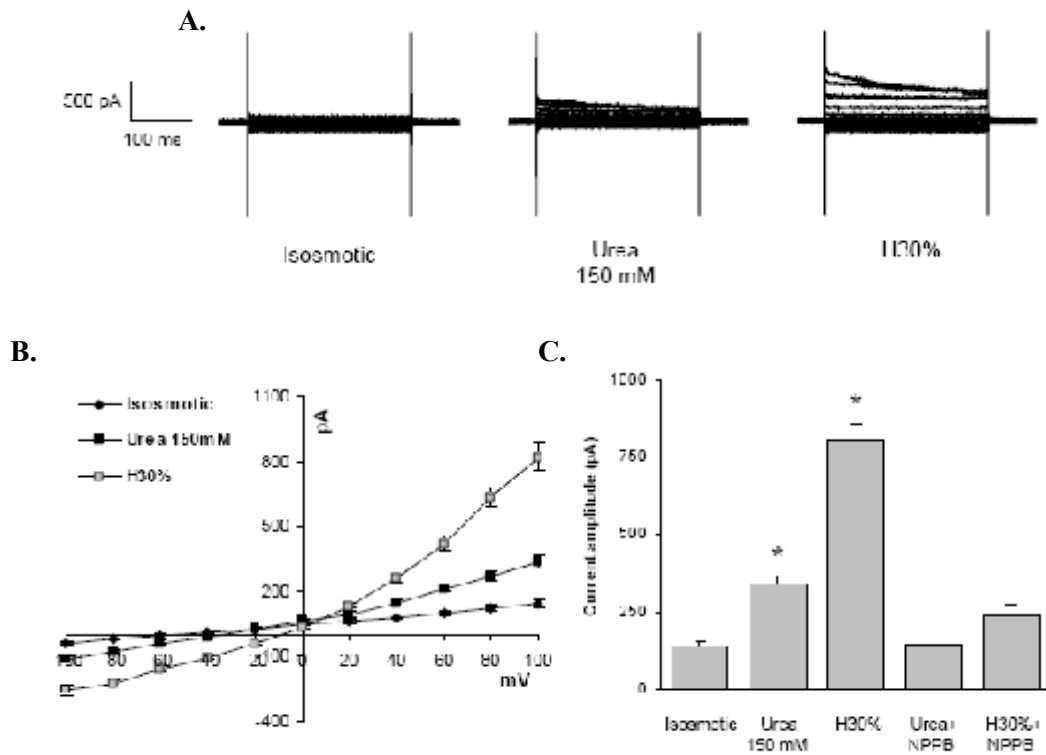


Figura 9. Activación por urea de una corriente de Cl<sup>-</sup> que muestra las características de la corriente activada por volumen. **A.** Corrientes totales representativas en cada una de las condiciones experimentales. **B.** Curvas de corriente-voltaje (I-V) en medios: isosmótico (◆), hiposmótico 30% (▲) isosmótico mas urea 150 mM (■). **C.** Efecto de los bloqueadores sobre la corriente a +100 mV a la condición experimental indicada. Promedios ± SE de 6-8 experimentos. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control \*P<0.05.

La Fig. 9A muestra los trazos característicos de la apertura de una corriente de Cl<sup>-</sup> en respuesta al tratamiento con urea 150 mM y un trazo representativo de la corriente activada por una solución 30% hiposmótica. Las curvas I-V (corriente-voltaje) activadas por urea 150 mM y por hiposmolaridad se ilustran en la Fig. 9B. Los rasgos típicos de la corriente de Cl<sup>-</sup> activada por volumen, son los que presenta la evocada por una solución hiposmolar. Esto es, rectificación saliente, inactivación a potenciales positivos y conductancia unitaria de 724 pA (a los 15 min). La adición de NPPB 100 μM disminuyó la magnitud de esta corriente de Cl<sup>-</sup> en 71% (Fig. 9C). Comparativamente con la corriente osmosensible, se observó que la evocada por urea muestra propiedades similares, pero de menor amplitud [338 pA (±27)]. Otra diferencia importante es que mientras que la corriente evocada por hiposmolaridad se puede registrar en prácticamente todas las células (31/32), la que se induce por urea se abrió sólo en aproximadamente la mitad (15/31).

El hecho de que las corrientes de  $\text{Cl}^-$  activadas por urea revirtieran a un potencial de  $-38 \text{ mV}$  refleja la menor amplitud de dicha corriente. La permeabilidad de la salida del  $\text{Cl}^-$  evocado por urea fue también demostrada por su inhibición con NPPB en un 58% (Fig. 9C).

#### 6.1.4. Inhibición de la movilización de osmolitos y DRV

La salida de osmolitos orgánicos, ejemplificada en este estudio por la taurina y el glutamato, así como la movilización del  $\text{Cl}^-$  a través de una vía conductiva sustentan la recuperación del volumen en condiciones hiposmóticas. La recuperación del volumen subsecuente al hinchamiento por urea se reduce de manera muy importante (82-95%) cuando estas vías se bloquean con los inhibidores de canales de  $\text{Cl}^-$  (Fig. 10). Asimismo, la inhibición de las cinasas de tirosina con AG18, que reduce de manera muy notable la liberación de taurina, tuvo un efecto muy marcado reduciendo en más del 90% la regulación del volumen (Fig. 10).

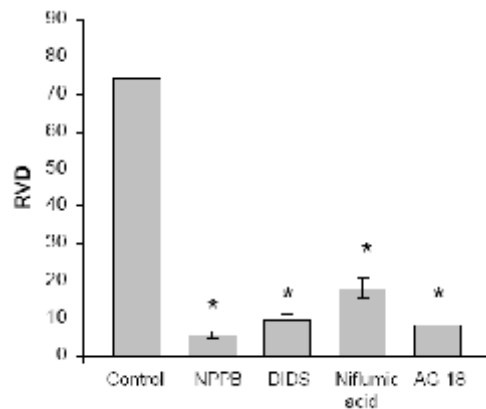


Fig. 10. Influencia de inhibidores de canales de  $\text{Cl}^-$  y de cinasas de tirosina en los mecanismos de DRV en respuesta al hinchamiento inducido por urea 150 mM. Promedios  $\pm$  SE de 6-8 experimentos. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control \* $P < 0.05$ .

## 6.2. Modelo de concentraciones elevadas de KCl

Los astrocitos expuestos a KCl 100 mM y ouabaína 1 mM (KO) mostraron un incremento continuo en el volumen celular. El hinchamiento inicia inmediatamente después del tratamiento y se incrementa progresivamente hasta alcanzar un máximo a los 27 minutos; después se observa una meseta que se extiende por 50 min sin que se presente mayor hinchamiento significativo. El hinchamiento máximo alcanzado en promedio fue de 14% (Fig. 11). El incremento en el volumen observado en los astrocitos expuestos a KO se debe por una parte, a la entrada de  $\text{K}^+$  impulsada por su alta concentración extracelular, y por otra, a la

acumulación de  $\text{Na}^+$  debida a la presencia del inhibidor de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Todo esto es seguido por un aumento en la entrada de  $\text{Cl}^-$  para mantener la electroneutralidad y de agua osmóticamente dirigida.

Para investigar el mecanismo responsable de la entrada de  $\text{K}^+$  a los astrocitos se estudió el efecto de dos compuestos, la bumetanida, un inhibidor del cotransportador electroneuro,  $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-/\text{K}^+$  (NKCC), y el bario, un bloqueador general de los canales de  $\text{K}^+$ . La Fig. 11 muestra que el tratamiento con bumetanida redujo considerablemente el incremento en volumen, hasta un 65%, en tanto que el bario inhibió el hinchamiento un 23%. Estos resultados indican una contribución muy importante del cotransportador NKCC al hinchamiento de los astrocitos, en tanto que la contribución de un canal de  $\text{K}^+$  es sólo marginal (Fig. 11). Con fines comparativos la Fig 11 muestra la respuesta de los astrocitos expuestos a una solución hiposmótica al 30%. Se observa un hinchamiento inmediato, alcanzando un 13.5% en el primer minuto después del estímulo y una reducción progresiva posterior, indicativa del DRV.

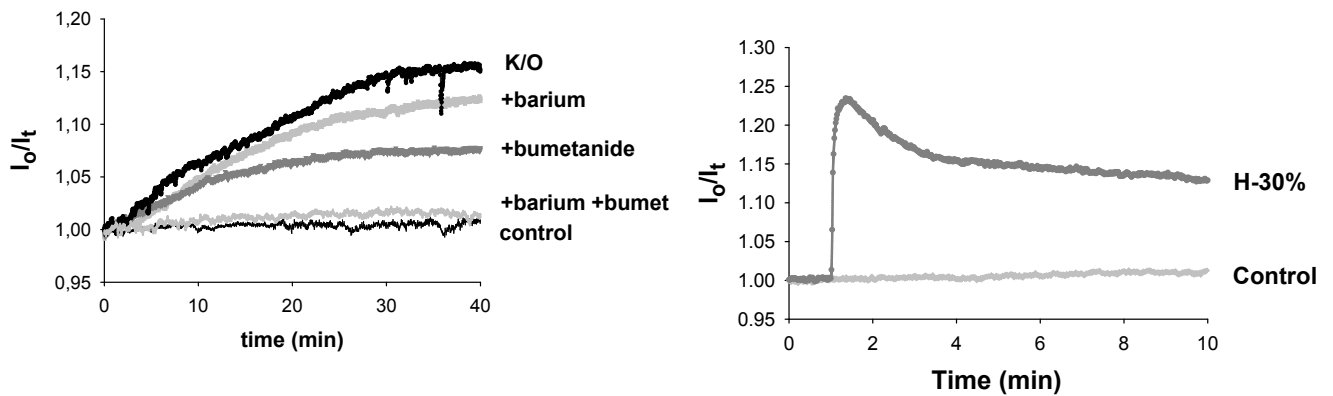


Figura 11. Hinchamiento de astrocitos corticales expuestos a KO (y los inhibidores bumetanida y bario) o hiposmótico. Los cambios en el volumen celular fueron estimados empleando un sistema de dispersión de luz.

### 6.2.1. Liberación de osmolitos: glutamato y taurina

Como se mencionó en la Introducción, el modelo de KO reproduce dos de los hechos presentes en la isquemia cerebral, esto es, un incremento en los niveles de  $\text{K}^+$  extracelular y la inhibición de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  debida a la falla energética. En estas condiciones se puede generar excitotoxicidad por la movilización excesiva del glutamato. Es por ello que en esta

parte del estudio, se pone mayor énfasis en las características de la movilización de este aminoácido. Para identificar la salida de glutamato en la condición KO se utilizó, como en el modelo anterior, el análogo no metabolizable D-aspartato marcado radioactivamente con  $^3\text{H}$ . La liberación de  $^3\text{H}$ -D-aspartato de los astrocitos expuestos a la condición KO muestra un patrón de liberación bifásico. En la primera fase, se observa un incremento rápido y significativo, durante el cual la liberación alcanza un máximo de 1.7% a los 3 min de transcurrido el estímulo (Fig. 12A). Posteriormente, la salida disminuye lentamente mostrando fracciones de 1.6 a 1.2% por minuto durante 8 min. En la segunda fase, la liberación muestra un incremento lento y progresivo que se mantiene durante todo el tiempo del experimento (40 minutos). En la primera fase se libera un total de 13.5% del D-aspartato acumulado, y en la segunda cerca del 31%. La suma de liberación durante las dos fases fue del 45%.

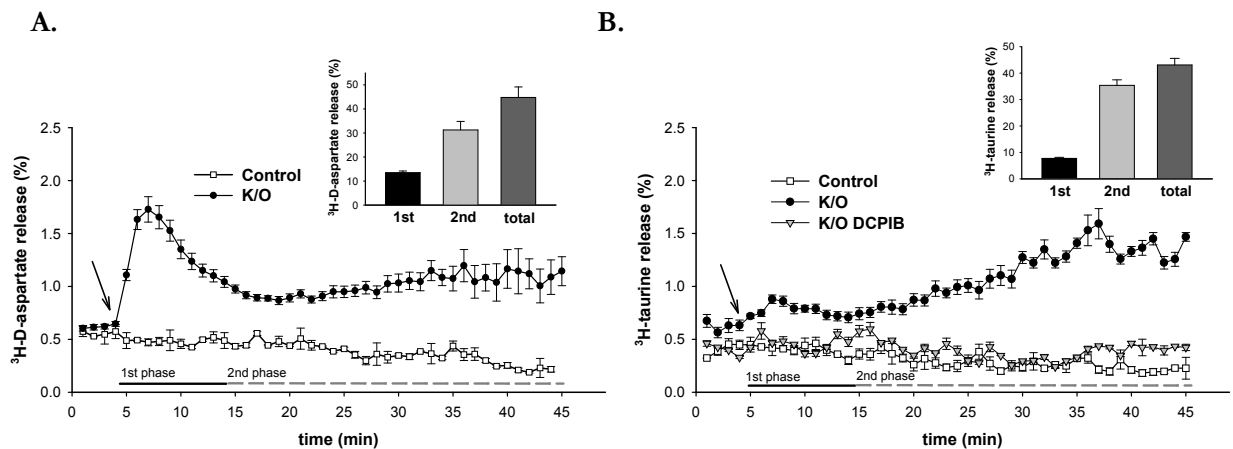


Figura 12. **A.** Liberación de D-aspartato y **B.** taurina inducida por KO. Las células precargadas con  $^3\text{H}$ -D-aspartato o  $^3\text{H}$ -taurina fueron perfundidas cada minuto con medio isomótico (hasta el minuto 4) y posteriormente el medio fue reemplazado por uno con  $\text{K}^+$  100 mM y ouabaina 1 mM. Los puntos representan la radiactividad liberada a cada fracción, expresada como el porcentaje de radiactividad total acumulada durante la carga. Promedios  $\pm$  ES de 8-10 experimentos.

La salida de taurina utilizando el aminoácido marcado con  $^3\text{H}$ , se evaluó en las mismas condiciones, y el curso temporal se muestra en la Fig. 12B. En los primeros minutos de la exposición a KO se observó un incremento en la liberación con un pico pequeño y transitorio. En adelante se observa un incremento continuo durante los siguientes 30 minutos, sin que se presente ninguna señal de inactivación. La movilización de taurina en la primera fase corresponde al 8% de la taurina acumulada, y en la segunda se alcanza el 35%, con un total de 43%.



Los siguientes experimentos se diseñaron con el propósito de investigar el(los) mecanismos de movilización del glutamato (D-aspartato) y la taurina en respuesta al estímulo con KO. Se consideraron dos posibilidades, la primera es que la liberación sea una respuesta a la condición despolarizante derivada de la disipación de los gradientes iónicos, lo que alteraría la direccionalidad de los transportadores de los aminoácidos, originalmente a cargo de permitir su acumulación en contra del gradiente de concentración. La otra posibilidad es que la liberación ocurriera en respuesta a un hinchamiento, a través del canal activado por volumen. Para el caso del glutamato, estas dos posibilidades se evaluaron durante las dos fases de liberación de D-aspartico examinando el efecto del TBOA, un bloqueador no competitivo del transportador del glutamato y el del DCPIB, un potente bloqueador específico de los canales aniónicos sensibles a volumen. La figura 13A muestra un marcado efecto inhibitorio del TBOA en la primera fase de liberación de D-aspartico, de hasta un 60%. El DCPIB mostró también un efecto inhibitor, en un 21%. El tratamiento simultáneo con los dos inhibidores redujo el flujo en un 95%. Se encontró un patrón de inhibición opuesto en la segunda fase de liberación (Fig. 13B) de D-aspartico, que mostró ser esencialmente insensible a TBOA pero notablemente inhibido por DCPIB. En el caso de la taurina, el tratamiento con el inhibidor de la vía sensible al volumen, DCPIB, previno totalmente la movilización inducida por K/O (Fig. 12B).

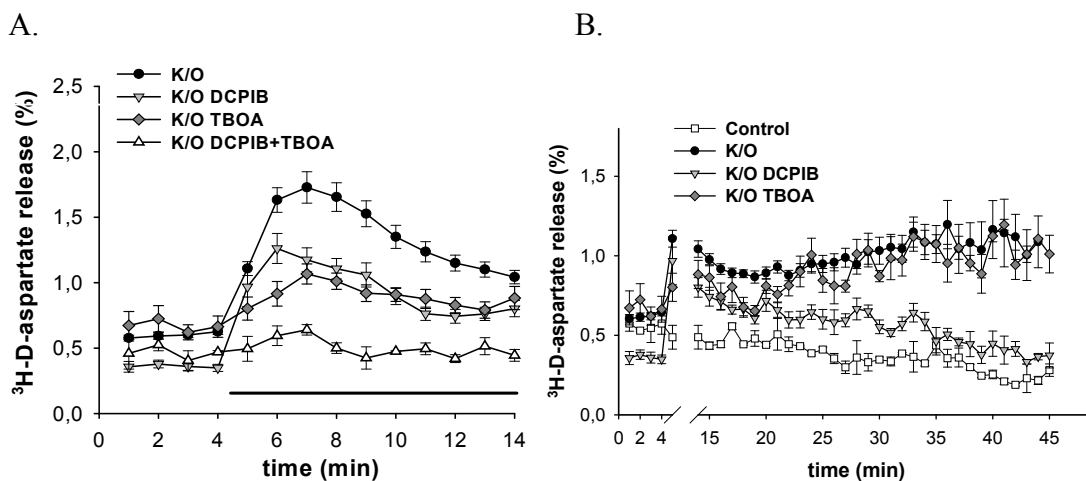


Figura 13. Efecto de TBOA y DCPIB en la salida de D-aspartico inducida por KO. Los astrocitos fueron preincubados con los bloqueadores (5  $\mu$ M TBOA y 10  $\mu$ M DCPIB) durante 30 minutos y estuvieron presentes durante todo el experimento. Promedios  $\pm$  ES de 6 experimentos.

## 7. DISCUSIÓN

Como se establece en los objetivos, el presente estudio tiene el propósito de conocer la respuesta celular al incremento en el volumen inducido en condiciones isosmóticas, a fin de establecer semejanzas y diferencias con respecto al hinchamiento y la recuperación del volumen (DRV) inducidos por hiposmolaridad. En la investigación se utilizaron dos modelos experimentales, consistentes en exponer a las células a concentraciones altas de urea (modelo 1) o de KCl más ouabaína (KO) (modelo 2). En ambos casos se genera hinchamiento celular por el influjo osmótico de agua que sigue a la acumulación de los osmolitos correspondientes, urea en el modelo 1 y  $K^+$  y  $Cl^-$  en el modelo 2, pero con una diferencia fundamental entre los dos modelos, pues en el primero, siendo la urea una molécula sin carga, hay una disminución en la fuerza iónica intracelular debida a la entrada de agua, en tanto que en el modelo de KO, la acumulación del agua es acarreada por los iones y por lo tanto la fuerza iónica intracelular se mantiene sin cambio. Este punto es de interés ya que una modificación en la fuerza iónica se ha considerado como una señal importante en los mecanismos sensores del volumen celular.

El modelo experimental de la acumulación de urea se usó en este estudio para caracterizar la respuesta celular al hinchamiento isosmótico en condiciones de fuerza iónica decreciente. La urea es el principal producto final del metabolismo del nitrógeno. En humanos y animales, en la mayoría de los casos, la ingesta proteica diaria excede los requerimientos necesarios para mantener los procesos anabólicos, por lo que las cantidades excedidas deben ser excretadas. En los mamíferos, cerca de 90% del nitrógeno de desecho es excretado por el riñón en forma de urea. La urea se encuentra presente en los fluidos tubulares y el intersticio de los riñones y en el hígado de mamíferos, así como en diversos tejidos que sintetizan poliaminas en condiciones fisiológicas y patológicas. La urea, que se forma en el hígado a través del ciclo urea-ornitina, es filtrada libremente a través de los glomérulos renales, y alrededor del 50% se reabsorbe pasivamente en los túbulos proximales y es excretada en la orina (Sands, 1999; Morris, 2002).

La urea puede constituir, entonces, una gran carga osmótica para el sistema renal, pues como para la mayoría de los solutos excretados en gran cantidad, esto se acompaña de un eflujo de agua, que podría generar diuresis osmótica. Sin embargo, en circunstancias normales, la urea no induce esta diuresis, porque es rápidamente transportada al interior celular. Esta acumulación se efectúa a través de distintos mecanismos que incluyen el paso a través de algunas de las acuaporinas bien caracterizadas (AQP4) y de transportadores especializados

selectivos, pertenecientes a las familias UT-A y UT-B. Estos transportadores son del tipo de los transportadores unidireccionales que llevan a cabo la difusión facilitada de solutos, incluyendo la urea (Fenton y Knepper, 2007). En el riñón estos mecanismos median la difusión facilitada de la urea a través de los compartimentos tubulares intersticiales y vasculares necesarios para la reabsorción y los mecanismos concentradores de orina. La expresión de los transportadores de urea en el tejido renal se explica por su participación en la producción de orina, al igual que en células del tejido sanguíneo que están expuestas a estos niveles altos de urea, pero estos transportadores también se encuentran en otros tejidos incluyendo el hígado, el cerebro, los túbulos seminíferos y el corazón (Sands, 2003; Bagnasco, 2005).

Las células utilizadas en este estudio, los fibroblastos 3T3, también expresan los transportadores de urea, como isoformas UT-A 1-4 (Sands, 2003). La importancia de estos transportadores en el incremento en volumen inducido por la urea se demuestra por el efecto de la floretina, un inhibidor potente de los transportadores UT-A y UT-B, que previene casi en su totalidad el aumento en el volumen debido a la acumulación de urea en estas células. Estos resultados permiten concluir igualmente que el transporte de urea a través de las acuaporinas, no participa de manera importante en la acumulación de urea, que parece estar a cargo en su totalidad por los transportadores unidireccionales. Tanto la magnitud como la velocidad del hinchamiento evocado por urea, fueron claramente menores que los del hinchamiento inducido por hiposmolaridad, lo que refleja una mayor permeabilidad del agua con respecto a la urea, pero no de la urea a través de las acuaporinas.

Los fibroblastos expuestos a una alta concentración de urea (150 mM), mostraron un proceso de regulación del volumen rápido y eficiente, observándose una recuperación mayor al 75%. Es importante señalar que no se observó una relación lineal entre la eficiencia en el DRV y la concentración de urea. La eficiencia del DRV en condiciones de urea elevada fue también claramente mayor que la observada en condiciones hiposmóticas, a pesar de que el incremento en el volumen fue significativamente mayor en condiciones hiposmóticas. Por tanto, una primera conclusión importante de este trabajo es que **la eficiencia en la recuperación del volumen subsecuente al hinchamiento no es directamente proporcional al incremento en el volumen.**

Las células 3T3 que incrementaron su volumen por exposición a la urea pusieron en marcha los mecanismos de recuperación de volumen descritos previamente para el DRV en condiciones hiposmóticas. En respuesta al hinchamiento por urea los fibroblastos activaron la

movilización de taurina, que como se explicó en la Introducción, puede considerarse como representativo de los osmolitos orgánicos.

La liberación de taurina en la condición de urea mostró similitudes con la que se activa por hiposmolaridad, incluyendo una sensibilidad a los bloqueadores generales de canales de  $\text{Cl}^-$  y a la inhibición de las cinasas de tirosina. Estos resultados en su conjunto, sugieren que la vía difusional a través de la cual se moviliza la taurina en la condición hiposmótica puede estar también permeando a la taurina que se libera en respuesta al hinchamiento por urea. La diferencia más significativa entre estos dos modelos es la que se refiere a la relación cuantitativa entre hinchamiento y movilización, encontrada en este estudio. Los resultados mostraron que el hinchamiento inducido por urea moviliza mayor cantidad de taurina que cuando el incremento en el volumen es evocado por la condición hiposmótica. Así, una proporción muy elevada de la poza de taurina, superior al 75%, se movilizó cuando las células alcanzaron un incremento en volumen de 16% en promedio, en tanto que en la condición hiposmótica, a pesar de que el incremento en el volumen celular fue de 26%, solamente se liberó el 10% de la taurina. Estos resultados llevan a la segunda conclusión importante de este estudio: **la magnitud de la movilización de taurina no es proporcional al incremento en el volumen celular.**

El análisis de la relación entre el incremento en el volumen y la salida de taurina en el modelo de la urea mostró que no hay una linealidad entre estos dos parámetros, ya que al graficarlos se obtiene una curva sigmoide, en la que puede observarse un cambio cuantitativo muy importante entre las concentraciones de 100 y 150 mM de urea. En este momento no tenemos una explicación evidente para este resultado. Podría sugerirse la participación de un segundo mecanismo de activación de la vía que permea a la taurina al alcanzarse un umbral de incremento en el volumen, o una concentración umbral en moléculas como el  $\text{Ca}^{2+}$  que se incrementa durante el hinchamiento, que a su vez pudieran activar a distintos elementos de cascadas de transducción con un posible efecto sobre la vía de permeabilidad de la taurina. Sin embargo, en este estudio no se encontró una influencia del  $\text{Ca}^{2+}$  ni en el curso temporal ni en la magnitud de liberación de la taurina. Cabe destacar en este sentido, que en condiciones hiposmóticas, al graficar la magnitud de la liberación de taurina vs el decremento en la osmolaridad, se observa una curva sigmoide, similar a la que se encontró para la urea.

El D-aspartato, usado como un análogo del glutamato, también fue liberado en respuesta al hinchamiento por urea. Sin embargo, la magnitud de la liberación fue notablemente menor que

el de la taurina, a concentraciones iguales de urea. Dado que el D-aspartato es un análogo no metabolizable del glutamato, esta diferencia no puede deberse, como sería el caso del glutamato, a una inaccesibilidad debida a su localización en compartimientos metabólicos, o a una menor disponibilidad debida a una degradación más rápida. Por tanto, debería aducirse alguna diferencia en la eficiencia de permeación a través de la vía, causada por diferencias en la estructura molecular. En este sentido es difícil sacar conclusiones debido a que a pesar de que algunas de las características de la permeación de osmolitos orgánicos si se han establecido, su identidad molecular no se pudo concretar. No es posible, entonces, determinar si existe una sola especie molecular para el transporte de compuestos tan heterogéneos como son los osmolitos orgánicos o si para cada uno de los grupos de osmolitos o individualmente, existe una vía distinta.

La movilización de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{K}^+$  representa el mecanismo más importante y más rápido para la regulación del volumen en la condición hiposmótica. En el modelo de urea examinado en este estudio el hinchamiento activó una corriente de  $\text{Cl}^-$  en los fibroblastos 3T3, con características similares a las que fluyen a través del canal de  $\text{Cl}^-$  activado por volumen, presente en la mayor parte de las células. En un estudio previo de nuestro laboratorio (Pasantes-Morales et al, 1997), se caracterizó esta corriente en los fibroblastos 3T3, la cual mostró las propiedades típicas de esta corriente, es decir: rectificación saliente, conductancia media e inactivación a potenciales positivos. Al comparar esta corriente con la activada por el hinchamiento evocado por urea, estudiada en el presente trabajo, se pudo observar que, si bien sus propiedades son similares a las de la corriente activada por hiposmolaridad, su activación es notablemente menos consistente, observándose sólo en un 50% de las células, en tanto que la osmosensible se activa prácticamente en todas (98%). Igualmente, una vez activada por urea, la magnitud de la corriente es también notablemente menor que la osmosensible.

En conjunto, estos resultados sugieren la tercera conclusión de este estudio, y es que **la contribución relativa de las vías de traslocación del  $\text{Cl}^-$  y de los osmolitos orgánicos a la recuperación del volumen en las células 3T3 es distinta en los modelos de hinchamiento por urea y por hiposmolaridad, siendo mayor la del  $\text{Cl}^-$  en el modelo hiposmótico y la de los osmolitos orgánicos en el caso de la urea.**

Las diferencias encontradas entre el modelo de urea y el de hiposmolaridad en relación con la recuperación del volumen sugieren distintos mecanismos de activación de las vías que movilizan a los osmolitos orgánicos y al  $\text{Cl}^-$ . En este momento, sin embargo, es difícil

identificar estas diferencias ya que la información disponible acerca de estos mecanismos es muy escasa. Se ha considerado que el cambio en la fuerza iónica intracelular es un elemento sensor de volumen y podría activar los mecanismos de recuperación. De acuerdo a los resultados de este trabajo y considerando el incremento en el volumen como una medida indirecta de la entrada de agua, que a su vez determina la magnitud del decremento en la fuerza iónica, debemos suponer que esta disminución fue menor en el caso de la urea que en el modelo hiposmótico. En estas condiciones puede concluirse que la vía de permeabilidad de la taurina es más sensible a la reducción en la fuerza iónica que el canal de  $\text{Cl}^-$ . Este resultado se suma a las diferencias encontradas entre las vías de permeabilidad a los dos tipos de osmolitos.

