

## EFFECTOS DE LA OSMOLARIDAD EXTRACELULAR SOBRE EL POTENCIAL DE MEMBRANA EN CONDROCITOS ARTICULARES

EFFECTS OF EXTRACELLULAR OSMOLARITY ON MEMBRANE POTENTIAL IN ARTICULAR CHONDROCYTES

Julio César Sánchez<sup>1</sup>

### Resumen

Los condrocitos articulares están sometidos a cambios continuos en las condiciones en las que viven debido a las fluctuaciones de carga mecánica durante el movimiento de las articulaciones, las cuales producen cambios en la osmolaridad extracelular. Los condrocitos modifican los flujos iónicos y de agua con el fin de mantener sus condiciones homeostáticas en respuesta a estos desafíos osmóticos. El presente estudio evalúa los efectos de los cambios en la osmolaridad extracelular sobre el potencial de membrana y los mecanismos implicados en la respuesta de los condrocitos articulares bovinos. La hiperosmolaridad causó hiperpolarización de la membrana y la hipoosmolaridad causó despolarización de ésta, pero valores de osmolaridad externa menores de 150 mOsm/l o mayores de 400 mOsm/l no produjeron variaciones adicionales. La hiperpolarización secundaria a hiperosmolaridad fue dependiente del flujo de K<sup>+</sup> al exterior de la célula a través de canales iónicos específicos para este ión, mientras que la despolarización secundaria a hipoosmolaridad fue dependiente del flujo de Na<sup>+</sup> al interior de la célula a través de canales catiónicos mecanosensibles.

*Palabras clave:* canales mecanosensibles, condrocitos, osmolaridad, potencial de membrana.

### Abstract

Articular chondrocytes face continuous changes in their surrounding conditions, due to fluctuations of mechanic load during the movement of joints, which produce variations in the extracellular osmolarity. Chondrocytes respond activating ion and water fluxes in order to maintain their homeostatic conditions in response to these osmotic challenges. The present study assesses the effects of changes in extracellular osmolarity on membrane potential and the mechanisms that are involved in the articular bovine chondrocyte response. The hyperosmolarity caused membrane hyperpolarization and the hypoosmolarity caused membrane depolarization, but osmolarity values below 150 mOsm/l o above 400 mOsm/l did not cause additional changes. The hyperpolarization following hyperosmolarity was dependent on K<sup>+</sup> efflux, through specific ionic channels, while depolarization following hypoosmolarity was dependent on Na<sup>+</sup> influx through mechanosensitive cationic channels.

*Key words:* chondrocytes, mechanosensitive channels, membrane potential, osmolarity.

## INTRODUCCIÓN

El cartílago articular es un tejido con propiedades únicas que recubre las superficies óseas en las articulaciones, evita el roce mecánico entre éstas y permite la movilidad (Hall *et al.*, 1996; Huber *et al.*, 2000). Además, este tejido absorbe parte de la carga impuesta durante el movimiento gracias a sus propiedades (Ker, 1999), dadas fundamentalmente por la matriz extracelular, constituida principalmente por agua y

colágeno tipo II, además de una red de proteoglicanos. Estos proteoglicanos poseen una serie de cargas negativas fijas que atraen cationes y repelen aniones, lo cual afecta la composición del líquido extracelular (Wilkins *et al.*, 2000a).

Los condrocitos son las únicas células del cartílago y son las responsables del recambio constante de la matriz extracelular, a pesar de que sólo constituyen el 1% del volumen total de este tejido (Archer y

Recibido: noviembre de 2003; aceptado para publicación: agosto de 2004.

<sup>1</sup> Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Salud, Universidad Tecnológica de Pereira. A. A. 097. La Julita, Pereira (RI), Colombia. Correo electrónico: <jcsanchez@utp.edu.co>.

