

Tesis de Posgrado

Mecanismos que determinan la tolerancia a la anoxia celular

Espelt, María Victoria

2003

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Espelt, María Victoria. (2003). Mecanismos que determinan la tolerancia a la anoxia celular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3574_Espelt.pdf

Cita tipo Chicago:

Espelt, María Victoria. "Mecanismos que determinan la tolerancia a la anoxia celular". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3574_Espelt.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

TESIS DE DOCTORADO

“Mecanismos que determinan la tolerancia a la anoxia
celular”

Autora:

María Victoria Espelt

Directores:

Dr. Pablo. J. Schwarzbaum

Dra. Gabriela Amodeo

2003

Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas
Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires
Junin 956, (1121). Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

A mis dos amores Fer y Martin

Quisiera agradecer:

al IQUIFIB, en donde realicé mi Tesis

al Dr. Pablo Schwarzbaum, mi director, consejero, y amigo

a la Dra. Gabriela Amodeo, mi co-directora y "ángel de la guarda"

al laboratorio del Dr. Rolando Rossi, a él en especial por su cordial ayuda

a los Dres. Rega y Delfino por sus buenos consejos

a Gerhard por su apoyo y cordialidad

a todos mis compañeros del IQUIFIB, en especial a Achi, Dani, Claudia, Luis y Moni

a Diego por soportarme y escucharme

a Paula por ser una buena persona

a mi AMIGA Karina, mi ex compañerita de labo, pero mi compañera de corazón hasta hoy

a la gente de arriba, las chicas y los chicos. A TODOS, gracias!!!

A mis padres por sostenerme y acompañarme incondicionalmente. Por hacer que mis momentos difíciles sean fáciles de resolver. Por ser mi apoyo y paz.

A Carli, Vero y Nachi, por toda su ayuda, apoyo, compañía.

A Inés por salvarme.

A Fer, mi amor, por todo su apoyo, amor, compañía, por correr atrás de Martín siempre que yo no podía llegar. En fin, por enseñarme y mostrarme que somos UNO.

A Martín por ser mi vida y, en especial, por prestarme la "cumpu".

Resumen

En la presente tesis se estudió la relación entre el volumen celular y los flujos transmembranales de K^+ en hepatocitos de goldfish (*Carassius auratus*) expuestos a condiciones anisomóticas o a limitación energética. La respuesta de volumen fue luego comparada con aquella presentada por hepatocitos de trucha (*Oncorhynchus mykiss*) y de rata (*Rattus rattus*). El volumen celular fue estudiado utilizando video microscopía y microscopía de epifluorescencia, mientras que la medición de los flujos de K^+ se estimó a partir de los flujos unidireccionales de $^{86}Rb^+$.

En hepatocitos de trucha y rata, la exposición a medio hiposmótico (180 mosM) a pH 7.45 produjo el aumento de volumen celular seguido por disminución regulatoria de volumen (RVD), respuesta que es mediada por el eflujo neto de KCl seguido de agua. Por el contrario, los hepatocitos de goldfish aumentaron su volumen pero no presentaron RVD en esas condiciones. En hepatocitos de goldfish, si bien la N-etilmaleimida pudo activar la salida de K^+ , esto no ocurrió cuando las células fueron expuestas a medio hiposmótico (120–180 mosM).

Se desarrolló un modelo matemático con el fin de analizar las interacciones existentes entre el volumen celular, el potencial de membrana, y la masa de los principales solutos difusibles bajo condiciones anisomóticas. Este modelo pudo ser utilizado para simular las respuestas volumétricas de los hepatocitos de las tres especies. Los resultados del modelo apoyan la idea de que la ausencia de RVD observada en hepatocitos de goldfish se debe a la ausencia de un elemento sensor de volumen. La comparación entre los resultados obtenidos con el modelo matemático y los resultados experimentales sugiere que los hepatocitos de goldfish poseen una capacidad restringida para desarrollar RVD.

El bloqueo de metabolismo energético puede generar gradientes osmóticos por aumento de la osmolaridad intracelular. En el presente estudio, la inhibición de la glucólisis por ácido iodoacético (IAA) no alteró el volumen celular en hepatocitos de goldfish, mientras que en presencia de cianuro (CN), inhibidor de la fosforilación oxidativa, o de CN y IAA (IAA+CN), el volumen celular disminuyó un 3–7%. A pesar de que en los hepatocitos de goldfish la limitación energética no tuvo efecto sobre el eflujo de K^+ , el influjo disminuyó un 57–66% en presencia de CN y CN+IAA pero no se vio alterada por el IAA sólo. La pérdida de K^+ intracelular luego de 20 min de exposición a CN o IAA+CN fue solo de un 4% del K^+ intracelular total.

En general, los resultados de este estudio sugieren que los hepatocitos de goldfish, a diferencia de las células de especies sensibles a la anoxia, evitan el desacople de los flujos transmembranales de K^+ en respuesta a un gradiente osmótico o limitación energética. Esto podría explicar por un lado la incapacidad de estas células para presentar RVD, pero al mismo tiempo la extraordinaria capacidad para mantener las concentraciones intracelulares de K^+ , prolongando de esta manera la viabilidad celular.

Abstract

The relationship between cell volume and K^+ transmembrane fluxes of goldfish (*Carassius auratus*) hepatocytes exposed to anisosmotic conditions or energetic limitation was studied, and compared with the volumetric response of hepatocytes from trout (*Oncorhynchus mykiss*) and rat (*Rattus rattus*). Cell volume was studied by video- and epifluorescence microscopy, while K^+ fluxes were assessed by measuring unidirectional $^{86}Rb^+$ fluxes.

In trout and rat hepatocytes, hyposmotic (180 mosM) exposure at pH 7.45 caused cell swelling followed by a regulatory volume decrease (RVD), a response reported to be mediated by net efflux of KCl and osmotically obliged water. In contrast, goldfish hepatocytes swelled but showed no RVD under these conditions. Although in goldfish hepatocytes a net K^+ efflux could be activated by *N*-ethylmaleimide, this flux was not, or only partially, activated by hyposmotic swelling (120–180 mosM).

A mathematical model was developed in order to gain insight into the multiple interactions between cell volume, membrane potential and the masses of diffusible solutes under anisosmotic conditions. This model was successfully used to simulate the volumetric responses of hepatocytes from the three species. Results from the model gave support to the idea that the lack of RVD observed in goldfish hepatocytes is due to the absence of a volume sensor element. A comparison between data predicted by this model and that obtained experimentally suggests that goldfish hepatocytes have a limited capacity to enable RVD.

Blockage of the metabolism can be viewed as an osmotic challenge where intracellular osmolarity may increase. In the present work, the inhibition of glycolysis by iodoacetic acid (IAA) did not alter cell volume in goldfish hepatocytes, whereas in the presence of cyanide (CN), an inhibitor of oxidative phosphorylation, or CN plus IAA (IAA+CN), cell volume decreased by 3–7%. While in goldfish hepatocytes, energetic limitation had no effect on K^+ efflux, K^+ influx decreased by 57–66% in the presence of CN and CN+IAA but was not significantly altered by IAA alone. Intracellular K^+ loss after 20 min of exposure to CN and IAA+CN amounted to only 4% of total intracellular K^+ .

Collectively, these observations suggest that goldfish hepatocytes, unlike hepatocytes of anoxia-intolerant species, avoid a decoupling of transmembrane K^+ fluxes in response to an osmotic challenge. This may underlie both the inability of swollen cells to undergo RVD but also the capability of anoxic cells to maintain intracellular K^+ concentrations almost unaltered, thereby prolonging cell survival.

Indice

	Página
Capítulo I	
Introducción general.....	1
Organismos tolerantes y sensibles a la anoxia.....	1
Células tolerantes y sensibles a la anoxia	3
Vías principales de producción de ATP.....	3
Metabolismo aeróbico.....	3
Metabolismo anaeróbico.....	5
Vías principales de consumo de ATP.....	7
El goldfish como organismo tolerante a la anoxia.....	7
Hepatocito de goldfish como modelo de célula tolerante a la anoxia.....	9
Objetivos de la tesis.....	10
Materiales y Métodos.....	12
Reactivos.....	12
Animales.....	12
Medios utilizados.....	12
Tratamientos aplicados sobre la suspensión celular.....	12
Aislamiento de hepatocitos	14
Obtención de hepatocitos de goldfish por digestión con colagenasa.....	14
Obtención no enzimática de hepatocitos de goldfish.....	16
Obtención de hepatocitos de trucha por digestión con colagenasa.....	16
Obtención de hepatocitos de rata por digestión con colagenasa.....	16
Viabilidad celular	19
Medición de proteínas.....	19
Medición del peso seco.....	19
Flujos de K ⁺	20
Influjo de K ⁺	20
Eflujo de K ⁺	20
Medición del Na ⁺ intracelular.....	21
Medición del volumen celular.....	22
Videomicroscopía.....	22
Microscopía de epifluorescencia.....	24

Cálculo del coeficiente de permeabilidad osmótica (Pf)	28
Medición del pH intracelular (pHi)	28
Factores de conversión en hepatocitos de goldfish.....	30
Estadísticas.....	30
 Capítulo II	
Efecto de medios anisomóticos sobre el volumen de hepatocitos de goldfish.....	31
Introducción.....	31
Objetivos.....	33
Resultados.....	34
Cambios de volumen en hepatocitos de goldfish sometidos a gradientes osmóticos transmembranales. Mediciones por videomicroscopía.....	34
Validación de la ausencia de RVD en hepatocitos de goldfish expuestos a medios hiposmóticos.....	36
Procedimiento de disociación de células.....	36
Estudios comparativos.....	36
pH del medio extracelular	37
Reversibilidad del aumento del volumen celular de hepatocitos de goldfish expuestos a medios hiposmóticos	37
Cálculo de la permeabilidad osmótica (Pf) en hepatocitos de goldfish.....	38
Influjo y eflujo de K^+ en hepatocitos de goldfish.....	39
Medios anisomóticos.....	40
Moduladores del eflujo de K^+ : pH extracelular alcalino y NEM	40
Discusión.....	41
El mecanismo efector de RVD	42
 Capítulo III	
Modelo matemático.....	45
Introducción.....	45
Objetivos.....	46
Características del modelo.....	46
Flujos iónicos	49
Potencial de membrana (V_m)	49
Flujo de la Na^+/K^+ -ATPasa (J_p)	50
Activación de la respuesta regulatoria de volumen a través de una función umbral.....	52
Resultados.....	54
Cambios de volumen en hepatocitos de goldfish.	54

Influjos y eflujos de K^+	56
Cambios de volumen en hepatocitos de trucha y rata.	57
Discusión.....	60
 Capítulo IV	
Efecto de la inhibición metabólica sobre el volumen de hepatocitos de goldfish.	63
Introducción.....	63
Objetivos.....	64
Resultados.....	65
Efectos de la inhibición metabólica en hepatocitos de goldfish, trucha y rata.....	65
Volumen celular.....	65
Mediciones de volumen celular por videomicroscopía.	65
Mediciones de volumen celular por microscopía de epifluorescencia.	67
Hepatocitos de goldfish sometidos a inhibición metabólica.	67
Experimentos comparativos: hepatocitos de goldfish, trucha y rata sometidos a intoxicación por CN.	70
Flujos transmembranales de K^+	70
Eflujo de K^+	70
Influjo de K^+	72
pH intracelular (pHi)	74
Contenido intracelular de Na^+	76
Discusión.....	78
Inhibición de las vías productoras de ATP.....	78
Relación entre el volumen celular y los flujos de K^+ :	78
Experimentos comparativos.....	79
Significado biológico de los cambios volumétricos observados.....	80
 Capítulo V	
Discusión	
general.....	82
Significado fisiológico de los cambios de volumen.....	82
Anoxia química	82
Medios hiposmóticos	82
Homeostasis del K^+	83
Perspectivas.....	86
Bibliografía.....	87

Capítulo I

INTRODUCCIÓN GENERAL

Si bien todos los vertebrados poseen una cierta capacidad para sobrevivir ambientes donde el oxígeno es escaso (condición denominada hipoxia), esta condición es a largo plazo incompatible con la supervivencia de la mayoría de los tejidos de mamíferos (Boutilier, 2001). Por el contrario, algunos vertebrados son capaces de sobrevivir largos períodos no sólo bajo hipoxia sino también en ambientes donde el oxígeno está ausente, condición denominada anoxia. Entre estos organismos tolerantes a la anoxia se encuentra el goldfish, un vertebrado cuyos hepatocitos fueron utilizados en el presente estudio como modelo de célula anoxia-tolerante.

Cuando las células se encuentran en un medio donde el nivel de oxígeno no es limitante, existe un balance entre la producción y el consumo de ATP^{*}, de manera que la concentración del nucleótido permanece constante. El grado de tolerancia celular a la anoxia depende en gran medida de la preservación de este balance energético en condiciones en las cuales el metabolismo aerobio está inhibido. Esta es la razón por la cual en la mayoría de las células la anoxia provoca un déficit energético que puede llevar a la muerte celular.

A continuación se explican las características por las cuales organismos y células son consideradas sensibles o tolerantes a la anoxia, con especial énfasis en el goldfish y los hepatocitos de este organismo.

• *Organismos tolerantes y sensibles a la anoxia*

La hipoxia es un estrés que experimentan todos los vertebrados en algún momento de su vida. Puede producirse por "exposición" ambiental *per se* o por insuficiencia circulatoria, respiratoria o metabólica (Boutilier y St-Pierre, 2000). En algunas especies de vertebrados, el estrés hipóxico se presenta solo en un estadio del desarrollo o en un período de su historia, por ejemplo, durante el trauma del nacimiento en los primates. En

* Adenosina trifosfato

otros grupos de animales, es una experiencia diaria asociada con el buceo, la supervivencia en una cueva, o el vuelo en altitudes extremas.

La anoxia es una condición más extrema que la hipoxia dado que la mayoría de los vertebrados no poseen mecanismos fisiológicos para sobrevivir o tolerar la ausencia de O_2 ambiental. Generalmente se verifica que las especies anoxia tolerantes son también capaces de sobrevivir ambientes hipóxicos, aunque lo opuesto no se cumple. Los animales que toleran la anoxia se comportan como anaerobios facultativos, dado que pueden vivir en ambientes en los que existe un suministro de oxígeno adecuado (normoxia) pero también tolerar la anoxia por períodos prolongados. Aquellos que muestran la mayor tolerancia pueden soportar la anoxia por períodos hasta 1000 veces mayores que las especies anoxia sensibles como los mamíferos pequeños (Bickler y col., 1998).

Dentro de los organismos tolerantes se encuentran el goldfish (*Carassius auratus*) y la carpa cruciana (*Carassius carassius*), dos especies de peces óseos pertenecientes a la familia de los Ciprinidos (Hochachka y Lutz, 2001). En ambientes hipóxicos, estas especies desarrollan respuestas fisiológicas orientadas a aumentar la llegada de O_2 a los tejidos, como por ejemplo a través de ajustes en la capilaridad, el volumen sanguíneo y/o la masa de glóbulos rojos.

En estrecha correlación a estos ajustes fisiológicos aparecen cambios en la hemoglobina (Hb) que incluyen (1) aumentos en el contenido de Hb en la sangre, (2) cambios en la afinidad por el O_2 y (3) cambios en los moduladores regulatorios. Estos cambios facilitan la toma de O_2 en los órganos de intercambio de gases y la liberación del O_2 en los tejidos para su utilización (Hochachka y Somero, 2002).

Los mecanismos fisiológicos arriba mencionados permiten prolongar la sobrevivencia de un organismo mientras las limitaciones de O_2 no son tan severas o prolongadas. En otras palabras, son adaptaciones efectivas para organismos aerobios en un mundo aerobio. Sin embargo muchas veces las respuestas fisiológicas de defensa no llegan a compensar la falta de O_2 . Todos los organismos, pero en especial los anoxia tolerantes, integran estas respuestas con líneas de defensa a nivel bioquímico.

- *Células tolerantes y sensibles a la anoxia*

Vías principales de producción de ATP

La energía metabólica se obtiene principalmente de las reacciones de oxidación-reducción, por medio de las cuales los electrones son transferidos desde un agente reductor (dador electrónico) a un agente oxidante (aceptor electrónico). La mayoría de los vertebrados obtiene la mayor parte de su energía del metabolismo aeróbico, donde el oxígeno molecular es utilizado para la oxidación de compuestos orgánicos. Por otro lado, en ausencia de oxígeno los vertebrados denominados anaerobios facultativos obtienen energía del proceso de fermentación: los electrones pasan de un intermediario orgánico producido por la degradación de un azúcar, a otro intermediario orgánico que actúa como aceptor electrónico.

Metabolismo aeróbico

En condiciones en las que hay normoxia, la síntesis de ATP se realiza principalmente a través del metabolismo aeróbico. Los electrones provenientes de la oxidación de sustratos son combinados con O₂ molecular y la energía liberada por estas reacciones es aprovechada para impulsar la síntesis de ATP. Para describir todo el proceso se utiliza el término de fosforilación oxidativa.

El proceso se inicia con la cadena respiratoria o cadena de transporte de electrones. En ella los electrones son transportados a través de los siguientes complejos transportadores de electrones o *carriers*: NADH deshidrogenasa, ubiquinona, y los citocromos. Los electrones son transportados a partir de un dador como NADH reduciendo a los *carriers* y finalmente el aceptor final de la cadena, el O₂ molecular, es reducido a agua. En ese momento los complejos se oxidan desde el más cercano al aceptor hacia el más alejado. La secuencia de los *carriers* es la que se presenta en la Fig. 1. En ella se identifican los sitios donde actúan los diferentes bloqueantes de la cadena de electrones.