Existe todavía la discusión acerca de si el  $\text{Cl}^-$  y los osmolitos orgánicos permean a través de una sola vía, algún tipo de canal aniónico no específico. Esta propuesta se basa en primer lugar, en la ya mencionada sensibilidad de la movilización de los osmolitos orgánicos a los bloqueadores de los canales de  $\text{Cl}^-$ , y asimismo, en estudios electrofisiológicos en los que se demuestra que los aminoácidos como la taurina y el glutamato, cuando se encuentran en forma aniónica, generan una corriente semejante a la del  $\text{Cl}^-$  en respuesta a la hiposmolaridad. Esto, sin embargo, simplemente indica que el tamaño del poro del canal de  $\text{Cl}^-$  es suficientemente grande como para dejar pasar aniones del tamaño del glutamato o de la taurina aniónica, pero no prueba de manera concluyente que sea ésta la vía de permeación fisiológica. Existen resultados recientes que sustentan más bien la existencia de dos entidades distintas. Entre estas evidencias están los estudios de Lambert y Hoffmann (1994) en células ascíticas; de Shennan y colaboradores (1994, 2000, 2006) en experimentos con tejido mamario de rata lactante, en células epiteliales de intestino humano (Tomassen et al, 2004), eritrocitos de raya (Davis-Amaral et al, 1996), y células HeLa (Stutzin et al, 2006) y en ovocitos de *Xenopus* (Stegen et al, 2000). En todos ellos se demuestra la independencia de las dos vías de salida. Una alternativa para explicar la sensibilidad de la vía de transporte de los osmolitos orgánicos a los bloqueadores de canales de  $\text{Cl}^-$  es que un elemento modulador de esta vía sea justamente el nivel de  $\text{Cl}^-$  intracelular, de forma tal que al impedir que haya un decremento en los niveles de  $\text{Cl}^-$  la vía de los osmolitos orgánicos no se active. Un factor que hace difícil esclarecer esta cuestión es el hecho de que hasta el momento, la identidad molecular de estas vías se desconoce.

Otro factor a considerar entre los elementos posibles de activación de las vías de salida de los osmolitos son las cinasas/fosfatasa de tirosina. Se sabe que el estado de fosforilación de

algunos residuos de tirosina es un factor importante en el caso de la liberación de taurina, ya que tal como se demostró en el presente estudio, afectando a las cinasas o a las fosfatasas que actúan sobre residuos de tirosina, se observa un decremento o un incremento, respectivamente, en la magnitud de movilización del osmolito. Esta es, sin embargo, prácticamente la única información que se tiene a este respecto. En el caso del canal de Cl<sup>-</sup>, se ha observado que en general, la corriente se reduce en presencia de bloqueadores de las cinasas de tirosina, aunque en algunos tipos celulares, esto no se observa. Las moléculas que se fosforilan en estos residuos tampoco están identificadas. Se ha propuesto que algunas de estas cinasas estén localizadas en receptores a factores de crecimiento. Hay evidencia que muestra la activación de estos receptores en condiciones hiposmóticas, así como en respuesta a hipertonicidad inducida por urea. Hay también evidencia de que la inhibición de la activación del EGFR en respuesta a hiposmolaridad, reduce la liberación osmosensible de taurina. La activación de estos receptores requiere la fosforilación en cinasas de tirosina presentes en la propia molécula del receptor, por lo que éstos podrían ser entonces, elementos en la cadena de señales de activación de las vías de salida de osmolitos. Otra posible explicación para la distinta eficiencia en cuanto a liberación de osmolitos orgánicos entre los modelos de urea y de osmolaridad es que la urea estuviese activando nuevos elementos de señalización o reforzando y amplificando los ya activados por la hiposmolaridad. El sustento de esta posibilidad requiere de investigaciones futuras.

Puede decirse que un incremento importante en los niveles extracelulares de urea causa un aumento en el volumen celular, rápido y de magnitud muy apreciable que puede contribuir a crear una condición de estrés celular en patologías que inducen una condición de azotemia. Esto puede suceder debido a una falla sistémica que derive en la acumulación de metabolitos de proteínas y aminoácidos, concurrente con una insuficiencia renal progresiva. En esta condición, los niveles de urea, así como los de otras moléculas nitrogenadas, pueden incrementarse muy notablemente. Las moléculas que se acumulan en la azotemia son, además de la urea, compuestos guanidínicos (ácido guanidinosuccínico, metilguanidina, guanidina y creatinina), ácido úrico, ácido hipúrico, aminoácidos, polipéptidos, poliaminas, fenoles, conjugados fenólicos, ácidos fenólicos e indólicos, acetoína, ácido glucurónico, carnitina, mioinositol, sulfatos, fosfatos y moléculas intermediarias. Muchas de ellas, tal como ocurre con la urea, pueden ser transportadas a la célula, generando un excesivo estrés celular osmótico, en caso de que los mecanismos de regulación se vean excedidos, de aquí el interés por conocer a

detalle los mecanismos que generan el incremento en volumen así como la respuesta celular a esta condición.

En la segunda parte de este estudio se seleccionó un modelo experimental en el que el incremento en el volumen celular ocurre por acumulación de los iones  $K^+$  y  $Cl^-$ . Por ello, el hinchamiento tiene lugar en condiciones isosmóticas y sin un decremento en la fuerza iónica intracelular. El modelo tiene el interés adicional de que reproduce dos fenómenos esenciales del episodio isquémico, a saber, el incremento en  $K^+$  extracelular, y la inhibición de la  $ATPasa Na^+/K^+$  resultante de la reducción de ATP que ocurre por la restricción de oxígeno y nutrientes. Una redistribución iónica similar se presenta asimismo en condiciones de falla renal, hepática o cardíaca, y de trauma craneoencefálico. Un incremento en el  $K^+$  extracelular se presenta también en el cerebro durante la epilepsia, pero los niveles más elevados, que llegan hasta 80 mM, son característicos de la isquemia cerebral.

El estudio se llevó a cabo en astrocitos, ya que son éstas las células nerviosas en las que preferentemente se observa un incremento en el volumen durante los estados patológicos asociados a un exceso en el  $K^+$  extracelular. Esta condición se relaciona con una de las funciones prioritarias de los astrocitos, que es la de mantener los niveles de  $K^+$  extracelular dentro de rangos muy controlados con el propósito de preservar la excitabilidad neuronal. Para llevar a cabo esta función, los astrocitos acumulan el  $K^+$  externo, restableciendo en lo posible sus niveles normales. Como consecuencia, la concentración intracelular de  $K^+$  se incrementa notablemente. El  $K^+$  acumulado en los astrocitos en aquellas regiones donde las concentraciones son muy altas difunde a través del sincicio glial formado por la conexión celular que se establece a través de las uniones comunicantes y es liberado progresivamente en áreas distantes (Kofuji y Newman, 2004). Este es el proceso conocido como *amortiguamiento del  $K^+$*  y es una de las funciones más importantes de los astrocitos. Cuando los niveles de  $K^+$  son excesivos, de forma que exceden la capacidad de amortiguamiento de los astrocitos, el  $K^+$  acumulado, junto con  $Cl^-$  y agua, inducen un incremento en el volumen (Su et al, 2002). Esta situación puede tener un efecto adverso en la excitabilidad neuronal, pues la reducción en el espacio extracelular permitiría la conducción efáptica, favoreciendo entre otras cosas, la hipersincronía de descarga neuronal tal como ocurre en la epilepsia (Hochman et al, 1995).

Por otra parte, el incremento en volumen en los astrocitos favorece la salida de glutamato, contribuyendo a generar hiperexcitabilidad, y en una condición extrema, causar la muerte neuronal por excitotoxicidad. Esta situación puede agravarse en condiciones de isquemia



cuando, debido a la disipación de los gradientes de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{K}^+$  inducida por la falla energética, el transportador del glutamato que es dependiente de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , se encuentra no solamente impedido para remover el glutamato extracelular sino que puede incluso funcionar de modo inverso, propiciando una mayor salida del aminoácido excitador (Leis et al, 2005).

Los resultados del presente estudio confirmaron el supuesto de que los astrocitos incrementan su volumen cuando hay una concentración elevada de  $\text{K}^+$  extracelular. El patrón de hinchamiento observado contrasta notablemente con el que se presenta en condiciones hiposmóticas o en el derivado de incrementar los niveles de urea extracelular. El volumen máximo alcanzado es similar para todas las condiciones, pero mientras que en las condiciones de urea o de hiposmolaridad, el tiempo requerido para alcanzar este máximo es de 2-6 minutos después del estímulo, en las células tratadas con KO requiere alrededor de 30 min. Esta diferencia tiene su explicación en el hecho de que, en tanto que en la condición hiposmótica como en el de la urea, el aumento en el volumen celular depende de la entrada de agua o de un osmolito como la urea que tiene mecanismos de permeación a través de la membrana celular de una altísima eficiencia, en el caso de la condición de KO, el hinchamiento resulta de la entrada de agua sólo una vez que se han acumulado el  $\text{K}^+$ , el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Cl}^-$ , proceso que requiere de un tiempo considerablemente mayor. Los mecanismos de acumulación de  $\text{K}^+$  subsecuente a su incremento en el espacio extracelular en los astrocitos no están aclarados por completo y existe controversia acerca de la contribución de aquéllos que se han propuesto como responsables de esta acumulación. Se ha sugerido una participación importante del cotransportador electroneutro  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  (la isoforma  $\text{KCC1}$  es la que tiene mayor contribución) aunque también se menciona la función de los canales de rectificación entrante de la familia Kir, en particular el Kir4. La contribución de estos dos mecanismos en nuestro sistema experimental fue explorada mediante un abordaje farmacológico, y los resultados obtenidos muestran una contribución muy importante del cotransportador KCC, en tanto que la contribución de un canal de  $\text{K}^+$  es sólo marginal. El curso temporal del incremento en el volumen muestra una fase inicial relativamente rápida y alcanza una meseta, sin que se presente un mayor incremento ulterior. La interpretación que hemos dado al patrón de hinchamiento en nuestras condiciones experimentales es que, en primer lugar, como se mencionó en la introducción, el mecanismo típico responsable de la recuperación del volumen celular está basado primordialmente en la salida de  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  a través de canales. La movilización ocurre en la dirección impuesta por el gradiente de concentración, el cual, en las condiciones de estos

experimentos, se ha disipado por la presencia de altas concentraciones de  $K^+$  extracelular y la inhibición del funcionamiento de la ATPasa  $Na^+/K^+$ . En estas condiciones, la regulación del volumen quedaría a cargo esencialmente de los osmolitos orgánicos. Es posible, sin embargo, que la movilización de los osmolitos orgánicos no se lleve a cabo de manera tan eficiente como en la condición hiposmótica o en la de urea, debido a la asociación que se presume con el funcionamiento de los canales de  $Cl^-$  activados por volumen. Se sabe que la liberación de aminoácidos y algunos polialcoholes inducida por el hinchamiento hiposmótico se bloquea por completo con los inhibidores del canal de  $Cl^-$  activado por volumen, lo que se ha interpretado, como se discutió en detalle en párrafos anteriores, a la posibilidad de que la(s) vía(s) de permeación de estos osmolitos requieran de una reducción previa en los niveles intracelulares de  $Cl^-$  o a algún otro tipo de elemento compartido entre las vías de movilización del  $Cl^-$  y los osmolitos orgánicos. En las condiciones experimentales de este estudio es probable que no haya ninguna disminución en el nivel citosólico de  $Cl^-$  y que debido a ello la salida de los aminoácidos esté disminuida. De cualquier forma, lo que sí puede afirmarse con base en los resultados de este estudio es que, aún cuando la operación de estas vías no se encuentre en máxima eficiencia, sí está permitiendo una liberación de los osmolitos, que posiblemente esté atenuando la magnitud del hinchamiento, aún cuando sea insuficiente para alcanzar una recuperación del volumen detectable. La meseta observada en el curso temporal del incremento en volumen puede deberse a que se haya alcanzado un equilibrio en la redistribución iónica o bien a una mayor participación de los osmolitos orgánicos, que en esta fase muestran el mayor nivel de movilización.

En este estudio se observaron diferencias significativas entre el glutamato y la taurina en lo que respecta al curso temporal de la liberación frente a condiciones de isquemia, así como en los mecanismos a través de los cuales se realiza esta movilización. Estas diferencias eran de esperarse dadas las características de los dos osmolitos. Así, mientras que el glutamato, participa en múltiples reacciones relacionadas con los requerimientos energéticos del cerebro y la excitabilidad, y su distribución intracelular en compartimientos metabólicos responde a esta multifuncionalidad, en el caso de la taurina, su inercia metabólica corresponde con una distribución uniforme en el citosol. La condición de isquemia modifica sustancialmente varios parámetros de la actividad celular, y de entre ellos, los pertinentes a este estudio son esencialmente la redistribución de los iones  $K^+$  y  $Na^+$  en el exterior y el interior de la célula, y como resultante, un cambio notable en el potencial de membrana en el sentido de la

despolarización. La liberación de los osmolitos D-aspártico y taurina responde de manera distinta a estos cambios. El D-aspartato mostró dos fases con diferente curso temporal: una fase inicial de activación e inactivación rápidas y una segunda fase, presente si las condiciones persisten, de salida tardía y progresiva. En este estudio estamos proponiendo que estas dos fases responden, la primera a la despolarización inducida por KO y la segunda al incremento en el volumen debido a la acumulación de  $K^+$  y el incremento en los niveles intracelulares de  $K^+$  y  $Na^+$ , seguido por  $Cl^-$  y agua impulsada osmóticamente. Las diferencias en el perfil de estas dos fases revelan dos mecanismos de liberación. La fase inicial tiene una proporción sustancial reducida (60%) por el bloqueador TBOA, que sugiere que el transportador operando en reversa es el principal mecanismo de liberación en esta primera fase. Los transportadores de glutamato en el cerebro normalmente funcionan removiendo el glutamato del espacio extracelular y permitiendo su acumulación en las células adyacentes. Los astrocitos contribuyen a esta función por medio de los transportadores GLAST-1 y GLT-1 (Pines et al, 1992), los cuales acumulan glutamato dentro de la célula contra su gradiente de concentración. La energía para este proceso está acoplada a las fuerzas electroquímicas generadas por los gradientes transmembranales de  $Na^+$ ,  $K^+$  y  $H^+$  y el potencial de membrana. En la condición de KO el cambio en los gradientes iónicos y en el potencial de membrana invierten las fuerzas de flujo, permitiendo que el glutamato se mueva bajo su propio gradiente de concentración, lo que da como resultado el cese de la acumulación intracelular y una salida de glutamato al espacio extracelular. Una fracción importante (21%) de la liberación de D-aspártico en la primera fase es inhibida por DCPIB, un agente que inhibe la salida de osmolitos sensible al volumen, lo que indica que incluso pequeños cambios en el volumen que ocurren durante los primeros minutos del tratamiento con KO, incrementan la salida de glutamato por esta vía. La presencia simultánea de TBOA y DCPIB reducen por completo la salida de D-aspártico en la primera fase de movilización. La segunda fase de esta salida mostró un curso temporal diferente y una distinta sensibilidad a TBOA y DCPIB. El bloqueador del transportador no tiene efecto en esta salida, mientras que el DCPIB inhibe toda la liberación.

Una contribución importante de este estudio fue la evaluación cuantitativa de los distintos mecanismos que participan en la liberación del glutamato mediante el análisis temporal en una escala de tiempo detallada. Los resultados obtenidos podrían conciliar las opiniones que durante mucho tiempo han estado en conflicto, sobre la predominancia de uno u otro de los mecanismos propuestos para la movilización del glutamato en condiciones de isquemia, i.e.

despolarización y operación del transportador en reversa por una parte, e hinchamiento y activación de la vía sensible a volumen por otra. El curso temporal examinado en este estudio muestra que la contribución de los dos mecanismos tienen patrones de temporalidad distintos y que, si bien en un período predomina el mecanismo que responde a la despolarización consecuente con la disipación de los gradientes, ya desde el inicio existe una fracción que responde al incremento en el volumen, y que esa fracción va siendo cada vez mayor con el transcurso del tiempo.

En contraste con el glutamato, la salida de taurina responde sobre todo al cambio en volumen inducido por la acumulación de  $K^+$  y  $Cl^-$ , ya que el tratamiento con DCPIB previno por completo la liberación en respuesta a KO. Aunque se observó un incremento marginal y transitorio en los primeros minutos después de la estimulación con KO, que pudiera deberse a la despolarización, en la mayor parte del tiempo la salida de taurina fue lenta y progresiva y, a diferencia del glutamato, esta salida responde prácticamente en su totalidad al incremento en el volumen. La liberación de taurina en la condición estudiada de KO puede tener un doble efecto benéfico, por un lado contribuyendo a limitar la magnitud del hinchamiento y por otro, participando en los mecanismos de protección ante el fenómeno de excitotoxicidad. Este proceso implica el deterioro de las membranas por el ataque de las especies reactivas de oxígeno generadas por el incremento en el  $Ca^{2+}$  intracelular a través de la sobreactivación de los receptores ionotrópicos del glutamato. Como consecuencia, hay un incremento en la lipoperoxidación membranal y una sobrecarga iónica que perpetúa el incremento en los niveles de Ca y genera una nueva condición de hinchamiento debida a entrada incontrolada de  $Na^+$  y  $Cl^-$  (Raiteri et al, 2002). Existe evidencia experimental en el sentido de que la taurina tiene un efecto estabilizador de las membranas que puede atenuar este cuadro de daño celular.

A partir de los resultados del presente estudio se concluye la importancia clave de los osmolitos orgánicos para hacer más eficientes los mecanismos de regulación del volumen celular en condiciones de edema isosmótico. En el modelo de la urea, esto quedó evidenciado al demostrarse una mayor eficiencia en el volumen cuando hay una operación óptima de la vía de salida de la taurina. En el modelo de KO, debe señalarse que la opción de prevenir el edema no es una alternativa viable, ya que el incremento en el volumen se debe a un requerimiento primordial de la célula nerviosa, el mantener el espacio extracelular en las condiciones más cercanas a las fisiológicas para evitar alteraciones en la excitabilidad nerviosa. Como, por otra parte, los mecanismos que permiten la regulación del volumen celular en condiciones

hiposmóticas son inoperantes en la condición KO, la alternativa para acelerar la desaparición del hinchamiento es hacer más eficientes las vías de movilización de los osmolitos orgánicos de forma selectiva, pues no sería conveniente acelerar la salida de glutamato, por ejemplo, sabiendo su inherencia a los procesos de exitotoxicidad.

## 8. CONCLUSIONES

### 8.1. Modelo de acumulación de urea

1. El incremento en volumen inducido por la urea estudiado en los fibroblastos 3T3 puso en marcha los mecanismos de recuperación de volumen descritos previamente para el DRV en condiciones hiposmóticas.
2. La recuperación del volumen fue más eficiente en el modelo de urea que en la condición hiposmótica en el mismo tipo celular.
3. La movilización de taurina en el modelo de urea fue considerablemente mayor que en la condición hiposmótica, a pesar de que se generó esencialmente el mismo incremento en el volumen.
4. La contribución relativa de las vías de translocación del  $\text{Cl}^-$  y de los osmolitos orgánicos en la recuperación del volumen es distinta en los modelos de hinchamiento por urea y por hiposmolaridad, siendo mayor la del  $\text{Cl}^-$  en el modelo hiposmótico y la de los osmolitos orgánicos en el caso de la urea.
5. La magnitud de la salida de taurina en el modelo de urea parece ser la responsable de la mayor eficiencia en la regulación del volumen

### 8.2. Modelo de acumulación de potasio (K/O)

1. El hinchamiento de los astrocitos expuestos a la condición KO se genera mayormente por la entrada de K a través de la operación del cotransportador electroneutro K/Cl (KCC), así como por la acumulación intracelular de Na y K debida a la inhibición de la  $\text{ATPasa Na}^+/\text{K}^+$ .
2. El hinchamiento inducido por KO no es seguido por un mecanismo de regulación de volumen. Se puede observar sin embargo, que el volumen alcanza una meseta, a pesar de que persisten las condiciones que generan el hinchamiento.
3. La salida de taurina y de otros osmolitos orgánicos, si bien no es suficiente para revertir el hinchamiento sí puede atenuar su magnitud.

4. El curso temporal de la salida de glutámico muestra dos fases, a cargo de dos diferentes mecanismos: la primera, posiblemente debida a la despolarización generada por la disipación de los gradientes iónicos, se inhibe por los bloqueadores del transportador (TBOA), que en estas condiciones no cumple su función de acumulación intracelular del glutamato, e incluso puede operar liberándolo. La segunda fase, casi asintótica, es inducida por el cambio en el volumen y es sensible a los agentes que previenen esta condición.
5. La movilización del glutamato inducida por la condición KO representa un peligro potencial para la supervivencia de las neuronas, al activarse los mecanismos de excitotoxicidad.
6. La movilización de taurina muestra prácticamente un solo componente, inducido por el incremento en el volumen. La salida de taurina en estas condiciones puede tener un doble beneficio para el tejido nervioso, la reducción en la magnitud del hinchamiento y la protección a las células expuestas a factores lesivos derivados de la muerte por isquemia y excitotoxicidad.

### **8.3. Conclusión general**

En conjunto, estos resultados destacan la importancia potencial de los osmolitos orgánicos para la regulación del volumen celular en condiciones isosmóticas. La movilización más eficiente de estos osmolitos ya sea por una mejor eficiencia en las señales de activación o por la sobre-expresión de las vías de permeabilidad de estos osmolitos, parece la mejor alternativa para regular el volumen celular en estas condiciones.

## 9. PERSPECTIVAS

El conocimiento del edema celular, en particular aquél que ocurre en el cerebro, es de particular importancia considerando las consecuencias graves que acarrea una situación sin control en este sentido. El cambio en el volumen es el resultado de los mecanismos que llevan a su incremento y la eficiencia de los mecanismos activos de regulación, por lo que las acciones encaminadas a lograr un volumen celular normal derivan necesariamente del conocimiento que se tenga de estos dos mecanismos. Por lo que conocemos hasta ahora, incluyendo los resultados de este estudio, puede haber diferencias muy notables dependiendo del estímulo responsable del incremento en el volumen.

En el caso del edema generado por la redistribución y acumulación de iones, queda claro que los mecanismos que llevan a esta acumulación son parte de la labor de mantenimiento de la homeostasis del espacio extracelular, que en todos los casos, pero en especial en el cerebro, es de la mayor importancia para evitar perturbaciones graves en la excitabilidad neuronal.

En los modelos estudiados en el presente trabajo se subraya la importancia de los osmolitos orgánicos para permitir y/o acelerar la recuperación del volumen, por lo que una línea clara de investigación a seguir es la de un mayor conocimiento de las señales que activan la movilización de estos osmolitos y muy especialmente, la identificación molecular de la(s) vía(s) de permeabilidad de los distintos osmolitos orgánicos. En tanto sea posible hacer estas vías más eficientes y cooperativas, la recuperación del volumen será mayor.

Otro aspecto en que pueden incidir las investigaciones futuras en este sentido es el de una modulación de la actividad de las acuaporinas. En esta dirección, la revisión que se llevó a cabo sobre el estado del conocimiento de las acuaporinas y el edema cerebral, muestra un campo con muchas posibilidades para incidir en el mantenimiento del volumen celular cercano a lo normal, aún en condiciones patológicas.



## 10. REFERENCIAS

- Anderson CM, Swanson RA. 2000. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia*, 32(1): 1-14.
- Bagnasco SM. 2005. Role and regulation of urea transporters. *Pflugers Arch*, 450(4): 217-26.
- Bai G, Rama Rao KV, Murthy CR, Panickar KS, Jayakumar AR, Norenberg MD. 2001. Ammonia induces the mitochondrial permeability transition in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurosci Res*, 66(5): 981-91.
- Basarsky TA, Feighan D, MacVicar BA. 1999. Glutamate release through volume-activated channels during spreading depression. *J Neurosci*, 19(15): 6439-45.
- Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer NH. 1984. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem*, 43(5): 1369-74.
- Blei AT, Larsen FS. 1999. Pathophysiology of cerebral edema in fulminant hepatic failure. *J Hepatol*, 31(4): 771-6.
- Bres V, Hurbín A, Duvoid A, Orcel H, Moos FC, Rabie A y Hussy N. 2000. Pharmacological characterization of volume-sensitive, taurine permeable anion channels in rat supraoptic glial cells. *Br J Pharmacol*, 130: 1976-82.
- Bullock R, Zauner A, Woodward JJ, Myseros J, Choi SC, Ward JD, Marmarou A, Young HF. 1998. Factors affecting excitatory amino acid release following severe human head injury. *J Neurosurg*, 89(4): 507-18.
- Butterworth RF. 2003. Hepatic encephalopathy. *Alcohol Res Health*, 27(3): 240-6.
- Cardin V, Lezama R, Torres-Marquez ME y Pasantes-Morales H. 2003. Potentiation of the osmosensitive taurine release and cell volume regulation by cytosolic Ca<sup>2+</sup> rise in cultured cerebellar astrocytes. *Glia*, 44: 119-28.
- Cardin V, Pena-Segura C y Pasantes-Morales H. 1999. Activation and inactivation of taurine efflux in hyposmotic and isosmotic swelling in cortical astrocytes: role of ionic strength and cell volume decrease. *J Neurosci Res*, 56: 659-67.
- Chamberlin ME, Strange K. 1989. Anisomotic cell volume regulation: a comparative view. *Am J Physiol*, 257: c159-73.
- Chen H, Sun D. 2005. The role of Na-K-Cl co-transporter in cerebral ischemia. *Neurol Res*, 27: 280-6.
- Davis-Amaral EM, Musch MW, Goldstein L. 1996. Chloride and taurine effluxes occur by different pathways in skate erythrocytes. *Am J Physiol*, 271(6 Pt 2): R1544-9.
- Di X, Goforth PB, Bullock R, Ellis E, Satin L. 2000. Mechanical injury alters volume activated ion channels in cortical astrocytes. *Acta Neurochir Suppl*, 76: 379-83.
- Dibaj P, Kaiser M, Hirrlinger J, Kirchhoff F, Neusch C. 2007. Kir4.1 channels regulate swelling of astroglial processes in experimental spinal cord edema. *J Neurochem*.
- Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. 2008. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*, 55(3): 310-8.
- Fenton RA, Knepper MA. 2007. Mouse models and the urinary concentrating mechanism in the new millennium. *Physiol Rev*, 87(4): 1083-112.
- Fraser CL, Arief AI. 1990. Fatal central diabetes mellitus and insipidus resulting from untreated hyponatremia: a new syndrome. *Ann Intern Med*, 112(2): 113-9.
- García JJ, Sanchez-Olea R y Pasantes-Morales H. 1991. Taurine release associated to volume regulation in rabbit lymphocytes. *J Cell Biochem*, 45: 207-212.
- Goodman BE. 2002. Transport of small molecules across cell membranes: water channels and urea transporters. *Adv Physiol Educ*, 26(1-4): 146-57.
- Grunder S, Thiemann A, Pusch M y Jentsch TJ. 1992. Regions involved in the opening of ClC-2 chloride channel by voltage and cell volume. *Nature*, 360: 759-62.