Francis-West, 2003; Muir, 1995). Estas células están sometidas a continuos cambios en osmolaridad extracelular debido a la constante fluctuación de la carga mecánica ejercida sobre las articulaciones durante el movimiento articular, ya que cuando se incrementa la presión sobre una articulación el agua es forzada a desplazarse del lugar donde se está ejerciendo mayor presión al lugar donde ésta es menor, lo cual genera una concentración de los solutos e incrementa la osmolaridad proporcionalmente, lo cual es transmitido a los condrocitos presentes en esa zona de cartílago (Urban, 1994; Wilkins *et al.*, 2000b). Cuando la carga es liberada ocurre el fenómeno contrario y la osmolaridad extracelular se reduce de nuevo. Estos cambios en osmolaridad producen a su vez cambios en los flujos de agua hacia el interior de la célula, ya que la membrana del condrocito es libremente permeable al agua y ésta se desplaza de acuerdo con gradientes osmóticos; cuando la osmolaridad extracelular se incrementa, el agua fluye desde el interior hacia el exterior de la célula, con el objetivo de compensar el gradiente osmótico establecido; cuando la osmolaridad extracelular disminuye ocurre lo contrario (Bush y Hall, 2001). Los cambios en el contenido de agua intracelular generan cambios en el volumen pero la célula posee mecanismos para compensar estos cambios osmóticos y mantener su volumen dentro de un rango que asegure su adecuado funcionamiento y su supervivencia (Mobasher *et al.*, 1998). Estos mecanismos implican la activación del transporte de solutos para inducir transporte de agua en un sentido u otro; sin embargo, durante este proceso se altera la composición intracelular y las concentraciones de diversos iones cambian, lo cual afecta la homeostasis celular y del cartílago (D'Andrea *et al.*, 2000; Dascalu *et al.*, 1996; Hall *et al.*, 1996), puesto que la síntesis de matriz extracelular es sensible a diversos cambios de la composición intracelular del condrocito articular como ha sido evidenciado por diversos autores (Gray *et al.*, 1998; Hall *et al.*, 1991).

Existe evidencia que ha comprobado que cambios en la osmolaridad extracelular pueden afectar las concentraciones intracelulares de  $H^+$  (Sánchez y Wilkins, 2003a; Yellowley *et al.*, 2002) y de  $Ca^{2+}$  en condrocitos articulares (Sánchez y Wilkins, 2003b); los efectos sobre el potencial de membrana no han sido evaluados sistemáticamente a pesar de la importancia

que pueden tener en la homeostasis de las células, ya que variaciones en el potencial de membrana pueden afectar el funcionamiento de múltiples canales y de otros transportadores de membrana. Sin embargo, hay evidencia de que los cambios en la osmolaridad extracelular pueden afectar el potencial de membrana y la excitabilidad eléctrica en otras células (Mukoh *et al.*, 1985; Paulmichl *et al.*, 1989).

En condiciones patológicas articulares reumáticas y no reumáticas, la homeostasis alterada del condrocito, producida por una gran diversidad de factores o por la interacción de éstos, parece ser el factor desencadenante de la enfermedad porque conduce a la producción de un cartílago defectuoso o a un recambio inadecuado de la matriz extracelular, generando una alteración de las propiedades mecánicas de este tejido (Alexopoulos *et al.*, 2003; Malmud *et al.*, 2003). Frecuentemente esta homeostasis alterada se refleja en una respuesta defectuosa a los desafíos que imponen las condiciones cambiantes que enfrenta el condrocito articular, particularmente en cuanto a variaciones en la osmolaridad externa, las cuales se producen cíclicamente.

El presente estudio analiza los efectos de los cambios en osmolaridad externa sobre el potencial de membrana utilizando la técnica del parche de membrana —*patch clamp*—, modalidad célula completa —*whole cell*—, para medir diferencias de voltaje a través de las membranas en condrocitos articulares bovinos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los reactivos utilizados fueron obtenidos de —*Sigma-Aldrich, Poole, UK*—. El cartílago y los condrocitos ya aislados fueron incubados en DMEM —*Dulbecco's modified Eagle medium*— suplementado con glutamina (2 mM) y antibióticos (penicilina 100  $\mu$ M y estreptomycin 100  $\mu$ M).