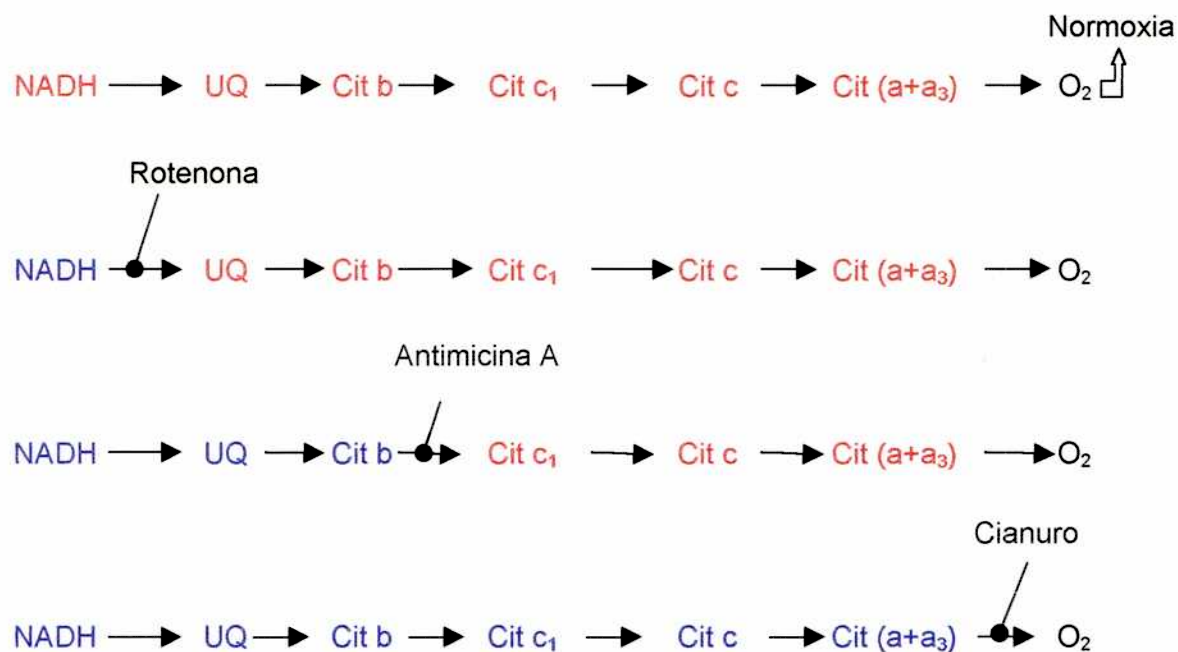


Fig. 1- Secuencia de *carriers* de electrones y efecto de diferentes inhibidores sobre su estado de oxidación. *Carriers* reducidos (azul), *carriers* oxidados (rojo). NADH: NADH deshidrogenasa, UQ: ubiquinona, Cit: citocromo.

Cuando los electrones son transportados de un *carrier* a otro, se libera energía que es utilizada para bombear protones a través de la membrana interna hacia el espacio intermembrana de la mitocondria. Esto crea un gradiente electroquímico de protones (H^+) a través de la membrana mitocondrial interna. El flujo de H^+ que retorna a la matriz mitocondrial a favor de su gradiente electroquímico impulsa, a través de la ATP sintetasa, la formación de ATP completando así el proceso de la fosforilación oxidativa.

Cuando en la cadena respiratoria se inhibe un *carrier*, como ocurre en presencia de rotenona o antimicina A, los complejos que se encuentran precediendo al inhibidor quedan en estado reducido mientras que los posteriores a dicho punto se mantienen oxidados.

Cuando no está presente un aceptor de electrones, como ocurre en la anoxia, todos los *carriers* permanecen en estado reducido. En presencia de cianuro (CN, anoxia química) todos los *carriers* se encuentran reducidos al igual que sucede en anoxia, pero la presencia de O₂ molecular puede desencadenar la formación de especies tóxicas del oxígeno como O₂^{-•}, H₂O₂ y OH^{-•} (estrés reductivo). Estos radicales actúan sobre lípidos y componentes celulares induciendo la pérdida de viabilidad celular (Gores y col., 1989).

Metabolismo anaeróbico

Entre las adaptaciones celulares para hacer frente a la anoxia, varias especies de animales redireccionan su metabolismo hacia funciones anaeróbicas. En las células de vertebrados, la forma más común de metabolismo anaeróbico es la glucólisis, ya sea a partir de glucosa o de glucosa-1P (proveniente de la glucogenólisis). Esta vía anaeróbica puede ser descrita como un proceso lineal de conversión del glucógeno o de la glucosa a lactato.

Uno de los problemas fundamentales de la glucólisis anaeróbica es la conservación del sustrato fermentable. Comparado con el metabolismo aeróbico, se generan en promedio 12-18 veces menos ATP por mol de glucosa. Es decir que en condiciones anaeróbicas se utiliza "mucho sustrato" para obtener "poca energía metabólica". En el caso del glucógeno y de la glucosa, se verifica que la tasa de utilización varía inversamente con la disponibilidad de oxígeno, proceso denominado "Efecto Pasteur". Esto significa que si la demanda de ATP permanece constante durante el tiempo en que el oxígeno no está disponible, las tasas de consumo de carbohidratos necesariamente deberían aumentar.

Lo arriba descrito implica que en anoxia, la producción glucolítica de ATP dependerá de la existencia de sustratos presentes y, en consecuencia, del estado nutricional de la célula. Los sustratos pueden provenir exógenamente a la célula o del glucógeno almacenado en el citosol. Las células que posean grandes reservas de glucógeno tendrán mayor capacidad de producir energía metabólica en ausencia de oxígeno (Hochachka y Somero, 2002). Este hecho no es trivial considerando que algunas especies animales, como el goldfish, poseen grandes reservas de glucógeno que proveerían de sustrato a la glucólisis. Así, tanto la glucosa proveniente del medio extracelular como el glucógeno endógeno, son metabolizados a lactato con la consiguiente producción de ATP.

La glucólisis puede ser bloqueada por dos mecanismos principales: a) mediante la utilización de 2-deoxiglucosa, la cual compite con la glucosa cuando ésta es transportada al interior celular, y que luego no puede ser utilizada como sustrato para la glucólisis; b) mediante el ácido iodoacético (IAA), un agente alquilante que inhibe la enzima glucolítica gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa.

Vías principales de consumo de ATP

El ATP, una vez producido, es utilizado para mantener las funciones celulares. Entre el 25-30% del ATP producido en una célula es utilizado para la síntesis de proteínas, 19-28% para la Na^+/K^+ -ATPasa, 4-8% para la Ca^{2+} -ATPasa, 7-10% para la gluconeogénesis, 3% para otras funciones. Es decir que, la síntesis de proteínas y la actividad Na^+/K^+ -ATPasa son los procesos que más ATP consumen en las células (Rolfe y Brown, 1997).

La Na^+/K^+ -ATPasa transporta iones en contra de sus gradientes electroquímicos transmembranales. Los iones, a su vez, son transportados en dirección opuesta a través de canales y transportadores. Todo este proceso lleva a la generación de una distribución estacionaria (alejada del equilibrio) de los iones difusibles a través de la membrana celular. Para llevar a cabo este proceso, la actividad Na^+/K^+ -ATPasa requiere de energía metabólica en la forma de ATP. En condiciones en las cuales la energía metabólica es limitante, como por ejemplo en la mayoría de las células durante la hipoxia y anoxia, el balance iónico se pierde. Por esa razón el mantenimiento de los gradientes iónicos transmembranales puede utilizarse como criterio dinámico de integridad celular (Hochachka, 1986).

De entre los iones difusibles, el K^+ citosólico es uno de los más sensibles a los cambios en el metabolismo energético (Krumshabel y col., 1998). En ausencia de oxígeno las células de animales sensibles a la anoxia sufren una rápida caída del ATP intracelular seguida por la salida de K^+ y la pérdida del potencial eléctrico transmembranal (Boutilier y St-Pierre, 2000).

Otro aspecto importante de la Na^+/K^+ -ATPasa refiere a su capacidad de regular el volumen celular. Una de las consecuencias del equilibrio Gibbs-Donnan[#] es el aumento de la osmolaridad intracelular. En células viables este desequilibrio osmótico es compensado por la actividad Na^+/K^+ -ATPasa. Debido a su estequiometría de transporte iónico, por cada ciclo de reacción esta bomba expulsa un osmolito al medio extracelular, compensando de esta manera el aumento en la osmolaridad intracelular que se generaría si la Na^+/K^+ -ATPasa estuviera inactiva o ausente.

[#] El equilibrio Gibbs-Donnan se plantea para células animales en ausencia de mecanismos de transporte activo.

- *El goldfish como organismo tolerante a la anoxia*

El goldfish es un pez anaerobo facultativo que presenta adaptaciones sistémicas (van den Thillart y col., 1980) y celulares (Schwarzbaum y col., 1996; Dorigatti y col., 1996; Krumschnabel y col., 2001) para sobrevivir en ausencia de oxígeno por períodos prolongados.

La dinámica estacional del goldfish se divide en tres períodos principales: la reproducción (al comienzo del verano), el abastecimiento de reservas (hacia fines del verano), y el invierno. El primer período, que dura aproximadamente un mes, se caracteriza por la utilización de las reservas obtenidas durante el invierno, por la maduración de las gónadas y el aumento del metabolismo lipídico. Durante este período tiene lugar la reproducción, al mismo tiempo que se verifica una baja tolerancia a la anoxia. El segundo período, que dura cerca de 4 meses, se desarrolla cuando comienza a disminuir la temperatura del agua hacia fines del verano. En ese momento se almacenan reservas de glucógeno (principalmente en el hígado y en el músculo blanco), disminuye el metabolismo de lípidos y comienza a desarrollarse la tolerancia a la anoxia. Pero la etapa crucial es el invierno, donde el goldfish habita lagos pequeños cuya superficie se congela durante 5-7 meses y varias zonas del lago sufren la ausencia total de oxígeno durante varios meses. En estrecha correlación con estos cambios ambientales los goldfish despliegan una alta tolerancia a la anoxia (Piironen y Holopainen, 1986) basada en la utilización de grandes reservas de glucógeno del músculo e hígado, la utilización de vías metabólicas alternativas (como la fermentación alcohólica) y una baja actividad locomotora.

El goldfish presenta el mayor contenido de glucógeno hepático de todos los vertebrados conocidos, llegando a aproximadamente 25-30% del peso fresco del hígado (Hochachka y Somero, 1984). Esto le permite abastecer de glucosa[&] al resto del organismo y especialmente al corazón y el cerebro en donde rápidamente se agotan las reservas de glucógeno en condiciones anóxicas (Nilsson, 1990).

[&] La liberación de glucosa requiere la formación de glucosa1P durante la glucogenólisis, seguido de la formación de glucosa6P por acción de la fosfoglucomutasa, y la defosforilación a glucosa mediada por la glucosa-6-fosfatasa. Finalmente la liberación de glucosa se realiza por transportadores específicos.

El goldfish posee tres sitios principales involucrados en el metabolismo energético: el hígado, el músculo rojo, y el músculo blanco. En períodos de escasez de alimento, el músculo rojo es la fuente de energía metabólica más importante, mientras que el blanco aporta sus reservas en los movimientos a altas velocidades. La función de abastecedor energético del hígado se utiliza para la supervivencia durante la anoxia.

En el metabolismo del goldfish anóxico operan dos caminos metabólicos diferentes: 1) la glucólisis o fermentación láctica, donde casi todos los tejidos muestran altas actividades de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) y por ende poseen la capacidad de generar lactato; 2) la fermentación alcohólica que se lleva a cabo en músculo rojo y blanco como se muestra a continuación (Shoubridge y Hochachka, 1980):

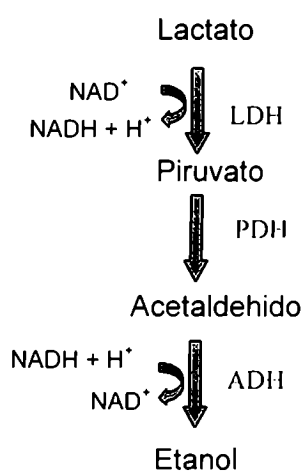


Fig. 2. Camino metabólico para la producción de etanol en el músculo esquelético de *Carassius spp.* ADH, alcohol deshidrogenasa; LDH, lactato deshidrogenasa; PDH, piruvato deshidrogenasa.

Pero estos dos tipos de fermentación no son independientes ya que el lactato producido en el hígado es metabolizado en los músculos a etanol, el que luego es excretado junto con CO_2 al ambiente acuático (Shoubridge y Hochachka, 1980).

La utilización coordinada de la fermentación láctica y alcohólica resuelve dos inconvenientes principales que se presentan en un ambiente anóxico:

- i) *el lactato no se acumula* sino que se libera a la sangre donde luego es recapturado por el músculo (blanco y rojo), sitio desde donde es metabolizado a etanol, y finalmente excretado por las branquias.
- ii) *se evita la acidosis celular*, dado que la generación de etanol como producto final de la fermentación utiliza una vía adicional (ver paso mediado por la alcohol deshidrogenasa en la Fig. 2) que consume protones.

Todas estas respuestas metabólicas son adaptativas en el sentido que prolongan la supervivencia del goldfish en ausencia de oxígeno. Pero la estrategia más importante que posee este animal consiste en disminuir la tasa metabólica[@]. Un ejemplo alcanza para entender la importancia de esta última adaptación. Durante el invierno, el glucógeno hepático del goldfish es aproximadamente 1300 μ moles unidades glucosilo/g tejido. Para un goldfish de 100 g, con aprox. 6 gramos de hígado, significa que se disponen de 7800 μ moles de glucógeno hepático (medido en unidades glucosilo). La tasa metabólica en reposo del goldfish a 4°C es 0.05 μ moles de ATP/g/min, lo que equivale a 7200 μ moles de ATP/100 g pez/día. Si se mantuviera esta tasa metabólica, el animal anóxico solo podría sobrevivir de su glucógeno hepático aproximadamente 1 día. Experimentos de calorimetría[#] con el animal entero muestran que la tasa metabólica se reduce 5 veces en ausencia de oxígeno, con lo cual la tolerancia a la anoxia se prolonga cerca de 5 días (Van den Thillart y col., 1983).

- *Hepatocito de goldfish como modelo de célula tolerante a la anoxia*

A partir del primer aislamiento de hepatocitos de rata por digestión con colagenasa (Berry y Friend, 1969), se generalizó el uso de estas células para el estudio de numerosos procesos metabólicos. A diferencia de otros tipos celulares los hepatocitos aislados retienen su organización intracelular y exhiben funciones metabólicas a tasas comparables a las observadas *in vivo* (Boyer y col., 1990).

La técnica de aislamiento fue luego adaptada para su utilización en peces (Moon y col 1985). Al igual que los hepatocitos de mamíferos, los hepatocitos de peces se mantienen metabólicamente activos durante horas y desarrollan una gran variedad de funciones anabólicas (gluconeogénesis, lipogénesis, cetogénesis, y la biosíntesis de proteínas y ácidos nucleicos) y catabólicas (glucólisis, ciclo de Krebs, etc). El hepatocito de pez es un modelo celular especialmente interesante, porque, a diferencia de lo que ocurre en su

[@] Tasa metabólica se refiere al metabolismo energético por unidad de tiempo

[#] La tasa metabólica puede ser determinada a partir de la producción total de calor del organismo en un dispositivo llamado calorímetro.

homólogo de mamíferos, permanece viable por períodos prolongados en un amplio rango de temperaturas y de niveles de oxígeno (Moon y col., 1985).

Para estudiar los mecanismos que permiten la tolerancia a la anoxia se requiere de un modelo celular que sea capaz de sobrevivir varias horas en ausencia de oxígeno. Si bien se han estudiado las alteraciones metabólicas que ocurren bajo anoxia en hepatocitos de rata (Carini y col., 1995, 1999), la baja viabilidad de las células en esas condiciones limitaba mucho su utilización (Gores y col., 1989).

Un modelo más apropiado para este tipo de estudios es el hepatocito de goldfish, ya que estas células permanecen viables por períodos prolongados bajo anoxia e hipoxia en un amplio rango de temperaturas. Esto es posible gracias a que mantienen el balance energético durante la anoxia, no sufren aumentos del calcio intracelular y mantienen la homeostasis del K^+ por medio de reducciones paralelas en los flujos unidireccionales del catión. De este modo las células de goldfish son capaces de mantener su viabilidad por lo menos durante 8 hs en ausencia total de oxígeno o en presencia de CN (Krumshabel, 2000) lo que las hace un modelo ideal para estudios de inhibición metabólica.

Objetivos de la tesis

Si bien en estudios previos se ha logrado una caracterización importante del modelo de tolerancia celular a la anoxia, los cambios asociados de volumen no han sido estudiados hasta el momento. En hepatocitos de organismos anoxia sensibles, el bloqueo de la fosforilación oxidativa provoca cambios en la osmolaridad intracelular y por ende un gradiente osmótico transmembranal que lleva al aumento de volumen[&], y muchas veces a la muerte celular. Algunas células consiguen compensar los aumentos volumétricos mediante movimientos netos de iones a través de la membrana celular.

Para poder entender como afecta la anoxia el volumen celular de hepatocitos anoxia-tolerantes, se propuso:

- ❖ estudiar el efecto de la inhibición metabólica[#] sobre el volumen celular, con especial atención al efecto de la anoxia.

[&] En todos los términos "hinchazón", "edema", y "aumento de volumen" son utilizados como sinónimos.

[#] Inhibición de las vías productoras de ATP.

- ❖ estudiar el efecto de medios hiposmóticos sobre el volumen celular. El interés de este punto radica en conocer las respuestas volumétricas de las células, independientemente del efecto que la inhibición metabólica pueda causar sobre el volumen celular.
- ❖ estudiar los flujos transmembranales de K^+ asociados a cambios de volumen. En hepatocitos de vertebrados, el K^+ es uno de los principales osmolitos responsables de la regulación volumétrica.
- ❖ a modo de comparación, los experimentos más relevantes fueron repetidos en hepatocitos de trucha (*Oncorhynchus mykiss*) y de rata, dos especies altamente sensibles a la anoxia.
- ❖ construir un modelo matemático que simule la evolución temporal del volumen celular, el potencial de membrana y la masa de los principales iones difusibles, cuando las células son sometidas a gradientes osmóticos variables.

MATERIALES Y METODOS

- *Reactivos*

Para el aislamiento de hepatocitos se utilizó colagenasa tipo VIII (goldfish y trucha, 461 U/mg) y colagenasa tipo IV (rata; 600 U/mg) de Sigma Chemical Company (EEUU). El $^{86}\text{Rb}^+$ [RbCl] fue provisto por NEN Life Science Products (EEUU). Los reactivos restantes fueron de grado analítico.