- Hansson E, Muyderman H, Leonova J, Allansson L, Sinclair J, Blomstrand F, Thorlin T, Nilsson M, Rönnbäck L. 2000. Astroglia and glutamate in physiology and pathology: aspects on glutamate transport, glutamate-induced cell swelling and gap-junction communication. *Neurochem Int*, 37(2-3): 317-29.
- Häussinger D, Kirchheis G, Fischer R, Schliess F, vom Dahl S. 2000. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocyte swelling and low-grade cerebral edema? *J Hepatol*, 32(6): 1035-8.
- Hochman DW, Baraban SC, Owens JW, Schwartzkroin PA. 1995. Dissociation of synchronization and excitability in furosemide blockade of epileptiform activity. *Science*, 270(5233): 99-102.
- Hougaard C, Jorgensen F y Hoffmann EK. 2001. Modulation of the volume-sensitive K<sup>+</sup> current in Ehrlich ascites tumour cells by pH. *Pflugers Arch*, 442: 622-33.
- Jackson PS, Strange K. 1993. Volume-sensitive anion channels mediate swelling-activated inositol and taurine efflux. *Am J Physiol*, 265: C1489-500.
- Jacobsen JG, Smith LH. 1968. Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. *Physiol Rev*, 48: 424-511.
- Jakab M, Furst J, Gschwentner M, Botta G, Garavaglia ML, Bazzini C, Rodighiero S, Meyer G, Eichmueller S, Woll E, Chwatal S, Ritter M, Paulmichl M. 2002. Mechanisms sensing and modulating signals arising from cell swelling. *Cell Physiol Biochem*, 12: 235-58.
- Junankar PR y Kirk K. 2000. Organic osmolyte channels: a comparative view. *Cell Physiol Biochem*, 10(5-6): 355-60.
- Kimelberg HK. 1995. Current concepts of brain edema. Review of laboratory investigations. *J Neurosurg*, 83(6): 1051-9.
- Kimelberg HK. 2004. Water homeostasis in the brain: basic concepts. *Neuroscience*, 129(4): 851-60.
- Kofuji P, Newman EA. 2004. Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience*, 129(4): 1045-56.
- Lambert IH, Hoffmann EK. 1994. Cell swelling activates separate taurine and chloride channels in Ehrlich mouse ascites tumor cells. *J Membr Biol*, 142(3): 289-98.
- Landis DM. 1994. The early reactions of non-neuronal cells to brain injury. *Annu Rev Neurosci*, 17: 133-51.
- Lang F, Busch GL, Ritter M, Volkl H, Waldegger S, Gulbins E y Haussinger D. 1998. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev*, 78: 247-306.
- Leis JA, Bekar LK, Walz W. 2005. Potassium homeostasis in the ischemic brain. *Glia*, 50(4): 407-16.
- Lezama R, Ortega A, Ordaz B y Pasantes-Morales H. 2005. Hyposmolarity-induced ErbB4 phosphorylation and its influence on the non-receptor tyrosine kinase network response in cultured cerebellar granule neurons. *J Neurochem*, 93: 1189-98.
- Martinez-Hernandez A, Bell KP, Norenberg MD. 1977. Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science*, 195(4284): 1356-8.
- Morris SM Jr. 2002. Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu Rev Nutr*, 22: 87-105.
- Motais R, Guizouarn H y Garcia-Romeu F. 1991. Red cell volume regulation: the pivotal role of ionic strength in controlling swelling-dependent transport systems. *Biochim Biophys Acta*, 1075: 169-80.
- Nelson RM, Lambert DG, Richard Green A, Hainsworth AH. 2003. Pharmacology of ischemia-induced glutamate efflux from rat cerebral cortex in vitro. *Brain Res*, 964(1): 1-8.
- Nilius B, Eggermont J, Voets T, Buyse G, Manolopoulos V y Droogmans G. 1997. Properties of volume-regulated anion channels in mammalian cells. *Prog Biophys Mol Biol*, 68: 69-119.
- Okada Y. 1997. Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl<sup>-</sup> channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor. *Am J Physiol*, 273: C755-89.

- Olsen ML, Sontheimer H. 2008. Functional implications for Kir4.1 channels in glial biology: from K<sup>+</sup> buffering to cell differentiation. *J Neurochem*, 107(3): 589-601.
- Pasantes-Morales H y Franco R. 2002. Influence of protein tyrosine kinases on cell volume change-induced taurine release. *Cerebellum*, 1: 103-9.
- Pasantes-Morales H y Morales Mulia S. 2000. Influence of calcium on regulatory volume decrease: role of potassium channels. *Nephron*, 86: 414-27.
- Pasantes-Morales H y Schousboe A. 1988. Volume regulation in astrocytes: a role for taurine as an osmoeffector. *J Neurosci Res*, 20: 503-9.
- Pasantes-Morales H, Franco R, Ochoa L, Ordaz B. 2002. Osmosensitive release of neurotransmitter amino acids: relevance and mechanisms. *Neurochem Res*, 27(1-2): 59-65.
- Pasantes-Morales H, Franco R, Torres-Marquez ME, Hernandez-Fonseca K, Ortega A. 2000. Amino acid osmolytes in regulatory volume decrease and isovolumetric regulation in brain cells: contribution and mechanisms. *Cell Physiol Biochem*, 10(5-6): 361-70.
- Pasantes-Morales H, Franco R. Astrocyte cellular swelling: mechanisms and relevance to brain edema. In: Aschner M & Costa L (ed). *The role of glia in Neurotoxicity*, 2<sup>nd</sup> ed. 2005 CRC Press.
- Pasantes-Morales H, Lezama RA y Ramos-Mandujano G. 2006. Tyrosine kinases and osmolyte fluxes during hyposmotic swelling. *Acta Physiol (Oxf)*, 187: 93-102.
- Pasantes-Morales H, Lezama RA, Ramos-Mandujano G y Tuz KL. 2006. Mechanisms of cell volume regulation in hypo-osmolality. *Am J Med*, 119: S4-S11.
- Pasantes-Morales H, Pena Segura C, Garcia O, Morales Mulia MM, Sanchez Olea R y Moran J. 1996. Characterization of the volume-activated taurine pathway in cultured cerebellar granule neurons. *Adv Exp Med Biol*, 403: 393-400.
- Pasantes-Morales H. 1996. Volume regulation in brain cells: cellular and molecular mechanisms. *Metab Brain Dis*, 11(3): 187-204.
- Pedersen SF, Hoffmann EK, Mills JW. 2001. The cytoskeleton and cell volume regulation. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 130(3): 385-99.
- Phillis JW, O'Regan MH. 2003. Characterization of modes of release of amino acids in the ischemic/reperfused rat cerebral cortex. *Neurochem Int*, 43(4-5): 461-7.
- Pines G, Danbolt NC, Bjørås M, Zhang Y, Bendahan A, Eide L, Koepsell H, Storm-Mathisen J, Seeberg E, Kanner BI. 1992. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature*, 360(6403): 464-7.
- Raiteri L, Stigliani S, Zedda L, Raiteri M, Bonanno G. 2002. Multiple mechanisms of transmitter release evoked by "pathologically" elevated extracellular [K<sup>+</sup>]: involvement of transporter reversal and mitochondrial calcium. *J Neurochem*, 80(4): 706-14.
- Rossi DJ, Oshima T, Attwell D. 2000. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature*, 403(6767): 316-21.
- Sanchez-Olea R, Moran J, Schousboe A y Pasantes-Morales H. 1991. Hyposmolarity-activated fluxes of taurine in astrocytes are mediated by diffusion. *Neurosci Lett*, 13: 233-236.
- Sanchez-Olea R, Pena C, Moran J y Pasantes-Morales H. 1993. Inhibition of volume regulation and efflux of osmoregulatory amino acids by blockers of Cl<sup>-</sup> transport in cultured astrocytes. *Neurosci Lett*, 156: 141-4.
- Sands JM. 1999. Urea Transport: It's Not Just "Freely Diffusible" Anymore. *News Physiol Sci*, 14: 46-47.
- Sands JM. 2003. Mammalian urea transporters. *Annu Rev Physiol*, 65: 543-66.
- Saransaari P, Oja SS. 1999. Enhanced taurine release in cultured cerebellar granule cells in cell-damaging conditions. *Amino Acids*, 17(4): 323-34.
- Saransaari P, Oja SS. 1999. Taurine release is enhanced in cell-damaging conditions in cultured cerebral cortical astrocytes. *Neurochem Res*, 24(12): 1523-9.

- Seki Y, Feustel PJ, Keller RW Jr, Tranmer BI, Kimelberg HK. 1999. Inhibition of ischemia-induced glutamate release in rat striatum by dihydrokinate and an anion channel blocker. *Stroke*, 30(2): 433-40.
- Shennan DB, McNeillie SA, Curran DE. 1994. The effect of a hyposmotic shock on amino acid efflux from lactating rat mammary tissue: stimulation of taurine and glycine efflux via a pathway distinct from anion exchange and volume-activated anion channels. *Exp Physiol*, 79(5): 797-808.
- Shennan DB, Thomson J, Davidson J, Gow IF. 2006. Properties of volume-activated taurine efflux from human breast cancer cells. *Adv Exp Med Biol*, 583: 109-16.
- Shennan DB, Thomson J. 2000. Further evidence for the existence of a volume-activated taurine efflux pathway in rat mammary tissue independent from volume-sensitive Cl<sup>-</sup> channels. *Acta Physiol Scand*, 168(2): 295-9.
- Shennan DB, Thomson J. 2004. Activation and inactivation of volume-sensitive taurine efflux from rat mammary gland. *Mol Cell Biochem*, 262(1-2):111-8.
- Shennan DB. 2008. Swelling-induced taurine transport: relationship with chloride channels, anion-exchangers and other swelling-activated transport pathways. *Cell Physiol Biochem*, 21(1-3): 15-28.
- Stegen C, Matskevich I, Wagner CA, Paulmichl M, Lang F, Bröer S. 2000. Swelling-induced taurine release without chloride channel activity in *Xenopus laevis* oocytes expressing anion channels and transporters. *Biochim Biophys Acta*, 1467(1): 91-100.
- Stewart VC, Stone R, Gegg ME, Sharpe MA, Hurst RD, Clark JB, Heales SJ. 2002. Preservation of extracellular glutathione by an astrocyte derived factor with properties comparable to extracellular superoxide dismutase. *J Neurochem*, 83(4): 984-91.
- Stover JF, Unterberg AW. 2000. Increased cerebrospinal fluid glutamate and taurine concentrations are associated with traumatic brain edema formation in rats. *Brain Res*, 875(1-2): 51-5.
- Stutzin A, Hoffmann EK. 2006. Swelling-activated ion channels: functional regulation in cell-swelling, proliferation and apoptosis. *Acta Physiol (Oxf)*, 187(1-2): 27-42.
- Su G, Kintner DB, Sun D. 2002. Contribution of Na<sup>(+)</sup>-K<sup>(+)</sup>-Cl<sup>(-)</sup> cotransporter to high-[K<sup>(+)</sup>]<sub>o</sub>-induced swelling and EAA release in astrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, 282(5): C1136-46.
- Szatkowski M, Attwell D. 1994. Triggering and execution of neuronal death in brain ischaemia: two phases of glutamate release by different mechanisms. *Trends Neurosci*, 17(9): 359-65.
- Tomassen SF, Fekkes D, de Jonge HR, Tilly BC. 2004. Osmotic swelling-provoked release of organic osmolytes in human intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 286(6): C1417-22.
- Walz W. 2000. Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochem Int*, 36(4-5): 291-300.
- Zhang Y, Zhang H, Feustel PJ, Kimelberg HK. 2008. DCPIB, a specific inhibitor of volume regulated anion channels (VRACs), reduces infarct size in MCAo and the release of glutamate in the ischemic cortical penumbra. *Exp Neurol*, 210(2): 514-20.
- Zielinska M, Zablocka B, Albrecht J. 2003. Effect of ammonia on taurine transport in C6 glioma cells. *Adv Exp Med Biol*, 526: 463-70.

**ANEXOS**

# Regulatory volume decrease after swelling induced by urea in fibroblasts: prominent role of organic osmolytes

Alejandra López-Domínguez · Gerardo Ramos-Mandujano ·  
Erika Vázquez-Juárez · Herminia Pasantes-Morales

Received: 15 December 2006 / Accepted: 12 July 2007  
© Springer Science+Business Media, LLC 2007

**Abstract** Cell swelling, regulatory volume decrease (RVD), volume-sensitive  $\text{Cl}^-$  ( $\text{Cl}_{\text{swell}}^-$ ) current and taurine efflux after exposure to high concentrations of urea were characterized in fibroblasts Swiss 3T3, and results compared to those elicited by hyposmotic (30%) swelling. Urea 70, 100, and 150 mM linearly increased cell volume (8.25%, 10.6%, and 15.7%), by a phloretin-inhibitable process. This was followed by RVD by which cells exposed to 70, 100, or 150 mM urea recovered 27.6%, 38.95, and 74.1% of their original volume, respectively. Hyposmolarity (30%) led to a volume increase of 25.9% and recovered volume in 32.5%.  $^3\text{H}$ -taurine efflux was increased by urea with a sigmoid pattern, as 9.5%, 18.9%, 71.5%, and 89% of the labeled taurine pool was released by 70, 100, 150, or 200 mM urea, respectively. Only about 11% of taurine was released by 30% hyposmolarity reduction in spite of the high increase in cell volume. Urea-induced taurine efflux was suppressed by NPPB (100  $\mu\text{M}$ ) and markedly reduced by the tyrosine kinase-general blocker AG18. The  $\text{Cl}_{\text{swell}}^-$  current was more rapidly activated and higher in amplitude in the hyposmotic than in the isosmotic/urea condition (urea 150 mM), but this was not sufficient to accomplish an efficient RVD. These results showed that at similar volume increase, cells swollen by urea showed higher taurine efflux, lower  $\text{Cl}_{\text{swell}}^-$  current and more efficient RVD, than in those swollen by hyposmolarity. The correlation found between RVD efficiency and taurine efflux suggest a prominent role for organic over

ionic osmolytes for RVD evoked by urea in isosmotic conditions.

**Keywords** Swelling · Taurine · Volume-sensitive chloride channel

## Introduction

Cell volume recovery occurring after hyposmotic swelling termed regulatory volume decrease (RVD) has been extensively studied in the recent years. It is accomplished by the active extrusion of  $\text{K}^+$  and  $\text{Cl}^-$  through conductive channels and by the operation of passive efflux pathways for organic osmolytes [1, 2]. The osmotransduction cascade connecting cell volume change and activation of the effectors allowing cell volume recovery involves as signaling elements an increase in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$ , and a number of kinases including importantly protein tyrosine kinases, MAP kinases, PI3K, and phospholipases [3, 4]. Cell swelling is induced not only by hyposmotic conditions, but also occurs in numerous situations without a change in external osmolarity. Isosmotic swelling, named also cytotoxic swelling, occurs as consequence of ionic redistribution or by rapid accumulation of permeable organic osmolytes. While the mechanisms for RVD in hyposmotic conditions have been extensively studied in the recent years, the cell response to cytotoxic swelling is less known. It is unclear whether cells are able to recover cell volume in this condition and this response may be different depending on the mechanism causative of swelling. Cytotoxic swelling occurs associated with renal, hepatic and cardiac failure, ischemia and trauma among others [1, 2]. Local volume increases occur also during nutrient uptake,  $\text{K}^+$  accumulation or ionic changes associated with brain

A. López-Domínguez · G. Ramos-Mandujano ·  
E. Vázquez-Juárez · H. Pasantes-Morales (✉)  
Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma  
de México, Ciudad Universitaria, Circuito Exterior, Mexico, DF  
04510, Mexico  
e-mail: hpasante@ifc.unam.mx

cell functioning [1, 5]. Pathologies associated with renal failure lead to a clinical condition known as azotemia, in which there is an increase in the plasma levels of nitrogen-rich compounds, and notably of creatinine, and urea. Those compounds like urea which are very rapidly transported into cells may result in a significant increase in cell volume. Urea is accumulated in cells by the two major selective transporters UT-A (isoforms1-5) and UT-B [6, 7]. Although preferentially located in kidney, these transporters are also expressed and functional in numerous extrarenal tissues [8]. All currently identified urea transporters translocate urea by a facilitated transport, non-saturable up to a concentration of 200 mM urea, independent of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  and inhibited by phloretin [6–8]. A recent study in C6 glial cells reports urea-induced cell swelling mediated by an active water transport via the UT-B1 urea transporter [9]. The experimental model of urea accumulation and swelling was used in the present study in fibroblasts to characterize the cell response to isosmotic swelling. We examined (i) the effect of increasing isosmotic urea concentrations on cell swelling (ii) the occurrence and efficacy of RVD after urea-induced swelling (iii) the activation of two osmolyte efflux pathways, i e., the volume-sensitive  $\text{Cl}^-$  channel ( $\text{Cl}_{\text{swell}}^-$ ), and the taurine efflux pathway which is considered representative of organic osmolyte pathway. Cell responses to urea swelling were compared to those observed in a 30% hyposmotic condition. An effect of urea 100–160 mM increasing taurine efflux has been described in mammary tissue explants [10].

## Materials and methods

### Materials

Cell culture medium Basal Medium Eagle and fetal bovine serum were from Gibco, Invitrogen. [ $^3\text{H}$ ]-taurine and D-[2,3- $^3\text{H}$ ] aspartic acid were from New England Nuclear (Boston, MA). AG18 and EGTA-AM from Calbiochem-Novabiochem Corp. (San Diego, CA). EGTA, NPPB (5-Nitro-2-(3-phenylpropyl-amino)-benzoic acid), niflumic acid, DIDS (4,4'-Diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid), phloretin and *ortho*-vanadate from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). All salts for preparation of medium solutions were from Merck (Darmstadt, Germany).

### Solutions and drugs

Isosmotic medium contained (in mM): 135 NaCl, 5 KCl, 1.17  $\text{MgSO}_4$ , 1  $\text{CaCl}_2$ , 5 glucose, and 10 HEPES, pH 7.4, with an osmolarity of 300 mOsm. Hyposmotic solutions (30% reduction, H30%: 210 mOsm) and isosmotic solutions of urea (70, 100 and 150 mM) were prepared by equiosmolar

reduction in the concentration of NaCl. Medium osmolarities were determined with a freezing point osmometer (Osmette A, Precision Systems Inc., Natick, MA). For drugs treatment, preincubation time is as indicated in each figure. Agents were present throughout the experiment.

### Cell cultures

Cultures of Swiss 3T3 cells were maintained in Eagle Basal Medium containing 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 50 U/ml penicillin and 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin in a humidified atmosphere containing 5%  $\text{CO}_2$  and 95% air at 37°C. For experimental purposes, Swiss 3T3 cells were plated in 35-mm dishes at  $1.5 \times 10^5$  cells/dish for radio-labeled amino acid fluxes and  $5 \times 10^5$  cells/dish for cell volume measurements, and used after 2 days when the cells were confluent.

### $^3\text{H}$ -Taurine and $^3\text{H}$ -D-aspartate release experiments

Swiss 3T3 fibroblasts were preloaded with  $^3\text{H}$ -taurine (0.1  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ) or  $^3\text{H}$ -D-aspartate (0.1  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ) for 1 h in isosmotic medium. After incubation, cells were washed for 8 min with isosmotic medium and superfused at 1 ml/min for 5 min, after which a stable efflux baseline was attained. The isosmotic medium was replaced by the experimental medium and samples were collected for 13 min. At the end of the experiments, cells were scraped and the radioactivity remaining in cells and in the collected samples determined in a liquid scintillation counter. Results are expressed as radioactivity released per minute expressed as percentage of the total incorporated during loading.

### Estimation of changes in cell volume

Cell volume measurements were performed by estimating the changes in relative cell volume with a large-angle light-scattering system. Cells Swiss 3T3 were cultured on rectangular coverglasses (8 mm  $\times$  50 mm) at 90% confluence at the time of experiments. Cover glasses were placed at a 50° angle relative to the excitation light in a cuvette filled with isosmotic medium (300 mOsm) in a Fluoromax-3, Horiba luminescence spectrometer. The stimulus was made by addition of urea or distilled water at isosmotic medium. Cells were excited at 585 nm with an argon arc lamp, and emission was detected at the same wavelength. Data are expressed as the inverse of the emission signal, because light intensity inversely correlates with cell volume. Cell volume changes were calculated according to the equation  $I_0/I_t$ , where  $I_0$  is the emission signal average when basal signal has been reached just before the stimulus, and  $I_t$  is emission signal at time  $t$ .

## Electrophysiological recordings

Electrophysiological recording was carried out on cells seeded on 35-mm dishes. Currents were measured with an Axopatch 200 patch-clamp amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA), using the whole-cell patch clamp configuration. All recordings were performed at room temperature ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ). In order to minimize junction potential errors due to changes in solutions composition, an agar bridge filled with 3 M KCl was used to connect the ground electrode to the bath solution. Patch electrodes were prepared from 1.5-mm OD, 1.0-mm ID borosilicate glass (World Precision Instruments), and had resistances between 3 and 5 M $\Omega$  when filled with the pipette solution. The recorded signal was filtered at 10 kHz with a low-pass Bessel filter and transferred to a computer with the Digidata 1,200 interface (Axon Instruments). No series resistance compensation was used. All recordings were acquired and analyzed with pCLAMP6 software (Axon Instruments). Whole-cell currents were elicited by 350 ms duration voltage steps ranging from  $-100$  to  $+100$  mV in 20-mV increments, from a holding potential of 0 mV.

Once the whole-cell configuration was obtained, cells were maintained for 5 min in isosmotic solution before addition of the stimulus solution. The voltage protocol was carried out every 2–3 min for the duration of the experiment. The standard pipette solution contained (in mM): 46 CsCl, 20 TEA-Cl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 1 EGTA, 0.7 CaCl<sub>2</sub>, (approximately 200 nM buffered calcium), and 5 Mg ATP, 150 mannitol, pH 7.4 adjusted with NaOH ( $300 \pm 3$  mosM). The bath solution had the following composition (in mM): 63 NaCl, 5 KCl, 1.17 MgSO<sub>4</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 5 glucose, 10 HEPES, 150 mannitol, pH 7.4, and 300 mOsm. The hypotonic bath solution (210 mOsm) was prepared by omitting mannitol from the standard bath solution and the isosmotic urea solution was made by substituting mannitol for urea.

## Statistical analysis

All data are given as means  $\pm$  SEM. Statistical significance was determined using analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. Statistically significant differences were considered at  $*P < 0.05$ .

## Results

### Urea-induced swelling and RVD

Fibroblasts exposed to urea 70–150 mM, replacing equiosmolar amounts of NaCl, showed an increase in cell volume with a magnitude proportional to the urea

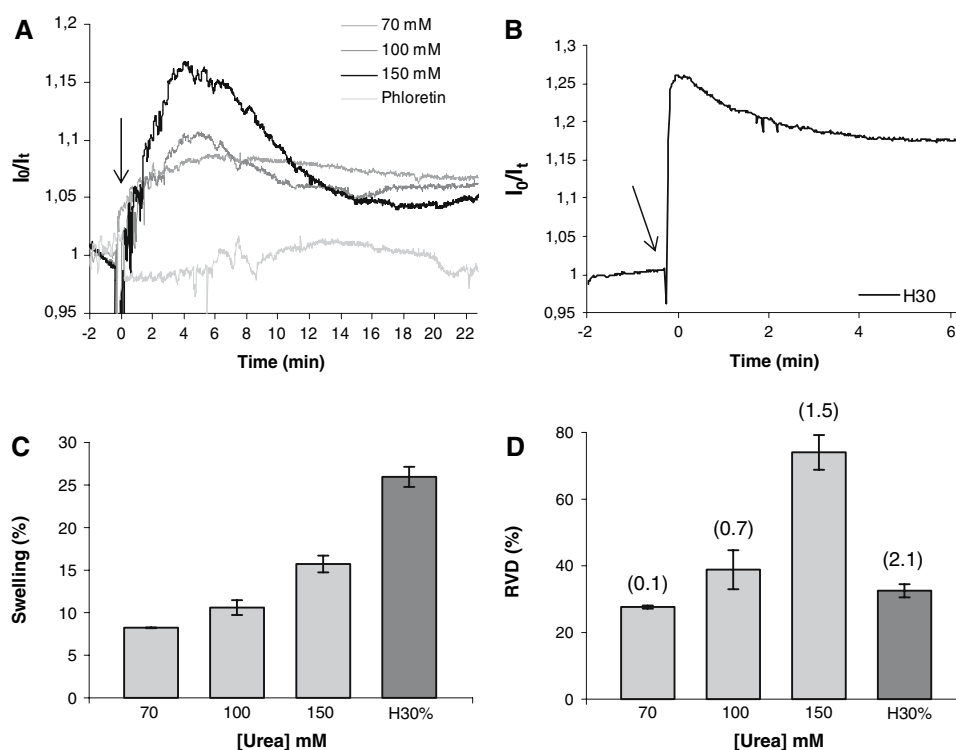
concentration. Cell volume increases of 8.2%, 10.6%, and 15.7% were induced by urea 70, 100, and 150 mM, respectively (Fig. 1A,C). An increase in volume was not detectable at lower urea concentration in our experimental conditions. The urea-induced swelling was prevented by phloretin, a blocker of urea transporters (Fig. 1A). Maximal swelling was reached at about 6.5 min after the exposure to urea and thereafter a mechanism of cell volume recovery was activated, by which volume started to decrease toward the original levels. The rate and efficiency of RVD were proportional to the extent of swelling, in turn dependent of the external urea concentration. In cells treated with 70, 100, or 150 mM urea, cells recovered 27.6%, 38.9%, and 74.1% of their original volume, respectively (Fig. 1D). RVD was notably more rapid in cells treated with 150 mM urea than with 100 mM urea, as shown by the slope of the volume decrease in each condition (Fig. 1D, data in parenthesis).

The extent of swelling, time course, and efficiency of RVD induced by urea were compared to those observed in cells exposed to a 30% hyposmotic solution. In this condition, swelling occurred immediately after the hyposmotic stimulus, attaining a volume increase of 25.9%. RVD started immediately after swelling and after 5 min cell volume has decreased 32.5%. No further cell volume decrease was observed after this time. The volume decrease rate expressed as the slope in parenthesis is slightly higher than that in 150 mM urea (Fig. 1B,C,D).