La solución experimental base utilizada fue solución salina suplementada con HEPES como *buffer* (SSH), cuya composición es (mM): NaCl 145, KCl 5,  $CaCl_2$  2, HEPES 15, glucosa 10, con pH ajustado a 7,4 usando NaOH concentrado y osmolaridad de 300 mOsm/l.

En los experimentos en los cuales el sodio extracelular fue removido, el NaCl fue reemplazado por NMDG-Cl. Las soluciones libres de  $\text{Ca}^{2+}$  fueron adicionadas con ácido etilenglicol-bis (2 aminoetileter) N, N, N', N'-tetraacético (EGTA, 1 mM) para quelar cualquier posible contaminante de este ión.

Soluciones de BaCl (300 mM), cloruro de tetraetilamonio (TEA-Cl, 500 mM), EGTA (100 mM) y  $\text{GdCl}_3$  (1 mM) fueron preparadas en agua destilada; soluciones base de tetrodotoxina (TTX, 500  $\mu\text{M}$ ) y amiloride (100 mM) fueron preparadas en dimetil-sulfóxido (DMSO).

Para producir cambios en la osmolaridad del medio, a SSH se adicionaron proporciones variables de agua destilada o SSH cuya osmolaridad había sido aumentada utilizando manitol a diversas concentraciones, de acuerdo con la osmolaridad final deseada.

Los condrocitos fueron aislados de cartílago bovino, utilizando el método descrito en detalle por Browning *et al.* (1999). Las células fueron aisladas por medio de digestión enzimática con colagenasa tipo I (2.000 unidades/ml en DMEM por 18 horas a 37 °C) a partir de cartílago procedente de articulaciones metacarpofalángicas bovinas de ejemplares de 18 a 36 meses de edad, obtenidos en el matadero local. El tejido fue refrigerado en las primeras 2 horas después del sacrificio y utilizado en las primeras 48 horas. Después de la incubación con colagenasa, las células fueron filtradas y resuspendidas en DMEM fresco, antes de ser resuspendidas en la respectiva solución experimental.

El potencial de membrana fue medido utilizando la técnica de parche de membrana —*patch clamp*—, modalidad célula completa —*whole cell*—, mediante clamp de corriente, la cual es descrita por Tsuga *et al.* (2002) aplicada a condrocitos articulares.

El potencial de membrana fue medido por medio de un amplificador Axopatch-200 —*Axon Instruments, Inc.*—. La adquisición de datos, el control experimental y el análisis fueron realizados por medio del *software* Pclamp 8.0 y el sistema de adquisición Digidata 1200 —*Axon Instruments, Inc.*—. Las micropipetas

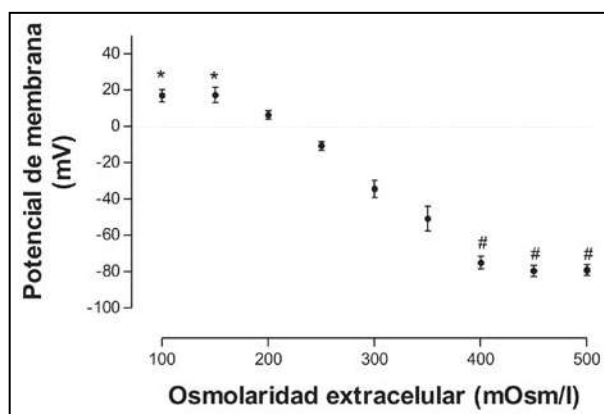
utilizadas fueron fabricadas de vidrio de borosilicato (Referencia PG150T, —*Harvard Apparatus Ltd.*—), por medio de un fabricante de pipetas o “*puller*” —*DMZ-Universal Puller, Dagan Corporation*— y tuvieron resistencias entre 5 y 8 m $\Omega$ . La solución externa fue SSH con osmolaridades variables y la solución interna fue KSH en todos los casos.