- *Animales*

Se utilizaron goldfish (*Carassius auratus*) (10-30g) obtenidos de una fuente comercial local, y truchas arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (150-250g) provenientes del Centro de Acuicultura de la Universidad Nacional del Comahue (Bariloche). Los peces fueron aclimatados por dos semanas a 20°C (goldfish) y a 15°C (trucha) en acuarios aireados de 200 litros. Para ambas especies, se mantuvo un fotoperíodo de 12 horas de luz/oscuridad y se alimentaron con alimento balanceado una vez al día. Ratas Wistar macho (200-300g) fueron hambreadas por 12 horas antes de ser utilizadas.

- *Medios utilizados*

Para la preparación de hepatocitos se utilizó un medio de lavado (M1) cuya composición es:

- M1-goldfish (mM): 10 HEPES; 138 NaCl; 5 KCl; pH=7.45, osmolaridad 280 mosM.
- M1-trucha (mM): 10 HEPES; 145.2 NaCl; 5.4 KCl; 5 glucosa; pH=7.6; osmolaridad 285 mosM.
- M1-rata (mM): 10.9 HEPES; 134.7 NaCl; 6.7 KCl; 5 glucosa; pH=7.45, osmolaridad 285 mosM.

Luego del aislamiento, las células fueron suspendidas en medio de incubación isosmótico (M2):

- M2-goldfish (mM): 10 HEPES; 135.2 NaCl; 3.8 KCl; 1.3 CaCl₂; 1.2 KH₂PO₄; 1.2 MgSO₄; 10 NaHCO₃; pH=7.45 o 7.6; osmolaridad 296 mosM.
- M2-trucha (mM): 10 HEPES; 136.9 NaCl; 5.4 KCl; 1.5 CaCl₂; 0.33 Na₂HPO₄; 0.44 KH₂PO₄; 1 MgSO₄; 5 NaHCO₃; 5 glucosa; pH=7.6; osmolaridad 292 mosM.
- M2-rata (mM): 25 HEPES; 120 NaCl; 5 KCl; 2.6 CaCl₂; 1.2 NaH₂PO₄; 0.5 MgSO₄; 4.2 NaHCO₃; 5 glucosa; 0.2% BSA; pH=7.45; osmolaridad 283 mosM.

Para preparar medios anisosmóticos se utilizaron volúmenes variables de M2[#] y medios 4 y 5.

- M4 (mM): 10 HEPES; 5 KCl; osmolaridad 76 mosM.
- M5 (mM): 10 HEPES; 135.2 NaCl; 3.8 KCl; 1.3 CaCl₂; 1.2 KH₂PO₄; 1.2 MgSO₄; 10 NaHCO₃; 200 sacarosa; osmolaridad 503 mosM.
- M6 (mM): 100 mM MgCl₂. Fue utilizado para los para los experimentos de flujo de K⁺ y de medición de Na⁺ extracelular.
- M7 (mM): 2 EDTA, 110 NaCl, 4 KCl, 25 NaHCO₃, pH=7.45.

Tratamientos aplicados sobre la suspensión celular

- captación de alanina: 10 mM L-alanina + 2,5 mM ácido oxiaminoacético (AOA), este último es un inhibidor de la conversión de L-alanina a piruvato (Kristensen, 1986).
- inhibición de la Na⁺/K⁺-ATPasa: 1 mM ouabaina (OB)
- activación del cotransporte K⁺/Cl⁻: 1 mM N-etilmaleimida (NEM), un agente alquilante de tioles (Lauf, 1982)
- medios alcalinos: medios iso- e hiposmótico como se describió anteriormente pero a pH = 7.8.
- inhibidores metabólicos:
 - anoxia química: incubación de la suspensión celular en presencia de 2 mM de cianuro (NaCN). El mismo se usa frecuentemente para simular la anoxia dado que

[#] En todos los casos "M2", "medio control" y "medio isosmótico" son utilizados como sinónimos.

es un potente inhibidor de la citocromo oxidasa, bloqueando la reducción de oxígeno (aceptor electrónico final) a agua durante la fosforilación oxidativa.

inhibición glucolítica: se incubaron las células con 0,5 mM IAA, un inhibidor de enzimas limitantes de la glucólisis.

inhibición total de la producción de ATP: se incubaron las células con 2 mM NaCN más 0.5 mM ácido iodoacético.

- inhibidores de transporte iónico: 1 mM tetraetilamonio (TEA) ó 5 mM BaCl₂ (ambos bloqueantes de los canales de K⁺ sensibles al voltaje), 1 mM quinina (bloqueante de los canales de K⁺ sensibles al Ca²⁺), 1 mM amilorida (inhibidor del contratransportador Na⁺/H⁺), 0.5 mM DIDS (inhibidor del contratransportador HCO₃⁻/Cl⁻).

El pH de los medios se midió con un pHímetro 720 (Orion Research Inc., Beverly, USA).

La osmolaridad de los medios se midió con un osmómetro de presión de vapor (5100 B; Wescor Inc., Logan, UT). En el caso de cambios de volumen, se midió la osmolaridad del medio isosmótico y se diluyó combinando los medios adecuados para producir los gradientes deseados.

• *Aislamiento de hepatocitos*

En los Ciprínidos, familia a la que pertenece el goldfish, no es posible distinguir las subdivisiones del parénquima hepático (lóbulos hepáticos), y el hígado se encuentra distribuido a lo largo del tubo digestivo. Las venas hepáticas, clásicamente en el centro de los lóbulos hepáticos, se encuentran distribuidas al azar a través del parénquima hepático lo que hace imposible la canulación portal (Bruslé y col., 1996). En el hígado de trucha y rata, en cambio, no ocurre lo mismo. Allí, el sistema porta es claramente visible permitiendo el aislamiento de hepatocitos mediante la utilización de la perfusión de la vena porta. Por lo tanto, se utilizaron diferentes protocolos para aislar hepatocitos de goldfish, trucha y rata, como se describe a continuación.

Obtención de hepatocitos de goldfish por digestión con colagenasa

Los goldfish se sacrificaron mediante un fuerte golpe en la parte posterior de la bóveda craneana y un corte transversal detrás de la cabeza seccionando la médula espinal.

Luego se liberaron los órganos de la cavidad abdominal practicando una serie de cortes (Fig. 3):

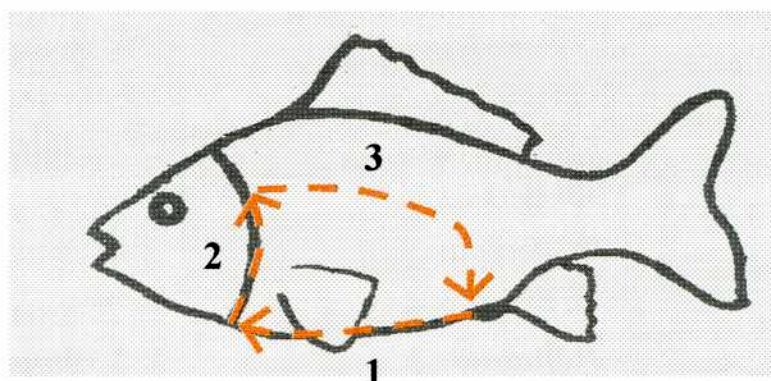


Figura 3- Diagrama de los cortes superficiales realizados en la disección del hígado de goldfish y trucha.

Se realizó un primer corte longitudinal (1) desde el poro anal hasta alcanzar la cavidad del corazón. El corte se continuó transversalmente formando un arco por detrás de las branquias hasta el dorso del animal (2). Desde este punto, se realizó un último corte por el borde superior de la cavidad abdominal curvándose hasta el ano (3). La porción de pared corporal así delimitada, se desprendió dejando a la vista los órganos contenidos en la cavidad abdominal. Estos fueron colocados sobre una placa metálica fría, y se procedió a separar el hígado, que se encuentra rodeando las paredes del intestino. Se tuvo especial cuidado de no dañar la vesícula biliar.

Se cortó el hígado en trozos pequeños, y se los incubó en M1 a 4°C bajo agitación constante. Luego, se dejaron decantar los fragmentos y se descartó el sobrenadante. Este procedimiento permitió una separación grosera del tejido graso y del exceso de sangre (Schwarzbaum y col., 1992). El pellet conteniendo los fragmentos de hígado fue incubado en M1 con 0.05% (p/v) de colagenasa. Se utilizó una pipeta Pasteur para dispersar las células y la suspensión celular resultante se filtró por una malla tipo Nytex de 150 μm de poro. El filtrado se incubó posteriormente a 4°C para inactivar a la colagenasa. La suspensión resultante estuvo compuesta por células hepáticas y sanguíneas. Como los hepatocitos representan la población de células de mayor tamaño de esta suspensión, su separación se realizó por centrifugación diferencial (Krumschnabel y col., 1994). En breve, la suspensión celular se centrifugó 2 min a 50g (4°C) en una centrífuga Sorvall RC5C. Se descartó el sobrenadante, y el pellet se resuspendió en M1. Se repitió esta operación dos

veces con M1 y una vez con M2 para asegurar la eliminación progresiva de la colagenasa y de las células sanguíneas contaminantes. El pellet final fue resuspendido en M2 a una concentración de 4×10^6 céls ml^{-1} .

Obtención no enzimática de hepatocitos de goldfish

Las células se obtuvieron por un método similar al descrito anteriormente pero se reemplazó el M1 + colagenasa con M1 + 2 mM EDTA (Seddon y Prosser, 1999).

Obtención de hepatocitos de trucha por digestión con colagenasa

El procedimiento de sacrificio y exposición de los órganos de la cavidad abdominal fue similar al descrito para los hepatocitos de goldfish (Fig. 3). Seguidamente, se separaron los tejidos con el fin de dejar al descubierto la vena porta hepática. Se realizó un corte en la misma, y se introdujo una cánula (diámetro=0.96mm). El hígado se perfundió durante 10 min con M1 con un caudal que se incrementó gradualmente hasta alcanzar 7 ml min^{-1} . La perfusión se continuó hasta la pérdida del color rojizo del hígado (pérdida de glóbulos rojos). Entonces, se perfundió el tejido con un medio con colagenasa 0.05% (p/v) hasta que el hígado perdió su textura rígida. Esto ocurrió en aproximadamente 15-20 min. Se extrajo el hígado del animal, se separó la cánula y se eliminó cualquier tejido no hepático. Se lo colocó en un recipiente en donde fue cortado con tijera hasta obtener trozos muy pequeños, con apariencia casi de homogenato. Se agregó colagenasa fresca y las células que aún no habían sido separadas, se dispersaron suavemente utilizando una pipeta Pasteur. Finalmente, las células se traspasaron a través de un filtro de malla tipo Nytex de $150 \mu\text{m}$ y se centrifugaron con M1 a 60g por 2 min, a 4°C , con el fin de eliminar la colagenasa del medio de suspensión celular. Se realizó una última centrifugación con M2 y el pellet obtenido se resuspendió en el mismo medio (ver Schwarzbaum y col., 1992) a una concentración celular de 4×10^6 céls ml^{-1} .

Obtención de hepatocitos de rata por digestión con colagenasa

Se realizó a partir del método descrito por Berry (1974). Los animales fueron anestesiados intraperitonealmente con pentotal sódico (150 mg kg^{-1}). Los medios de perfusión se mantuvieron a 37°C .

La técnica comprendió las siguientes etapas:

- A. Canulación de la vena porta hepática
- B. Eliminación de glóbulos rojos:
 - i) sección de la vena cava inferior
 - ii) ligadura de la vena cava inferior
 - iii) corte del diafragma y el corazón
- C. Extracción del hígado y recirculación de colagenasa
- D. Bloqueo de la actividad enzimática
- E. Obtención de hepatocitos

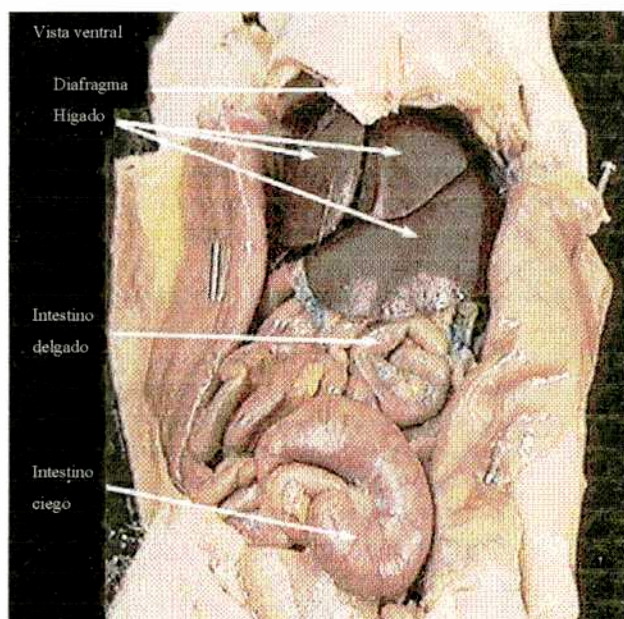


Figura 4. Fotografía de la zona ventral de una rata con los órganos expuestos.

- A. Se cortó el peritoneo longitudinalmente desde la zona pélvica hasta el diafragma dejando expuestas la vísceras del animal (ver Fig. 4). Estas se hicieron a un lado para la visualización de la vena porta hepática, en la que se realizó un pequeño corte y se colocó la cánula (diámetro= 1.6 mm).

- B. La perfusión fue realizada con M1 con un caudal lento que se incrementó hasta alcanzar 40 ml min^{-1} .
- i) En cuanto la cánula fue colocada, se seccionó la vena cava inferior dejando fluir el líquido libremente a la cavidad abdominal. A medida que se desarrolló la perfusión se observó la pérdida de color del hígado debido al lavado de glóbulos rojos.
 - ii) Luego de aproximadamente 5 min, se aumentó la presión del líquido de perfusión en el interior del hígado ligando la vena cava inferior. Este procedimiento permitió una mejor eliminación de glóbulos rojos.
 - iii) Transcurridos unos segundos, se cortó el diafragma y el corazón permitiendo que el líquido perfundido fluyera al exterior del animal.
- C. Se extrajo el hígado del cuerpo del animal sin separarlo de la cánula, y se lo colocó en un recipiente de recirculación conteniendo colagenasa 0.05% (p/v) a 37°C . Allí, se lo perfundió con la enzima que fue recirculada, hasta que se observó la pérdida de su textura rígida (8 minutos aproximadamente). Pasado este tiempo se extrajo la cánula, el tejido no hepático, y se colocó el hígado en un recipiente con colagenasa fresca. Se pasó un peine de dientes separados para liberar las células dispersas sin dañarlas. En este punto la consistencia del hígado fue la de un homogenato concentrado. Las células se incubaron a 37°C durante 4 min con el fin de romper los cúmulos celulares restantes. Pasado este tiempo, se filtraron por una malla metálica de $150 \mu\text{m}$.
- D. Las células obtenidas fueron diluídas con M2 frío (4°C), se centrifugaron a 50g a 4°C y el pellet se resuspendió nuevamente en M2 frío. El procedimiento se realizó dos veces.
- E. El pellet final se resuspendió en el mismo medio y se filtró por una malla metálica de $60\mu\text{m}$. Las células fueron resuspendidas en medio M2 a una concentración de $4 \cdot 10^6 \text{ céls ml}^{-1}$.

Luego del aislamiento, las células de las tres especies fueron incubadas en un medio isosmótico (M2) durante 45 min en un baño con agitación a 20°C antes de su utilización.

- *Viabilidad celular*

La viabilidad de los hepatocitos aislados se cuantificó antes de cada experimento por el método de exclusión del azul de Tripán. Este es un colorante capaz de teñir solamente el núcleo de las células muertas. La suspensión de hepatocitos (4×10^6 céls ml⁻¹) fue incubada en M2 conteniendo 0.04% (p/v) de azul de Tripán durante 1 min. Luego se realizó el conteo y determinación de viabilidad de las células utilizando una cámara de Neubauer (ver Schwarzbaum y col., 1992). Todos los conteos se realizaron por duplicado a partir de dos diluciones independientes de la suspensión celular con el fin de reducir significativamente el error propio del manipuleo de las células.

En todos los casos la viabilidad de hepatocitos de trucha y goldfish fue mayor al 95%, mientras que para los hepatocitos de rata fue mayor al 90%.

En el caso de los experimentos de fluorescencia, la viabilidad celular se controló durante todo el experimento mediante la retención de la calceína o del BCECF (2',7'-bi(carboxietil)-5'(6)-carboxifluoresceína). Sólo las células viables son capaces de retener dichos fluorocromos.

- *Medición de proteínas*

Se realizó según el método de Lowry y col. (1951).

- *Medición del peso seco*

Se pesaron tubos Eppendorf de 1,5-ml, vacíos, que luego fueron utilizados para centrifugar 10×10^6 células a 6700g. Se extrajo el sobrenadante de los Eppendorf por aspiración y se colocaron en estufa destapados hasta secar el pellet. Finalmente, se pesaron nuevamente y se calculó el peso del pellet sustrayendo el del Eppendorf vacío.

- *Flujos de K⁺*

Los flujos de K⁺ se estimaron utilizando el isótopo radiactivo del Rb⁺ (⁸⁶Rb⁺) que actúa como un análogo del K⁺ (Krumschnabel y col., 1996). Se realizaron experimentos de pulso con el fin de determinar la tasa inicial de incorporación del ión a las células en diferentes tiempos. El flujo de entrada de ⁸⁶Rb⁺ fue denominado influjo de K⁺ mientras que el flujo de salida de ⁸⁶Rb⁺ fue denominado eflujo de K⁺. Para cada experimento independiente se utilizaron hígados provenientes de 1 a 3 peces.

Influjo de K⁺

Las células fueron suspendidas en medios isosmóticos a una concentración de 12 10⁶ céls ml⁻¹. La suspensión celular fue diluída 1:1 con M4 (resultando una osmolaridad de 180 mosM), o con M2 en presencia o ausencia de inhibidores metabólicos.