### Urea-evoked taurine efflux

Cells loaded with <sup>3</sup>H-*taurine* and superfused with isosmotic medium, released taurine at a rate of 0.2% of the total radioactivity accumulated. Treatment with urea increased this efflux with a magnitude dependent on the external urea concentration and the corresponding extent of swelling. Figure 2A shows the time course of taurine efflux from cells exposed to 100 mM urea. A rapid increase of taurine efflux was observed, reaching a maximal at 5 min after the stimulus, which is followed by a short phase of inactivation. Thereafter the release was sustained and no further inactivation was observed during the time of the experiment (25 min) (Fig. 2A). The peak release was 1.85% (of the total labeled pool), and the total release during the 25 min of the experiment was 18.9% (Fig. 2A,C). A notably stronger response was induced by 150 mM urea. Taurine efflux rapidly activates and increased progressively to reach a peak after 6 min. The efflux then rapidly decreased toward the initial efflux rates. Taurine efflux at the peak was 10.1% and during the time of the experiment, cells released 71% of the labeled taurine content (Fig. 2B,C). The urea-evoked taurine efflux depends on the extent of swelling although





**Fig. 1** Swelling and RVD in fibroblasts 3T3 exposed to urea or to a hypotonic condition. Cells were exposed to urea (70, 100, and 150 mM) replacing equimolar amounts of NaCl, or to hypotonic medium (H30%). The changes in cell volume were estimated using a large-angle light-scattering system as described in Methods. **(A)** Representative traces of volume changes in cells exposed to urea and the inhibitory effect of phloretin. **(B)** Volume changes in the

hypotonic condition. Cells rapidly swell and RVD started immediately. **(C)** Maximal volume attained in the experimental conditions of A and B, expressed as the percentage increase over the basal condition. **(D)** Regulatory volume decrease calculated as the volume recovered at the end of the experiment expressed in percentage. The volume decrease rate, expressed as the decrease slope is indicated in parenthesis. Results are means of 10–22 experiments

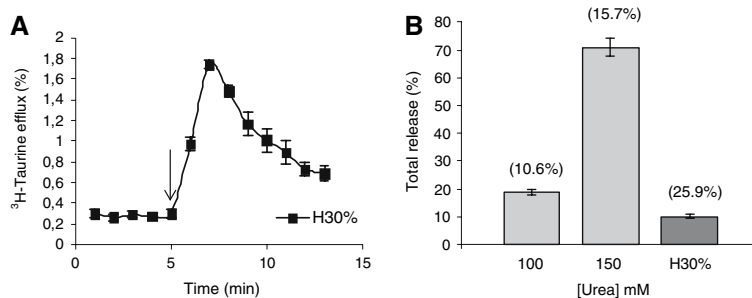
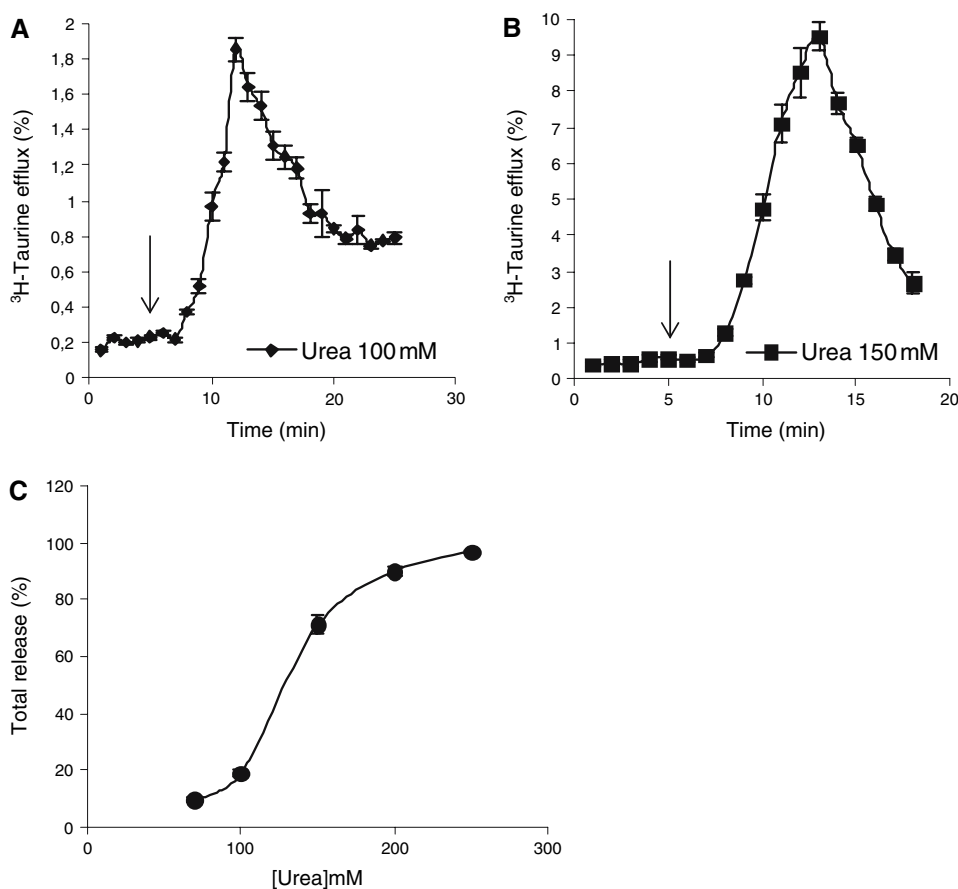
this is not a linear response. The urea-taurine efflux ratio shows rather a sigmoid pattern. Urea 70–100 mM released 9.5–18.9% of the labeled taurine cell pool, 71% was released by 150 mM urea and at higher concentrations essentially all the labeled taurine was released (Fig. 2C). Taurine efflux evoked by urea results from cell swelling, as shown by the effect preventing the release in a solution made hyperosmotic by raffinose (results not shown). Figure 3A shows the time course and amount of taurine efflux evoked by 30% reduction in osmolarity. Activation and inactivation of taurine efflux were rapid and the total amount released of 10.8% (Fig. 3B) was notably lower than that induced by urea. This is in spite of the markedly higher swelling attained in the hypotonic condition (data in parenthesis in Fig. 3B).

Urea-dependent taurine release was not significantly affected by omission of external  $\text{Ca}^{2+}$  or by decreasing intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  by treatment with EGTA-AM. These conditions slightly elevated the basal efflux and reduced the urea-stimulated release from  $70.9 \pm 2.9\%$  to  $63.8 \pm 2.4\%$  in the absence of external  $\text{Ca}^{2+}$ , or to  $63.4 \pm 3.1\%$  in cells treated with EGTA-AM ( $n = 4-6$ ).

Modulation of the activity of tyrosine kinases had an influence on the urea-evoked taurine efflux. AG18, a general blocker of tyrosine kinases, showed a clear inhibitory effect (70%) and correspondingly, the blocker of tyrosine phosphatases *o*-vanadate had a stimulatory effect (Fig. 4A). Experiments in this figure were carried out in cells exposed to 100 mM urea, to better show the stimulatory effect of *o*-vanadate. Figure 4B also illustrates the marked inhibitory effect of AG18 on taurine efflux induced by 150 mM urea. The tyrosine kinase blocker had a strong inhibitory effect (over 60%) also on taurine efflux evoked by hypotonicity (Fig. 4C). It should be noticed however, that treatment with AG18 had a marked effect reducing by almost 50% the cell volume increase elicited by hypotonicity and therefore, the observed reduction in taurine efflux could be a consequence of this effect of the blocker. AG18 did not affect cell swelling in the urea model.

The urea-induced taurine efflux occurs by a mechanism sensitive to  $\text{Cl}^-$  channel blockers. These agents are known to inhibit the efflux of organic osmolytes, including taurine, elicited by hypotonic conditions in essentially all cell types [11–13]. The effect of these blockers on urea-evoked

**Fig. 2** Urea-induced taurine release. Cells preloaded with  $^3\text{H}$ -taurine were superfused with isosmotic medium during 5 min, and at the arrow, the medium was replaced for one containing urea 100 mM (A) or 150 mM (B). The points represent radioactivity released at each fraction, expressed as percentage of total radioactivity accumulated during loading. (C) Total  $^3\text{H}$ -taurine released after of stimulus and up to the end of the experiment versus urea concentration (70–250 mM). Results are means  $\pm$  SE of 10–16 experiments



**Fig. 3** Hyposmolarity-induced taurine release. Comparison to urea-induced release. Cells preloaded with  $^3\text{H}$ -taurine were superfused with isosmotic medium during 5 min, and at the arrow, the medium was replaced by 30% hypotonic medium. (A) Time course of  $^3\text{H}$ -taurine efflux elicited by a 30% reduction in osmolarity. Results expressed as in Fig. 2. (B) Total  $^3\text{H}$ -taurine released after urea or

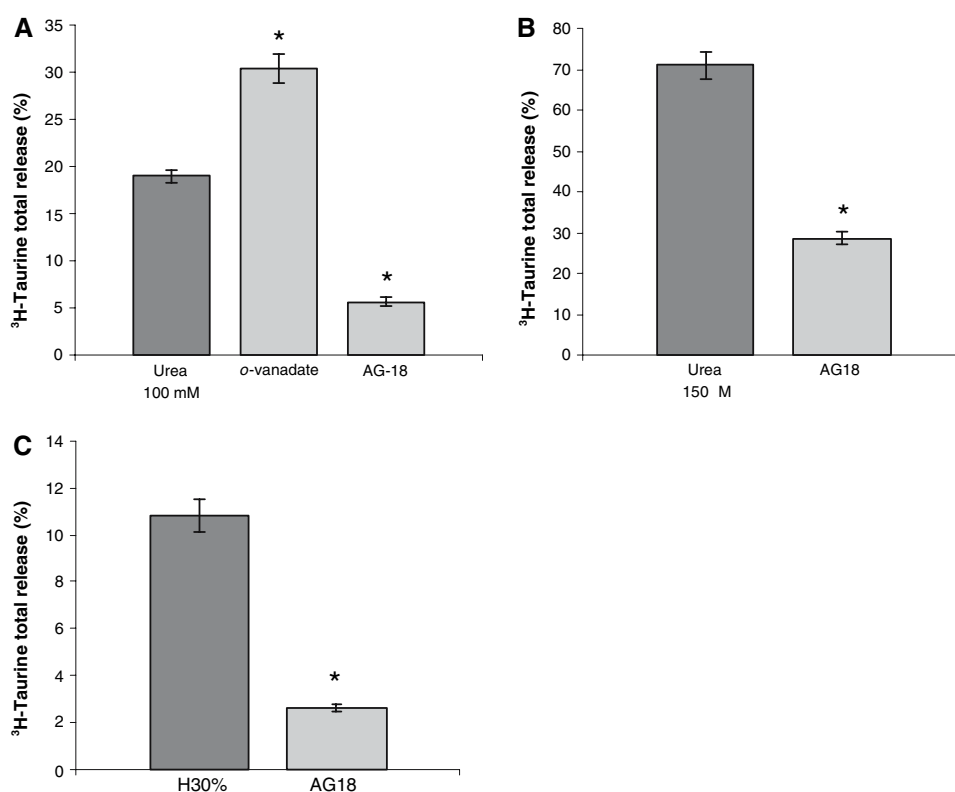
hyposmolarity stimulation during the time of the experiment, expressed as in Fig. 2. To compare the swelling/taurine efflux response in the two conditions, the volume increase induced by each condition is indicated in parenthesis. Results are means  $\pm$  SE of 6–12 experiments

taurine efflux is shown in Fig. 5A. NPPB (100  $\mu\text{M}$ ), DIDS (100  $\mu\text{M}$ ), and niflumic acid (500  $\mu\text{M}$ ) showed a potent inhibitory action on taurine efflux. For NPPB a concentration/response effect was examined and results shown in Fig. 5B. A small but significant decrease of taurine efflux was observed already at 12.5  $\mu\text{M}$ , and at 25  $\mu\text{M}$  it was reduced by 60%. Higher concentrations between 50 and 100  $\mu\text{M}$  abolished the release. The calculated  $\text{IC}_{50}$  was

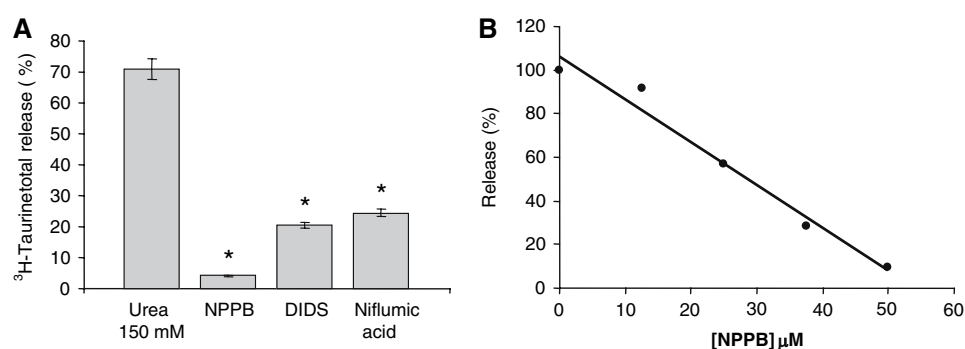
26.7  $\mu\text{M}$ . These results are similar to those reported for taurine efflux in hypotonic conditions [11–13].

The effect of urea was examined also on the release of  $^3\text{H}$ -D-aspartate, a non-metabolizable analog of glutamate. Urea-evoked swelling increased the release of  $^3\text{H}$ -D-aspartate, with a concentration threshold higher than for taurine and a significant lower amount released in comparison to taurine (Fig. 6).

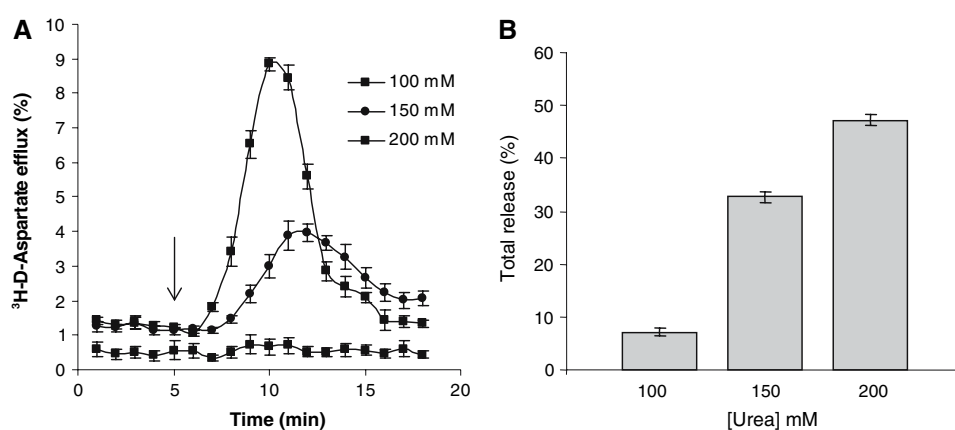
**Fig. 4** Effect of modulation of tyrosine kinase activity on taurine release induced by urea or by hyposmolarity. Superfusion assay and expression of results as in Figs. 2–3. (A) Cells treated with 100 mM urea and exposed to *o*-vanadate (100  $\mu$ M) or AG-18 (50  $\mu$ M). (B) Cells stimulated with 150 mM urea and treated with AG18. (C) Cells exposed to 30% hyposmotic solution and treated with AG18. Cells were preincubated 30 min with the blockers, which were then present throughout the experiment. Results are means  $\pm$  SE of 6–12 experiments. Significantly different from control \* $P < 0.05$



**Fig. 5** Effect of  $\text{Cl}^-$  channel-blockers on taurine release in urea-swollen cells. (A) Cells treated with urea 150 mM, and exposed to NPPB (100  $\mu$ M), DIDS (100  $\mu$ M) or niflumic acid (500  $\mu$ M). (B) Dose-dependent effect of NPPB. The calculated  $\text{IC}_{50}$  was 26.7  $\mu$ M. Superfusion assays and data expression were as in Fig. 2



**Fig. 6** Urea-induced D-aspartate release. Cells preloaded with  $^3\text{H-D-aspartate}$  were superfused with isosmotic medium during 5 min, and at the arrow, the medium was replaced for one containing urea 100, 150, or 200 mM urea. (A) Time course of D-aspartate release. (B) Total release expressed as in Fig. 2. Results are means  $\pm$  SE of 4–6 experiments



Effect of urea on the volume-sensitive  $\text{Cl}^-_{\text{swell}}$  current

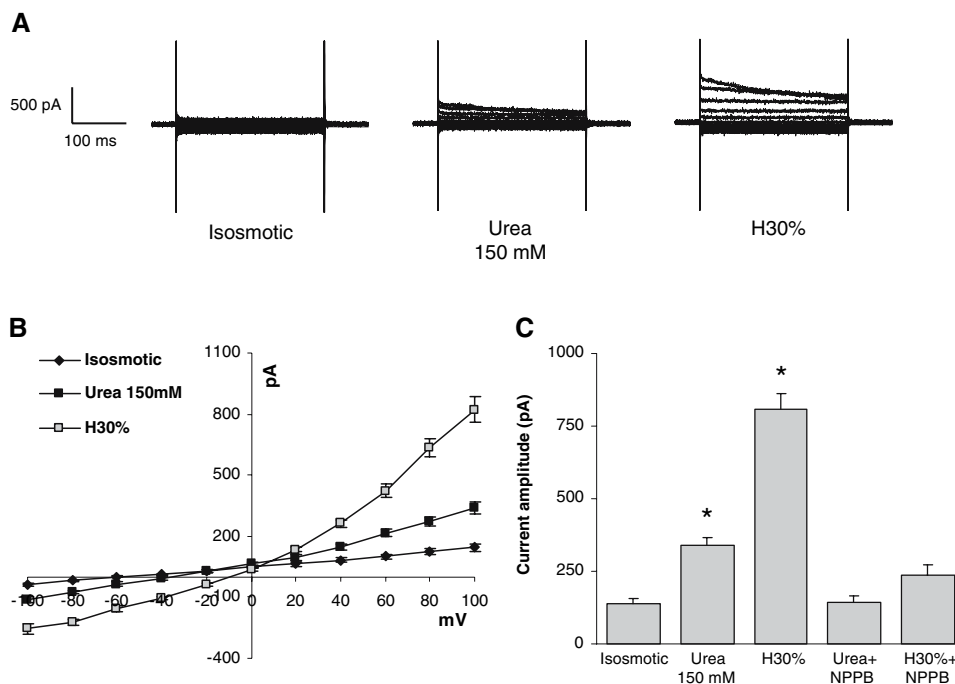
To examine a possible effect of urea on swelling-induced currents in 3T3 cells, membrane currents were measured using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique as described in Methods. To focus on the  $\text{Cl}^-$  currents, in these experiments we used 46 mM CsCl and 20 mM TEA-Cl in the patch pipette in order to minimize the contribution of  $\text{K}^+$  currents. After forming the whole-cell configuration, cells were maintained during 5 min in isosmotic solution and the steady-state current was recorded. Under these conditions, membrane currents were very nearly ohmic and reversed at  $-50$  mV, presumably reflecting a small but finite permeability to  $\text{Cs}^+$  ions. Cells were then exposed to 30% hyposmolar solution (210 mOsm) or to the 150 mM urea solution. Figure 7(A–C) shows the current evoked by swelling in the hyposmotic condition,  $\text{Cl}^-_{\text{swell}}$ , which exhibits previously reported features characteristic of  $\text{ICl}^-_{\text{swell}}$  [14]. It is an outwardly rectifying current, with inactivation kinetics at large positive voltages and a reversal potential ( $-10$  mV) close to the  $\text{Cl}^-$  equilibrium potential of  $-0.2$  mV predicted by our solutions and as expected for a  $\text{Cl}^-$  permeable channel. The fact that the swelling-activated current does not reverse at

0 mV could be explained by the existence of a residual outward current, possibly carried by  $\text{Cs}^+$  ions.

The current recorded at about 10 min after the stimulus was of 822 pA ( $\pm 62$ ) at 100 mV. This current was activated in 31 out of 32 cells. After 10 min of recording, addition of 100  $\mu\text{M}$  NPPB decreased the magnitude of the  $\text{Cl}^-_{\text{swell}}$  current by 71%.

In a different set of experiments, exposure of 3T3 cells to urea 150 mM induced a small current of average amplitude 338 pA ( $\pm 27$ ), which is notably lower than that evoked by hyposmolarity (Fig. 7A–C). This urea-activated current was observed in only 15 of 31 cells and shows some of the characteristics of  $\text{ICl}^-_{\text{swell}}$ . The fact that the urea-activated current reversed at a potential of  $-38$  mV reflects the smaller amplitude if the  $\text{Cl}^-$  current and thus a larger contribution of the outward  $\text{Cs}^+$  currents to the overall reversal potential. The  $\text{Cl}^-$  permeability of the urea-evoked current is also demonstrated by its blockade by application of NPPB to a similar extent as the  $\text{Cl}^-_{\text{swell}}$  current, 58% (Fig. 7C).

The smaller magnitude of  $\text{Cl}^-_{\text{swell}}$  activated by urea as compared to  $\text{Cl}^-_{\text{swell}}$  evoked by hyposmolarity also reflects the observation that ureas generates a smaller change in volume than that generated by the hyposmotic solution.



**Fig. 7** Effect of urea and hyposmolarity on the osmosensitive  $\text{Cl}^-$  current. The figure shows currents obtained after a 5 min equilibration in the indicated solution and thus represent steady-state currents. Current–voltage (I–V) curves were recorded every 2–3 min for the duration of the experiment. (A) Panel shows representative whole-cell current traces at the indicated experimental conditions. (B) I–V curves

from cells in control medium ( $\blacklozenge$ ), 30% hyposmotic medium ( $\square$ ), and urea 150 mM ( $\blacksquare$ ). (C) Bars show current amplitude at +100 mV in the indicated experimental conditions. Results are means  $\pm$  SE of 6–8 experiments. The asterisk indicates a condition significantly different from control ( $P < 0.05$ )

## Effects of $\text{Cl}^-$ channel- and tyrosine kinase- general blockers on RVD

In view of the effect of NPPB and other similar blockers on  $\text{Cl}^-$  and taurine response to urea-induced swelling, it was expected to find an effect of these agents impairing RVD. Figure 8A,B shows that treatment with NPPB or AG18 delayed the first phase of swelling but it finally reached the same as in control. RVD was essentially suppressed by these blockers (Fig. 8A,B). RVD elicited by hyposmolarity was also reduced by NPPB or AG18, but these agents were less potent than in the urea condition (Fig. 8C). AG18 but not NPPB, reduced cell swelling from  $25.9 \pm 1.18$  to  $14.7 \pm 0.84$  ( $n = 10$ ).

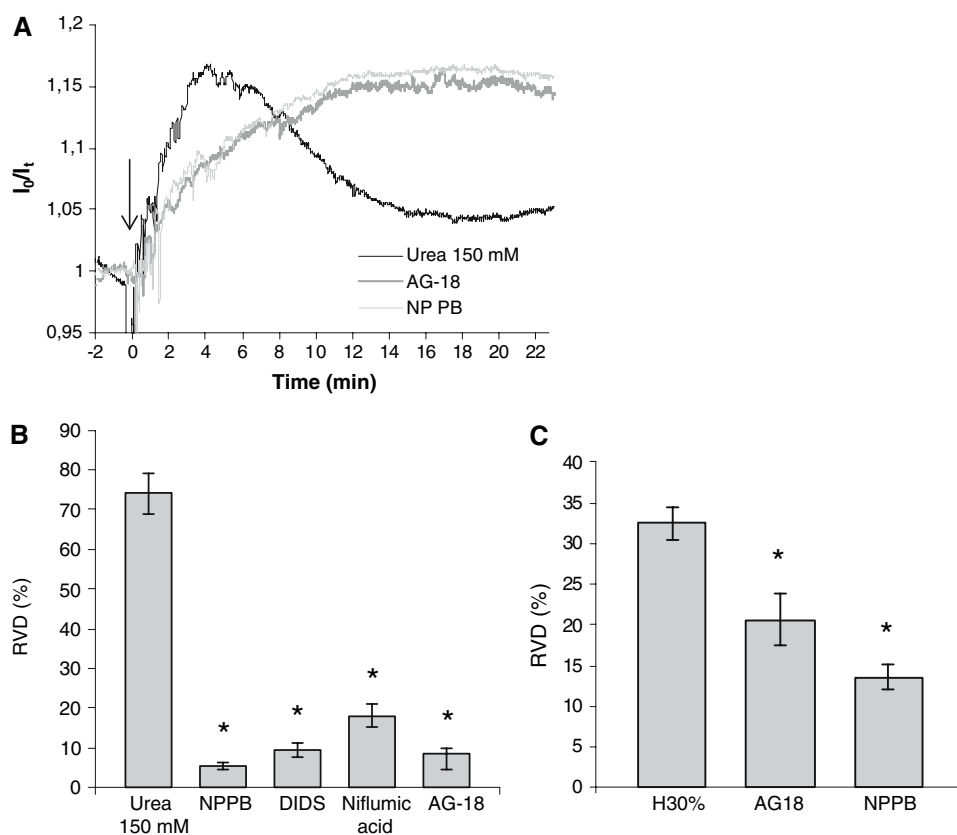
## Discussion

The present study in fibroblasts showed the isosmotic urea-elicited cell swelling of a magnitude dependent on its external concentration. Swelling by urea was fully prevented by phloretin, a blocker of urea transporters [6–8], suggesting this mechanism as responsible for urea accumulation and subsequent swelling. Cells responded to urea-induced isosmotic swelling by activation of RVD with a rate and efficiency proportional to the extent of swelling. In

cells exposed to 100 mM urea, volume increased 10% and cells recovered about 40% of their original volume. In cells treated with 150 mM urea when swelling was about 16%, RVD was faster and more efficient, and cells recovered 74% of their volume. RVD activated after urea-induced swelling was markedly reduced by NPPB, DIDS, and niflumic acid. These results indicate that cell volume recovery observed after treatment with urea is the typical RVD, accomplished by the efflux of  $\text{Cl}^-$  and organic osmolytes via a pathway sensitive to these blockers [11–13], and not as result of a change in the dynamics of urea accumulation. The correlation found for urea-induced swelling and RVD efficiency was not observed in the hyposmotic condition, since the large volume increase of 27% evoked by hyposmolarity was followed by a cell volume recovery of only 34%. RVD efficiency was also unrelated to the time required to reach maximal swelling, which is longer in the urea model, likely reflecting the different cell membrane permeability to water and urea.

The characteristics and contribution of two main osmolyte efflux pathways, i.e., the taurine efflux pathway and the  $\text{Cl}^-_{\text{swell}}$  channel, activated by swelling in hyposmotic or isosmotic (urea) conditions may explain in part the differences found in RVD efficiency in these two models. Taurine and  $\text{Cl}^-$  extrusion contribute to RVD in hyposmotic conditions in essentially all cell types [1, 3, 4]. We

**Fig. 8** Effects of  $\text{Cl}^-$  channel blockers and of AG18 on RVD in cells treated with urea 150 mM or hyposmolarity. (A) Representative traces of volume changes in cells swollen by 150 mM urea, and the effect of NPPB (100  $\mu\text{M}$ ) or AG18 (50  $\mu\text{M}$ ). (B) Effect on RVD in urea-treated cells in the presence of NPPB (100  $\mu\text{M}$ ), DIDS (100  $\mu\text{M}$ ), niflumic acid (500  $\mu\text{M}$ ) or AG-18 (50  $\mu\text{M}$ ). Volume changes were estimated as in Fig. 1. Cells were preincubated 30 min with the blockers, which were then present throughout the experiment. (C) Effect of NPPB or AG18 on RVD elicited by hyposmolarity. Results are means  $\pm$  SE of 6–12 experiments. Significantly different from control \* $P < 0.05$



showed here that these pathways also participate in RVD elicited by isosmotic urea-induced swelling, but marked differences were found between urea and hyposmolarity regarding the operation of these pathways. Cells respond to 150 mM urea-induced swelling by a massive efflux of taurine (71%), whereas in the hyposmotic condition, taurine release was distinctly lower (10.8%) in spite of the significantly higher swelling in this condition. This difference correlates with the efficiency of RVD in the two models, and stress the importance of the taurine efflux pathway for the efficient accomplishment of RVD. It is worthy to notice that the taurine efflux pathway seems to permeate also a variety of organic osmolytes [13], which may as well contribute to the efficient RVD observed in urea-swollen cells. Although the contribution of this pathway to volume regulation in hyposmotic swelling is well established and its relevance in an isosmotic condition is here documented, the signal(s) involved in its activation/operation are still unclear [2–4]. Assuming that volume increase reflects higher water content and reduced intracellular ionic strength, it can be concluded that this parameter is not critical for taurine release in fibroblasts, since no correspondence was found between the high swelling and the marginal amount of taurine released observed in the hyposmotic condition. A decrease in ionic strength has been considered as a trigger for activation of effectors leading to RVD [15–17]. This notion has been challenged for taurine efflux in a study in skate red blood cells [18] showing no correlation between taurine release and intracellular electrolyte concentration and our present results are also on this line. An alternate possibility to explain the marked differences observed in the magnitude of taurine efflux when is elicited by urea or hyposmolarity, is that urea could be affecting per se, elements or signals influencing the taurine efflux pathway. Tyrosine kinases and their targets might be some of those sites and there is evidence supporting this possibility [19]. At concentrations similar to those used in the present study, urea activates effectors such as EGFR [20, 21], which may in turn activate numerous downstream signaling chains, known to influence the swelling-activated taurine efflux pathway. PI3K, a target of one of these signaling chains, and known to influence the hyposmotic taurine efflux [2, 4, 20], is also activated by urea [22]. A comparative study of the effect of urea and hyposmolarity on these signaling elements may give some clues about the differences found in the magnitude of taurine fluxes evoked by the two stimuli. A general blocker of tyrosine kinases AG18, was used in the present study as a preliminary approach to test a possible role of these enzymes on taurine efflux and RVD in isosmotic conditions. AG18 markedly reduced taurine efflux evoked by urea and accordingly, also inhibited RVD. AG18 similarly decreased RVD and taurine efflux in the

hyposmotic model. However, this blocker had a clear effect reducing swelling in the hyposmotic, but not in the urea condition, thus making inaccurate any direct comparison between the two models regarding the influence of tyrosine kinases by using this agent. Calcium seems not involved in RVD in cell swollen by urea since the urea-induced taurine efflux in fibroblasts was essentially  $\text{Ca}^{2+}$  independent and urea-induced swelling is not inducing a significant rise in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  [10]. Taurine efflux elicited by urea followed a sigmoid pattern. This type of response has been also described for taurine efflux in hyposmotic conditions [23], but still the mechanism(s) responsible for this pattern nor its physiological significance have been elucidated. It may reflect the occurrence of two mechanisms of release with different swelling threshold, and likely additive, directed to elicit a massive efflux of taurine, and other organic osmolytes, when the extent of swelling represents a risk for the physiology of the cell.