Todos los datos son presentados como promedios  $\pm$  SEM y la significancia de las diferencias fue evaluada por la prueba t-Student no pareada. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

El potencial de membrana en reposo promedio de los condrocitos articulares bovinos fue de  $36,4 \pm 5,2$  mV. Cuando la osmolaridad extracelular se incrementó a intervalos de 50 mOsm/l, las células se hiperpolarizaron proporcionalmente, pero incrementos mayores a 400 mOsm/l no produjeron hiperpolarizaciones adicionales (figura 1).

En las células en las cuales la osmolaridad extracelular disminuyó, el potencial de membrana varió hacia la despolarización; pero, igual que en el caso anterior, no hubo despolarizaciones adicionales cuando la osmolaridad fue menor de 150 mOsm/l (figura 1).



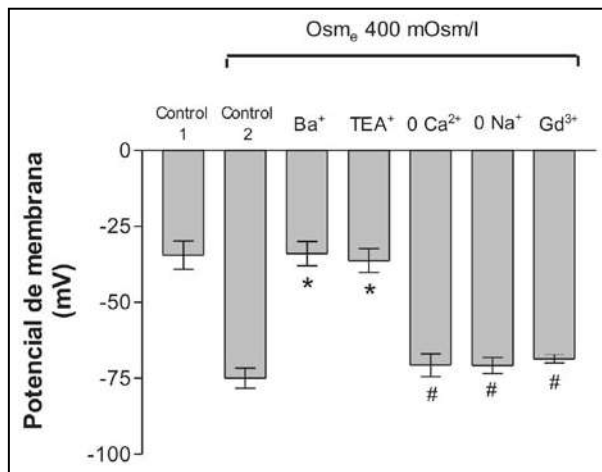
**Figura 1.** Efectos de la osmolaridad externa sobre el potencial de membrana en condrocitos articulares bovinos. Los puntos marcados con asterisco (\*) no muestran diferencias significativas entre ellos; lo mismo sucede para los puntos marcados con numeral (#). Todos los demás promedios son diferentes significativamente de los demás.  $n = 5$  en todos los casos

La hiperpolarización secundaria a hiperosmolaridad fue completamente inhibida por Ba<sup>+</sup> (3 mM) y TEA<sup>+</sup> (5 mM), conocidos inhibidores de canales de K<sup>+</sup>, pero no fue afectada por la ausencia de Ca<sup>2+</sup> o Na<sup>+</sup> extracelulares ni por Gd<sup>3+</sup> (10 μM) un inhibidor de los canales activables por la distensión de la membrana (figura 2). Por otro lado, la depolarización secundaria a hipoosmolaridad fue completamente dependiente del Na<sup>+</sup> extracelular, no fue afectada por la ausencia de Ca<sup>2+</sup> extracelular y fue inhibida por Gd<sup>2+</sup> (10 μM). Tampoco fue modificada por TTX (5 μM), inhibidor de canales de Na<sup>+</sup> activables por voltaje, ni por amiloride (1 mM), bloqueador de los canales epiteliales de Na<sup>+</sup> (figura 3).

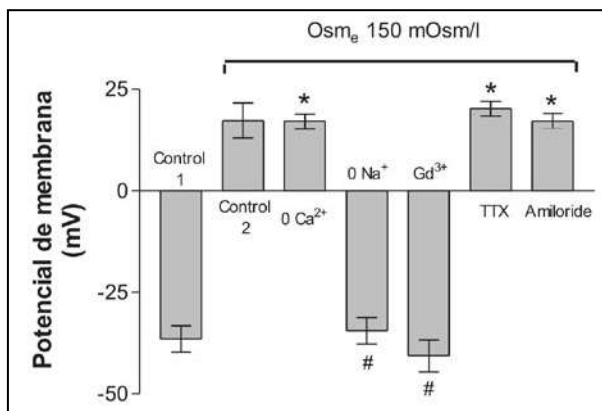
**DISCUSIÓN**

El presente estudio evaluó por primera vez los efectos de los cambios de la osmolaridad extracelular sobre el potencial de membrana en condrocitos articulares, cambios a los cuales estas células están expuestas permanentemente. Las mediciones realizadas mostraron que el potencial de membrana varía proporcionalmente con la osmolaridad extracelular en un rango entre 150 a 400 mOsm/l. Incrementos o disminuciones adicionales no produjeron otros cambios en el potencial de membrana.