A los 0, 10, 20 y 40 min, se transfirieron 3,5 ml de la suspensión celular a tubos cónicos que contenían 1,26 µCi de ⁸⁶Rb⁺, y se agitaron durante 60 s. Luego de 1, 4, y 7 min de incubación, se transfirieron 500 µl de la suspensión celular, por duplicado, a tubos Eppendorf de 1,5-ml. Estos tubos contenían 500 µl de M6 a 4°C con el fin de detener la captación del isótopo por las células. Se centrifugaron 4 s a 6700g y se eliminó el sobrenadante por aspiración. Se lavó dos veces el medio adherido al pellet y a las paredes del tubo agregando cuidadosamente 1 ml de M6, removiéndolo por aspiración. Este procedimiento aseguró una pequeña señal de fondo. El pellet celular fue agitado vigorosamente en vortex con 1 ml de solución de centelleo y la radiactividad fue cuantificada en un contador de centelleo. Se tomaron muestras de 5 µl de la suspensión celular de los tubos cónicos, por duplicado, con el fin de determinar la actividad específica del ⁸⁶Rb⁺. Los resultados se expresan como nmol 10⁻⁶ céls⁻¹ min⁻¹

Eflujo de K⁺

La suspensión de hepatocitos (20 10⁶ céls ml⁻¹) se incubó en presencia de 1,75 µCi ⁸⁶Rb⁺ ml⁻¹ durante 2:30 h, tiempo necesario para que las células incorporaran el isótopo. Luego, la suspensión se diluyó 1:1 en M4 o en M2 en presencia o ausencia de inhibidores metabólicos, con el agregado de 1,75 µCi ⁸⁶Rb⁺ ml⁻¹. Luego de 0, 10, 20 y 40 min de incubación, 1 ml de la suspensión celular fue transferido a tubos de reacción Eppendorf de 1,5-ml y se centrifugó durante 4 s a 6700g. Se extrajo el sobrenadante del

tubo de reacción por aspiración y se diluyó el medio adherido al pellet y a las paredes del mismo dos veces con 1 ml del medio de tratamiento no radioactivo removiéndolo por aspiración.

El pellet celular fue resuspendido en 1 ml del medio de incubación (isosmótico, en ausencia o en presencia de inhibidores, o hiposmótico) no radioactivo. Se tomaron 5 μl para determinar la radiactividad total. De esta suspensión celular se extrajeron muestras de 200 μl por duplicado a los 4 y 8 min, y los pellets se separaron del medio por centrifugación rápida como se describió en "influjo de K^+ ". Se transfirieron 50 μl del sobrenadante a tubos Eppendorf de 1,5-ml, se agregó solución de centelleo, y se midió la radiactividad. Los resultados se expresan como $\text{cpm } 10^{-6} \text{ céls}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Con el fin de identificar el tipo de canales de K^+ que potencialmente se activarían durante anoxia química, se incubaron los hepatocitos de goldfish en presencia de 5 mM BaCl_2 , 1 mM TEA, 1 mM de quinina. Estos bloqueantes se agregaron al medio de incubación 4 min antes del agregado de CN.

- *Medición del Na^+ intracelular*

El procedimiento se basa en el uso de una solución de ácido ftálico y ftalato que permite, mediante la centrifugación rápida de una suspensión de hepatocitos, separar las células del medio de suspensión celular.

Se agregaron alícuotas de 200 μl de la suspensión celular ($40 \times 10^6 \text{ céls ml}^{-1}$) sobre la superficie de una solución de 1 ml de ftálico/ftalato (40 % v/v de ácido ftálico más 60 % v/v de dibutil-ftalato) y se centrifugó durante 1 min a 6700g. Luego de centrifugar se removió la solución de ftálico/ftalato por aspiración y el pellet celular se diluyó con 500 μl de agua destilada y se sonicó durante 30 min.

En algunos experimentos los hepatocitos fueron incubados en un medio libre de Na^+ (M6) durante 30 min. Luego se centrifugaron durante 4 s a 6700g y se resuspendieron en el mismo medio previo al inicio del experimento. El nivel de Na^+ intracelular se midió por fotometría de llama utilizando un fotómetro EEL (Evans Electro Selenium Ltd., Inglaterra).

- *Medición del volumen celular*

Videomicroscopía

Se midió el tamaño de los hepatocitos por videomicroscopía de contraste de fase. Se sembraron 50 μl de una suspensión celular de concentración $4 \cdot 10^6$ céls ml^{-1} en una cámara de perfusión de 500 μl , cuya base está formada por un cubreobjetos circular de diámetro 12 mm (FischerCo, USA). Los hepatocitos se equilibraron por 20 min bajo *superfusión* con M2 (goldfish, trucha o rata según corresponda) con un caudal de 0.5 ml min^{-1} . Luego, las células fueron superfundidas con diferentes medios dependiendo del tratamiento. En estas condiciones no fue necesario el agregado de un medio de adhesión celular ya que las células se mantuvieron adheridas al cubreobjetos durante todo el experimento.

Los hepatocitos se observaron a una magnificación total de 300X en un microscopio de contraste de fase invertido (Olympus IMT-2) equipado con un objetivo 20X de amplitud *numérica* 0.40. Las imágenes se tomaron a través de una cámara CCD (EDC-1000, Electrim Corp., NJ, USA) que operó con ganancia fija y se adquirieron a través de una computadora por medio del programa Optimet (Bioscan, Inc., WA, EEUU) a intervalos fijos de tiempo.

Al finalizar el experimento los hepatocitos se perfundieron con una solución de calceína 1 μM y se identificaron las células que permanecieron viables durante todo el experimento. El sistema utilizado se muestra en la Fig. 5.

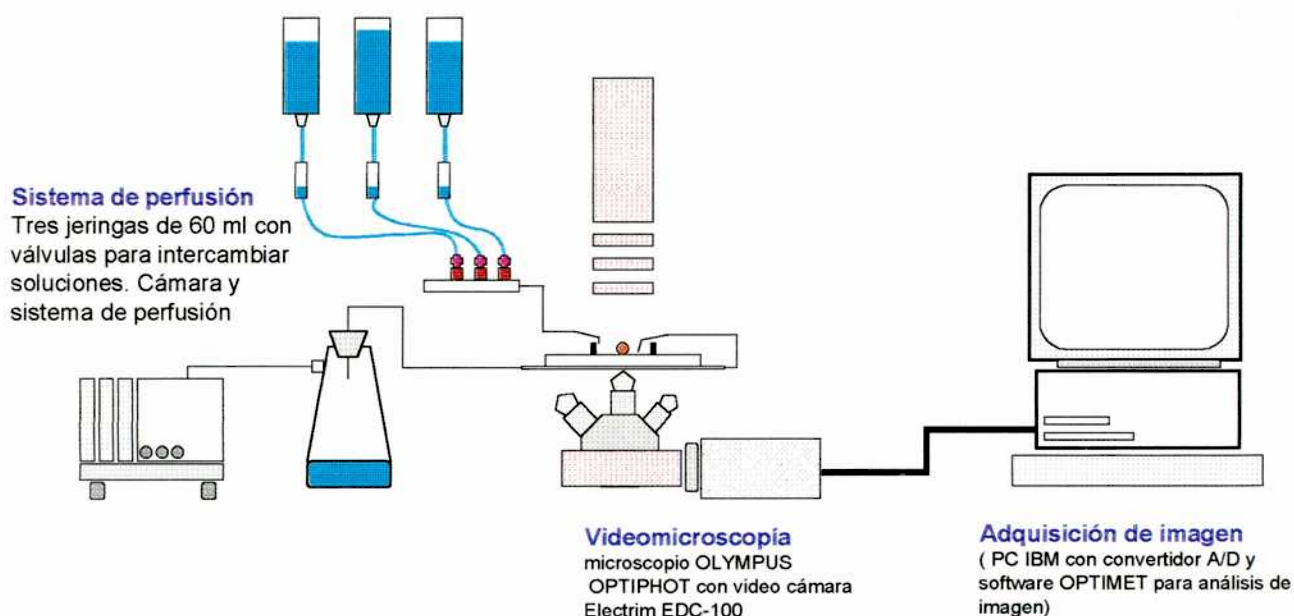


Figura 5- Diagrama del sistema utilizado en los experimentos de videomicroscopía.

Los volúmenes celulares se estimaron a partir de los diámetros de los hepatocitos, asumiendo que poseen forma esférica y que su volumen cambia en la misma magnitud en todas las direcciones radiales. A intervalos de tiempo fijo se midieron los diámetros de las mismas células a partir de las imágenes almacenadas durante todo el experimento. Los volúmenes celulares fueron computados solo para las células que se mantuvieron viables durante todo el experimento.

Los resultados se presentan como $\text{media} \pm \text{ESM}$ de cuatro experimentos independientes, utilizando 13-15 células por experimento. Los datos de volumen se expresan como volumen total (V ; en cm^3) o como volumen relativo (V_r), en donde

$$V_r = V_t/V_0$$

V_t es el valor de V para $t=t$, mientras que V_0 es V para $t=0$.

Bajo las condiciones experimentales aplicadas en este trabajo la técnica permitió detectar cambios de volumen mayores al 8 %.

Microscopía de epifluorescencia

Para la medición del volumen celular se utilizaron fluorocromos derivados de la fluoresceína. Estos se obtienen comercialmente como el ester acetoximetilo (AM) del fluorocromo. Los compuestos AM, una vez en el interior celular, son clivados por esterasas intracelulares quedando retenidos en el interior de las células (Tsien, 1981).

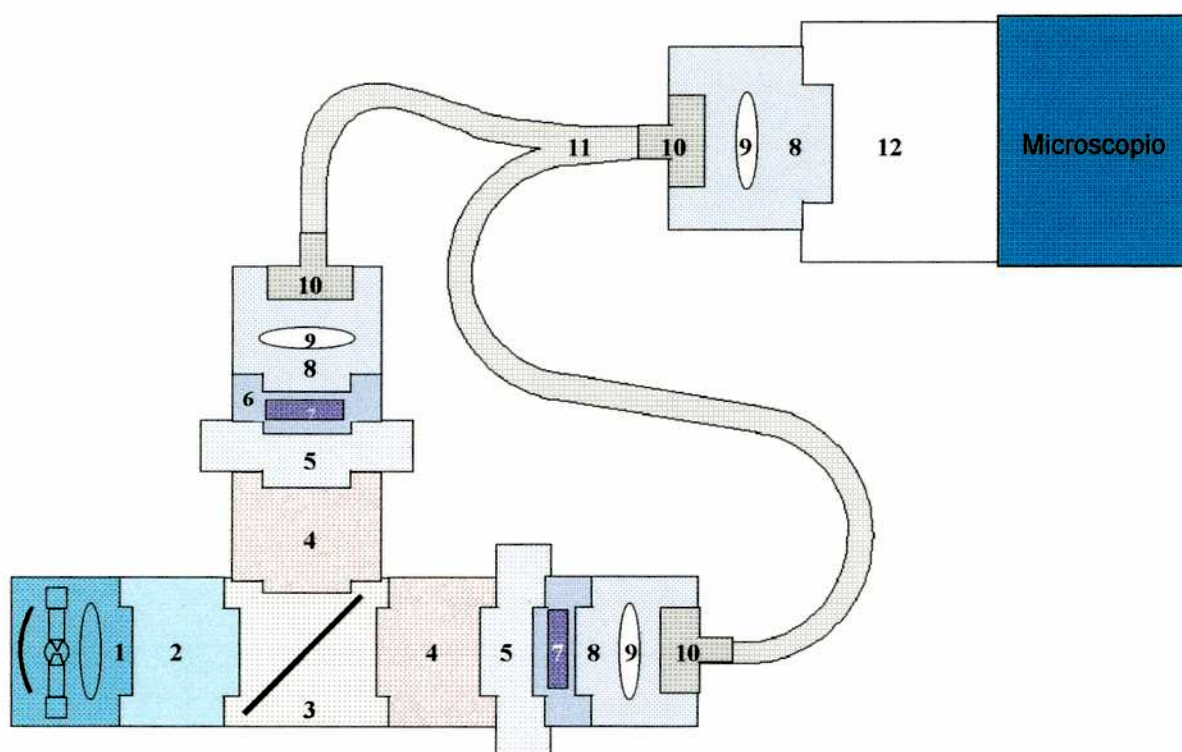


Figura 6. Diagrama del sistema utilizado en los experimentos de epifluorescencia. 1= fuente de iluminación con lámpara de Xenón; 2= filtro de agua (filtro de radiación infrarroja); 3= separador (*splitter*) de rayos; 4= adaptador; 5= *shutter* electrónico de alta velocidad controlado por unidad controladora y computadora; 6= rueda de filtros; 7= filtros de excitación; 8-9-10= acople óptico para la fibra óptica; 11= fibra óptica bifurcada; 12= módulo de epiiluminación del microscopio

Se sembraron 300 μl de una suspensión celular ($4 \cdot 10^6$ céls ml^{-1}) sobre un cubreobjetos de 25-mm de diámetro (FischerCo, USA) previamente embebido con poli-L-lisina al 0.1% (p/v). Cada cubreobjeto con las células adheridas se montó en una cámara con medio isosmótico y ésta en un microscopio invertido de epifluorescencia Nikon TE-200. Allí las células fueron superfundidas con los distintos medios durante todo el experimento.

Se utilizó el fluorocromo calceína, que actúa como marcador del volumen de agua intracelular. Como la calceína es insensible a iones en el rango fisiológico, y su masa intracelular es constante, los cambios en la concentración del fluorocromo (y por ende en

la intensidad de fluorescencia) son proporcionales a cambios en el volumen celular (Alvarez-Leefmans y col., 1995). El volumen de agua celular cambia en relación inversa con la concentración del fluorocromo. En base al mismo principio se utilizó el fluorocromo BCECF.

El volumen de agua intracelular se infirió de las lecturas de intensidad de fluorescencia excitando la calceína a la longitud de onda de su único pico de excitación (495 nm). El BCECF fue excitado a su longitud de onda isobéctica[&] (440 nm). En todos los casos se utilizó un filtro de excitación 470 CWL, un espejo dicróico de 500 nm LP y un filtro de emisión de 515 nm LP (Fig. 6).

El software de adquisición (Metafluor) utilizado permitió marcar una pequeña región dentro de la célula, correspondiente a un 3-10% del área total de la misma, en donde se midió la intensidad de fluorescencia (ver Fig. 7A). A esta región se la denominó pinhole digital (ver Alvarez-Leefmans y col., 1997). También se marcaron pinholes digitales en zonas del campo de observación sin células, denominamos a la señal que emitieron "fluorescencia de fondo" (Fig. 7A y 7B).

La incorporación o cargado del fluorocromo se realizó durante 45-60 min incubando a las células en presencia de 4 μM de calceína o 5 μM de BCECF. La señal fluorescente proveniente fue monitoreada cada 60 s hasta que la intensidad de fluorescencia se estabilizó en un nivel constante correspondiente a 5-10 veces el nivel de fluorescencia de fondo (Fig. 7B).

Al finalizar el cargado del fluorocromo, la suspensión celular fue lavada con M2 hasta que se obtuvo una señal fluorescente constante (aproximadamente 30 min).

La superfusión de las células se realizó con un caudal de 2 ml min⁻¹.

[&] Longitud de onda donde el fluorocromo es insensible a cambios de pH y solo reporta cambios en su concentración intracelular.

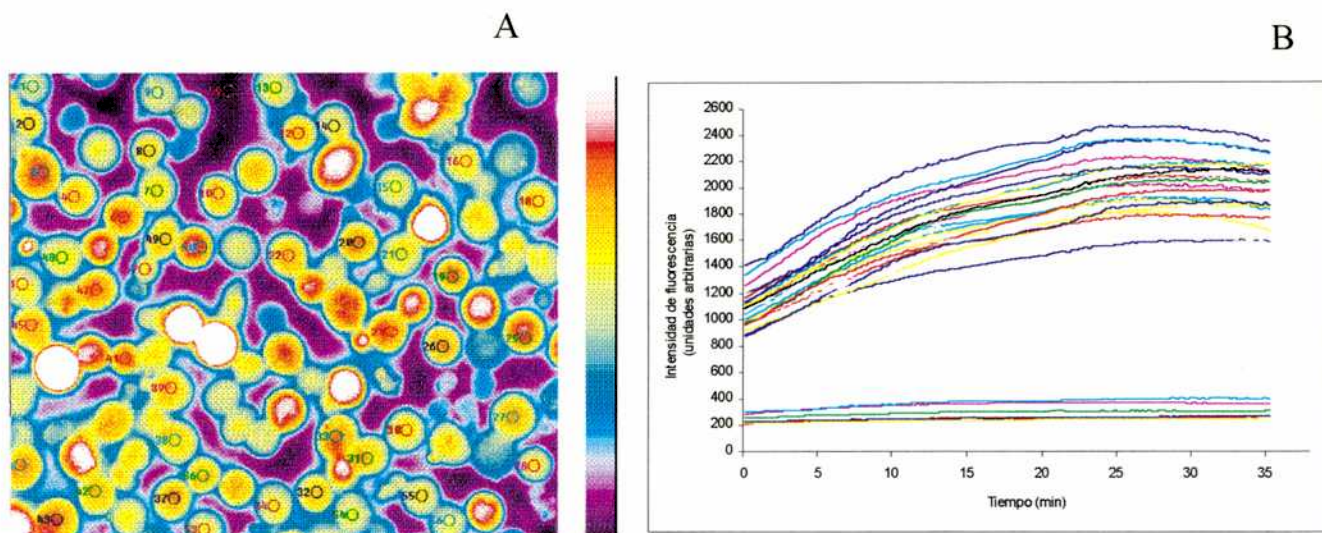


Figura 7- A) Hepatocitos de goldfish cargados con calceína, observados en pseudocolor. Los círculos numerados indican las regiones (“pinholes” digitales) de la célula utilizadas para adquirir la intensidad de fluorescencia durante el curso temporal de un experimento. Magnificación: 400x. B) Gráfico que ilustra la intensidad de fluorescencia en función del tiempo cuando los hepatocitos son cargados con calceína o BCECF. Las líneas en el rango de intensidad de fluorescencia entre 200 y 400 indican la fluorescencia de fondo.

Para poder convertir la intensidad de fluorescencia (en unidades arbitrarias) a V_r , se realizó una calibración en la cual se expusieron las células a medios iso-, hipo- e hiperosmótico (Fig. 8). La suspensión celular fue expuesta 3-5 min a medios: isosmótico, levemente hiposmótico (-10%) y levemente hiperosmótico (+10%). Finalmente se superfundió con medio isosmótico M2 durante 15 min con el fin de que las células restablecieran el estado estacionario antes de exponerlas al tratamiento específico.