The  $\text{Cl}^-$  current activated by hyposmotic swelling in 3T3 fibroblasts exhibited properties similar to those reported in other cell types, i.e., outwardly rectifying, inactivation at more positive potentials and sensitivity to NPPB [24, 25]. A slight deviation of the reversed potential observed with respect to the  $\text{Cl}^-$  equilibrium potential suggest a minor contribution of other currents activated in fibroblasts. In clear contrast to that observed for taurine efflux, the magnitude of  $\text{Cl}_{\text{swell}}^-$  current activated by urea was notably lower than that elicited by a hyposmolarity. Also, its activation was less consistent, being observed in only about half of the registered cells, whereas it activates in essentially all cells in the hyposmotic condition. It is likely that, in contrast to that observed for taurine efflux, the activation and magnitude of the  $\text{Cl}_{\text{swell}}^-$  current depends on the extent of swelling and the consequent reduction of intracellular ionic strength. This would explain why more swollen cells (hyposmolarity) show higher and more consistent  $\text{Cl}_{\text{swell}}^-$  current. The influence of ionic strength on  $\text{Cl}_{\text{swell}}^-$  channels has been supported by results in chick cardiac myocytes as well as in CPAE cells [26, 27]. Interestingly, the more efficient operation of the  $\text{Cl}_{\text{swell}}^-$  channel in the hyposmotic model was not sufficient to accomplish an efficient volume regulation, which seems to require a significant contribution of the organic osmolyte pathway represented here by taurine efflux. In this respect, the more complete RVD observed in hyposmotic conditions in other cell types, such as cultured astrocytes [28, 29], may be due to the efficient operation of the organic osmolyte efflux pathway, traced by taurine efflux, together with a robust  $\text{Cl}_{\text{swell}}^-$  current.

In summary, results of the present study showed that (1). In 3T3 fibroblasts urea induces a concentration-dependent swelling by a phloretin-inhibitable mechanism of urea accumulation, (2). The urea-induced swelling is followed

by an efficient volume regulatory process, correlating with the magnitude of swelling, (3). RVD in cells swollen by urea relies mostly on the contribution of the taurine efflux pathway, and is less dependent on the  $\text{Cl}^-_{\text{swell}}$ -mediated  $\text{Cl}^-$  efflux, (4). RVD and taurine efflux in urea-swollen cells are markedly inhibited by a general blocker of tyrosine kinases, (5). Hyposmotic swelling in fibroblasts evokes a robust  $\text{Cl}^-_{\text{swell}}$  current, a modest taurine release and incomplete RVD. Altogether, these results suggest a prominent role for organic osmolytes over ionic osmolytes for RVD in isosmotic swelling, at least when it is evoked by urea.

**Acknowledgments** We deeply acknowledge the valuable technical assistance of Ms. Claudia Peña-Segura. This work was supported in part by grants No. 209507 from DGAPA, UNAM, and 46465 from CONACYT, México.

## References

- Lang F, Busch GL, Volkl H (1998) The diversity of volume regulatory mechanisms. *Cell Physiol Biochem* 8:1–45
- Pasantes-Morales H, Lezama RA, Ramos-Mandujano G et al (2006) Mechanisms of cell volume regulation in hypo-osmolality. *Am J Med* 119:S4–S11
- Hoffmann EK, Pedersen SF (2006) Sensors and signal transduction pathways in vertebrate cell volume regulation. *Contrib Nephrol* 152:54–104
- Pasantes-Morales H, Cardin V, Tuz K (2000) Signaling events during swelling and regulatory volume decrease. *Neurochem Res* 25:1301–1314
- Pasantes-Morales H, Franco R (2005) Astrocyte cellular swelling: mechanisms and relevance to brain edema. In: Aschner M, Costa L (eds) *The role of Glia in neurotoxicity*, 2nd edn. CRC Press, Boca Raton, FL
- Bagnasco SM (2005) Role and regulation of urea transporters. *Pflugers Arch* 450:217–226
- Sands JM (2003) Mammalian urea transporters. *Annu Rev Physiol* 65:543–566
- Shayakul C, Hediger MA (2004) The SLC14 gene family of urea transporters. *Pflugers Arch* 447:603–609
- Ogami A, Miyazaki H, Niisato N et al (2006) UT-B1 urea transporter plays a noble role as active water transporter in C6 glial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 351:619–624
- Shennan DB, Grant AC, Gow IF (2002) The effect of hyposmotic and isosmotic cell swelling on the intracellular  $[\text{Ca}^{2+}]$  in lactating rat mammary acinar cells. *Mol Cell Biochem* 233:91–97
- Jackson PS, Strange K (1993) Volume-sensitive anion channels mediate swelling-activated inositol and taurine efflux. *Am J Physiol* 265:C1489–C1500
- Sanchez-Olea R, Peña C, Moran J et al (1993) Inhibition of volume regulation and efflux of osmoregulatory amino acids by blockers of  $\text{Cl}^-$  transport in cultured astrocytes. *Neurosci Lett* 156:141–144
- Junankar PR, Kirk K (2000) Organic osmolyte channels: a comparative view. *Cell Physiol Biochem* 10:355–360
- Okada Y (1997) Volume expansion-sensing outward-rectifier  $\text{Cl}^-$  channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor. *Am J Physiol* 273:C755–C789
- Cardin V, Pena-Segura C, Pasantes-Morales H (1999) Activation and inactivation of taurine efflux in hyposmotic and isosmotic swelling in cortical astrocytes: role of ionic strength and cell volume decrease. *J Neurosci Res* 56:659–667
- Cannon CL, Basavappa S, Strange K (1998) Intracellular ionic strength regulates the volume sensitivity of a swelling-activated anion channel. *Am J Physiol* 275:C416–C422
- Guizouarn H, Motais R (1999) Swelling activation of transport pathways in erythrocytes: effects of  $\text{Cl}^-$ , ionic strength, and volume changes. *Am J Physiol* 276:C210–C220
- Wittels KA, Hubert EM, Musch MW, Goldstein L (2000) Osmolyte channel regulation by ionic strength in skate RBC. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279:R69–R76
- Pasantes-Morales H, Lezama RA, Ramos-Mandujano G (2006) Tyrosine kinases and osmolyte fluxes during hyposmotic swelling. *Acta Physiol (Oxf)* 187:93–102
- Cohen DM (1999) Signalling and gene regulation by urea and NaCl in the renal medulla. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26:69–73
- Xu H, Tian W, Lindsey JN et al (2005) EphA2: expression in the renal medulla and regulation by hypertonicity and urea stress in vitro and in vivo. *Am J Physiol Renal Physiol* 288:F855–F866
- Zhang Z, Yang XY, Soltoff SP et al (2000) PI3K signalling in the murine kidney inner medullary cell response to urea. *Am J Physiol Renal Physiol* 278:F155–F164
- Pasantes-Morales H, Moran J, Schousboe A (1990) Volume-sensitive release of taurine from cultured astrocytes: properties and mechanism. *GLIA* 3:427–432
- Nilius B, Eggermont J, Voets T et al (1997) Properties of volume-regulated anion channels in mammalian cells. *Prog Biophys Mol Biol* 68:69–119
- Okada Y (2006) Cell volume-sensitive chloride channels: phenotypic properties and molecular identity. *Contrib Nephrol* 152:9–24
- Zhang J, Lieberman M (1996) Chloride conductance is activated by membrane distension of cultured chick heart cells. *Cardiovasc Res* 32:168–179
- Sabirov RZ, Prenen J, Tomita T, Droogmans G, Nilius B (2000) Reduction of ionic strength activates single volume-regulated anion channels (VRAC) in endothelial cells. *Pflugers Arch* 439:315–320
- Cardin V, Lezama R, Torres-Marquez ME, Pasantes-Morales H (2003) Potentiation of the osmosensitive taurine release and cell volume regulation by cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  rise in cultured cerebellar astrocytes. *Glia* 44:119–128
- Ordaz B, Tuz K, Ochoa LD, Lezama R, Pena-Segura C, Franco R (2004) Osmolytes and mechanisms involved in regulatory volume decrease under conditions of sudden or gradual osmolarity decrease. *Neurochem Res* 29:65–72

## Thrombin potentiates D-aspartate efflux from cultured astrocytes under conditions of K<sup>+</sup> homeostasis disruption

Erika Vázquez-Juárez, Reyna Hernández-Benítez, Alejandra López-Domínguez and Herminia Pasantes-Morales

*División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, México*

### Abstract

Thrombin levels increase in brain during ischemia and hemorrhagic episodes, and may contribute to excitotoxic neural damage. This study examined the effect of thrombin on glutamate efflux from rat cortical cultured astrocytes using <sup>3</sup>H-D-aspartate as radiotracer. The glutamate efflux was initiated by addition of 100 mM K<sup>+</sup> plus 1 mM ouabain (K/O) to replicate extracellular and intracellular ionic changes that occur during cerebral ischemia. Upon exposure to K/O, astrocytes swelled slowly and progressively with no evidence of volume regulation. The K/O-induced swelling was inhibited by 65% with bumetanide and 25% with BaCl<sub>2</sub>, suggesting contribution of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> co-transporter and Kir channels. K/O-elicited <sup>3</sup>H-D-aspartate that consisted of two phases. The first transient component of the release corresponded to 13.5% of total <sup>3</sup>H-D-aspartate loaded. It was markedly reduced (61%) by the glutamate transporter blocker DL-threo-b-Benzyloxyaspartic acid and weakly inhibited (21%) by the volume-sensitive anion

channel blocker 4-[(2-Butyl-6,7-dichloro-2-cyclopentyl-2,3-dihydro-1oxo-1H-inden-5-yl)oxy] butanoic acid (DCPIB). During the second sustained phase of release, cells lost 45% of loaded <sup>3</sup>H-D-aspartate via a mechanism that was insensitive to DL-threo-b-Benzyloxyaspartic acid but nearly completely suppressed by DCPIB. Thrombin (5 U/mL) had only marginal effects on the first phase but strongly potentiated (more than two-fold) <sup>3</sup>H-D-aspartate efflux in the second phase. The effect of thrombin effect was proportional to cell swelling and completely suppressed by DCPIB. Overall our data showed that under K/O swelling conditions, thrombin potently enhance glutamate release via volume-sensitive anion channel. Similar mechanisms may contribute to brain damage in neural pathologies which are associated with cell swelling, glutamate efflux and increased thrombin levels.

**Keywords:** cytotoxic swelling, volume regulation, excitotoxicity, protease-activated receptors.

*J. Neurochem.* (2009) **111**, 1398–1408.

Swelling of brain cells, predominantly astrocytes, occurs either by a decrease in external osmolarity, or under isosmotic conditions by redistribution of ions and organic osmolytes which accumulate into the cells, generating the driving force for water influx. Isosmotic swelling occurs in brain associated with pathologies such as epilepsies, ischemia, hepatic encephalopathy and cranial trauma (Mongin and Kimelberg 2004; Pasantes-Morales and Franco 2005). Astrocytes are the brain cells which predominantly swell under these conditions, as consequence of their crucial role of clearance from the extracellular space, of potential injuring molecules such as K<sup>+</sup>, ammonium, or lactate, thus maintaining an optimal environment for neuronal function (Leis *et al.* 2005; Norenberg *et al.* 2005; Syková and Nicholson 2008). Mechanisms of uptake and/or metabolism operate specifically in astrocytes to accomplish this homeostatic function (Chen and Swanson 2003). However, during the progress of pathologies, the clearance capacities of astrocytes may be

exceeded or forced to operate at maximal rate, a situation in which astrocytes not only fail to restore homeostasis, but may trigger responses that exacerbate and spread the original damage (Mongin and Kimelberg 2004; Pasantes-Morales and Franco 2005). Swelling is an early expression of this exceeded buffering capacity of astrocytes. Astrocyte swelling occurs in ischemia due to K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> accumulation

Received June 12, 2009; revised manuscript received August 26, 2009; accepted September 14, 2009.

Address correspondence and reprint requests to Herminia Pasantes-Morales, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Ciudad Universitaria, Mexico, DF, Mexico. E-mail: hpasante@ifc.unam.mx

**Abbreviations used:** K/O, 100 mM K<sup>+</sup> plus 1 mM ouabain; DCPIB, 4-[(2-Butyl-6,7-dichloro-2-cyclopentyl-2,3-dihydro-1oxo-1H-inden-5-yl)oxy] butanoic acid; TBOA, DL-threo-b-Benzyloxyaspartic acid; NKCC, N<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> co-transporter; Kir, inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel; PAR, proteinase activated receptor; DIDS, 4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid; NPPB, 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid.



followed by osmotically-driven water. The enhanced extracellular K<sup>+</sup> levels, which may reach concentrations of up to 80 mM, generate an ionic imbalance harmful for neuronal excitability (Walz 2000; Rossi *et al.* 2007; Doyle *et al.* 2008). Also involved in astrocytic K<sup>+</sup> clearance is the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase (Leis *et al.* 2005). If, as in ischemia, the ATPase activity is reduced or impaired, the dissipation of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transmembrane gradients may further contribute to swelling and to disturb in addition, the normal operation of transporters which use the driving force of these gradients for the uptake of a variety of molecules, including the highly neurotoxic excitatory amino acid glutamate (Camacho and Massieu 2006; Doyle *et al.* 2008; Malarkey and Parpura 2008). This situation contributes to neuronal death by excitotoxicity, particularly at the perifocal areas of global ischemia (Won *et al.* 2002; Rossi *et al.* 2007). Under these conditions, any additional factor enhancing glutamate efflux from brain cells will aggravate the excitotoxic damage. Thrombin may be one of such factors.

Besides the role of thrombin in blood coagulation, this molecule exerts a variety of effects on brain cells, which depending on thrombin concentration may be either cytoprotective or cytotoxic (Wang and Reiser 2003). Thrombin is present in brain in low concentrations, which dramatically increase in ischemia as well as in other hemorrhagic or traumatic episodes (Xi *et al.* 2003; De Castro Ribeiro *et al.* 2006; Hua *et al.* 2007). Thrombin effects occur through PAR-1, PAR-3 and PAR-4 receptors, activated by a proteolytic cleavage mechanism via G protein-coupled signaling pathways (Coughlin 2000). The PAR receptors are present in astrocytes (Junge *et al.* 2004). The link of thrombin with glutamate efflux here investigated is based on recent reports showing that ligand activation of G protein-coupled receptors, including PAR receptors, potentiates the swelling-evoked efflux of amino acids such as taurine and glutamate, which in a variety of cells are acting as osmolytes and in brain may have the dual role of osmolytes and neurotransmitters (Fisher *et al.* 2008; Vázquez-Juárez *et al.* 2008).

In a previous study, we showed a marked effect of thrombin increasing hyposmotic-swelling induced glutamate efflux from cultured astrocytes (Ramos-Mandujano *et al.* 2007). The purpose of the present study is to investigate whether thrombin potentiates glutamate efflux evoked by isosmotic swelling under conditions disturbing the astrocytic capacity for K<sup>+</sup> clearance, i.e. high extracellular K<sup>+</sup> levels and ATPase blockade by ouabain (Leis *et al.* 2005). If this occurs, thrombin may exacerbate neurotoxicity and brain damage in pathologies concurrent with a disturbed K<sup>+</sup> homeostasis. Due to the time required for the experiments, the non-metabolizable analogue of glutamate, D-aspartate, was used in this study as tracer for glutamate.

## Materials and methods

### Materials

Basal medium Eagle, fetal bovine serum and fura-2AM were purchased from Invitrogen. Ouabain octahydrate, L-glutamine (non-animal source), bumetanide, 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid (NPPB) and the synthetic peptide SFLLRN were from Sigma-Aldrich Chemical (St Louis, MO, USA). FSLLRN, TFLLR and AYPGKF were from Bachem Americas (Torrance, CA, USA). Pen Strep (penicillin streptomycin) was from GIBCO, Invitrogen's brand, Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). DCPIB (4-[(2-Butyl-6,7-dichloro-2-cyclopentyl-2,3-dihydro-1oxo-1H-inden-5-yl)oxy] butanoic acid) and DL-TBOA were from TOCRIS Bioscience (Ellisville, MO, USA), and 4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) and PPACK from Calbiochem (San Diego, CA, USA). Thrombin was from Vital Products (bovine plasma origin, specific activity > 2000 U/mg protein). Radiative molecules [2,3-<sup>3</sup>H]-Taurine and D-[2,3-<sup>3</sup>H]-aspartic acid were from American Radiolabeled Chemicals Inc. (St Louis, MO, USA) and Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK) respectively. Salts for preparation of medium solutions were from J.T. Baker (NaCl, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, and BaCl<sub>2</sub>), Sigma Chemicals (D-(+)-Glucose) and Roche (Indianapolis, IN, USA) (Hepes).

### Cell cultures

Cortical astrocyte cultures were obtained from Wistar 1 day-old rat pups. Dissociated cell suspensions were plated at  $3 \times 10^6$  cells in 35 mm Petri dishes, with basal medium Eagle, 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 50 U/mL penicillin and 50 µg/mL streptomycin. For cell volume measurements astrocytes were grown on coverslips set over 60 mm Petri dishes with  $1.5 \times 10^6$  cells. Cultures were incubated at 37°C in humidified 5% CO<sub>2</sub>/95% air atmosphere, until confluence.

### Solutions

Isosmotic control medium contained (in mM) 135 NaCl, 5 KCl, 1.7 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.17 MgSO<sub>4</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 5 glucose, 10 HEPES (300 mOsm, with pH 7.4). Isosmotic K/O solutions were prepared replacing 100 mM NaCl with 100 mM KCl, plus 1 mM ouabain. Hyposmotic solution (210 mOsm) was prepared correspondingly reducing NaCl. Osmolarity was verified by a freezing point osmometer from Precision Systems Inc. (Natick, MA, USA).

### Cell volume measurements

Volume measurements were performed by estimating the changes in relative cell volume with a large-angle light-scattering system (McManus *et al.* 1993; Pedersen *et al.* 2002). Astrocytes cultured on coverslips were placed at 50° angle relative to the excitation light in a cuvette filled with isosmotic K/O. To test the effect of hyposmolarity the cuvette was filled with isosmotic medium during 2 min and then distilled water was added to attain the osmolarity required. Cells were excited at 585 nm with an argon arc lamp (emission was detected at 585 nm). Data are expressed as the inverse of the emission signal as light intensity inversely correlates with cell volume, according to the equation  $I_o/I_t$  (where  $I_o$  = the emission signal average when basal signal has been reached just before the stimulus;  $I_t$  = emission signal at time  $t$ ). It should be noticed that absolute volume values cannot be obtained with this

method, but that it is useful mainly to comparatively evaluate changes in cell volume evoked by different conditions or in the presence of inhibitors. This has to be considered for all mentions to cell volume made through the manuscript.

### Release experiments

Astrocytes preloaded 1 h with  $^3\text{H}$ -D-aspartate or  $^3\text{H}$ -taurine (0.3  $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ ) were washed and superfused at 1 mL/min with isosmotic control medium up to reach a stable efflux baseline. Then, medium was replaced by isosmotic K/O solution superfused continued during 40 min. To test the effect of blockers DL-threo-b-Benzyloxyaspartic acid (TBOA) and DCPIB, cells were 30 min pre-incubated with the inhibitor or the corresponding vehicle. Thrombin (5 U/mL) was added as indicated in the figures. At the end of the experiment, radioactivity in samples (collected during 45 min) and that remaining in cells was measured in a liquid scintillation counter. Results are expressed as radioactivity released per minute as percentage of the total radioactivity incorporated during loading.

### $\text{Ca}^{2+}$ measurements

To estimate changes in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  astrocytes cultured on rectangular coverslips in plastic dishes (60 mm), were incubated with fura-2/AM (2  $\mu\text{M}$ ) for 40 min. The coverslips were then gently washed in control medium to remove the extracellular dye and were placed at a  $50^\circ$  angle relative to the excitation light path in a cuvette filled with control medium or with K/O solution in a Fluoromax-3, Horiba luminescence spectrometer. Excitation wavelength was alternated between 340 and 380 nm and fluorescence intensity was monitored at 510 nm. The values obtained through this procedure were used to calculate the ratio of fluorescence intensity (fluorescence at 340 nm/fluorescence at 380 nm).

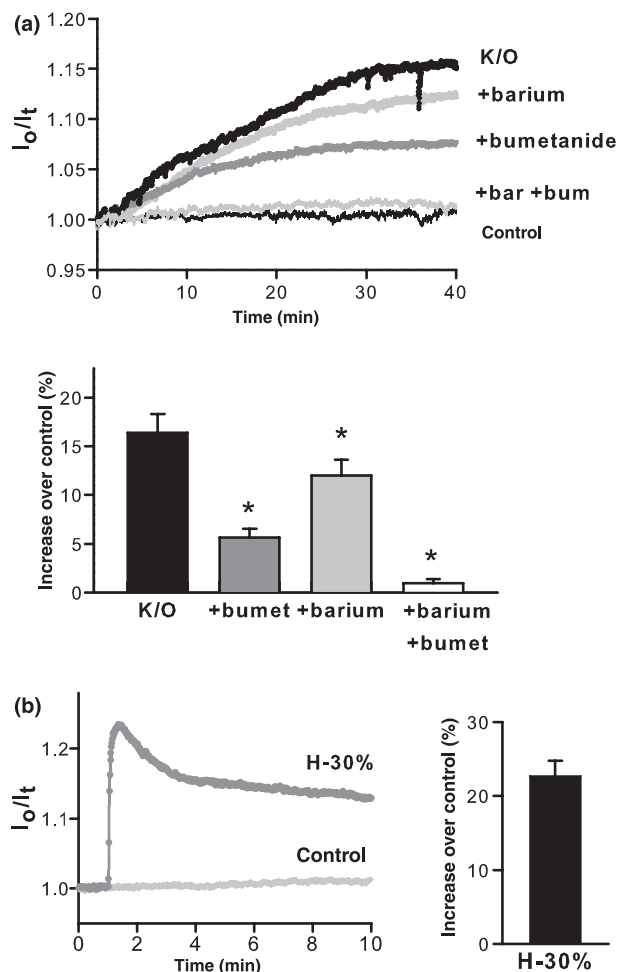
### Data analysis

Statistical differences between experimental groups were determined by Student's *t*-test and analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test, statistically significant differences were considered at  $*p < 0.05$ . All data are given as mean  $\pm$  SEM.

## Results

### High extracellular $\text{K}^+$ concentration and ouabain (K/O) increased astrocyte volume under isosmotic conditions

Cultured astrocytes exposed to 100 mM KCl and 1 mM ouabain (isosmotic solution made by equiosmolar reduction of NaCl) (K/O) showed a continuous increase in cell volume. Swelling started immediately after the treatment and progressively increased to reach a maximum after 27 min. No significant further swelling was observed up to 50 min. Maximal K/O-induced astrocyte swelling (evaluated with the limitations inherent to the light-scattering method) was 16% in average over cell volume in controls (Fig. 1a). K/O-elicited swelling was markedly reduced (66%) when astrocytes were treated with 10  $\mu\text{M}$  bumetanide, a known blocker of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$  co-transporter (NKCC1). Swelling was also decreased (27%) by 200  $\mu\text{M}$   $\text{BaCl}_2$ , (barium) which at this concentration acts as blocker of inwardly rectifying  $\text{K}^+$



**Fig. 1** Swelling of cortical astrocytes exposed to isosmotic K/O and effects of the NKCC cotransporter blocker bumetanide and the Kir channel blocker barium. (a) Representative traces of volume changes in cells exposed to KCl (100 mM), replacing equiosmolar NaCl, plus 1 mM ouabain (K/O), and the effect of bumetanide (10  $\mu\text{M}$ ) barium (200  $\mu\text{M}$ ) and both. Bumetanide (10  $\mu\text{M}$ ) was preincubated 30 min in control medium before treatment with K/O, and was present throughout the experiment. Barium (200  $\mu\text{M}$ ) was added at the time of exposure to K/O medium. Results in bars (means  $\pm$  SE of 6–10 experiments) correspond to maximal swelling expressed as percentage over volume under control conditions. (b) Astrocyte swelling and volume regulation in 30% hyposmotic medium (H-30%). \*Significantly different from control K/O  $p < 0.05$ .

channels. Treatment with the two blockers simultaneously, abolished astrocyte swelling (Fig. 1a). Astrocytes exposed to 30% hyposmotic solution show immediate swelling, with maximal peak of 22% over the basal value, attained almost immediately after the stimulus. Thereafter, a progressive reduction in cell volume was observed (Fig. 1b). This result, included in the present study with comparative purposes, confirms other reports showing the typical regulatory volume decrease in cultured astrocytes (Pasantes-Morales *et al.*

1994; Olson *et al.* 1995; Cardin *et al.* 1999). Thrombin added to the control medium elicited a marginal increase of  $2.1 \pm 0.84\%$  ( $n = 6$ ) of astrocyte volume.

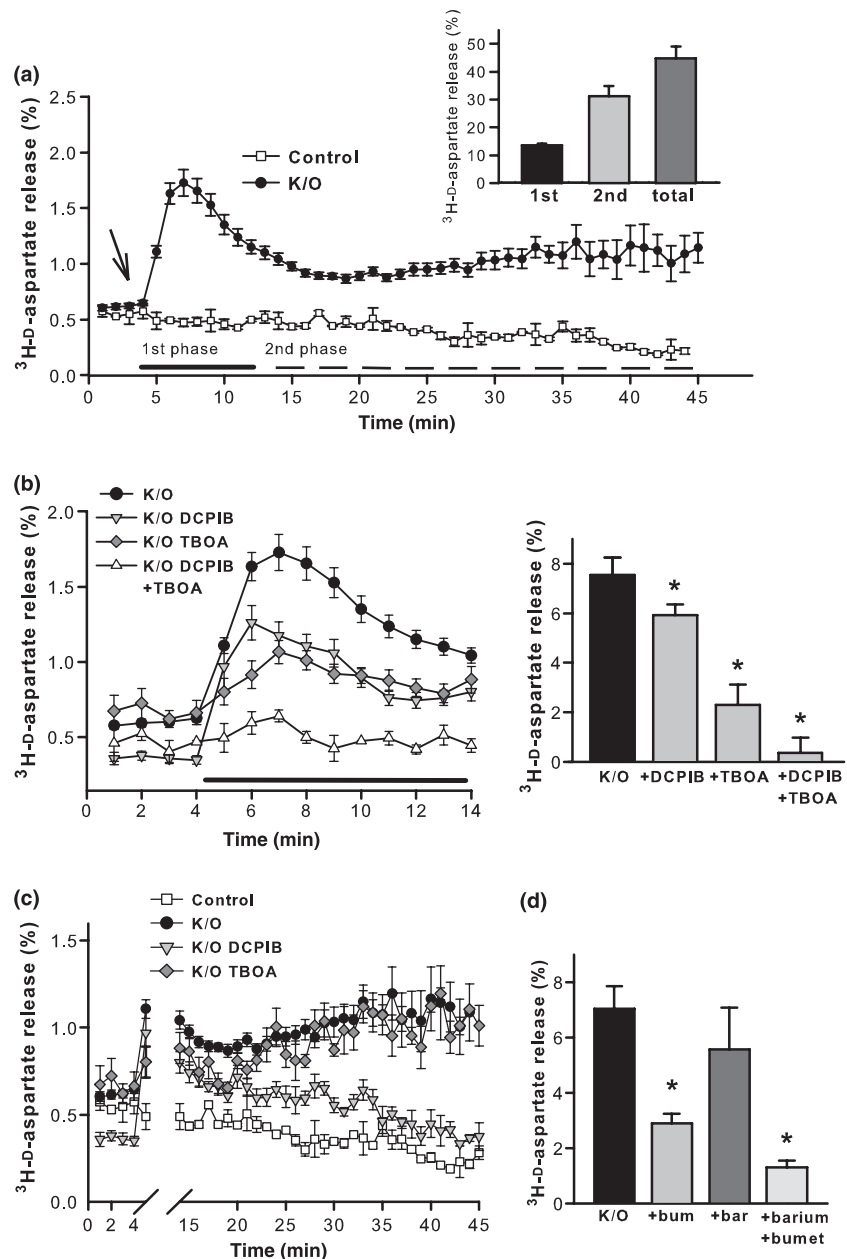
### Treatment with K/O increased D-aspartate via two different routes

Astrocytes loaded with <sup>3</sup>H-D-aspartate and superfused with control medium, released labeled D-aspartate at a rate of 0.5% per min. Treatment with K/O increased D-aspartate release with a biphasic pattern. In the first phase, a fast and large increase in D-aspartate was observed, reaching a peak release of 1.7%, 3 min after the stimulus (Fig. 2a). Then, efflux slowly decreased showing release fractions of

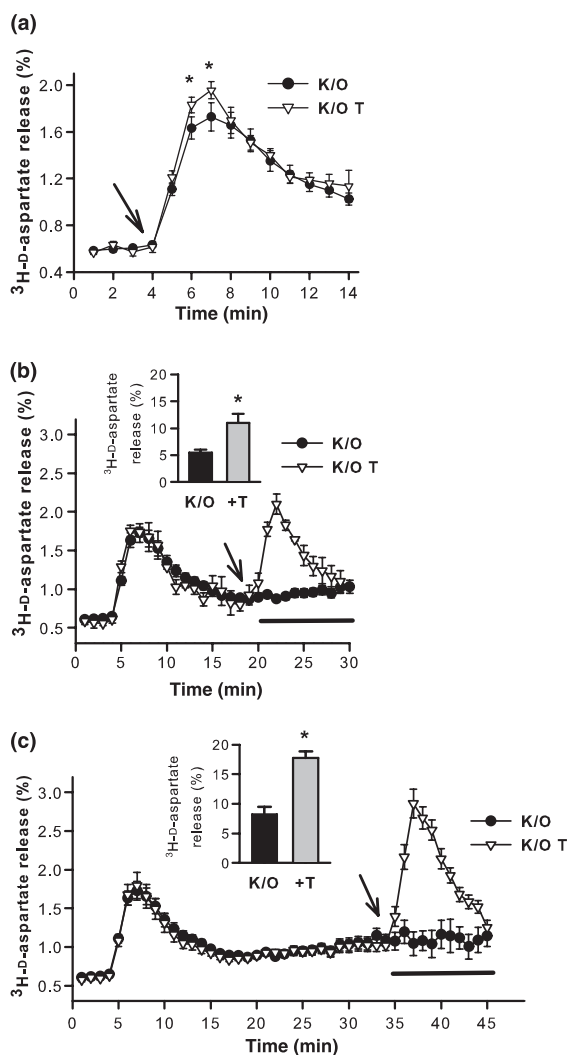
1.6–1.2% per min during about 8 min. Thereafter, a second phase of release was observed, in which D-aspartate efflux increased slowly and progressively, without showing any decline during the time of the experiment (40 min). (Fig. 2a). The amount of D-aspartate released during the first phase corresponds to 13.5% of loaded D-aspartate, and the amount released in the second phase is 31% resulting in a total release of 45% (Fig. 2a).