Los cambios en el potencial de membrana pueden constituirse en un mecanismo importante en la respuesta del condrocito articular cuando la osmolaridad externa cambia durante su ciclo vital, ya que diversos canales iónicos y transportadores que intervienen en la homeostasis iónica de la célula pueden ser sensibles a voltaje (Mobasheri *et al.*, 1998). Existen una diversidad de canales iónicos cuya conductancia varía con los cambios de potencial de membrana, varios de los cuales han sido descritos en condrocitos: canales de Ca<sup>2+</sup>, canales de Na<sup>+</sup>, canales de K<sup>+</sup> (Mobasheri *et al.*, 1998; Wilkins *et al.*, 2000a) y canales de H<sup>+</sup> (Sánchez y Wilkins, 2003a). Igualmente, el intercambiador Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>, que puede mediar tanto la entrada como la salida de Ca<sup>2+</sup>, es también regulable por cambios de voltaje. Esto implica que los cambios en la osmolaridad externa pueden estar afectando flujos iónicos en la membrana del condrocito a través de este mecanismo. Además, el efecto sobre el potencial de membrana es también un reflejo de los



**Figura 2.** Efectos de diversos factores sobre la hiperpolarización inducida por hiperosmolaridad externa. Control 1 denota el potencial de membrana a la osmolaridad basal de 300 mOsm/l. Las barras marcadas con asterisco (\*) no exhiben diferencias significativas en comparación con control 1, pero sí con control 2. Las barras marcadas con numeral (#) presentan la situación contraria. n = 5 en todos los casos. Véase texto para las concentraciones de Ba<sup>+</sup> y TEA<sup>+</sup>



**Figura 3.** Efectos de diversos factores sobre la despolarización inducida por hipoosmolaridad externa. Control 1 denota el potencial de membrana a la osmolaridad basal de 300 mOsm/l. Las barras marcadas con numeral (#) no exhiben diferencias significativas en comparación con control 1, pero sí con control 2. Las barras marcadas con asterisco (\*) presentan la situación contraria. n = 5 en todos los casos. Véase texto para las concentraciones de TTX y amiloride

mecanismos que son alterados por otras vías durante este proceso.

Los experimentos realizados demostraron que la hiperpolarización secundaria a hiperosmolaridad es dependiente del flujo de K<sup>+</sup> al interior de la célula, a través de canales iónicos específicos para este ión,

los cuales son inhibidos por TEA<sup>+</sup> o por Ba<sup>+</sup>. Esto podría significar que la hiperosmolaridad abre estos canales directamente, o que lo hace estimulando un mecanismo adicional de transducción. La hiperosmolaridad extracelular induce flujos de agua hacia el exterior de la célula con el objetivo de compensar el gradiente osmótico creado y esto puede afectar las propiedades mecánicas de la membrana. Se conoce la existencia de canales catiónicos mecanosensibles en diversas células (Sackin, 1995), incluidos los condrocitos (Wright *et al.*, 1996), y algunos de ellos pueden activarse cuando se disminuye la tensión de la membrana, pero la mayoría de estos canales no son específicos para el K<sup>+</sup> y por lo tanto son débilmente afectados por Ba<sup>+</sup> o TEA<sup>+</sup>; estos canales son, además, sensibles a Gd<sup>2+</sup> y este ión no afectó la respuesta hiperpolarizante en los experimentos realizados; adicionalmente, si canales catiónicos inespecíficos se abren durante el potencial de reposo, el potencial electroquímico hace que sea prevalente el flujo de Na<sup>+</sup> al interior de la célula, lo cual produciría una despolarización y no una hiperpolarización. Esto hace pensar que los canales implicados, en este caso, no son canales catiónicos inespecíficos sino canales específicos para K<sup>+</sup>, ya que si el flujo de este ión es el predominante, la célula se hiperpolariza debido a que el potencial de equilibrio para el K<sup>+</sup> es más negativo que el potencial de membrana en reposo. La gran diversidad de los canales de K<sup>+</sup> y la inespecificidad de estos dos inhibidores hace imposible dilucidar cuáles son los canales específicos implicados con los hallazgos obtenidos; estudios posteriores utilizando otras metodologías podrían aclarar el mecanismo correspondiente.