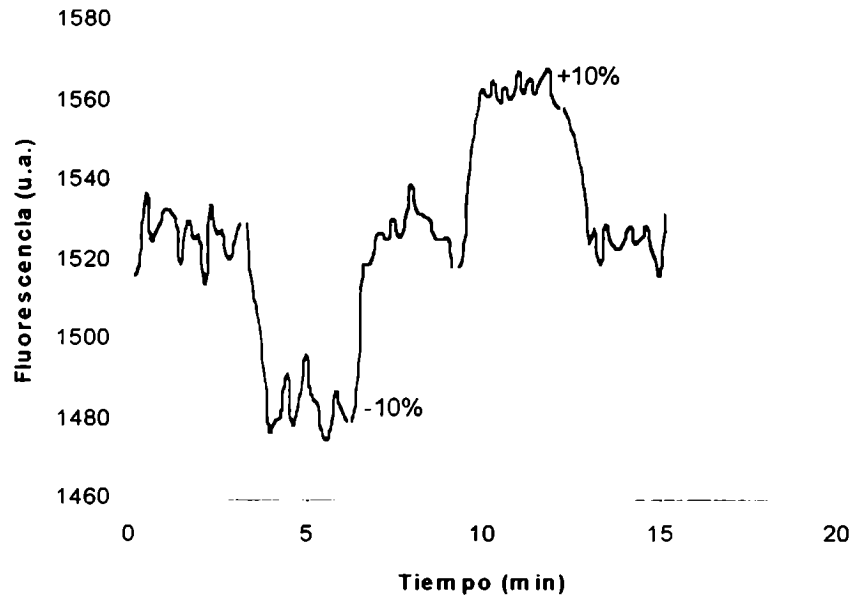


Figura 8. Fluorescencia en unidades arbitrarias en función del tiempo. Ejemplo de la calibración realizada para cada célula.

Los valores de V_r se calcularon de la siguiente manera:

$$V_r = \frac{F_o - F_t - F_{bkg}}{1 - F_{bkg}}$$

en donde F_o y F_t representan la intensidad de fluorescencia de un pinhole digital a $t=0$ y a $t=t$, respectivamente. El valor de F_{bkg} representa la intensidad de fluorescencia inespecífica.

El porcentaje de RVD (disminución regulatoria de volumen) asociado a la repuesta volumétrica de células expuestas a medios hiposmótico fue calculado de la siguiente manera:

$$\%RVD = \left[\frac{(V_{r_{max}} - 1) - (V_{r_{reg}} - 1)}{V_{r_{max}} - 1} \right] \times 100$$

En donde $V_{r_{max}}$ representa el valor de V_r máximo alcanzado, y $V_{r_{reg}}$ representa el valor de V_r luego de 20 o 40 minutos de alcanzado $V_{r_{max}}$ (ver Fig. 9)

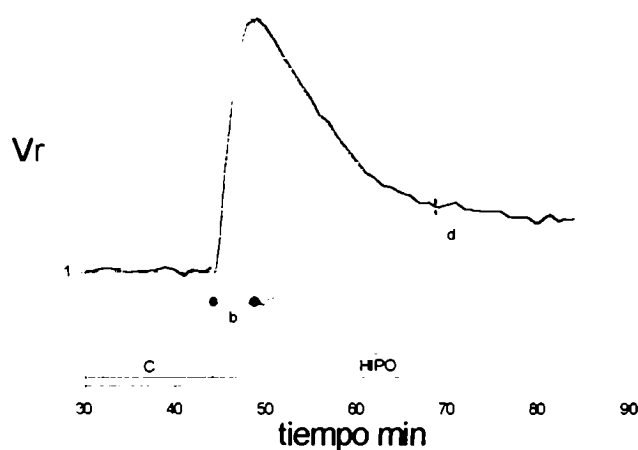


Figura 9- Volumen relativo en función del tiempo en hepatocitos expuestos a medio isomótico (c), seguido de medio hiposmótico (HIPO). Se ilustran los parámetros medidos: valor de $V_{r_{max}}$ en el pico máximo hiposmótico (a); tiempo desde la exposición a HIPO hasta el máximo hiposmótico (b); valor de $V_{r_{reg}}$ luego de t=e del máximo hiposmótico (d).

Una descripción detallada de esta técnica, su validación y los cálculos correspondientes pueden encontrarse en la bibliografía (Alvarez-Leefmans y col. , 1995; Altamirano y col. , 1998).

- *Cálculo del coeficiente de permeabilidad osmótica (Pf)*

El Pf se calculó a partir de los valores de Vr de los hepatocitos de goldfish, del volumen inicial ($V_0 = 1.36 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^3$), el área de superficie ($S = 5.94 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2$), el volumen molar de agua ($V_w = 18 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$) y la tasa inicial de aumento del volumen $d(V/V_0)/dt$, por medio de la relación (Zhang et al., 1990):

$$Pf = V_0 \times [d(V/V_0)/dt] / [S \times V_w \times (OSM_i - OSM_o)]$$

En donde OSM_i y OSM_o denotan la osmolaridad intra- y extracelular, respectivamente.

- *Medición del pH intracelular (pHi)*

Se realizaron mediciones continuas del pHi utilizando hepatocitos cargados con BCECF. Se utilizó microscopía de epifluorescencia utilizando el sistema que se mostró en la Fig. 6. Las células fueron excitadas a 495 nm y 440 nm. La primera es la longitud de onda en la que la fluorescencia del BCECF es proporcional a la concentración intracelular del

fluorocromo y al pHi. La segunda es la longitud de onda isobéptica del BCECF. Así, el cociente de la fluorescencia a 495 nm y a 440 nm ($F_{495/440}$) es directamente proporcional al pHi pero independiente de los cambios de concentración intracelular del fluorocromo (Gleeson y col., 1990).

Al final de cada experimento se realizó una calibración con el fin de traducir los resultados de $F_{495/440}$ a valores de pHi. Para ello se utilizaron medios con 10 μ M nigericina y los siguientes patrones de pH 5.40, 5.70, 6.05, 6.56, 6.98, 7.46, 8.03. La composición de los mismos fue 10 mM HEPES, 150 mM KCl, y se ajustó a los distintos pH con KOH. El principio de esta metodología se basa en la utilización de nigericina y de una concentración de K^+ en los patrones de pH, similar a la concentración intracelular del ión. En estas condiciones el pHi es forzado a igualar al pHe.

Las células fueron incubadas secuencialmente con los diferentes patrones de pH comenzando por el más alcalino y se registró el $F_{495/440}$ correspondiente a cada uno. Así se obtuvo el gráfico de la Fig. 10.



8 8.5

Figura 10. $F_{495/440}$ en función del pHe. Las células fueron incubadas con los diferentes patrones de pH y se registró el cociente de la intensidad de fluorescencia a las dos longitudes de onda 495 nm y 440 nm.

Ajustando los puntos del gráfico a una curva sigmoidea, se obtuvieron los valores de $R_{\text{máx}}$, $R_{\text{mín}}$ y pK . Los valores de pH_i se calcularon a partir de la siguiente ecuación:

$$pH_i = pK + \log \frac{(F_{495/440} - R_{\text{máx}})}{(R_{\text{mín}} - F_{495/440})}$$

En donde $R_{\text{máx}}$ es la $F_{495/440}$ máxima y $R_{\text{mín}}$ es la $F_{495/440}$ mínima.

El pK se mantuvo en un rango de 7.2 a 7.5 en todas las células analizadas.

- *Factores de conversión en hepatocitos de goldfish*

El volumen de las células fue $1.31 \cdot 10^{-9} \pm 2.02 \cdot 10^{-11} \text{ cm}^3 \text{ céls}^{-1}$ ($n=56$). La relación entre proteínas totales y el número de células fue 0.7 ± 0.1 (mg proteína 10^6 céls^{-1}) ($n=13$). El diámetro de las células obtenido por videomicroscopía fue $12.77 \pm 0.24 \text{ }\mu\text{m}$ (147 células de 10 preparaciones independientes) y el porcentaje de peso seco fue $25 \pm 1 \%$ ($n=19$). El rendimiento de células fue $62.2 \pm 9.7 \cdot 10^6 \text{ células g}^{-1}$ de peso fresco⁻¹ ($n=15$).

- *Estadísticas*

Se evaluó el efecto de diferentes tratamientos sobre los flujos transmembranales de K^+ mediante ANOVA de una vía seguido por el test de comparaciones múltiples Tukey-Kramer. Se consideró significativo un valor de $p \leq 0.05$. Los ajustes exponenciales para el cálculo de V_m ($V_{\text{máximo}} \pm SE$) se realizaron por medio de la regresión no lineal.

En todos los casos se utilizaron 4 preparaciones independientes. El símbolo "n" indica el número de células provenientes de esas cuatro preparaciones.

Capítulo II

Efecto de medios anisomóticos sobre el volumen de hepatocitos de goldfish.

Introducción

El movimiento de agua a través de las membranas biológicas es siempre pasivo y rápido. Por esa razón, la distribución final del agua entre las células y el medio que las rodea es siempre una distribución en equilibrio termodinámico. Dado que en la mayoría de las células animales la permeabilidad al agua es mucho más elevada que la de los solutos, la membrana celular se comporta como si fuese selectivamente permeable al agua, es decir, como una membrana osmótica.

Cuando las células animales son expuestas a medios anisomóticos, inicialmente presentan cambios de volumen hasta alcanzar nuevamente una distribución en equilibrio del agua. Sin embargo, en la mayoría de los casos, luego del período inicial de cambio de volumen, continúa una fase de recuperación que ocurre a pesar de la continua presencia del medio anisomótico (Häussinger, 1996). Este comportamiento indica que la mayoría de las células animales está dotada de mecanismos que le permiten regular su volumen frente a gradientes osmóticos.

El tiempo en el que las células restablecen su volumen luego del estímulo anisomótico, varía desde minutos a horas dependiendo del tipo celular en estudio. El comportamiento regulatorio de volumen fue observado en una variedad de células incluyendo eritrocitos nucleados, linfocitos humanos, hepatocitos de mamíferos y vertebrados inferiores, células renales de mamífero, oocitos, axones, y miocitos, así como en varios epitelios (Foskett y Spring, 1985; Bianchini y col., 1988; Lang y col., 1990).

De acuerdo a la dirección del gradiente osmótico transmembranal, se han descrito dos tipos de respuestas regulatorias: aumento regulatorio de volumen (*regulatory volume increase* o RVI) y disminución regulatoria de volumen (*regulatory volume decrease* o RVD) (Sarkadi y Parker, 1991; Alvarez-Leefmans y Reuss, 1996). La RVD se refiere al proceso mediante el cual una célula mantenida en solución hiposmótica recupera su volumen original después de haber sufrido un aumento osmótico de volumen. Por el

contrario, en el RVI una célula mantenida en un medio hiperosmótico recupera su volumen original luego de una disminución osmótica del mismo.

Generalmente la RVD es provocada por la activación de flujos de K^+ dependientes e independientes de Cl^- (mecanismo efector de la respuesta). En la RVI en cambio, se activan flujos de Na^+ (intercambiador Na^+/H^+ , cotransportador $Na^+/K^+/2Cl^-$). El primer grupo permite la pérdida disipativa de K^+ y Cl^- intracelular mientras que la activación de los segundos lleva a la ganancia neta de Na^+ y Cl^- extracelular por parte de la célula (Fig. 11).

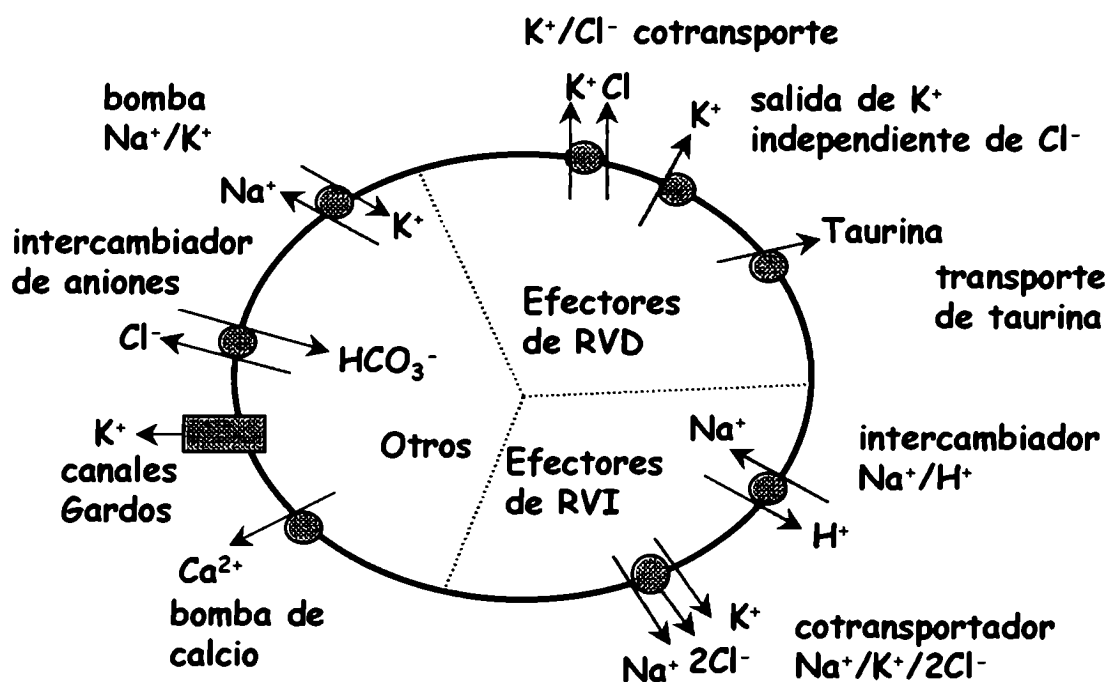


Figura 11- Esquema que ilustra los principales caminos de transporte a través de la membrana celular de células de vertebrados. Las flechas indican los flujos netos de los solutos. RVD, disminución regulatoria del volumen. RVI, aumento regulatorio del volumen.

En células hepáticas de mamíferos no se verifica RVI en medios hiposmóticos, sino que éste debe ser inducido al exponer las células a un medio isosmótico luego de RVD (Corassanti y col., 1990; Gleeson y col., 1990). Por el contrario, en medios hiposmóticos los hepatocitos de trucha muestran RVI mediado por la activación en paralelo de intercambios Na^+/H^+ y Cl^-/HCO_3^- (Haussinger y Lang, 1991, Fossat y col., 1997).

Durante la RVD no solo se activa el flujo de electrolitos (K^+ y Cl^-) acompañado por agua sino que también se verifica la salida de osmolitos orgánicos (Emma y col., 1997). Entre estos últimos se encuentran aminoácidos como taurina, poliglicoles como el sorbitol y

aminas cuaternarias como tetrametilamina. Los sistemas de transporte activados durante la RVD no parecen estar involucrados en el mantenimiento del estado estacionario intracelular del K^+ y Cl^- . Es decir que permanecen silenciosos hasta que las células aumentan su volumen por encima de un valor umbral (Bianchini y col., 1988).

Los mecanismos por los cuales el estímulo osmótico es transducido por la célula provocando la activación de la salida de K^+ y Cl^- no se conocen completamente. En hepatocitos de mamíferos, el aumento de volumen abriría canales catiónicos no selectivos debido al estiramiento de la membrana plasmática (*stretch activated channels*). Así se produciría el aumento en la entrada de Ca^{2+} a la célula y la activación de canales de K^+ sensibles al calcio (Burgess y col., 1981). Sin embargo, este aumento de Ca^{2+} citosólico no parece ser un requisito para el desarrollo de la RVD (Häussinger, 1996), ya que la salida de K^+ y Cl^- se activaría directamente por el estiramiento de la membrana plasmática (Sackin, 1987, Lang y col., 1998).

Cuando las células son expuestas a soluciones isosmóticas que poseen un soluto permeable, ocurre una respuesta osmótica diferente. En este caso, el soluto penetra en las células aumentando la osmolaridad intracelular. Este aumento provoca la entrada de agua, hinchazón celular y subsecuente RVD isosmótica. Esta secuencia de eventos puede observarse en hepatocitos de mamífero incubados en presencia de L-alanina, en donde el aminoácido es cotransportado con Na^+ hacia el interior celular. El cotransporte Na^+ :alanina produce un aumento de volumen como resultado del aumento de solutos intracelulares (Bakker-Grunwald, 1983).

Objetivos

- ❖ Estudiar el efecto de medios anisomóticos sobre el volumen celular.
- ❖ Analizar los flujos transmembranales de K^+ asociados a los cambios de volumen.
- ❖ Realizar estudios comparativos con hepatocitos de trucha y de rata.

Resultados

- *Cambios de volumen en hepatocitos de goldfish sometidos a gradientes osmóticos transmembranales. Mediciones por videomicroscopía*

En la Fig. 12 se observa la evolución temporal del volumen (V) de hepatocitos expuestos a medios de diferentes osmolaridades de 120 a 503 mosM; y M2 en presencia de ALA-AOA.