The mechanism of D-aspartate efflux during the two identified phases was investigated using the Na<sup>+</sup>-dependent glutamate carrier blocker TBOA, and DCPIB, a specific and potent blocker of the volume-sensitive anion channel. Cells were incubated with the blockers during 20 min before

**Fig. 2** D-Aspartate efflux from cortical astrocytes evoked by K/O and effect of swelling and carrier blockers. Astrocytes preloaded with <sup>3</sup>H-D-aspartate were superfused (1 mL/min) with control medium during 4 min, and then (arrow) with the same control medium (□) or the isosmotic K/O medium (100 mM KCl replacing the equivalent NaCl), and 1 mM ouabain (●). Points represent the radioactivity released at each fraction, expressed as percentage of total radioactivity accumulated during loading. (a) The time-course of <sup>3</sup>H-D-aspartate showing two phases, a first phase (solid bottom line), activated and inactivated within 10 min after exposure to K/O, and a progressively increasing second phase of release (bottom dashed line) during the next 30 min. In bars is the amount of <sup>3</sup>H-D-aspartate release at each phase, expressed as percentage of the total label accumulated in loading. (b) <sup>3</sup>H-D-aspartate release in K/O during the first phase (10 min after K/O, solid bottom line) and effects of 5 μM TBOA and 10 μM DCPIB and both. (c) Efflux and effect of blockers TBOA, DCPIB during the second phase (min 15–40 after K/O). (□) Control; (●) K/O; (▽) K/O plus DCPIB; (◆) K/O plus TBOA. (d) Effect of cell swelling blockers bumetanide (10 μM) and barium (200 μM) on D-aspartate release in K/O during the second phase (30–40 min after K/O). Bars represent net efflux, i.e. release under the K/O condition minus release without K/O, in the presence of the blockers. Results are means ± SE of 6–8 experiments. \*Significantly different from control K/O  $p < 0.05$ .



treatment with K/O. Fig. 2b shows a marked inhibitory effect of TBOA on the first phase of D-aspartate efflux, which is reduced up to 61%. DCPIB showed also an inhibitory effect, decreasing D-aspartate efflux by 21%. Simultaneous treatment with the two blockers reduced the



**Fig. 3** Effect of thrombin on K/O-induced efflux of D-aspartate from cultured cortical astrocytes (a)  $^3\text{H}$ -D-aspartate efflux during 10 min after K/O exposure (first phase) and the potentiation by 5 U/mL thrombin, added at the arrow. (b)  $^3\text{H}$ -D-aspartate efflux during 30 min after K/O and the potentiation by thrombin added at the arrow. (c) K/O-evoked  $^3\text{H}$ -D-aspartate efflux during 40 min and the potentiation by thrombin added at the arrow. Points represent the radioactivity released at each fraction, expressed as percentage of total accumulated under the following conditions: (●) K/O; (▼) K/O plus thrombin. Bars in b and c show  $^3\text{H}$ -D-aspartate released in 10 fractions (bottom line) in the presence or absence of thrombin and represent net efflux (K/O minus control release) under the indicated conditions. Points in the curves and results in bars, are means  $\pm$  SE of six experiments. \*Significantly different from controls in the absence of thrombin  $p < 0.05$ .

efflux up to 84% (Fig. 2b). An opposite inhibition pattern was found for the second release phase of D-aspartate, which was essentially insensitive to TBOA but markedly reduced by DCPIB (Fig. 2c). These results suggest that swelling is the stimulus to evoke the second phase of D-aspartate release. This was confirmed by the marked reduction of D-aspartate efflux when cell swelling was inhibited by bumetanide (59%), barium (19%) or bumetanide plus barium (81%) (Fig. 2d). Results on the time-course and mechanisms of D-aspartate efflux confirm those reported by Rutledge and Kimelberg (1996).

### D-Aspartate efflux evoked by K/O is potentiated by thrombin

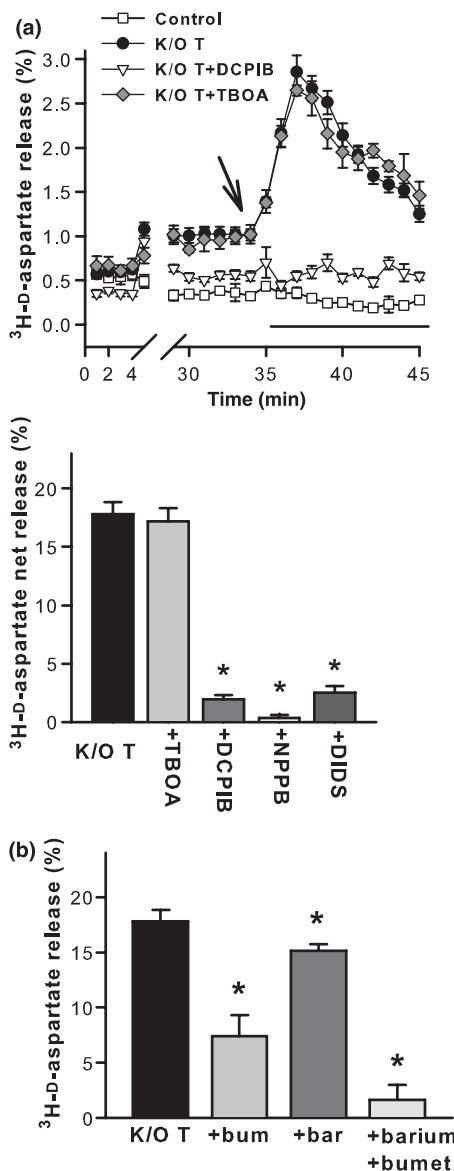
Thrombin added at the same time as K/O evoked a small but significant enhancement of D-aspartate efflux (Fig. 3a), but when added 15 min after exposure to K/O, once the first release phase has almost inactivated, a large potentiation of D-aspartate efflux was observed, increasing by 101% the K/O-evoked efflux (Fig. 3b). An even higher potentiation of D-aspartate efflux of about 117% was observed when thrombin was applied when the second phase has progressed, 30 min after the stimulus (Fig. 3c). Thrombin evoked release of D-aspartate was unaffected by TBOA and essentially abolished by DCPIB, NPPB or DIDS (Fig. 4a). These results suggest that the effect of thrombin occurs primarily on D-aspartate fluxes across the volume-activated anion channel. In further support to this notion, the thrombin potentiated D-aspartate efflux was essentially suppressed by preventing astrocyte swelling with bumetanide and barium (Fig. 4b).

### K/O evoked taurine efflux is potentiated by thrombin

Taurine efflux examined in the same conditions exhibited only a small increase as result of K/O exposure in the initial minutes, corresponding to the first phase of release (Fig. 5a). Thereafter, taurine efflux increased continuously during the next 30 min with no sign of inactivation. Taurine released was 8% and 35% in the first and second phase, respectively, resulting in a total release of 43% (Fig. 5a). Taurine efflux evoked by K/O was abolished by DCPIB (Fig. 5a). Thrombin increased taurine efflux, by a DCPIB-sensitive mechanism (Fig. 5b).

### The mechanisms of thrombin effect increasing taurine and D-aspartate efflux

The mechanism mediating thrombin effects on K/O efflux of D-aspartate likely involves its action as a protease on a PAR receptor. This is supported by results in Fig. 6a, showing how thrombin pretreatment with the protease inhibitor PPACK, prevented the thrombin potentiation of K/O-evoked D-aspartate efflux. The PAR-1 isoform seems that predominantly involved in thrombin effect, since the PAR-1 agonists SFLLRN and TFLLR (5  $\mu\text{M}$ ), fully replicate the effect of thrombin on D-aspartate efflux, while the scrambled peptide,



**Fig. 4** Effects of swelling-, carrier- and volume-sensitive pathway-blockers on K/O-evoked D-aspartate potentiated by thrombin. (a) Effects of TBOA, DCPIB, NPPB and DIDS on D-aspartate released during the last 10 min of perfusion with K/O plus thrombin (bottom line). (b) Effects of the K/O induced swelling blockers bumetanide and barium on the D-aspartate release as in (a). Astrocytes were pre-incubated with the blockers, 5  $\mu$ M TBOA, 10  $\mu$ M DCPIB, 50  $\mu$ M NPPB or DIDS, 10  $\mu$ M bumetanide, during 30 min, and then the experiment was carried out as in Fig. 2. Barium (200  $\mu$ M) was added at the time of K/O treatment. Bars represent net efflux (K/O minus control release) under the indicated conditions, and are means  $\pm$  SE of 4–6 experiments. \*Significantly different from K/O plus thrombin condition  $p < 0.05$ .

FSLLRN was without effect (Fig. 6b). The PAR-4 agonist AYPGKF (50  $\mu$ M) was essentially ineffective (Fig. 6b).

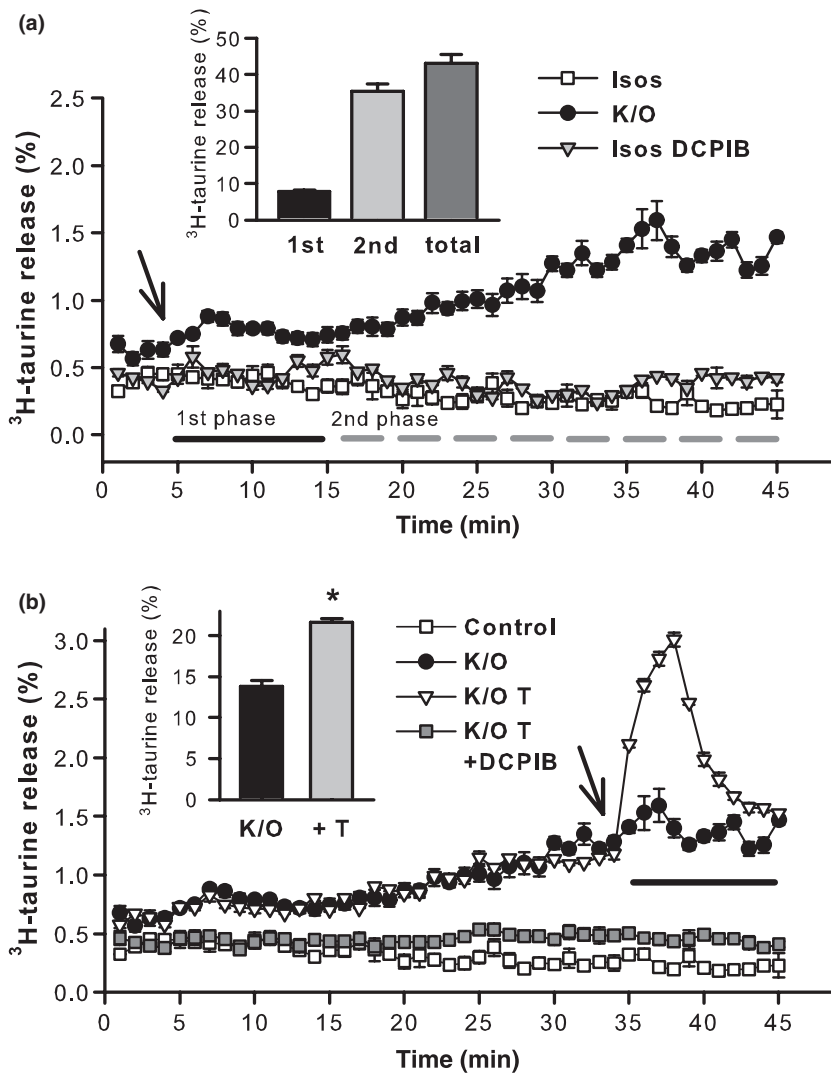
Thrombin interaction with PAR receptors is known to elicit a marked increase in cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration

([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>). This effect is consistently observed in a large variety of cells and was also found in the present study in cortical cultured astrocytes treated with K/O. The magnitude of thrombin effect increasing K/O-induced D-aspartate release was markedly different during the time of the experiment as above described. To exclude a variation in the extent of thrombin-evoked [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> rise during the experiment as the reason for this difference, the change in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> was examined when thrombin was applied 2 min (Fig. 7a), 15 or 30 min after K/O stimulus (Fig. 7b and c). Figure 7b shows no difference in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> elevation at any of the times examined.

## Discussion

The present results showed swelling in cultured astrocytes under isosmotic conditions, evoked by treatment with high extracellular K<sup>+</sup> concentrations and ouabain (K/O). The swelling time-course observed contrasts notably with that induced by 30% reduction in osmolarity in the same preparation (cultured astrocytes) (Pasantes-Morales *et al.* 1994; Olson *et al.* 1995; Cardin *et al.* 2003 and present results). Whereas maximal volume under the hyposmotic condition was attained almost immediately after the stimulus, it required about 30 min to be reached in K/O-treated cells. Another remarkable difference is that while hyposmotic swelling is followed by an active process of volume recovery, in the K/O-treated cells there is no evidence of volume regulation, though a plateau is reached at a certain time.

Astrocyte swelling elicited by K/O treatment is the consequence of K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> accumulation, followed by osmotically obligated water (Ransom *et al.* 1996; Walz 2000). A small proportion may come also from intracellular Na<sup>+</sup> raised by Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase blockade, which is though, counteracted by the suppressed K<sup>+</sup> accumulation via the ATPase. Under this condition, net K<sup>+</sup> uptake is accomplished primarily by activation of the electroneutral co-transporter NKCC. NKCC1 is the isoform expressed in cultured astrocytes and there is evidence in support of the substantial contribution of this transporter to the uptake phase of K<sup>+</sup> clearance by astrocytes (Walz 1987; Su *et al.* 2002a, b; Mongin 2007). The present results showing a marked reduction in K/O-induced swelling when NKCC1 is blocked by bumetanide are in line with these previous observations. The glial inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels of the Kir family channels are proposed as an additional pathway for K<sup>+</sup> accumulation and K<sup>+</sup> buffering. The Kir4.1 isoform is expressed in cultured and *in situ* astrocytes and constitute the major part of the astrocytic Kir conductance (Olsen and Sontheimer 2008; Benesova *et al.* 2009). We found that blockade of Kir channels with barium led to a mild decrease of astrocyte swelling, suggesting a modest contribution of this mechanism to K<sup>+</sup> uptake in cultured cortical astrocytes.



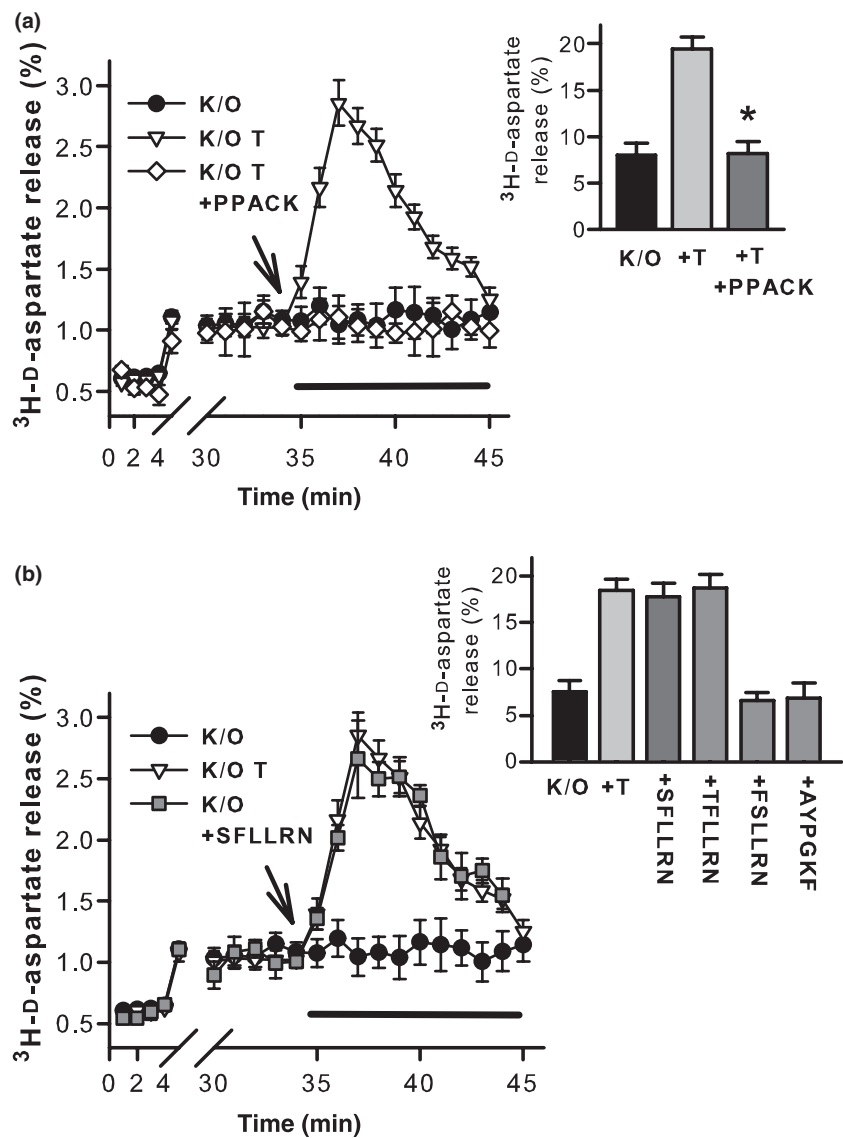
**Fig. 5** Effect of K/O on  $^3\text{H}$ -taurine release, its potentiation by thrombin and the effect of DCPIB. (a) Astrocytes were preloaded with  $^3\text{H}$ -taurine and treated as in Fig. 2. (b) Time-course of K/O-evoked taurine efflux and the effect of thrombin (5 U/mL) added 30 min after K/O exposure (bottom line) and the effect of DCPIB (10  $\mu\text{M}$ ) on thrombin potentiation. DCPIB treatment as described in Fig. 2. Points represent the radioactivity released at each fraction, expressed as percentage of total  $^3\text{H}$ -taurine accumulated under the following conditions: ( $\square$ ) Control; ( $\bullet$ ) K/O; ( $\nabla$ ) K/O plus DCPIB; ( $\nabla$ ) K/O plus thrombin ( $\blacksquare$ ) K/O plus thrombin plus DCPIB. Bars in (a) represent net efflux (K/O minus control release) in the two phases of release. Bars in b show taurine released in 10 fractions (bottom line) in the presence or absence of thrombin. \*Significantly different at  $p < 0.05$ .

The time-course of K/O-induced swelling in cortical cultured astrocytes showed no evidence of an efficient volume regulation, which contrasts with the fast volume recovery observed after hyposmotic swelling. This is a predictable result since the typical regulatory volume decrease observed under hyposmotic conditions is accomplished to a large extent, by  $\text{K}^+$  and  $\text{Cl}^-$  extrusion (Wehner 1998; Stutzin and Hoffmann 2006) which cannot occur in high extracellular  $\text{K}^+$  concentrations. The pool of organic osmolytes, including glutamate, taurine and myo-inositol (Rutledge and Kimelberg 1996; Cardin *et al.* 1999; Isaacks *et al.* 1999), is mobilized, attenuating the magnitude of swelling, and is presumably responsible for the observed swelling plateau, but appears insufficient to accomplish cell volume recovery when the K/O condition persists.

Taurine and D-aspartate efflux elicited by K/O was comparatively examined in the present study, and marked differences were found in the release pattern between the two amino acids. In contrast to the fast and large release of

D-aspartate observed immediately after K/O exposure, only a marginal increase in taurine efflux was observed. Differences in the carrier properties may contribute to the difference observed, since while glutamate transporter is  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$ -dependent, taurine carrier is only  $\text{Na}^+$ -dependent and consequently is less influenced by changes in external  $\text{K}^+$ . Results showing that prevention of taurine efflux by DCPIB, a specific blocker of the volume-sensitive anion channel (Decher *et al.* 2001), points to this pathway as the main route for taurine translocation.

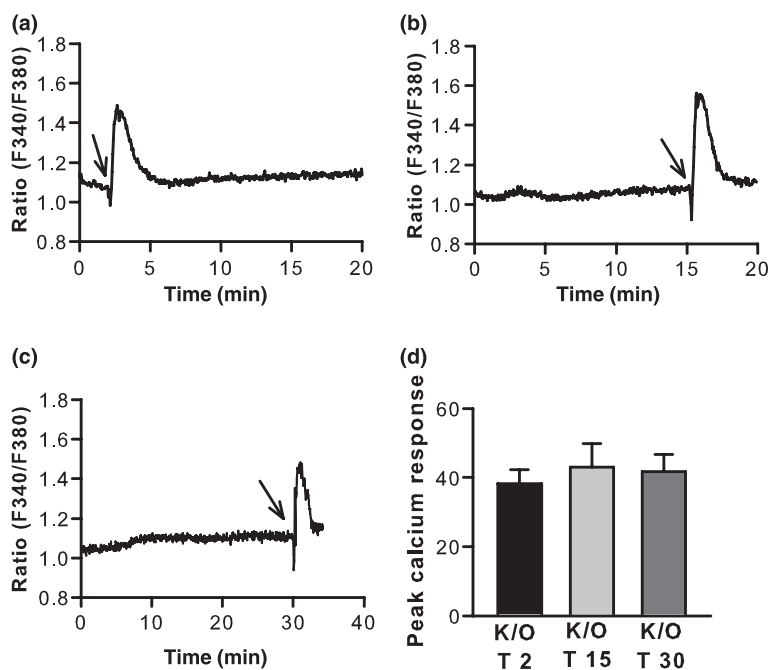
The release of D-aspartate from astrocytes was also increased by K/O treatment, as previously reported (Rutledge and Kimelberg 1996). The efflux time-course shows two different phases: an initial phase, of fast activation and inactivation, and a second phase, of delayed and progressive efflux, detectable as long as the K/O condition persists. The pharmacological profile of these two phases revealed two different mechanisms for release. The initial phase, markedly reduced (60%) by the carrier blocker TBOA, is



**Fig. 6** Effect of PPACK and PAR agonists on K/O-evoked D-aspartate release. (a) Thrombin pre-incubated 30 min with PPACK (1  $\mu$ M) was applied to cells exposed to K/O during 30 min as in Fig. 4c. (b) Effect of the synthetic peptides, PAR-1 agonists, SFLLRN or TFLLR (5  $\mu$ M), FSLLRN (scrambled peptide), the PAR-4 agonist, AYPGKF (50  $\mu$ M), were added to K/O-treated cells replacing thrombin, 30 min after K/O as in Fig. 3c. Bars in (a) represent D-aspartate released in the last 10 fractions (bottom line) by K/O, K/O plus thrombin and K/O plus PPACK-treated thrombin. In (b) bars illustrate D-aspartate release in the presence of the peptides as in (a). Results are means  $\pm$  SE of four experiments. \*Significantly different from K/O plus thrombin, by  $p < 0.05$ .

then likely occurring via the transport reversal, a condition favored by the dissipation of ionic gradients and depolarization. Interestingly, a fraction of 21% of D-aspartate release in this first phase was reduced by DCPIB, the volume-sensitive pathway blocker, suggesting that even small changes in cell volume as occurring in the first minutes after treatment with K/O, enhance glutamate efflux via this pathway. The simultaneous presence of TBOA and DCPIB reduced 95% the D-aspartate efflux from this first fraction, excluding mechanisms other than swelling and carrier-mediated efflux as contributors to D-aspartate release. The second phase of D-aspartate efflux showed a markedly different time-course as compared with the initial phase, and a different pattern of sensitivity to TBOA and DCPIB. While the carrier blocker had no effect, D-aspartate efflux was abolished by DCPIB, NPPB or DIDS, a result that points to swelling as the main stimulus for this release. The

swelling-dependent phase of D-aspartate efflux is also evident by the effect preventing this efflux when cell swelling is reduced by treatment with bumetanide and barium. A previous study has shown a strong inhibitory effect of bumetanide on D-aspartate release elicited by high K<sup>+</sup> concentrations (Su *et al.* 2002a, b), a result confirmed in the present results. All these observations clearly establish that D-aspartate efflux is elicited by both, depolarization/dissipation of the ionic gradients and cell swelling, and proceeds via two different routes, as has been previously demonstrated by Rutledge and Kimelberg (1996). The same conclusion has been reached after substantial evidence regarding glutamate efflux in a variety of experimental models of ischemia, *in vitro* and *in vivo* (Nelson *et al.* 2003; Phillis and O'Regan 2003; Mongin and Kimelberg 2004; Swanson *et al.* 2004; Kimelberg 2005). This similarity is expected since the experimental paradigm of the



**Fig. 7** Changes in  $[Ca^{2+}]_i$  elicited by thrombin in astrocytes at different times of exposure to K/O: (a). Thrombin added 2 min after K/O exposure (b). 15 min after K/O. (c) 30 min after K/O. Results are expressed as ratio of fluorescence intensity (340/380 nm) (d). Quantification of the peak of  $[Ca^{2+}]_i$  response for each condition (bars were obtained from the peak value minus the basal K/O value).  $[Ca^{2+}]_i$  was measured with fura-2AM (2  $\mu$ M) as detailed in Methods. Means  $\pm$  SE from 6 to 10 experiments.

present study replicates intracellular and extracellular ionic changes that occur during cerebral ischemia, and has been often considered as an ischemic-like model (Rutledge and Kimelberg 1996). In contrast to glutamate, taurine efflux, which is also reported to be released in ischemia models (Phillis and O'Regan 2003; Mongin and Kimelberg 2004), seems to respond largely to swelling.