La despolarización secundaria a hipoosmolaridad, en cambio, sí parece estar mediada por canales catiónicos inespecíficos activables por distensión (Wright *et al.*, 1996), lo cual es evidenciado por el marcado efecto del Gd<sup>2+</sup>. Estos canales podrían activarse ante el incremento de la tensión de la membrana, secundario al incremento del volumen intracelular, que ocurre como consecuencia de la hipoosmolaridad externa que induce flujos de agua hacia el interior de la célula. Además, la dependencia de Na<sup>+</sup> externo de la despolarización inducida por hipoosmolaridad parece indicar que este efecto depende de los flujos

de Na<sup>+</sup> al interior de la célula; pero la ausencia de un efecto de TTX y amiloride, los cuales son los inhibidores por excelencia de los canales de Na<sup>+</sup> activables por voltaje y de los canales epiteliales de Na<sup>+</sup>, respectivamente, descartan la posibilidad de un papel de este tipo de canales en la respuesta a la hipoosmolaridad en condrocitos; probablemente, son los canales mecanosensibles los responsables.

La ausencia de Ca<sup>2+</sup> extracelular no afectó la respuesta del condrocito ante variaciones de la osmolaridad externa, lo cual descarta un papel de éste en la respuesta. Los canales mecanosensibles son también permeables a Ca<sup>2+</sup> (Sackin, 1995) pero el gradiente electroquímico de Na<sup>+</sup> hace que los flujos de este ión prevalezcan sobre los de Ca<sup>2+</sup>; por esta razón, ante su ausencia la despolarización ocurre igual porque el Ca<sup>2+</sup> no contribuye significativamente al flujo de cargas positivas al interior de la célula.

En síntesis, los hallazgos del presente trabajo sugieren que la hiperosmolaridad extracelular produce hiperpolarización en condrocitos articulares y que esta hiperpolarización podría estar mediada por el flujo de K<sup>+</sup> al interior de la célula, a través de canales específicos para este ión, mientras que la hipoosmolaridad produce despolarización del condrocito, mediada por flujos de Na<sup>+</sup> al interior de la célula, a través de canales catiónicos mecanosensibles.

Estos resultados son una base para futuras investigaciones en torno a la relación existente entre osmolaridad y características eléctricas de la membrana, no solamente en condrocitos articulares sino también en otros tipos de células. Un mejor entendimiento de esta relación permitirá comprender mejor los procesos que llevan a alteraciones de las respuestas celulares ante desafíos osmóticos en el curso de procesos patológicos como la osteoartritis y otras patologías articulares.

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Fisiología Celular de la Universidad de Oxford, en Oxford, Inglaterra, con el apoyo de Colciencias y la Universidad Tecnológica de Pereira (Risaralda), Colombia.