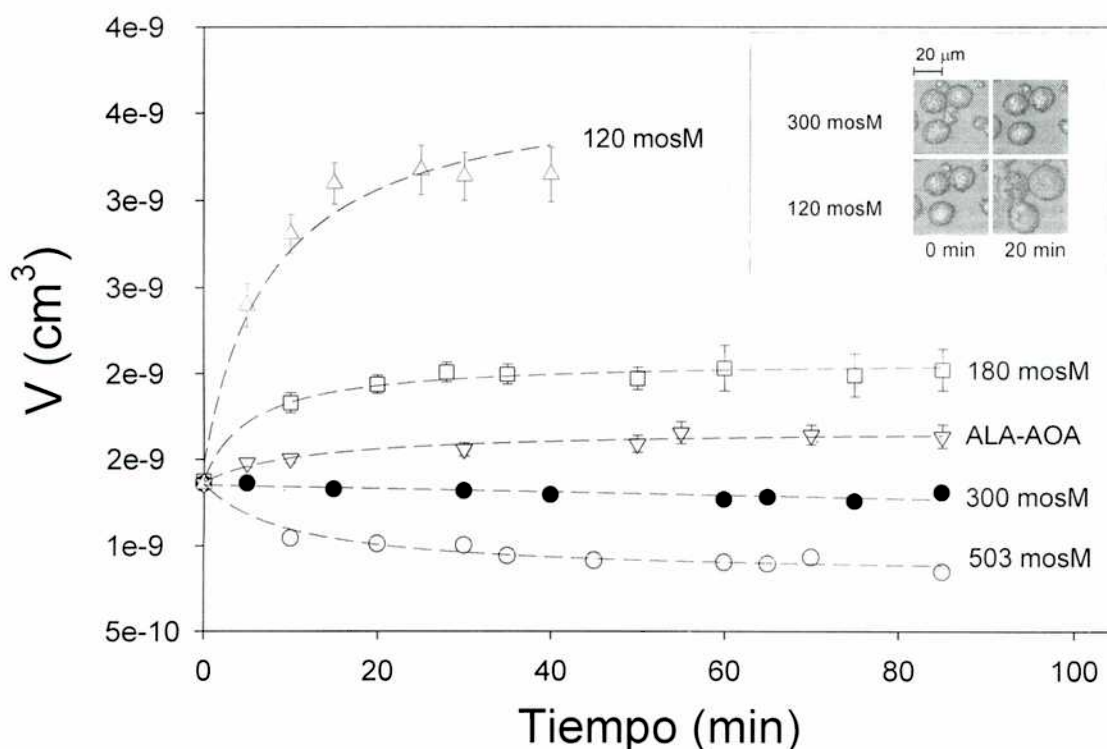


Figura 12. Volumen relativo en función del tiempo en hepatocitos de goldfish. Resultados obtenidos por videomicroscopía. Las células fueron expuestas a medios 120 mosM (Δ), 180 mosM (\square), 300 mosM (\bullet), 503 mosM (\circ) y a ALA-AOA (∇). Los resultados son medias \pm ESM de cuatro experimentos independientes (en algunos puntos la barra de error se encuentra dentro del símbolo). Las líneas punteadas representan el ajuste exponencial a los datos experimentales con los parámetros de mejor ajuste en la Tabla 1. Inserto: micrografías de hepatocitos de goldfish en M2 (300 mosM, paneles superiores) y 120 mosM (paneles inferiores). Magnificación: $\times 300$.

En medio isosmótico (~ 300 mosM) V se mantuvo constante ($1.31 \cdot 10^{-9} \pm 2.02 \cdot 10^{-11} \text{ cm}^3$, $n=56$) durante todo el período de observación. Por el contrario, en presencia de medios

120 mosM (60% hiposmótico) y 180 mosM (40% hiposmótico), V mostró un aumento no lineal alcanzando $3.1 \cdot 10^{-9} \pm 1.56 \cdot 10^{-11} \text{ cm}^3$ (n=55) y $2.00 \cdot 10^{-9} \pm 1.21 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^3$ (n=56) respectivamente. Para ambas osmolaridades, las células no mostraron RVD.

Cuando las células se expusieron al medio 503 mosM (168% hiperosmótico), su volumen disminuyó a $8.5 \cdot 10^{-10} \pm 3.91 \cdot 10^{-11} \text{ cm}^3$ (n=55), sin observarse RVI.

La incubación de hepatocitos en medio M2 + ALA-AOA[&], provocó un aumento de V hasta alcanzar un valor de $1.63 \cdot 10^{-9} \pm 6.91 \cdot 10^{-11} \text{ cm}^3$ (n=57), sin presentar RVD.

Las líneas de la Fig. 12 resultan de ajustar a los resultados experimentales una función exponencial con los parámetros que se indican en Tabla 1.

Tabla 1- Resultados de ajustar a los valores experimentales de la Figura 12 una función exponencial de la forma $V = V_0 + (V_m - V_0)(1 - e^{-kt})$.

Tratamiento	V_m (cm^3)	$t_{1/2}$
120 mosM	3.46 ± 0.24	7.54 ± 1.29
180 mosM	2.00 ± 0.12	5.44 ± 1.60
180 mosM (CFM)	2.03 ± 0.18	7.92 ± 4.05
ALA-AOA	1.63 ± 0.08	11.93 ± 7.07
503 mosM	0.90 ± 0.07	8.41 ± 1.54

Valores de los parámetros \pm ES (error standard del ajuste).

V_m y V_0 indican el volumen máximo y el inicial respectivamente. V indica volumen celular a tiempo t. El valor de $t_{1/2}$ (el tiempo necesario para alcanzar el 50% del V_m) se calculó de la siguiente manera $t_{1/2} = \ln(2)/k$, en donde k es una constante. ALA-AOA es un medio isosmótico en presencia de 10 mM L-alanina más 2.5 mM ácido aminooxiacético. CFM indica experimentos realizados con hepatocitos aislados en medio libre de colagenasa.

Contrariamente a lo esperado, no se observó RVD en células de goldfish expuestas a medio hiposmótico. Este es un resultado muy poco común en la literatura de hepatocitos, que podría tener consecuencias fisiológicas importantes (ver discusión). Por ello se realizaron experimentos adicionales para validar los resultados obtenidos.

[&] El medio M2 + ALA-AOA es isosmótico e hipotónico. Isosmótico ya que tiene la misma osmolaridad que la intracelular, sin embargo, dado que la presencia de ALA-AOA en el medio extracelular genera entrada de ALA y agua a la célula, el medio es además hipotónico.

- *Validación de la ausencia de RVD en hepatocitos de goldfish expuestos a medios hiposmóticos*

Procedimiento de disociación de células

La utilización de colagenasa para disociar las células pudo haber removido una proteína de membrana determinante de la RVD. Para poner a prueba esta hipótesis, se disociaron hepatocitos en M7, sin colagenasa pero con EDTA (Seddon y Prosser, 1999).

En la Fig. 13A se observa que los hepatocitos de goldfish aislados en un medio libre de colagenasa presentaron cambios volumétricos similares (cualitativa- y cuantitativamente) a los aislados utilizando dicha enzima. En ambos casos el volumen aumentó hasta alcanzar un valor constante sin observarse RVD.

Estudios comparativos

Para validar la técnica de medición de volumen por videomicroscopía, se realizaron experimentos en medios hiposmóticos en hepatocitos de trucha y rata para los cuales se sabía de la existencia de RVD inducida por medios hiposmóticos (Bianchini y col., 1988 y 1991; Corassanti y col., 1990).

En la Fig. 13B se observa la evolución temporal del Vr de hepatocitos de goldfish, trucha y rata expuestos a medio hiposmótico. En las células de trucha y rata, la exposición a medio 180 mosM produjo un aumento de Vr que alcanzó un valor máximo de 1.18 ± 0.03 (trucha, $n=48$) y 1.34 ± 0.02 (rata, $n=48$). Luego se observó RVD de 94.02 ± 23.74 % (trucha) y 65.38 ± 5.41 % (rata).

Se ajustó una función exponencial de la forma $V_r = V_{r_0} + A t e^{-nt}$ a los datos experimentales, donde V_{r_0} es el valor del Vr a tiempo 0, mientras A y n denotan constantes.

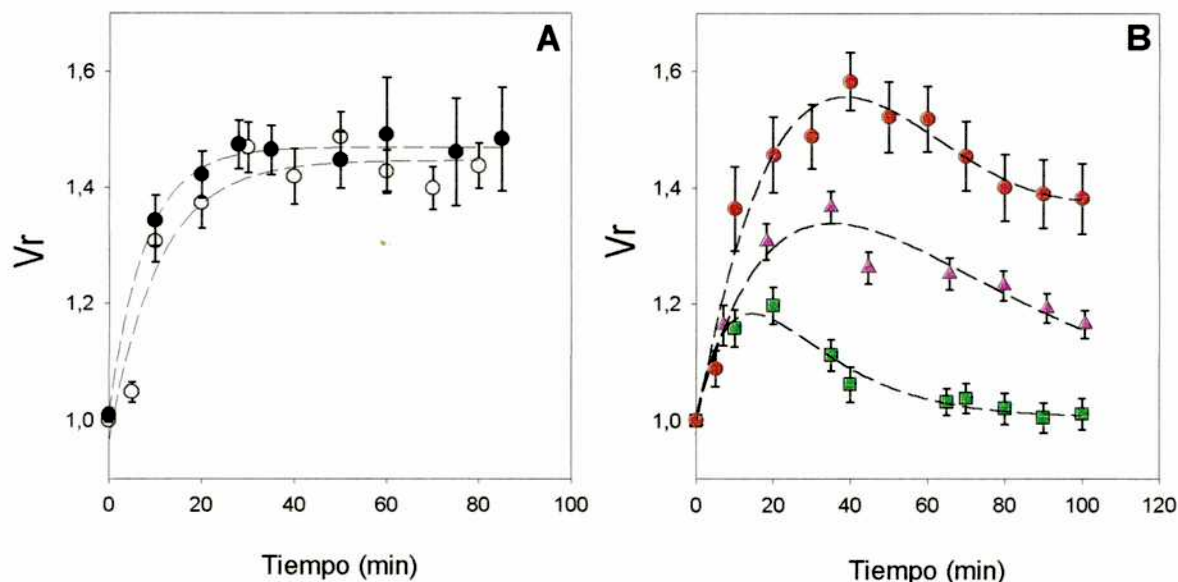


Figura 13- Evolución temporal del volumen relativo en hepatocitos de goldfish, trucha y rata. Resultados obtenidos por videomicroscopía. (A) Volumen relativo (V_r) en función del tiempo de hepatocitos de goldfish expuestos a medio 180 mosM a pH 7.45. Los hepatocitos fueron aislados utilizando medio con colagenasa (●) o en medio sin colagenasa (○). (B) V_r en función del tiempo de hepatocitos de rata (▲), trucha (■) y goldfish (●) expuestos a medios 180 mosM a pH 7.45 (rata), 7.6 (trucha) y 7.8 (goldfish). Los valores son la media \pm ESM de cuatro experimentos independientes. Magnificación: x300. Las líneas representan el ajuste empírico a los datos, con los valores de los parámetros de la Tabla 1.

pH del medio extracelular

Para probar si la RVD en hepatocitos de goldfish podría activarse en medio alcalino (como se demostró en otros sistemas; ver discusión de este capítulo), las células fueron expuestas a medios iso- e hiposmótico (180 mosM) a pH 7.8. La exposición a medio 180 mosM pH=7.8 indujo un aumento del V_r a un máximo de 1.58 ± 0.05 ($n=48$), seguido por una RVD de $25.83 \pm 1.81\%$ ($n=48$) (Fig. 13B).

Reversibilidad del aumento del volumen celular de hepatocitos de goldfish expuestos a medios hiposmóticos

Se analizó la reversibilidad del aumento volumétrico. Como se observa en la Fig. 14 en medios hiposmótico (180 mosM) el V_r aumentó sin presentar RVD. El subsiguiente agregado de medio isosmótico provocó una disminución de volumen a valores control.

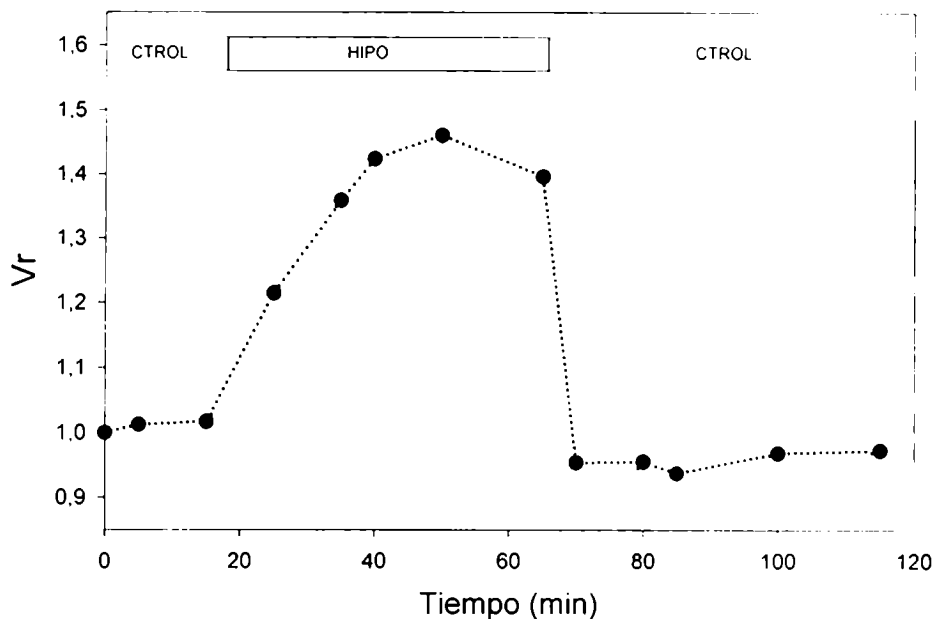


Figura 14- Evolución temporal del volumen relativo de hepatocitos de goldfish expuestos a medios hiposmóticos. Las células fueron superfundidas 15 min con medio control (isomótico), durante 45 min con medio hiposmótico (180 mosM) y finalmente con medio isomótico nuevamente. Resultados obtenidos por videomicroscopía. Los resultados son medias \pm ESM de cuatro experimentos independientes. Magnificación: x300.

- *Cálculo de la permeabilidad osmótica (Pf) en hepatocitos de goldfish*

El cálculo de Pf requiere la medición precisa del cambio inicial de volumen cuando las células son sometidas a medios anisomóticos. Para ello se utilizó microscopía de epifluorescencia con alta frecuencia de registro (una medición por segundo). En estas condiciones, se determinó Pf de la pendiente inicial de aumento de volumen y de disminución del mismo cuando las células fueron expuestas a medios de osmolaridades en el rango de 120-503 mosM.

A modo ilustrativo, la Fig. 15 muestra los cambios de volumen que ocurren en hepatocitos de goldfish incubados en medio 85 % hiposmótico. Se observó que el Vr aumentó (ISO-HIPO) y disminuyó (HIPO-ISO) presentando pendientes similares en ambas fases. El Pf resultante fue $1.7 \cdot 10^{-3} \pm 2.7 \cdot 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$. Para el cálculo se utilizaron 17 células de 7 preparaciones independientes. Un ANOVA de una vía mostró que el valor de Pf fue independiente de la osmolaridad externa ($P = 0.30$).

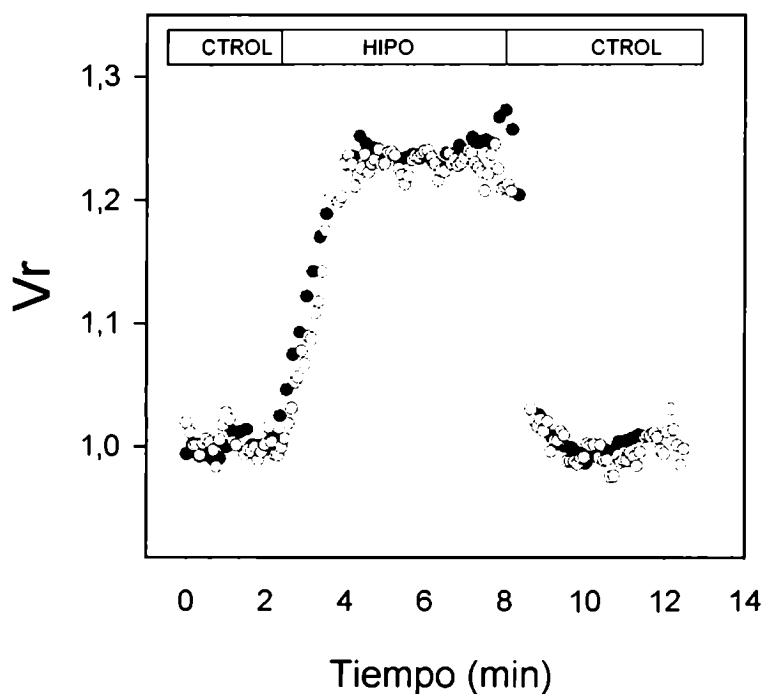


Figura 15. Evolución temporal del Vr de hepatocitos de goldfish. Resultados obtenidos por microscopía de epifluorescencia. Efecto del medio hiposmótico (255 mosM) sobre el volumen celular. Previo al experimento, las células fueron cargadas con calceína (●) o BCECF (○). Cada símbolo representa el volumen celular de una única célula.

- *Influjo y eflujo de K^+ en hepatocitos de goldfish*

Medios anisomóticos

En la Fig. 16 se muestra la magnitud del influjo y eflujo de K^+ en el tiempo, para hepatocitos de goldfish incubados en medio iso- e hiposmótico. En medio isosmótico el influjo de K^+ fue $0.35 \pm 0.12 \text{ nmol } 10^{-6} \text{ céls}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Fig. 16A), mientras que el eflujo fue $0.24 \pm 0.02 \text{ cpm } 10^{-6} \text{ céls}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Fig. 16B). Ninguno de los dos flujos unidireccionales fue alterado al incubar las células en medios hiposmóticos.

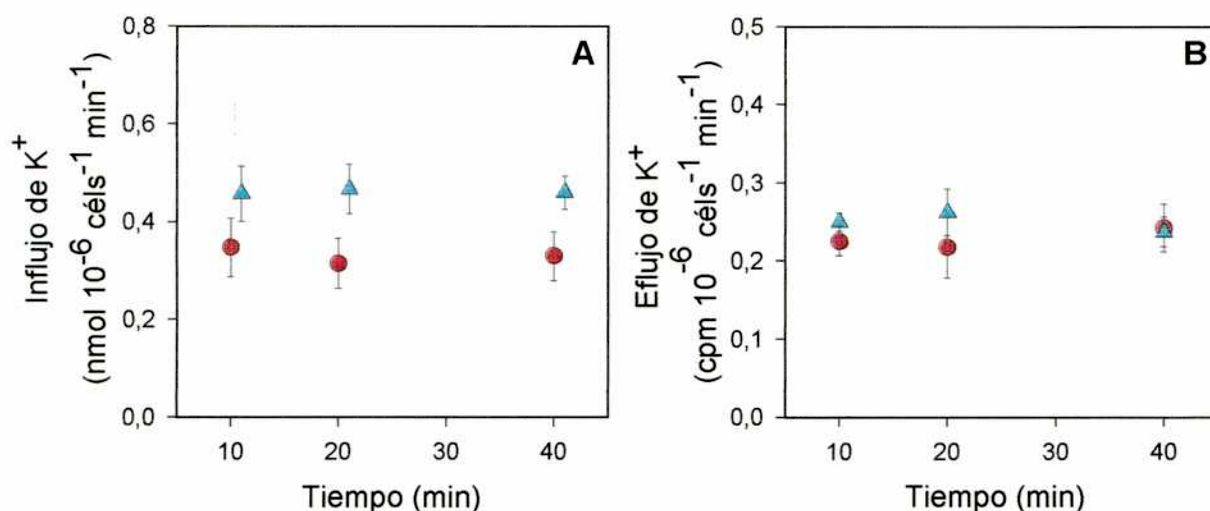


Figura 16. Influxo (A) y eflujo (B) de K⁺ en hepatocitos de goldfish expuestos durante 40 min a medio control (●) y 180 mosM (Δ). Los resultados son la media ± ESM de cuatro experimentos independientes.