The main interest of the present study was to investigate whether thrombin potentiates glutamate efflux under ischemic-like conditions, thus potentially aggravating the risk of excitotoxicity. It should be noticed that in all experiments, D-aspartate was used as tracer for glutamate. Glutamate participates in multiple reactions related to brain energetic demands, and excitability (Dienel and Hertz 2005; Rossi *et al.* 2007) and in astrocytes particularly, glutamate is actively metabolized via glutamine synthetase (Isaacks *et al.* 1999). Therefore, the amount of glutamate released by K/O and K/O plus thrombin may be lower than that of D-aspartate. If this is too low to promote excitotoxicity remains to be demonstrated.

We showed in a previous report a marked effect of thrombin increasing glutamate efflux from cultured astrocytes swollen by hyposmolarity (Ramos-Mandujano *et al.* 2007) and the present study demonstrates a similar effect of thrombin in a model of isosmotic swelling, in this case elicited by intracellular  $K^+$ ,  $Na^+$  and  $Cl^-$  intracellular accumulation. As above mentioned, in contrast to the immediate and fast increase in cell volume after a hyposmotic stimulus, swelling under the K/O condition has a temporal pattern allowing us to demonstrate that thrombin potentiation of glutamate efflux, D-aspartate in this case,

occurs with a magnitude proportional to the degree of swelling. A small but significant effect of thrombin increasing D-aspartate release was observed within the first minutes after the stimulus, when only minute changes in cell volume occur. Later, the potentiation by thrombin is much higher, with a magnitude related to the extent of swelling. In full accordance with this conclusion, when swelling is prevented by bumetanide and barium, the thrombin-potentiated D-aspartate efflux was essentially suppressed.

The effect of thrombin found in the present study, in agreement with that observed on hyposmotic glutamate efflux, involved a protease-activated receptor (PAR), mainly the PAR-1 isoform, which is present in astrocytes (Wang *et al.* 2002; Wang and Reiser 2003; Junge *et al.* 2004). Thrombin activation of PAR receptors elicits a signaling pathway resulting in  $[Ca^{2+}]_i$  increase in astrocytes confirming its effect in numerous cell types. Thrombin increased  $[Ca^{2+}]_i$  in astrocytes from two main sources, extracellular  $Ca^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  from the endoplasmic reticulum stores (Ramos-Mandujano *et al.* 2007). As above mentioned, thrombin potentiation of D-aspartate and taurine efflux was higher when thrombin was applied after longer times after the K/O treatment. This pattern is not due to any difference in the extent of thrombin-elicited  $[Ca^{2+}]_i$  elevation, which was found to be the same all along the experiment. It seems, in contrast, related to the degree of cell swelling which is progressively increasing. Altogether, these results show that glutamate (D-aspartate) efflux can be enhanced in swollen cells under isosmotic conditions including those replicating ischemia, provided that a threshold swelling is attained.



The thrombin-elicited increase in glutamate efflux from astrocytes might contribute to ischemic-induced neuronal death by excitotoxicity (Feustel *et al.* 2004; Mongin 2007) particularly since brain thrombin levels notably increase in ischemia. Other observations relate thrombin with excitotoxicity, such as the ischemia-induced up-regulation of PAR receptors (Xi *et al.* 2003) for which thrombin is the main substrate, or reported thrombin action increasing the efficiency of the glutamate NMDA-type receptor, which may exacerbate glutamate potential damage (Gingrich *et al.* 2000; Lee *et al.* 2007; Sharp *et al.* 2008). Altogether, these observations point to a possible effect of thrombin aggravating the excitotoxic damage known to occur in ischemia. In support to this possibility is the resistance to ischemic damage observed in transgenic mice defective in PAR-1, and the increased neuronal survival by treatment with PAR-1 blockers argatroban and hirudin (Kawai *et al.* 1996; Strigow *et al.* 2000, 2001; Karabiyikoglu *et al.* 2004).

The effects of thrombin increasing D-aspartate efflux were found abolished by preventing swelling with bumetanide and barium. Also taurine and D-aspartate release were suppressed by DCPIB. Altogether, these results point to the swelling-activated permeability pathway as the site of thrombin influence. DCPIB is a specific and potent blocker of the volume-sensitive glutamate efflux from astrocytes as shown by previous results from us and others (Abdullaev *et al.* 2006; Ramos-Mandujano *et al.* 2007). DCPIB and other Cl<sup>-</sup> channel blockers also inhibit the swelling-induced efflux of organic osmolytes (Abdullaev *et al.* 2006; Shennan 2008). There is still controversy on whether the swelling-sensitive Cl<sup>-</sup> channel itself is the permeability pathway for the organic osmolytes, including glutamate, a controversy raised by consistent observation of an inhibitory effect of essentially all the volume-sensitive Cl<sup>-</sup> channel blockers on the volume-sensitive efflux of organic osmolytes. If this means that the same pathway carries both Cl<sup>-</sup> and organic osmolytes or that they are so closely interconnected that blockade of one, blocks also the other one, is still uncertain. In any event, there is evidence of a strong effect of DCPIB reducing swelling-induced glutamate efflux in astrocytes and more recently DCPIB was also shown to prevent glutamate efflux evoked by middle cerebral artery occlusion-induced ischemia in adult rat. In support to the critical role played by cell swelling as a route for glutamate efflux leading to excitotoxic damage in ischemia, DCPIB showed a significant reduction of the infarct volume in this *in vivo* ischemia model (Zhang *et al.* 2008).

## Acknowledgments

We deeply acknowledge the valuable technical assistance of Ms. Claudia Peña-Segura, and Dr. Gerardo Ramos-Mandujano. This work was supported in part by grants from IMPULSA-03 and DGAPA IN203410, UNAM and 46465 from CONACYT, México.

This study is part of the requirements for the PhD degree in Biomedical Sciences of Erika Vázquez-Juárez at the Universidad Nacional Autónoma de México, with a CONACYT, Mexico fellowship.

## References

- Abdullaev I. F., Rudkouskaya A., Schools G. P., Kimelberg H. K. and Mongin A. A. (2006) Pharmacological comparison of swelling-activated excitatory amino acid release and Cl<sup>-</sup> currents in cultured rat astrocytes. *J. Physiol.* **572**, 677–689.
- Benesova J., Hock M., Butenko O., Prajerova I., Anderova M. and Chvatal A. (2009) Quantification of astrocyte volume changes during ischemia in situ reveals two populations of astrocytes in the cortex of GFAP/EGFP mice. *J. Neurosci. Res.* **87**, 96–111.
- Camacho A. and Massieu L. (2006) Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. *Arch. Med. Res.* **37**, 11–18.
- Cardin V., Peña-Segura C. and Pasantes-Morales H. (1999) Activation and inactivation of taurine efflux in hyposmotic and isosmotic swelling in cortical astrocytes: role of ionic strength and cell volume decrease. *J. Neurosci. Res.* **56**, 659–667.
- Cardin V., Lezama R., Torres-Marquez M. E. and Pasantes-Morales H. (2003) Potentiation of the osmosensitive taurine release and cell volume regulation by Ca<sup>2+</sup> rise in cultured cerebellar astrocytes. *Glia* **44**, 119–128.
- Chen Y. and Swanson R. A. (2003) Astrocytes and brain injury. *Cereb. Blood Flow Metab.* **23**, 137–149.
- Coughlin S. R. (2000) Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* **407**, 258–264.
- De Castro Ribeiro M., Badaut J., Price M., Meins M., Bogousslavsky J., Monard D. and Hirt L. (2006) Thrombin in ischemic neuronal death. *Exp. Neurol.* **198**, 199–203.
- Decher N., Lang H. J., Nilius B., Bruggemann A., Busch A. E. and Steinmeyer K. (2001) DCPIB is a novel selective blocker of I(Cl,swell) and prevents swelling-induced shortening of guinea-pig atrial action potential duration. *Br. J. Pharmacol.* **134**, 1467–1479.
- Dienel G. A. and Hertz L. (2005) Astrocytic contributions to bioenergetics of cerebral ischemia. *Glia* **50**, 362–388.
- Doyle K. P., Simon R. P. and Stenzel-Poore M. P. (2008) Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology* **55**, 310–318.
- Feustel P. J., Jin Y. and Kimelberg H. K. (2004) Volume-regulated anion channels are the predominant contributors to release of excitatory amino acids in the ischemic cortical penumbra. *Stroke* **35**, 1164–1168.
- Fisher S. K., Cheema T. A., Foster D. J. and Heacock A. M. (2008) Volume-dependent osmolyte efflux from neural tissues: regulation by G-protein-coupled receptors. *J. Neurochem.* **106**, 1998–2014.
- Gingrich M. B., Junge C. E., Lyuboslavsky P. and Traynelis S. F. (2000) Potentiation of NMDA receptor function by the serine protease thrombin. *J. Neurosci.* **20**, 4582–4595.
- Hua Y., Keep R. F., Hoff J. T. and Xi G. (2007) Brain injury after intracerebral hemorrhage: the role of thrombin and iron. *Stroke* **38**, 759–762.
- Isaacs R. E., Bender A. S., Kim C. Y., Shi Y. F. and Norenberg M. D. (1999) Effect of osmolality and anion channel inhibitors on myo-inositol efflux in cultured astrocytes. *J. Neurosci. Res.* **57**, 866–871.
- Junge C. E., Lee C. J., Hubbard K. B., Zhang Z., Olson J. J., Hepler J. R., Brat D. J. and Traynelis S. F. (2004) Protease-activated receptor-1 in human brain: localization and functional expression in astrocytes. *Exp. Neurol.* **188**, 94–103.

- Karabiyikoglu M., Hua Y., Keep R. F., Ennis S. R. and Xi G. (2004) Intracerebral hirudin attenuates ischemic damage and neurologic deficits without altering local cerebral blood flow. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **24**, 159–166.
- Kawai H., Yuki S., Sugimoto J. and Tamao Y. (1996) Effects of a thrombin inhibitor, argatroban, on ischemic brain damage in the rat distal middle cerebral artery occlusion model. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **278**, 780–785.
- Kimelberg H. K. (2005) Astrocytic swelling in cerebral ischemia as a possible cause of injury and target for therapy. *Glia* **50**, 389–397.
- Lee C. J., Mannaioni G., Yuan H., Woo D. H., Gingrich M. B. and Traynelis S. F. (2007) Astrocytic control of synaptic NMDA receptors. *J. Physiol.* **581**, 1057–1081.
- Leis J. A., Bekar L. K. and Walz W. (2005) Potassium homeostasis in the ischemic brain. *Glia* **50**, 407–416.
- Malarkey E. B. and Parpura V. (2008) Mechanisms of glutamate release from astrocytes. *Neurochem. Int.* **52**, 142–154.
- McManus M., Fischbarg J., Sun A., Hebert S. and Strange K. (1993) Laser light-scattering system for studying cell volume regulation and membrane transport processes. *Am. J. Physiol.* **265**, C562–C570.
- Mongin A. A. (2007) Disruption of ionic and cell volume homeostasis in cerebral ischemia: The perfect storm. *Pathophysiology* **14**, 183–193.
- Mongin A. A. and Kimelberg H. K. (2004) Astrocytic swelling in neuropathology, in *Neuroglia* (Kettenmann H. O. and Ransom B. R., eds), pp. 550–562. Oxford University Press, New York.
- Nelson R. M., Lambert D. G., Richard Green A. and Hainsworth A. H. (2003) Pharmacology of ischemia-induced glutamate efflux from rat cerebral cortex in vitro. *Brain Res.* **964**, 1–8.
- Norenberg M. D., Rao K. V. and Jayakumar A. R. (2005) Mechanisms of ammonia-induced astrocyte swelling. *Metab. Brain Dis.* **20**, 303–318.
- Olsen M. L. and Sontheimer H. (2008) Functional implications for Kir4.1 channels in glial biology: from K<sup>+</sup> buffering to cell differentiation. *J. Neurochem.* **107**, 589–601.
- Olson J. E., Alexander C., Feller D. A., Clayman M. L. and Ramnath E. M. (1995) Hypoosmotic volume regulation of astrocytes in elevated extracellular potassium. *J. Neurosci. Res.* **40**, 333–342.
- Pasantes-Morales H. and Franco R. (2005) Astrocyte cellular swelling: mechanisms and relevance to brain edema, in *The Role of Glia in Neurotoxicity* (Aschner M. and Costa L. G., eds), pp. 173–191. CRC Press, New York.
- Pasantes-Morales H., Murray R. A., Lilja L. and Morán J. (1994) Regulatory volume decrease in cultured astrocytes. I. Potassium- and chloride-activated permeability. *Am. J. Physiol.* **266**, C165–C171.
- Pedersen S. F., Beisner K. H., Hougaard C., Willumsen B. M., Lambert I. H. and Hoffmann E. K. (2002) Rho family GTP binding proteins are involved in the regulatory volume decrease process in NIH3T3 mouse fibroblasts. *J. Physiol.* **15**(541), 779–796.
- Phillis J. W. and O'Regan M. H. (2003) Characterization of modes of release of amino acids in the ischemic/reperfused rat cerebral cortex. *Neurochem. Int.* **43**, 461–467.
- Ramos-Mandujano G., Vázquez-Juárez E., Hernández-Benítez R. and Pasantes-Morales H. (2007) Thrombin potentially enhances swelling-sensitive glutamate efflux from cultured astrocytes. *Glia* **55**, 917–925.
- Ransom C. B., Sontheimer H. and Janigro D. J. (1996) Astrocytic inwardly rectifying potassium currents are dependent on external sodium ions. *Neurophysiol* **76**(1), 626–630.
- Rossi D. J., Brady J. D. and Mohr C. (2007) Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. *Nat. Neurosci.* **10**, 1377–1386.
- Rutledge E. M. and Kimelberg H. K. (1996) Release of [3H]-D-aspartate from primary astrocyte cultures in response to raised external potassium. *J. Neurosci.* **16**, 7803–7811.
- Sharp F., Liu D. Z., Zhan X. and Ander B. P. (2008) Intracerebral hemorrhage injury mechanisms: glutamate neurotoxicity, thrombin, and Src. *Acta Neurochir. Suppl.* **105**, 43–46.
- Shennan D. B. (2008) Swelling-induced taurine transport: relationship with chloride channels, anion-exchangers and other swelling-activated transport pathways. *Cell Physiol Biochem* **21**, 15–28.
- Strigrow F., Riek M., Breder J., Henrich-Noack P., Reymann K. G. and Reiser G. (2000) The protease thrombin is an endogenous mediator of hippocampal neuroprotection against ischemia at low concentrations but causes degeneration at high concentrations. *Proc Natl Acad Sci* **97**, 2264–2269.
- Strigrow F., Riek-Burchardt M., Kiesel A., Schmidt W., Henrich-Noack P., Breder J., Krug M., Reymann K. G. and Reiser G. (2001) Four different types of protease-activated receptors are widely expressed in the brain and are up regulated in hippocampus by severe ischemia. *Eur. J. Neurosci.* **14**, 595–608.
- Stutzin A. and Hoffmann E. K. (2006) Swelling-activated ion channels: functional regulation in cell-swelling, proliferation and apoptosis. *Acta Physiol* **187**, 27–42.
- Su G., Kintner D. B., Flagella M., Shull G. E. and Sun D. (2002a) Astrocytes from Na<sup>(+)</sup>-K<sup>(+)</sup>-Cl<sup>(-)</sup> cotransporter-null mice exhibit absence of swelling and decrease in EAA release. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **282**(5), C1147–C1160.
- Su G., Kintner D. B. and Sun D. (2002b) Contribution of Na<sup>(+)</sup>-K<sup>(+)</sup>-Cl<sup>(-)</sup> cotransporter to high-[K<sup>(+)</sup>]<sub>o</sub>-induced swelling and EAA release in astrocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **282**(5), C1136–C1146.
- Swanson R. A., Ying W. and Kauppinen T. M. (2004) Astrocyte influences on ischemic neuronal death. *Curr Mol Med* **4**, 193–205.
- Syková E. and Nicholson C. (2008) Diffusion in brain extracellular space. *Physiol. Rev.* **88**, 1277–1340.
- Vázquez-Juárez E., Ramos-Mandujano G., Hernández-Benítez R. and Pasantes-Morales H. (2008) On the role of G-protein coupled receptors in cell volume regulation. *Cell Physiol Biochem* **21**, 1–14.
- Walz W. (1987) Swelling and potassium uptake in cultured astrocytes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **65**(5), 1051–1057.
- Walz W. (2000) Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochem. Int.* **36**, 291–300.
- Wang H. and Reiser G. (2003) Thrombin signaling in the brain: the role of protease-activated receptors. *Biol Chem* **384**, 193–202.
- Wang H., Ubl J. J. and Reiser G. (2002) Four subtypes of protease-activated receptors, co-expressed in rat astrocytes, evoke different physiological signaling. *Glia* **37**, 53–63.
- Wehner F. (1998) Cell volume-regulated cation channels. *Contrib. Nephrol.* **123**, 8–20.
- Won S. J., Kim D. Y. and Gwag B. J. (2002) Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death. *J Biochem Mol Biol* **35**, 67–86.
- Xi G., Reiser G. and Keep R. F. (2003) The role of thrombin and thrombin receptors in ischemic, hemorrhagic and traumatic brain injury: deleterious or protective? *J. Neurochem.* **84**, 3–9.
- Zhang Y., Zhang H., Feustel P. J. and Kimelberg H. K. (2008) DCPIB, a specific inhibitor of volume regulated anion channels (VRACs), reduces infarct size in MCAo and the release of glutamate in the ischemic cortical penumbra. *Exp. Neurol.* **210**, 514–520.

# ACUAPORINAS Y EDEMA CEREBRAL\*

Alejandra López-Domínguez y Herminia Pasantes

## RESUMEN

El edema cerebral es una condición asociada a numerosas patologías, con consecuencias clínicas frecuentemente más graves que la propia patología de origen. El edema ocurre como consecuencia de una alteración en la distribución del agua entre el líquido cefalorraquídeo y el plasma, y los compartimientos intersticial e intracelular, en respuesta a cambios en la presión hidrostática y presión osmótica. El edema vasogénico ocurre cuando hay daño en la barrera hematoencefálica, entrada de agua y proteínas plasmáticas generando la expansión del espacio intersticial. El edema citotóxico ocurre cuando hay una acumulación de agua en el citosol, debida a perturbaciones en la distribución normal de osmolitos. La importancia de las acuaporinas en la generación y/o en la prevención del edema celular o vasogénico está siendo activamente investigada. En esta revisión se informa acerca de los resultados más recientes en este tema.

**PALABRAS CLAVE:** Acuaporina, transporte de agua, edema cerebral, edema vasogénico, edema citotóxico.

## INTRODUCCIÓN

Las células animales tienen una proporción muy alta de agua, por lo que su volumen está directamente relacionado con los movimientos de agua que ocurren a través de la membrana celular. Una proporción importante de los flujos transmembranales de agua ocurre por el mecanismo de difusión pasiva a través de la bicapa lipídica. El paso del agua a través de la sección hidrofóbica de la membrana, restringe en parte su difusión pero ésta se puede acelerar enormemente cuando intervienen proteínas membranales que forman canales específicos, a través de los cuales el agua pasa con muy

pocas restricciones. Estas moléculas son las acuaporinas. Tanto el flujo a través de la bicapa lipídica como el movimiento a través de las acuaporinas ocurren siguiendo el gradiente del potencial químico del agua. Este potencial es inversamente proporcional a la concentración de solutos y está en función de la presión osmótica.

## TRANSPORTE DE AGUA A TRAVÉS DE LAS ACUAPORINAS

La permeabilidad al agua es una propiedad general de las membranas de las células animales, por lo que durante mucho tiempo se pensó que era

## ABSTRACT

Brain water is distributed between blood, cerebrospinal fluid, interstitial and intracellular compartments and moves across these compartments following differences in osmotic and hydrostatic pressures. Brain edema occurs by water accumulation resulting from blood brain barrier disruption (vasogenic edema) or by increase in cell water resulting either from a hyponatremic condition or by osmolyte redistribution between the extracellular and intracellular compartments (cytotoxic edema). In most pathologies, one type of edema gradually results in the development of the other type. The role of aquaporins in the generation or/and the control of brain edema is now extensively investigated. This review informs about recent result on this topic.

**KEY WORDS:** Aquaporin, water transport, brain edema, vasogenic edema, cytotoxic edema.

transportada únicamente a través de la bicapa lipídica, que es común a todas las membranas. Sin embargo, desde hace varias décadas se habían reunido evidencias que apuntaban hacia un mecanismo adicional mucho más rápido para el transporte del agua a través de la membrana, mediado por moléculas proteicas. Fue hasta 1988 que se pudo aislar y caracterizar el primero de estos componentes moleculares, que resultaron ser poros o canales para el transporte específico del agua. Se les dio el nombre de acuaporinas (1). Su funcionamiento es extremadamente eficiente, llegando a transportar hasta tres mil mi-

\*Recibido: 2 de julio de 2009 Aceptado: 13 de octubre de 2009

División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 04510, México. Autor responsable: Dra. Herminia Pasantes Tel: 5622-5608; Fax: 5622-5607. Correo E: hpasante@ifc.unam.mx

TABLA 1  
Patrón de expresión, función y distribución de las acuaporinas en el humano

AQP	Locus genético	No. aminoácidos	Transporte	Permeabilidad al agua	Localización
AQP0	12q13	263	Agua, iones	Baja	Cristalino (ojo)
AQP1	7p14	269	Agua, CO <sub>2</sub> , NO, iones	Alta	Eritrocitos, pulmón, riñón, cerebro, ojo y endotelio vascular
AQP2	12q13	271	Agua	Alta	Riñón
AQP3	9p13	292	Agua, glicerol	Alta	Piel, riñón, pulmón, ojo y tracto gastrointestinal
AQP4	18q22	323	Agua	Alta	Riñón, cerebro, pulmón, tracto gastrointestinal y músculo
AQP5	12q13	265	Agua	Alta	Glándula salival, lagrimal y sudorípara, pulmón y ojo
AQP6	12q13	282	Aniones NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> >I <sup>-</sup> >>Br <sup>-</sup> >Cl <sup>-</sup> >>F <sup>-</sup>	Baja	Riñón
AQP7	9p13	170	Agua, urea, glicerol, arsenito	Alta	Tejido adiposo, riñón y testículos
AQP8	16p12	255	Agua, urea, amoniacó	Alta	Riñón, hígado, páncreas, tracto gastrointestinal y testículos
AQP9	15q22	295	Agua, urea, polioles (glicerol y manitol), purinas, pirimidinas, arsenito	Baja	Hígado, leucocitos, cerebro y testículos
AQP10	1q21	264	Agua, glicerol, urea	Baja	Tracto gastrointestinal
AQP11	11q13	271	-	-	Cerebro, hígado y riñón
AQP12	2q37	265	-	-	-

llones de moléculas de agua por segundo. Las acuaporinas forman canales que son notablemente selectivos, excluyendo el paso de iones de todo tipo y sólo algunos subtipos de acuaporinas permiten el paso de moléculas pequeñas como la urea y el glicerol. El desplazamiento del agua a través de estos canales es bidireccional, determinado por el gradiente electroquímico del agua. La familia de las acuaporinas en las células de mamíferos consta hasta la fecha de trece subtipos, designados en

una serie secuencial de AQP0 a AQP12. Las AQP3, AQP7 y AQP9 son también permeables al glicerol (Tabla 1).

El subtipo mejor caracterizado es la AQP1, que fue la primera en ser aislada de la membrana de eritrocitos humanos (Fig. 1). El estudio cristalográfico de la AQP1 muestra que se trata de una proteína monomérica, que para formar el canal de paso del agua se organiza en forma de tetrámeros, con cuatro monómeros idénticos. Esta organización permite la formación de un

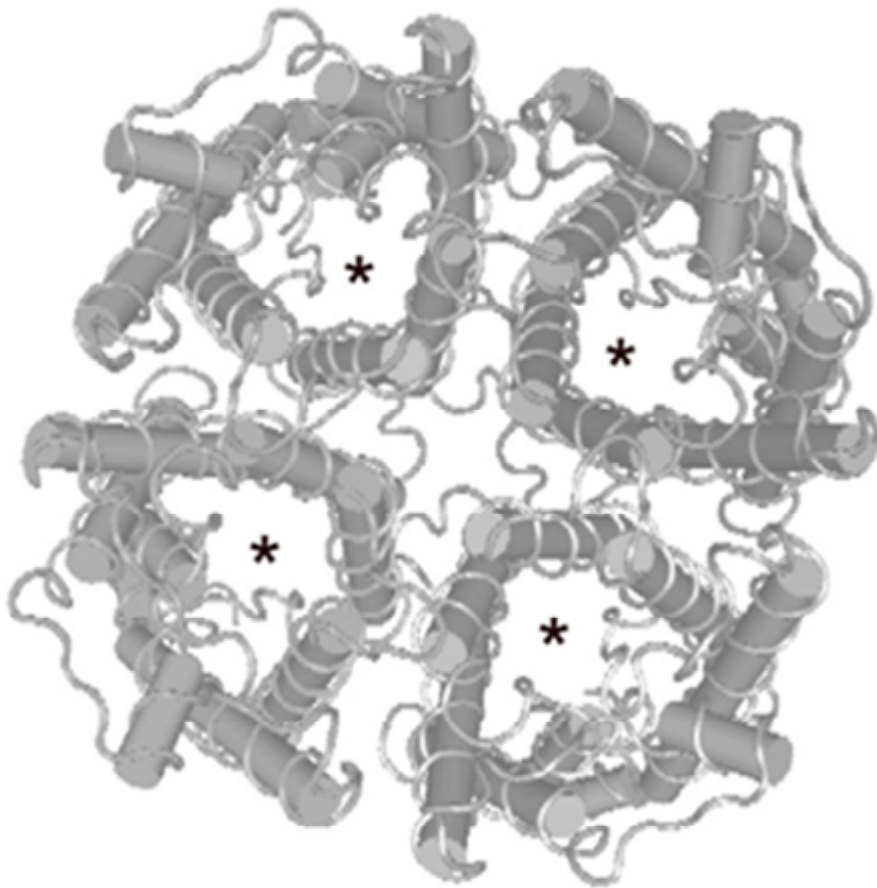
poro, cuyo diámetro es de 2 nanómetros de largo y 0.3 nanómetros de ancho (Fig. 1). Esta dimensión limita el paso de la mayoría de las moléculas presentes en los fluidos biológicos. Una de las propiedades más interesantes de las acuaporinas es su capacidad para impedir el paso de iones, que por su tamaño, podrían permear fácilmente a través del poro de las acuaporinas. Esto se consigue en parte mediante la presencia de una barrera formada por un aminoácido con carga positiva, la arginina, el cuál

está situado en una posición estratégica dentro del poro. Esta estructura está conservada en todos los subtipos de acuaporinas. Existen también fuerzas electrostáticas que dificultan el paso de los iones, y a la vez determinan la orientación de las moléculas de agua, las que de esta forma, ingresan al poro de manera ordenada, permitiendo una difusión muy rápida.

### Los distintos tipos de acuaporinas: características y localización en el sistema nervioso

La importancia fisiológica de los distintos subtipos de acuaporinas se ha establecido en diversos tejidos y órganos. Entre los mejor conocidos se encuentra el sistema renal, en el que varios subtipos de acuaporinas tienen un papel determinante en la

reabsorción del agua durante el proceso de concentración de la orina. Las acuaporinas tienen también una función crítica en el intercambio de fluido en los capilares, en el humor acuoso y en la producción del líquido cefalorraquídeo, lo que sugiere su participación en patologías como el edema pulmonar, el edema cerebral o el glaucoma. El cristalino, la córnea, el músculo esquelético, los epitelios glandulares e intestinales, son otros tantos tejidos en los que las acuaporinas desempeñan un papel muy importante en la regulación de los fluidos celulares (Tabla 1) (2). Asimismo, las acuaporinas parecen ser el medio a través del cual ocurre en buena parte el movimiento del agua osmótica durante los cambios en el volumen celular.