## REFERENCIAS

- Alexopoulos LG, Haider MA, Vail TP, Guilak F.** 2003. Alterations in the mechanical properties of the human chondrocyte pericellular matrix with osteoarthritis. *J Biomech Eng* 125:323-333.
- Archer CW, Francis-West P.** 2003. The chondrocyte. *Inter J Biochem Cell Biol* 35:401-404.
- Browning JA, Walker RE, Hall AC, Wilkins RJ.** 1999. Modulation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange by hydrostatic pressure in isolated bovine articular chondrocytes. *Acta Physiol Scand* 166:39-45.
- Bush PG, Hall AC.** 2001. The osmotic sensitivity of isolated and in situ bovine articular chondrocytes. *J Orthop Res* 19:768-778.
- D'Andrea P, Calabrese A, Capozzi I, Grandolfo M, Ronon R, Vittur F.** 2000. Intercellular Ca<sup>2+</sup> waves in mechanically stimulated articular chondrocytes. *Biorheol* 37:75-83.
- Dascalu A, Korenstein R, Oron Y, Nevo Z.** 1996. A hyperosmotic stimulus regulates intracellular pH, calcium and S-100 protein levels in avian chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 227:368-373.
- Gray ML, Pizanelli AM, Grodzinsky AJ, Gehl KA.** 1988. Mechanical and physicochemical determinants of the chondrocyte biosynthetic response. *J Orthop Res* 6:777-792.
- Hall AC, Hortwitz ER, Wilkins RJ.** 1996. The cellular physiology of articular cartilage. *Exp Physiol* 81:535-545.
- Hall AC, Urban JP, Gehl KA.** 1991. The effects of hydrostatic pressure on matrix synthesis in articular cartilage. *J Orthop Res* 9:1-10.
- Huber M, Trattng S, Lintner F.** 2000. Anatomy, biochemistry and physiology of articular cartilage. *Invest Radiol* 35:573-580.
- Ker RF.** 1999. The design of soft collagenous load-bearing tissues. *J Exp Biol* 202:3315-3324.
- Malemud CJ, Islam N, Haqqit M.** 2003. Pathophysiological mechanisms in osteoarthritis lead to novel therapeutic strategies. *Cells Tissues Organs* 174:34-48.
- Mobasher A, Mobasher R, Francis MJ, Trujillo E, Álvarez De La Rosa D, Martín-Vasallo P.** 1998. Ion transport in chondrocytes: membrane transporters involved in intracellular ion homeostasis and the regulation of cell volume, free [Ca<sup>2+</sup>] and pH. *Histol Histopathol* 13:893-910.
- Mukoh S, Kawasaki K, Yonemura D, Tanabe.** 1985. Hyperosmolarity-induced hyperpolarization of the membrane potential of the retinal pigment epithelium. *Doc Ophthalmol* 60:369-374.
- Muir H.** 1995. The chondrocyte, architect of cartilage. *BioEssays* 17:1039-1048.
- Paulmichl M, Friedrich F, Maly K, Lang F.** 1989. The effect of hypoosmolarity on the electrical properties of Madin Darby canine kidney cells. *Pflügers Arch* 413:456-462.
- Sackin H.** 1995. Mechanosensitive channels. *Ann Rev Physiol* 57:333-353.
- Sánchez JC, Wilkins RJ.** 2003a. Effects of hypotonic shock on intracellular pH in bovine articular chondrocytes. *Comp Biochem Physiol A* 135:575-583.
- Sánchez JC, Wilkins RJ.** 2003b. Mechanisms involved in the increase in intracellular calcium following hypotonic shock in bovine articular chondrocytes. *Gen Physiol Biophys* 22:487-499.
- Tsuga K, Tohse N, Yoshino M, Sugimoto T, Yamashita T, Ishii S, Yabu H.** 2002. Chloride conductance determining membrane potential of rabbit articular chondrocytes. *J Membrane Biol* 185:75-81.
- Urban JP.** 1994. The chondrocyte: a cell under pressure. *Br J Rheumatol* 33:901-908.
- Wilkins RJ, Browning JA, Ellory JC.** 2000a. Surviving in a matrix, membrane transport in articular chondrocytes. *J Membrane Biol* 177:95-108.
- Wilkins RJ, Browning JA, Urban JP.** 2000b. Chondrocyte regulation by mechanical load. *Biorheol* 37:67-74.
- Wright MO, Jobanputra P, Avington C, Salter DM, Nuki G.** 1996. Effects of intermittent pressure-induced strain on the electrophysiology of cultured human chondrocytes: evidence for the presence of stretch-activated membrane ion channels. *Clin Sci* 90:61-71.
- Yellowley CE, Hancox JC, Donahue HJ.** 2002. Effects of cell swelling on intracellular calcium and membrane currents in bovine articular chondrocytes. *J Cell Biochem* 86:290-301.