Moduladores del eflujo de K⁺: pH extracelular alcalino y NEM (Fig. 17)

Con el agregado de NEM el eflujo de K⁺ aumentó a 0.45 ± 0.04 cpm 10^{-6} céls⁻¹ min⁻¹, es decir aprox. 3.3 veces el valor control.

En medio hiposmótico a pH 7.8 el eflujo de K⁺ fue $114 \pm 13\%$ mayor que en medio hiposmótico a pH=7.45.

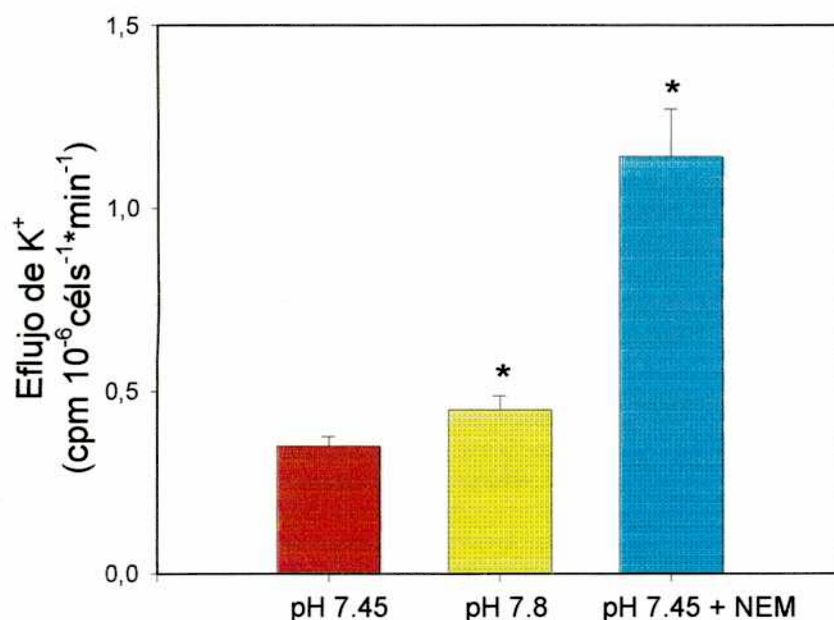


Figura 17. Eflujo de K⁺ en hepatocitos de goldfish expuestos a medio 180 mosM a pH 7.45, pH 7.8 o pH 7.45+ NEM. Los resultados son media+ESM de cuatro experimentos independientes. El asterisco indica $P < 0.05$ con respecto a los valores isosmóticos.

Discusión

En este capítulo, se muestra por primera vez la respuesta volumétrica que desarrollaron los hepatocitos de goldfish al ser sometidos a gradientes osmóticos transmembranales. Como se observa en la Fig. 12, la exposición de las células a un medio hiperosmótico provocó disminución de volumen hasta alcanzar un valor constante, sin presentar RVI. De manera recíproca, en presencia de medios hiposmóticos se produjo un aumento del volumen celular hasta valores constantes sin RVD.

El valor de Pf obtenido ($1.7 \cdot 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$) fue significativamente menor al valor reportado para hepatocitos de rata a la misma temperatura ($6.6 \cdot 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$; Yano y col., 1996), aunque se mantuvo en el mismo rango. Estos valores sugieren una permeabilidad al agua relativamente baja[#], lo que es en principio consistente con la ausencia posible de canales de agua en hepatocitos de vertebrados, ya que el Pf de una bicapa lipídica que no contiene canales de agua es menor a $5 \cdot 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$ (Verkman, 1993).

Los hepatocitos de goldfish aumentaron su volumen en medios hiposmóticos sin mostrar respuesta regulatoria de volumen. Antes de inferir las consecuencias fisiológicas de la falta de RVD, fue necesario validar este resultado con diversos experimentos.

Primeramente se verificó que la utilización de colagenasa para el aislamiento de hepatocitos no hubiera eliminado algún elemento de la membrana que impidiera la RVD. Cuando los hepatocitos de goldfish fueron aislados con un medio libre de colagenasa, y luego expuestos a medio hiposmótico, la respuesta volumétrica fue similar a aquella observada en hepatocitos aislados en presencia de la enzima (Fig. 13A). Así quedó demostrado que la presencia de colagenasa en el medio de aislamiento no provocaba la ausencia de RVD.

El paso siguiente fue realizar estudios comparativos utilizando hepatocitos de trucha y rata, para los cuales se sabía previamente que presentaban RVD luego de la incubación en medios hiposmóticos (Bianchini y col., 1988; Gores y col., 1989; Corassanti y col., 1990). La utilización de estas células con el mismo sistema de medición utilizado con los hepatocitos de goldfish permitiría validar la técnica utilizada. En la Fig. 13B se observa

[#] Si bien la permeabilidad osmótica es baja en comparación con otros valores del mismo parámetro, el valor obtenido para el hepatocito de goldfish sigue siendo alto en comparación con la permeabilidad iónica del mismo sistema.

que tanto los hepatocitos de rata como los de trucha presentaron RVD al ser superfundidos con medios hiposmóticos. Es decir que la medición de cambios de volumen por videomicroscopía permitió detectar la ausencia o presencia de respuesta regulatoria de volumen.

El mecanismo efector de RVD

La pérdida de K^+ parece ser el mecanismo efector principal en el desarrollo de RVD en muchos tipos celulares de vertebrados. Utilizando técnicas de electrofisiología, Wang y Wondergem (1993) demostraron que en hepatocitos de rata el edema celular estaba asociado a un aumento de la permeabilidad del K^+ . Por otro lado Bianchini y col. (1988) demostraron que en hepatocitos de trucha, la incubación en medios hiposmóticos producía un aumento del V_r y de la permeabilidad al K^+ . El eflujo de K^+ resultante era 7 veces superior al influjo del catión, generando salida de K^+ seguida de agua.

La respuesta de hepatocitos de goldfish fue diferente. Los resultados del presente estudio muestran que la exposición a medios hiposmóticos de estas células no provocó desacople de los flujos de K^+ y consecuentemente no se produjo RVD (Fig. 16). La falta de RVD en medios hiposmóticos también fue reportada en células de mucosa intestinal de goldfish (Groot, 1981). Sin embargo, esta respuesta no puede generalizarse a todas las células de goldfish ya que en túbulos renales (Fugelli y col., 1995) y glóbulos rojos (Catlett y Millich, 1976) la disminución del volumen de células hinchadas se produjo como resultado de eflujo neto de KCl y agua.

La ausencia de RVD de células de goldfish expuestas a medio hiposmótico pudo deberse a la inexistencia del mecanismo efector o a la falta de activación del mismo. Para verificar la presencia del mecanismo efector, se indujo la salida de K^+ de dos formas distintas. Por un lado se utilizó NEM, un conocido activador del cotransportador KCl (Bianchini y col., 1988, Jensen, 1994; Bogdanova y Nikinmaa, 2001). En células de goldfish hinchadas, la activación farmacológica de la salida de KCl –por NEM– debería inducir RVD. Por otro lado, se intentó inducir la salida de K^+ incubando a los hepatocitos de goldfish en medios hiposmóticos pero a pH alcalinos. Este tratamiento se basa en resultados utilizando glóbulos rojos de carpa (especie que pertenece a la familia *Cyprinidae* al igual que el goldfish) que muestran la activación del eflujo de K^+ cuando se aumenta el pH extracelular

de 7.6 a 7.8 (Jensen, 1994). Si en células de goldfish expuestas a medios hiposmóticos a pH 7.8 se activara la salida de K^+ , entonces podría observarse la presencia de RVD.

Los experimentos en presencia de NEM mostraron un aumento en el eflujo de K^+ , indicando que en principio el mecanismo efector de RVD estaría presente en los hepatocitos de goldfish (Fig. 17).

La incubación de hepatocitos de goldfish en medios hiposmóticos a pH=7.8 mostró hinchazón celular seguida de una leve regulación del volumen (Fig. 13B) y un aumento en el eflujo de K^+ (Fig. 17). Es decir, en medios alcalinos, a diferencia de los resultados en medios a pH=7.45 (ver Fig. 19), la respuesta regulatoria de volumen correlacionó directamente con un aumento en el eflujo de K^+ .

Se podría hipotetizar que la falta de RVD en hepatocitos de goldfish sometidos a medio hiposmótico podría deberse a la aparición de cambios irreversibles en estas células. Sin embargo, la exposición secuencial de hepatocitos a medios iso-, hipo- e isosmóticos (Figs. 14 y 15) mostró que el aumento volumétrico de células en medios hiposmóticos fue reversible.

Hasta aquí los experimentos de validación indicaban que la ausencia de RVD no era resultado de algún tipo de artificio.

La última validación realizada estuvo relacionada con los métodos utilizados para medir el volumen celular. Los mismos se encuentran divididos en dos categorías principales (Alvarez Leefmans y Reuss, 1996): a) aquellos que estiman el volumen celular total, y b) los que estiman el volumen de agua intracelular.

Un ejemplo de los primeros es la videomicroscopía donde se obtiene una imagen plana de la célula en estudio. Si la forma de la célula se asemeja a la de una figura geométrica (como una esfera en nuestro caso), conociendo una o dos de sus dimensiones puede calcularse el volumen celular total. El segundo método consiste en estimar el volumen de agua intracelular a partir de la concentración de un marcador de volumen intracelular. En el caso de la microscopía de epifluorescencia la calceína es un marcador apropiado para este tipo de mediciones.

Dado que ambos métodos permiten estimar el volumen celular por medio de principios totalmente independientes, se volvieron a exponer hepatocitos de goldfish a medios hiposmóticos pero esta vez se midió el volumen celular por microscopía de epifluorescencia. Los experimentos (Fig. 15) demostraron que la ausencia de RVD fue independiente de la técnica de medición empleada. Más aún, la utilización de BCECF en

lugar de calceína mostró que los cambios de volumen estimados por microscopía de epifluorescencia fueron independientes del fluorocromo empleado (Fig. 15).

Capítulo III

Modelo matemático

Introducción

Las propiedades dinámicas de las células están determinadas por el funcionamiento integrado de procesos de transporte a través de la membrana celular (Fig. 18). Todos los componentes del sistema "célula" interaccionan entre si haciendo muy difícil analizar procesos aislados. Un ejemplo de esta dificultad se observa con el funcionamiento de la Na^+/K^+ -ATPasa. Además de su efecto electrogénico esta enzima actúa como una bomba osmótica (Alvarez Leefmans y Reuss, 1996) expulsando un osmolito en cada ciclo de reacción y contribuyendo así al mantenimiento del volumen celular (Baumgarten y col., 1995). El funcionamiento de la Na^+/K^+ -ATPasa contribuye al potencial de membrana, el cual a su vez afecta varios pasos del ciclo de reacción de la bomba. Por otro lado, los cambios de volumen alteran la concentración de los iones difusibles, y esos cambios en las concentraciones modifican el potencial de membrana, el que a su vez puede afectar el volumen celular.

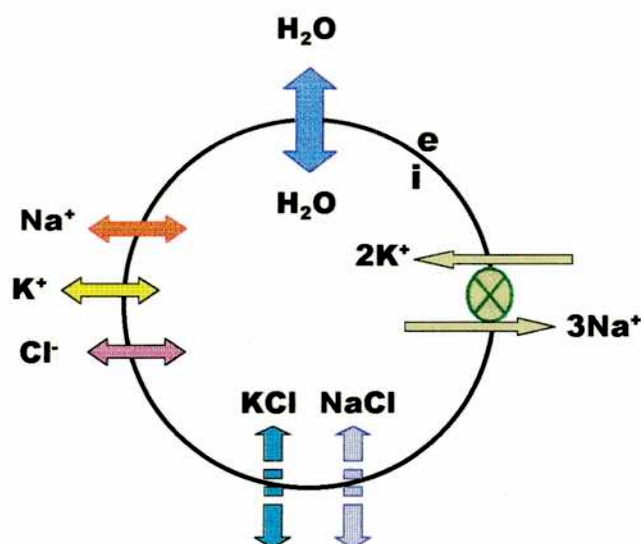


Figura 18. Esquema de los distintos flujos de solutos a través de la membrana plasmática celular (i= intracelular, e= extracelular). Se incluye Na^+/K^+ -ATPasa con estequiometría $3\text{Na}^+:2\text{K}^+$, la difusión de Na^+ , Cl^- , K^+ , y agua (flechas continuas) y los flujos de NaCl y KCl activables por cambios de volumen (flechas discontinuas).

Para superar esta aparente complejidad y poder entender mejor los mecanismos involucrados en los cambios de volumen celular, se construyó un modelo matemático (basado en un modelo postulado por Hernández y Cristina, 1998) que permite simular las

interacciones entre el volumen celular, el potencial de membrana y los flujos de los principales iones difusibles. De esta manera se identificaron los mecanismos involucrados en la respuesta de volumen de los hepatocitos frente a medios anisomóticos.

Un aspecto clave del modelo es la posibilidad de simular la RVD a través de una función umbral. Es decir, luego de la exposición de las células a medios hiposmóticos, el modelo predice el flujo de entrada de agua y el aumento de volumen resultante. Cuando el valor de volumen coincide con un valor prefijado llamado "sensor de volumen" (v_{se}), y luego de un tiempo de retardo (LAG), el modelo activa el eflujo de K^+ y Cl^- , permitiendo la RVD.

La validez del modelo fue probada ajustando las simulaciones a los datos experimentales.

Objetivos

- ❖ Desarrollar un modelo matemático que permita simular la evolución temporal del volumen celular, el potencial de membrana y la masa de los principales iones difusibles cuando los hepatocitos de goldfish, trucha y rata son expuestos a medios anisomóticos variables.

• *Características del modelo*

El modelo consiste de:

- 1- ecuaciones diferenciales ordinarias que describen el cambio en el tiempo del volumen celular y de las masas de Na^+ , K^+ y Cl^- .
- 2- ecuaciones algebraicas que describen la evolución temporal del potencial de membrana y de los flujos iónicos.

El modelo se integró numéricamente con el fin de simular el comportamiento dinámico de las células utilizando el programa SCoP (versión 3.51; Simulation Resources, Inc., Redlands, CA). Los ajustes se realizaron mediante la rutina SCoPfit, la cual utiliza cuadrados mínimos para buscar los valores de los parámetros que minimizan una función error. Este último procedimiento fue denominado ajuste modelo dependiente, para

enfaticar el hecho de que durante el ajuste las constantes y restricciones impuestas por el modelo matemático fueron tomadas en cuenta.

Para el flujo de la Na^+/K^+ -ATPasa (J_p), se dedujo una expresión en estado estacionario utilizando el programa Mathematica (versión 2.2.1).

El modelo matemático permite simular los cambios en el tiempo del volumen celular y las concentraciones de los principales iones difusibles cuando las células son expuestas a gradientes osmóticos. Los símbolos y las abreviaturas utilizadas se encuentran definidas en la Tabla 2.

Tabla 2. Parámetros y variables utilizados en el modelo matemático

Parámetros	
Ac	Area permeable efectiva de la superficie celular
$P_{\text{Na}^+}, P_{\text{K}^+}, P_{\text{Cl}^-}$	Coefficientes de permeabilidad de $\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{Cl}^-$
Pf	Permeabilidad osmótica
vse	Sensor de volumen o valor umbral del volumen celular
$\text{Na}^+_o, \text{K}^+_o, \text{Cl}^-_o$	Concentraciones extracelulares de Na^+, K^+ y Cl^- bajo condiciones isosmóticas
OSMo	Osmolaridad extracelular
X_i	Cantidad total de solutos impermeables intracelulares
mATP, mADP, mPi	Masas intracelulares de ATP, ADP, y Pi
f1 ..., f6	Constantes de la transición N1,..., N6 para el ciclo de reacción de la Na^+/K^+ -ATPasa
b1..., b6	Constantes de la transición N6,...,N1 para el ciclo de reacción de la Na^+/K^+ -ATPasa
Keq	Constante de equilibrio de hidrólisis de la reacción $\text{ATP} \leftrightarrow \text{ADP} + \text{Pi}$
ET	Cantidad total de Na^+/K^+ -ATPasa por unidad de área
Z	Parámetro cinético del $J_{\text{K}^+:\text{Cl}^-}$ inducido por el volumen celular
Variables principales	
Vr	Volumen relativo
$m\text{Na}^+, m\text{K}^+, m\text{Cl}^-, m\text{ALA}$	Masas intracelulares de $\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{Cl}^-$ y L-alanina
$\text{Na}^+_i, \text{K}^+_i, \text{Cl}^-_i, \text{Pi}, \text{ADP}, \text{ATP}$	Concentraciones intracelulares de $\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{Cl}^-$, fosfato, ADP y ATP
Vm	Diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana celular
t	Tiempo
J_p	Flujo de la Na^+/K^+ -ATPasa
$J_{\text{Na}^+}, J_{\text{K}^+}, J_{\text{Cl}^-}$	Flujos electrodifusionales de Na^+, K^+ y Cl^-
$J_{\text{K}^+:\text{Cl}^-}$	Flujos de K^+ y Cl^- inducidos por el volumen celular
$J_{\text{ALA}:\text{Na}^+}$	Flujo de L-alanina cotransportado con Na^+

En el modelo se asume que: a) dentro de la célula existe una cantidad fija de aniones impermeables monovalentes. b) Na^+, K^+ y Cl^- son los únicos iones difusibles presentes. c) Na^+ y K^+ se mueven pasivamente en respuesta a sus gradientes electroquímicos y además son transportados activamente por la Na^+/K^+ -ATPasa con una estequiometría de $3 \text{Na}^+ / 2 \text{K}^+$. Esta relación se mantiene fija a lo largo de toda la simulación. d) Cl^- y el agua

se mueven solo pasivamente. e) una función umbral activa un cotransporte electroneutro de KCl que de otro modo se encuentra silenciado (estequiometría 1:1). f) cuando en el medio externo se encuentra presente L-alanina, ésta es cotransportada junto con el Na⁺ al interior de la célula con una estequiometría 1:1. g) debido a la ausencia de reacciones que involucren el metabolismo energético, las masas intracelulares de ATP, ADP y Pi se mantienen constantes; así sus concentraciones sólo pueden ser modificadas por un cambio en el volumen de la célula. h) el área total de la superficie celular sensible al transporte de solutos y agua (Ac) se mantiene constante e independiente de los cambios en el volumen celular.