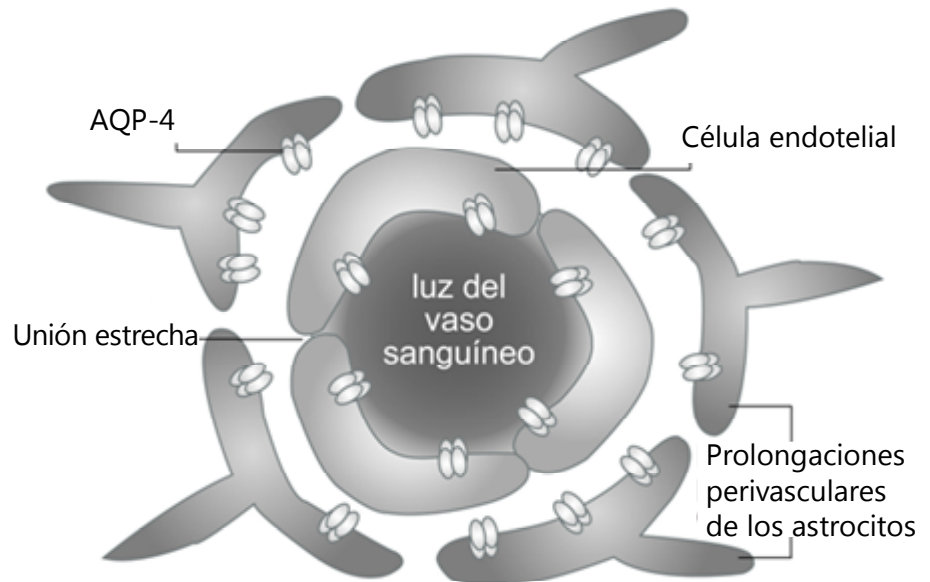
**Figura 1.** Modelo estructural de la AQP-1 tetramérica vista desde la superficie extracelular. Cada monómero está representado con diferente color. Los asteriscos representan los poros de agua para cada subunidad.

En el sistema nervioso se expresan principalmente las acuaporinas AQP1, 4 y 9. La AQP1 se localiza preferentemente en el epitelio del plexo coroideo, en la membrana apical de las células epiteliales. Participa en la formación del líquido cefalorraquídeo y su expresión se incrementa en tumores del plexo coroideo que se asocian con una formación excesiva del líquido cefalorraquídeo. La AQP1 se localiza en neuronas sensoriales de la raíz dorsal y se ha relacionado con la percepción del dolor. La AQP9 tiene la particularidad de que además de ser permeable al agua, permite el paso de pequeñas moléculas sin carga tales como glicerol, urea, lactato, purinas y pirimidinas. La AQP9 se expresa en los astrocitos en la región periventricular del parénquima y en la glía que bordea el espacio subaracnoideo, coincidiendo en algunas zonas con la AQP4. La AQP9 se localiza en los tunicos, en los astrocitos que forman los principales tractos de sustancia blanca, en núcleos del septo y del hipotálamo y en la glía de Bergmann. Funcionalmente se ha involucrado a la AQP9 en el movimiento de osmolitos como el lactato y la urea, contribuyendo a la regulación osmótica. Recientemente se ha detectado la presencia en el cerebro de las acuaporinas AQP3, AQP5, AQP6, AQP7 y AQP8. Las acuaporinas AQP3, AQP5 y AQP8 se localizan en astrocitos y en la membrana basolateral de las células del epitelio ependimal. Las acuaporinas AQP5, AQP6 y AQP7 se han encontrado hasta ahora sólo en las neuronas. La AQP8 se encuentra en neuronas y oligodendrocitos. La AQP11 se ha localizado en las espinas dendríticas de las células de Purkinje, en las neuronas de las regiones CA1 y CA3 del hipocampo y en neuronas corticales (3).

La AQP4 se expresa abundantemente en el cerebro, encontrándose en concentraciones diez veces más ele-

vadas que en otros órganos. Es la acuaporina con mayor relevancia en la eliminación del edema vasogénico y participa también en el desplazamiento de agua en el edema citotóxico (Fig. 2). La AQP4 se clonó de células de pulmón de ratón (4, 5) y posteriormente se clonó una segunda isoforma en cerebro de ratón, que contiene un segmento amino terminal más largo (Tabla 1) (6). Ambas isoformas se encuentran en el cerebro, pero la más corta, con 301 residuos de aminoácidos, es la más abundante (Tabla 1). Una característica típica de la AQP4 es que, a diferencia de las otras acuaporinas no se inhibe por mercuriales, debido a la ausencia de algunos residuos de cisteína que son críticos para la unión de estos agentes. La AQP4 se localiza en los astrocitos, en las células endoteliales y en las células de Müller de la retina. En los astrocitos se encuentra en forma predominante en las células que forman las interfases cerebroventricular y cerebrovascular, con una distribución polarizada, concentrándose en las zonas de los astrocitos que entran en contacto directo con los capilares y la piamadre. Se encuentra también en zonas de alta vascularización y en aquellas que están a cargo de la osmopercepción y la osmorregulación a nivel sistémico, como son el órgano subfórmico y el núcleo supraóptico. La AQP4 no se encuentra en neuronas.

La comprensión y la extensión del papel que juega la AQP4 en la fisiopatología del sistema nervioso se ha visto facilitada por la generación de un ratón transgénico AQP4<sup>-/-</sup> (5, 7). Otros ratones transgénicos con efecto sobre la funcionalidad de AQP4 son el modelo de ratón distrofina<sup>-/-</sup> y el  $\alpha$ -sintrofina<sup>-/-</sup>. La presencia y funcionalidad adecuadas de estas proteínas son necesarias para la localización correcta de la AQP4 en la membrana.



**Figura 2.** Vía de salida del agua de la barrera hematoencefálica a la corriente sanguínea durante el edema cerebral.

### ACUAPORINAS Y EDEMA CEREBRAL

En condiciones fisiológicas el agua en el cerebro adulto se distribuye entre varios compartimientos: el líquido cefalorraquídeo, el plasma, el intersticial y el intracelular, desplazándose entre estos distintos compartimientos en respuesta a las diferencias en presión homeostática y presión osmótica. El edema cerebral se origina cuando se presenta una distribución inadecuada de agua entre estos distintos compartimientos. El edema cerebral se presenta en un gran número de patologías, y es una complicación clínica grave, en ocasiones aún más seria que la propia patología que le dio origen. El edema cerebral puede ser vasogénico o citotóxico. El edema vasogénico es el que ocurre al haber daño de la barrera hematoencefálica y como consecuencia, el agua y algunas proteínas plasmáticas entran al parénquima cerebral siguiendo el desbalance en la presión hidrostática. El edema vasogénico es primordialmente una expansión del espacio intersticial. El fluido que se acumula

durante el edema vasogénico se elimina a través de la glía limitante externa hacia el espacio subaracnoideo y luego a través de la glía limitante interna y el epéndimo hacia los ventrículos. El edema citotóxico ocurre cuando hay acumulación de agua en el citosol, a consecuencia de perturbaciones en la distribución normal de iones y osmolitos orgánicos a consecuencia de situaciones patológicas.

### AQP4 Y EDEMA VASOGÉNICO

Como se mencionó anteriormente, la distribución de la AQP4 en elementos celulares sugería su participación en los desplazamientos de agua ya sea para la generación del edema como para la eliminación de los fluidos que lo causan. Esta predicción derivada de los sitios de expresión de la AQP4 se ha confirmado experimentalmente. Hay evidencia de que la AQP4 juega un papel clave en la eliminación del líquido intracerebral durante el edema vasogénico, sustentada en las siguientes observaciones: 1. En un modelo experimental de edema vasogénico consistente en la infusión

de líquido cefalorraquídeo, se observa un incremento en la presión intracraneal en animales deficientes en AQP4, 2. El incremento en la presión intracraneal generado por inyección de fluido isotónico en el parénquima cerebral es mayor en los ratones AQP4<sup>-/-</sup>, 3. En condiciones de traumatismo craneoencefálico, los animales deficientes en AQP4 muestran mayor daño neurológico, un incremento en la presión intracraneal y mayor acumulación de agua que sus correspondientes controles con un daño semejante en la barrera hematoencefálica (8, 7), 4. En un modelo experimental de edema vasogénico generado por el implante de células que generan un melanoma, los animales deficientes en AQP4 mostraron un incremento en la presión intracraneal y un pronóstico neurológico adverso en comparación con los controles (5). Estas evidencias, en conjunto, sustentan la participación de la AQP4 en el mecanismo de eliminación de fluido desde el parénquima cerebral hacia el plasma en el curso del edema vasogénico. Estos resultados confirman la participación de la AQP4 en el edema vasogénico, afectando al proceso de eliminación de los fluidos acumulados más que al de desplazamiento dentro del parénquima cerebral.

### **AQP4 Y EDEMA CITOTÓXICO**

El edema citotóxico se define como la acumulación de agua en las células nerviosas a consecuencia de una condición patológica. Aunque en términos de definición hay una clara diferencia entre el edema vasogénico y el citotóxico, en el curso de muchas de las patologías que los originan es frecuente que coincidan los dos tipos de edema, a veces con diferente patrón temporal, generándose uno a consecuencia del otro. El edema citotóxico a su vez, puede originarse a consecuencia de un decremento en la osmolaridad del plasma, en todas aquellas patolo-

gías que conllevan un cuadro de hiponatremia o bien en condiciones isosmóticas en situaciones patológicas como la epilepsia, la isquemia, el traumatismo cefálico o de médula espinal y la encefalopatía hepática.

### **Hiponatremia**

La hiponatremia es una condición que se presenta en numerosas patologías. La hiponatremia puede ser consecuencia de un incremento en los niveles de agua o de un decremento en el contenido plasmático de electrolitos, en particular el sodio que es el que se encuentra en mayor concentración.

Un exceso en el contenido en agua plasmática ocurre en la polidipsia psicótica. En esta condición, el enfermo muestra una necesidad continua de ingerir agua, lo que termina diluyendo el plasma y generando un cuadro de edema cerebral. Otra situación en la que se incrementa el contenido de agua plasmática es durante el consumo de la droga llamada éxtasis. Este compuesto es un bloqueador del transportador de la serotonina y a través de este efecto desregula los centros de control de la temperatura localizados en el hipotálamo, haciendo que el individuo tenga una sensación de calor insoportable que lo induce a ingerir líquido en grandes cantidades durante un tiempo corto. Se presenta entonces, un cuadro de hiponatremia y el edema cerebral que genera es la causa de los pocos casos de muerte asociados a esta droga. Una condición de hiponatremia se presenta también en los corredores de maratón. Algunos casos de edema cerebral fatal, por desgracia demasiado frecuentes, ocurren a consecuencia de la administración de fluidos durante la terapia postoperatoria, que no están cuidadosamente ajustados a los niveles de sodio/agua y otros osmolitos en el momento de la infusión.

El edema en condiciones de hiponatremia se genera simplemente

por el desbalance osmótico que tiene lugar entre los compartimientos extracelular e intracelular. La concentración de solutos en el interior de la célula es mayor y el agua se desplaza de acuerdo a su potencial, hasta igualar la osmolaridad. En estas condiciones, la gran mayoría de las células animales, incluyendo las células nerviosas, incrementan su volumen, pero en forma muy rápida se inicia un mecanismo regulador que ha persistido en las células animales a través de la evolución. Se trata de una respuesta activa, que se pone en movimiento a pesar de que persistan las condiciones hiposmóticas externas. Este mecanismo conocido como decremento regulador del volumen consiste en la expulsión de solutos osmóticamente activos presentes en concentraciones altas en la célula, hacia el espacio extracelular, con la finalidad de restablecer el equilibrio osmótico. Las moléculas que tienen a su cargo este proceso, son llamadas osmolitos. En términos moleculares los osmolitos caen en dos grandes categorías: 1. Los iones K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> y 2. Un grupo de moléculas pequeñas de naturaleza diversa, que son los osmolitos orgánicos. Los aminoácidos glutamato, aspartato, GABA, glicina y taurina, el mioinositol y las aminas fosfoetanol amina y creatina son los osmolitos orgánicos que participan mayoritariamente en la recuperación del volumen (9). El decremento regulador del volumen se observa tanto en el cerebro completo como en distintas preparaciones nerviosas como rebanadas de tejido o neuronas y astrocitos en cultivo (10). El papel de las acuaporinas en los desplazamientos de agua en hiponatremia no está bien establecido y los pocos estudios que se han dirigido a examinar este aspecto han sido en ocasiones, contradictorios. Un incremento en la expresión inmunológica de la AQP4 se reporta en el cerebro de ratas con hiponatremia, pero que no se acom-

pañña de un incremento a nivel transcripcional ni de un cambio en distribución intracelular. En astrocitos obtenidos del cerebro del ratón AQP4<sup>-/-</sup> se observa una disminución muy marcada, de más de siete veces, en el desplazamiento del agua en condiciones de hiponatremia. Sin embargo, en astrocitos en los que se bloquea la expresión funcional de la AQP4 por RNA de interferencia, no se observó ningún cambio en la permeabilidad del agua en condiciones hiposmóticas (11). Resulta claramente necesario incrementar el número de investigaciones sobre este tópicico antes de tener una conclusión acerca del papel de la AQP4 o de otras acuaporinas en el decremento regulador del volumen en células nerviosas.

Como se mencionó antes, una patología en la que se produce hiponatremia es la intoxicación por agua, una condición presente en padecimientos sicóticos. Un modelo experimental de esta condición es simplemente la infusión de agua. Para llegar a producirse edema citotóxico, el agua en el plasma debe desplazarse a través de los compartimientos representados por la barrera hematoencefálica, y el compartimiento intersticial, antes de llegar al citosol. En el ratón deficiente en AQP4, la infusión de agua en el plasma induce una significativamente menor mortalidad (8%) que en los controles nativos (76%). Esta diferencia parece deberse a una menor acumulación de agua en el cerebro del ratón AQP4<sup>-/-</sup>, debida a un desplazamiento menor a través de la barrera hematoencefálica como sugieren los resultados que muestran un mayor hinchamiento en el pie de los astrocitos de los ratones nativos (5,12). Básicamente los mismos resultados se observan cuando la localización de la AQP4 está alterada en los ratones transgénicos sin distrofina o sin  $\alpha$ -sintrofina (13).

### Epilepsia

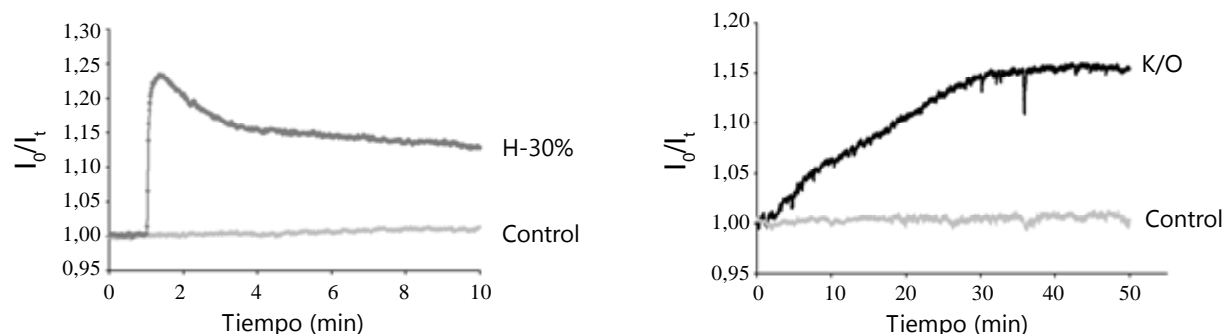
La relación entre una condición de hiponatremia y el incremento en la actividad convulsiva se conoce desde hace tiempo. Diversos estudios *in vitro* han confirmado el vínculo entre edema e hiperexcitabilidad y han tratado de establecer el mecanismo celular y molecular de esta asociación. El aumento en volumen de los astrocitos inducido por hiponatremia, que lleva a una reducción correspondiente del espacio extracelular, induce actividad epileptiforme en varias preparaciones nerviosas. Otra evidencia en este sentido es la reducción de la actividad epileptiforme por furosemida, un inhibidor del cotransportador NKCC, que participa en el aumento en volumen en los astrocitos asociado a hiperexcitabilidad neuronal y acumulación de K<sup>+</sup> (14). Con estos antecedentes, se plantea la posibilidad de que la AQP4 esté participando en el control de la excitabilidad. En un estudio reciente se comparó la susceptibilidad convulsiva al pentilentetrazol de los ratones AQP4<sup>-/-</sup> en comparación con los animales control. Los resultados mostraron una menor tasa de mortalidad, pero un menor umbral de aparición y una duración significativamente mayor de las convulsiones (14). Este efecto puede deberse a una capacidad reducida por parte de los astrocitos y al exceso de K<sup>+</sup> que se libera al espacio extracelular como consecuencia de la hiperexcitabilidad neuronal.

### Isquemia

Durante un episodio isquémico, la reducción o el cese en el aporte de oxígeno y de glucosa lleva a una insuficiencia energética que disipa los gradientes transmembranales de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>. Esto trae como consecuencia un incremento en las concentraciones intracelulares de Na y un aumento en los niveles de K extracelular debido a la interrupción de la actividad de la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> al interrumpirse la

cadena respiratoria mitocondrial por ausencia de oxígeno. El nivel extracelular de K<sup>+</sup> en isquemia severa puede llegar hasta 80 mM, lo que lleva a la activación del sistema de amortiguamiento espacial a cargo de los astrocitos. Los niveles extracelulares de K<sup>+</sup> en el cerebro deben mantenerse dentro de márgenes muy controlados, debido a su papel fundamental en la excitabilidad neuronal. Los astrocitos tienen un papel clave en esta regulación a través del mecanismo conocido como amortiguamiento espacial del K<sup>+</sup>. Durante este proceso, el K<sup>+</sup> se acumula en los astrocitos que se encuentran en el área de los focos epiléptico o isquémico y es transferido a otros astrocitos a través de las uniones comunicantes, para ser liberado en regiones alejadas del sitio de máxima concentración extracelular. En condiciones de isquemia severa y prolongada, el proceso de transferencia se ve sobrepasado y el K<sup>+</sup> se acumula en los astrocitos. Esto es seguido por la entrada de Cl<sup>-</sup> para mantener la electroneutralidad y de agua que sigue su potencial químico, llevando a un incremento en el volumen del astrocito. A diferencia de lo que ocurre en el edema en condiciones de hiponatremia, en este caso los astrocitos no son capaces de regular su volumen, por lo que permanecen hinchados (Fig. 3). Un elemento adicional que lleva a un incremento en el volumen en los astrocitos, es la lactacidosis. En condiciones de isquemia incompleta, cuando las células no reciben oxígeno pero hay todavía un aporte remanente de glucosa, los astrocitos tienen la capacidad de generar energía mediante la vía de glucólisis anaeróbica. Como resultado de la operación acelerada de esta cadena de reacciones, junto con la imposibilidad de que el piruvato se metabolice en la mitocondria, se genera lactato que incrementa sus niveles intracelulares, movilizándolo el agua





**Figura 3.** Incremento en el volumen de astrocitos corticales en cultivo expuestos a medio hiposmolar al 30% (H-30%) o a una condición experimental que simula la isquemia consistente en un medio con KCl (100 mM), que reemplaza equiosmolarmente NaCl, y ouabaína (1mM) K/O. Los cambios en el volumen celular fueron estimados empleando un sistema de dispersión de luz. Los datos están expresados como el inverso de la magnitud de la emisión de señal y fueron calculados de acuerdo con la ecuación  $I_0/I_t$  (donde:  $I_0$ = el promedio de la señal de emisión antes del estímulo;  $I_t$ = la señal de emisión a tiempo t) (Vázquez-Juárez et al., no publicado).

para restablecer el equilibrio osmótico. Junto con el lactato se generan también protones ( $H^+$ ), que activan al intercambiador  $Na^+/H^+$  que se acopla al intercambiador aniónico  $Cl^-/HCO_3^-$ , incrementando aún más el desplazamiento de agua al interior de la célula. Un estudio reciente en astrocitos en cultivo muestra que la lactacidosis incrementa la expresión de la AQP4 (15).

El incremento en el volumen de los astrocitos por todos estos mecanismos conlleva a un daño adicional, pues esta condición induce la movilización del glutamato al espacio extracelular. En condiciones fisiológicas, el glutamato que se libera por la actividad de las neuronas es inmediatamente removido del extracelular y re-introducido a las células, particularmente a los astrocitos, mediante transportadores dependientes de la energía derivada de los gradientes de  $Na^+$  y de  $K^+$ . En condiciones de isquemia, estos gradientes se disipan ya que a su vez dependen de la actividad de la ATPasa  $Na^+/K^+$ , que se encuentra colapsada por la condición de anoxia inherente a la isquemia. Ante esta situación, los transportadores no sólo son incapaces de eliminar al glutamato del espacio extracelular sino que incluso lo movilizan desde el interior de la célula. El riesgo de esta condición es que ocu-

rra la muerte neuronal por excitotoxicidad, un fenómeno bien caracterizado que ocurre por la sobrefunción de los receptores ionotrópicos al glutamato del tipo NMDA, presentes en las neuronas, que permiten la entrada de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$ . El  $Na^+$  contribuye al colapso de los gradientes iónicos mientras que el  $Ca^{2+}$  inicia una cadena de daño que lleva a la muerte neuronal, a través de la activación de proteasas y la generación de estrés nitroxidativo.

La participación de las acuaporinas en el edema cerebral durante la isquemia se ha sugerido por el incremento en la expresión de AQP4 en condiciones de isquemia *in vivo*, aunque los estudios que muestren un incremento real son muy escasos. Este aspecto se ha estudiado también comparando el daño cerebral y la mortalidad de ratones a los que se genera un cuadro de isquemia por oclusión de la arteria cerebral media, con aquellos ratones deficientes en AQP4. Los resultados de estas investigaciones muestran que la lesión cerebral, la magnitud del edema celular y la tasa de mortalidad son significativamente menores en los animales AQP4<sup>-/-</sup> (16). Esta protección se ha encontrado también en ratones mutantes en los que se ha eliminado la proteína  $\alpha$ -sintrofina. Esta proteína participa en

el andamiaje que permite la inserción adecuada de la AQP4, de modo que en su ausencia, la funcionalidad de la AQP4 se ve afectada (13). Estos resultados indican que la AQP4 participa en el desplazamiento del agua que ocurre durante la isquemia y que lleva al incremento en volumen en los astrocitos con el consecuente daño antes descrito.

### Traumatismos craneano y de la médula espinal

El edema cerebral es una de las primeras y más importantes manifestaciones clínicas del traumatismo craneoencefálico. Es también posiblemente la causa principal de la mortalidad asociada a este tipo de accidentes. El edema se genera por una serie de factores, mecánicos y químicos. Una de las primeras respuestas es una onda de despolarización que incrementa los niveles intracelulares de  $Na^+$  y  $Cl^-$ , a los que sigue el agua osmóticamente dirigida. Se presenta también una deformación mecánica de la membrana celular lo que incrementa su permeabilidad, a veces en forma descontrolada. Si el trauma conlleva cuadros hemorrágicos, se presentan entonces las alteraciones inherentes a la isquemia, incluyendo el edema citotóxico causado por los factores antes señalados. Finalmente, con fre-

cuencia se asocia una alteración en la secreción de la hormona antidiurética, con lo que se genera hiponatremia, que contribuye también al cuadro edematoso. La participación de la AQP4 en el edema asociado al traumatismo craneano se ha sustentado en estudios que muestran un cambio en la expresión de este canal que abarca la zona de la lesión en la que se ve un aumento en la expresión, así como un decremento en las zonas adyacentes a la lesión. Estos resultados se interpretan como un mecanismo de protección para evitar la propagación del edema a las zonas vecinas (17). El mecanismo que induce estos cambios podría ubicarse a nivel de una redistribución en la membrana celular o a una degradación de la molécula mediada por factores todavía desconocidos.

### Encefalopatía hepática

La encefalopatía hepática es una complicación clínica de una condición de hiperamonemia, generada por una insuficiencia hepática severa. En el ce-

rebro solamente los astrocitos pueden eliminar el exceso de amonio, ya que son los únicos que tienen una enzima, la glutamina-sintetasa, que lo deriva hacia la síntesis de glutamina. Como consecuencia de esta reacción y de la propia acumulación del amonio, se genera un cuadro de estrés oxidativo, que activa una cadena autopropagada de daño membranal y mitocondrial, sobrecarga iónica y de agua, causante del edema característico de la encefalopatía hepática. La participación de las AQPs en la encefalopatía hepática se está apenas investigando. En un modelo de astrocitos en cultivo se ha encontrado que el daño mitocondrial aparentemente induce la sobreexpresión de AQP4, que puede contribuir al edema, y que se revierte por antioxidantes (18).

### Conclusiones y perspectivas

El conocimiento actual de la participación de las acuaporinas en el edema cerebral generado por distintas

patologías es apenas incipiente. Aunque en el caso del edema vasogénico si se cuenta con evidencia experimental sólida de su participación en la eliminación del fluido acumulado, para el caso del edema citotóxico, los pocos resultados con los que se cuenta hasta la fecha se han obtenido en distintas preparaciones biológicas y con diferentes abordajes experimentales. Entre las perspectivas en el campo de las acuaporinas y el edema cerebral están de manera notable, el estudio mucho más amplio de su papel en el edema citotóxico, en todas las patologías en las que se presenta. El análisis y la caracterización de los mecanismos que modulan la activación o la inactivación de las acuaporinas por los distintos factores que generan el edema es un tópico muy poco explorado. El avance en este tema ofrece una amplia gama de posibilidades para la prevención y el control de los daños asociados al edema cerebral.

## REFERENCIAS

1. Carbrejy JM, Agre P (2009) Discovery of the aquaporins and development of the field. *Handb Exp Pharmacol* 190:3-28.
2. Verkman AS (2005) More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J Cell Sci* 118: 3225-3232.
3. Tait MJ, Saadoun S, Bell BA, Papadopoulos MC (2008) Water movements in the brain: role of aquaporins. *Trends Neurosci* 31:37-43.
4. Hasegawa H, Ma T, Skach W, Matthey MA, Verkman AS (1994) Molecular cloning of a mercurial-insensitive water channel expressed in selected water-transporting tissues. *Biol Chem* 269:5497-5500.
5. Verkman AS, Binder DK, Bloch O, Auguste K, Papadopoulos MC (2006) Three distinct roles of aquaporin-4 in brain function revealed by knockout mice. *Biochim Biophys Acta* 1758:1085-1093.
6. Jung JS, Bhat RV, Preston GM, Guggino WB, Baraban JM, Agre P (1994) Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc Natl Acad Sci* 91:13052-13056.
7. Papadopoulos MC, Verkman AS (2007) Aquaporin-4 and brain edema. *Pediatr Nephrol* 22:778-784.
8. Papadopoulos MC, Manley GT, Krishna S, Verkman AS (2004) Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema. *FASEB J* 18:1291-1293.
9. Hoffmann EK, Lambert IH, Pedersen SF. (2009) Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol Rev* 89:193-277.
10. Pasantes-Morales H, Franco R (2005) Astrocyte cellular swelling: mechanisms and relevance to brain edema. En: *The Role of Glia in Neurotoxicity*. Editores: Aschner M, Costa L. CRC-Press, pp.173-190.

11. Solenov E, Watanabe H, Manley GT, Verkman AS (2004) Sevenfold-reduced osmotic water permeability in primary astrocyte cultures from AQP-4-deficient mice, measured by a fluorescence quenching method. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:C426-C432.
12. Manley GT, Fujimura M, Ma T, Noshita N, Filiz F, Bollen AW, Chan P, Verkman AS (2000) Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat Med* 6:159-163.
13. Zador Z, Bloch O, Yao X, Manley GT (2007) Aquaporins: role in cerebral edema and brain water balance. *Prog Brain Res* 161:185-194.
14. Hsu MS, Lee DJ, Binder DK (2007) Potential role of the glial water channel aquaporin-4 in epilepsy. *Neuron Glia Biol* 3:287-297.
15. Morishima T, Aoyama M, Iida Y, Yamamoto N, Hirate H, Arima H, Fujita Y, Sasano H, Tsuda T, Katsuya H, Asai K, Sobue K (2008) Lactic acid increases aquaporin 4 expression on the cell membrane of cultured rat astrocytes. *Neurosci Res* 61:18-26.
16. Manley GT, Binder DK, Papadopoulos MC, Verkman AS (2004) New insights into water transport and edema in the central nervous system from phenotype analysis of aquaporin-4 null mice. *Neuroscience* 129:983-991.
17. Sun MC, Honey CR, Berk C, Wong NL, Tsui JK (2003) Regulation of aquaporin-4 in a traumatic brain injury model in rats. *J Neurosurg* 98:565-569.
18. Rama Rao KV, Norenberg MD (2007) Aquaporin-4 in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 22:265-275.