El siguiente sistema de ecuaciones controla las velocidades de cambio de V, Vm y las masas de los solutos difusibles.

$$\frac{d(V)}{dt} = Ac \times V_w \times Pf \times \left(\frac{X_i + m_{Na^+} + m_{K^+} + m_{Cl^-} + m_{ALA}}{V} - OSM_o \right) \quad (1)$$

$$\frac{d(m_{Cl^-})}{dt} = Ac \times (J_{Cl^-} + J_{K^+Cl^-}) \quad (2)$$

$$\frac{d(m_{Na^+})}{dt} = Ac \times (-3 \times J_p + J_{Na^+} + J_{Na^+ALA}) \quad (3)$$

$$\frac{d(m_{K^+})}{dt} = Ac \times (2 \times J_p + J_{K^+} + J_{K^+Cl^-}) \quad (4)$$

$$\frac{d(m_{ALA})}{dt} = Ac \times J_{ALA} \quad (5)$$

En la Ec. 1, los coeficientes de reflexión de todos los solutos se consideran iguales a la unidad. La osmolaridad externa (OSMo) es considerada constante. La expresión “(Xi + m_{Na⁺} + m_{K⁺} + m_{Cl⁻} + m_{ALA})/V” define la osmolaridad intracelular (OSMi). El producto “Pf x (OSMi – OSMo)” representa el flujo de agua: cuando, por ejemplo OSMi < OSMo, el flujo de agua es negativo, así se verifica la salida de agua y la célula se encoge hasta que las osmolaridades llegan a ser iguales a ambos lados de la membrana celular.

Considerando la estequiometría de la Na⁺/K⁺-ATPasa (3Na⁺/2K⁺), Jp fue multiplicado por “-3” (Ec. 3) y por “2” (Ec. 4) con el fin de convertir los moles de ATP a moles de Na⁺ y K⁺, respectivamente.

La consistencia fisicoquímica del modelo fue probada como se describe en detalle en Cristina y Hernández (1998).

Flujos iónicos

Los flujos de los iones difusibles están determinados por la expresión de Goldman.

$$J_{Na^+} = P_{Na^+} \times [Na^+{}_o - (m_{Na^+}/V) \times e^u] \times u / (e^u - 1) \quad (6)$$

$$J_{Cl^-} = P_{Cl^-} \times [Cl^-{}_o \times e^u - (m_{Cl^-}/V)] \times u / (e^u - 1) \quad (7)$$

$$J_{K^+} = P_{K^+} \times [K^+{}_o - (m_{K^+}/V) \times e^u] \times u / (e^u - 1) \quad (8)$$

con

$$u = F \times Vm / (R \times T)$$

Se supuso que Ac es constante e igual para todas las sustancias que son transportadas, aunque se sabe que los iones son transportados a través de proteínas transportadoras específicas, y que debido a ello en una situación real Ac podría variar considerablemente con el tipo de ión. Es por ello que los flujos, así como las permeabilidades, son *aparentes*. Si durante el cambio de volumen los transportadores no fueran sintetizados *de novo*, ni destruidos, Ac se mantendría constante.

Potencial de membrana (Vm)

Debido a que los cambios en el Vm ocurren a mayor velocidad que los cambios de V y de la concentración intracelular de los iones, se supone que en todo momento el Vm se encuentra en un pseudo-estado estacionario definido por la permeabilidad de los iones, el flujo de la Na^+/K^+ -ATPasa y los gradientes de concentración. Como en Hernandez y Cristina (1998), se asume que las actividades de los iones son iguales a la concentración de los mismos, los que se expresan como masa dividida por el volumen*. La ecuación 9 es en esencia la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz para el valor de estado estacionario del Vm (Goldman, 1943; Hodgkin y Katz, 1949), con el agregado de " $(-Jp \times (e^u - 1)/u)$ " para incluir el efecto electrogénico de Jp sobre Vm .

* Por ejemplo, la expresión " m_{Cl^-}/V " define la concentración de cloruros

$$V_m = \frac{R \times T}{F} \times \ln \left[\frac{-J_p \times \frac{e^u - 1}{u} + P_{Na^+} \times Na^+_o + P_{K^+} \times K^+_o + P_{Cl^-} \times \frac{m_{Cl^-}}{V_c}}{P_{Na^+} \times \frac{m_{Na^+}}{V} + P_{K^+} \times \frac{m_{K^+}}{V} + P_{Cl^-} \times Cl^-_o} \right] \quad (9)$$

V_m es la diferencia de potencial eléctrico (o potencial de membrana) a través de la membrana plasmática.

Flujo de la Na^+/K^+ -ATPasa (J_p)

Como en el caso del V_m , la llegada a un estado estacionario del flujo de la Na^+/K^+ -ATPasa es también un evento rápido cuando se lo compara con los cambios que ocurren en V y en las concentraciones iónicas intracelulares. Esta es la razón por la que se derivó la expresión de estado estacionario de J_p que corresponde al modelo descrito por Chapman y col. (1983; ver también Hernández y col., 1989). La expresión de estado estacionario también evita el problema de agregar nuevas ecuaciones diferenciales al modelo. Las expresiones de la forma " $(e^{u/2})^n$ " aparecen en la formulación general de J_p ya que en el modelo V_m se encuentra afectando dos pasos elementales del ciclo de reacción de la Na^+/K^+ -ATPasa (pasos 3 y 5 en Fig. 19). Para mantener la expresión del flujo de la Na^+/K^+ -ATPasa lo más simple posible, la concentración de cada componente intracelular fue utilizada en lugar de usar su masa y volumen respectivos.

El flujo estacionario de la Na^+/K^+ -ATPasa es el siguiente:

$$J_p = \frac{n}{\sum_{i=1}^{23} c_i d_i} \quad (10)$$

con

$$n = ET \times [-(ADP \times b_1 \times b_2 \times b_3 \times b_4 \times b_5 \times b_6 \times K^+ i^2 \times Na^+ o^3 \times Pi) + ATP \times f_2 \times f_3 \times f_4 \times f_5 \times f_6 \times K^+ o^2 \times Na^+ i^3 \times (e^{u/2})^4]$$

y con las expresiones para c_i y d_i que se detallan a continuación.

I	Ligandos que multiplican (c_i)	Coficiente (d_i)
1	ATP x ADP x Na ⁺ o ³	$b_1 \times b_2 \times b_3 \times f_5 \times f_6 \times (e^{u/2})^2$
2	ATP x ADP x Na ⁺ o ³ x K ⁺ i ²	$b_1 \times b_2 \times b_3 \times b_6 \times f_5 \times (e^{u/2})^2$
3	ATP x ADP x K ⁺ i ² x Ko ²	$b_1 \times b_2 \times b_6 \times f_4 \times f_5 \times (e^{u/2})^3$
4	ATP x ADP x K ⁺ o ²	$b_1 \times b_2 \times f_4 \times f_5 \times f_6 \times (e^{u/2})^3$
5	ATP x K ⁺ i ² x K ⁺ o ²	$(b_1 + f_2) \times b_6 \times f_3 \times f_4 \times f_5 \times (e^{u/2})^4$
6	ATP x K ⁺ o ²	$(b_1 + f_2) \times f_3 \times f_4 \times f_5 \times f_6 \times (e^{u/2})^4$
7	ATP x ADP x Na ⁺ i ³ x Na ⁺ o ³	$b_2 \times b_3 \times f_1 \times f_5 \times f_6 \times (e^{u/2})^2$
8	ATP x ADP x Na ⁺ i ³ x K ⁺ o ²	$b_2 \times f_1 \times f_4 \times f_5 \times f_6 \times (e^{u/2})^3$
9	ATP x Na ⁺ i ³	$f_1 \times f_2 \times f_3 \times f_5 \times f_6 \times (e^{u/2})^4$
10	ATP x Na ⁺ i ³ x Na ⁺ o ³	$b_3 \times f_1 \times f_2 \times f_5 \times f_6 \times (e^{u/2})^2$
11	ATP x Na ⁺ i ³ x K ⁺ o ²	$f_1 \times f_4 \times f_5 \times (e^{u/2})^3 \times [f_2 \times f_6 + f_3 \times (f_2 + f_6) \times e^{u/2}]$
12	ADP x Pi x Na ⁺ i ³ x Na ⁺ o ³	$(f_6 \times e^{u/2} + b_5) \times b_2 \times b_3 \times b_4 \times f_1$
13	Pi x Na ⁺ i ³	$(b_5 + f_6 \times e^{u/2}) \times b_4 \times f_1 \times f_2 \times f_3 \times (e^{u/2})^2$
14	Pi x Na ⁺ i ³ x Na ⁺ o ³	$(b_5 + f_6 \times e^{u/2}) \times b_3 \times b_4 \times f_1 \times f_2$
15	Na ⁺ i ³ x K ⁺ o ²	$(b_5 + f_6 \times e^{u/2}) \times f_1 \times f_2 \times f_3 \times f_4 \times (e^{u/2})^2$
16	ADP x Pi x Na ⁺ o ³	$(f_6 \times e^{u/2} + b_5) \times b_1 \times b_2 \times b_3 \times b_4$
17	ADP x Pi x Na ⁺ o ³ x K ⁺ i ²	$(b_1 \times e^{u/2} + b_5) \times b_2 \times b_3 \times b_4 \times b_6$
18	ADP x Pi x K ⁺ i ²	$b_1 \times b_2 \times b_4 \times b_5 \times b_6 \times e^{u/2}$
19	ADP x Na ⁺ o ³ x K ⁺ i ²	$b_1 \times b_2 \times b_3 \times b_5 \times b_6$
20	ADP x K ⁺ i ² x K ⁺ o ²	$b_1 \times b_2 \times b_5 \times b_6 \times f_4 \times e^{u/2}$
21	Pi x Na ⁺ o ³ x K ⁺ i ²	$(b_1 + f_2) \times b_3 \times b_4 \times b_5 \times b_6$
22	Pi x K ⁺ i ²	$(b_1 + f_2) \times b_4 \times b_5 \times b_6 \times f_3 \times (e^{u/2})^2$
23	K ⁺ i ² x K ⁺ o ²	$(b_1 + f_2) \times b_5 \times b_6 \times f_3 \times f_4 \times (e^{u/2})^2$

En donde

$$Km_{ATP} = \frac{\sum_{i=12}^{23} c_i d_i}{\left(\sum_{i=1}^{11} c_i d_i / ATP\right)}$$

y

$$K_{0.5Na+i} = \left[\frac{\sum_{i=1}^6 c_i d_i + \sum_{i=16}^{23} c_i d_i}{\left(\sum_{i=7}^{15} c_i d_i / Na+i^3\right)} \right]^{1.3}$$

Activación de la respuesta regulatoria de volumen a través de una función umbral

Además de las expresiones para J_{K^+} (Ec. 6) y J_{Cl^-} (Ec. 7), se supuso la existencia de un flujo de potasio y cloruro adicional ($J_{K^+:Cl^-}$) que solo puede ser activado cuando el V alcanza un valor igual al de un sensor de volumen (vse).

Si $V > vse$ (11)

$$J_{K^+:Cl^-} = Z \times (V - vse) / vse \times (K^+o \times Cl^-o - mK^+ \times mCl^-/V^2)$$
 (12)

El parámetro "Z" tiene en cuenta la densidad de transportadores de K^+ y Cl^- .

Cuando $V > vse$, un cierto retardo en el tiempo (LAG) es introducido antes de que pueda ser activado $J_{K^+:Cl^-}$. En ausencia del vse, la RVD es inexistente. Alternativamente, la ecuación 12 muestra que la RVD puede ser bloqueada si Z es igual a cero, si $V=vse$ o si no se encuentran presentes el K^+ o el Cl^- .

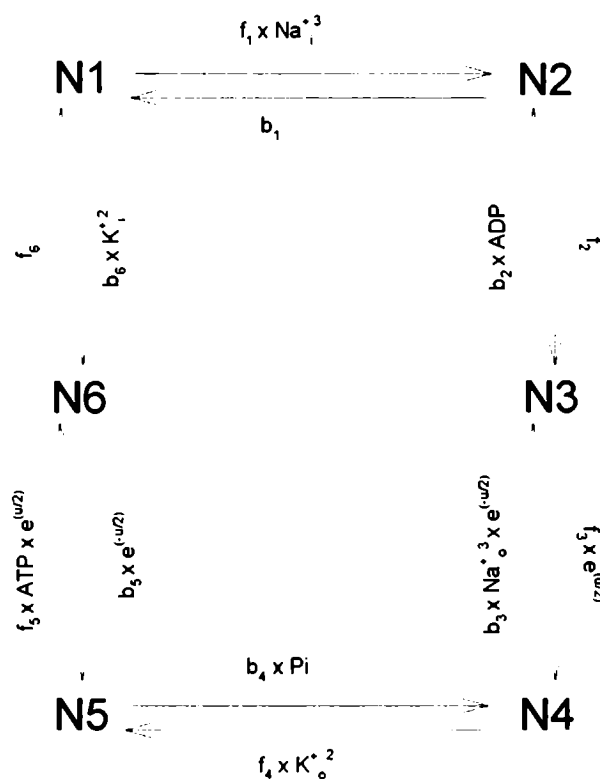


Figura 19. Esquema de reacción en seis pasos elementales para el transporte activo de Na^+ - K^+ por la Na^+/K^+ -ATPasa (Hernández y col., 1989 y Hernández y Cristina, 1998). Este ciclo de reacción fue utilizado para deducir la expresión de estado estacionario del flujo de la Na^+/K^+ -ATPasa (J_p) que se utiliza en la Ec. 10.

N1 , ..., N6 son intermediarios del ciclo de reacción de la enzima. Na_i^+ , K_i^+ , Na_o^+ , K_o^+ son las concentraciones intracelulares y extracelulares de Na^+ y K^+ , respectivamente. El símbolo "u" representa $F \times V_m / (R \times T)$. Los símbolos f_1, \dots, f_6 y b_1, \dots, b_6 representan las constantes elementales de cada uno de los pasos del ciclo de reacción.

RESULTADOS

- *Cambios de volumen en hepatocitos de goldfish.*

Los símbolos de la Fig. 20 muestran los resultados experimentales de V_r vs tiempo para hepatocitos incubados en medios anisomóticos (idem Fig. 12, Capítulo II). Las líneas continuas representan el ajuste modelo dependiente a los datos experimentales, con los valores y parámetros de mejor ajuste que se muestran en las Tablas 3 y 4.

Puede observarse que la disminución del V_r predicha por el modelo para células en medio hiperosmótico es mayor que la observada experimentalmente. Excepto por este caso, las restantes simulaciones ajustaron bien a los datos experimentales.

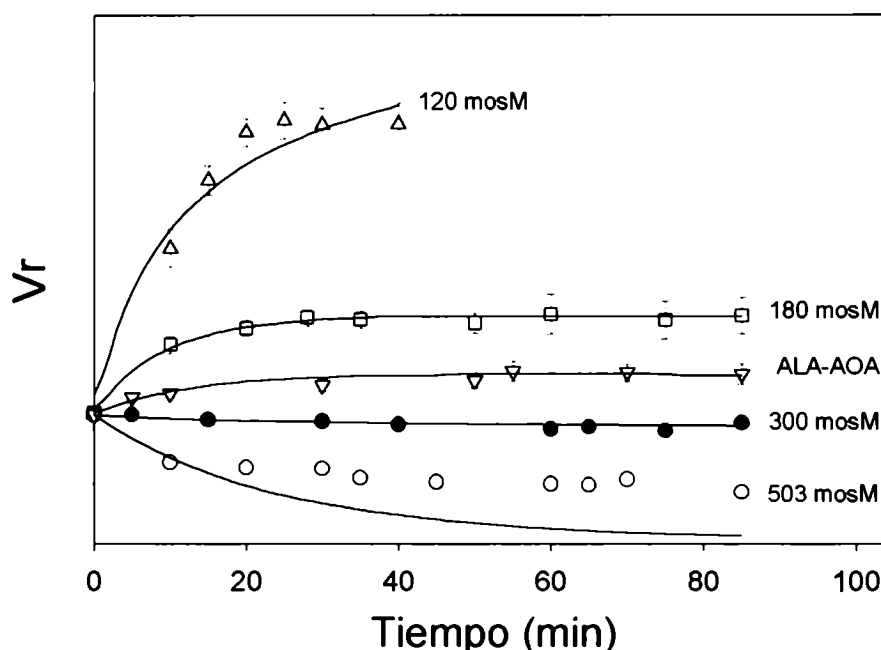


Figura 20. Volumen relativo en función del tiempo en hepatocitos de goldfish. El V_r se calculó a partir de los resultados experimentales presentados en la Fig.12, Cap. II. Las células fueron expuestas a medios 120 mosM (Δ), 180 mosM (\square), 300 mosM (\bullet), 503 mosM (\circ) y a ALA-AOA (∇). Los resultados son medias \pm ESM de cuatro experimentos independientes. Las líneas continuas representan el ajuste dependiente del modelo con los valores de los parámetros de las tablas Tablas 3 y 4.

En la Fig. 21 se observan resultados de experimentos similares a los de la Fig. 20, es decir, V_r vs t para las células de goldfish incubadas en medios anisomóticos, pero utilizando microscopía de epifluorescencia en lugar de videomicroscopía. Se observa la respuesta volumétrica reversible que presentan los hepatocitos de goldfish al ser expuestos con medios iso, hipo e isosmótico. La línea continua muestra el ajuste modelo dependiente a los datos experimentales, utilizando un valor de P_f similar al obtenido experimentalmente (entre $1.4 \cdot 10^{-3}$ y $1.7 \cdot 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$).

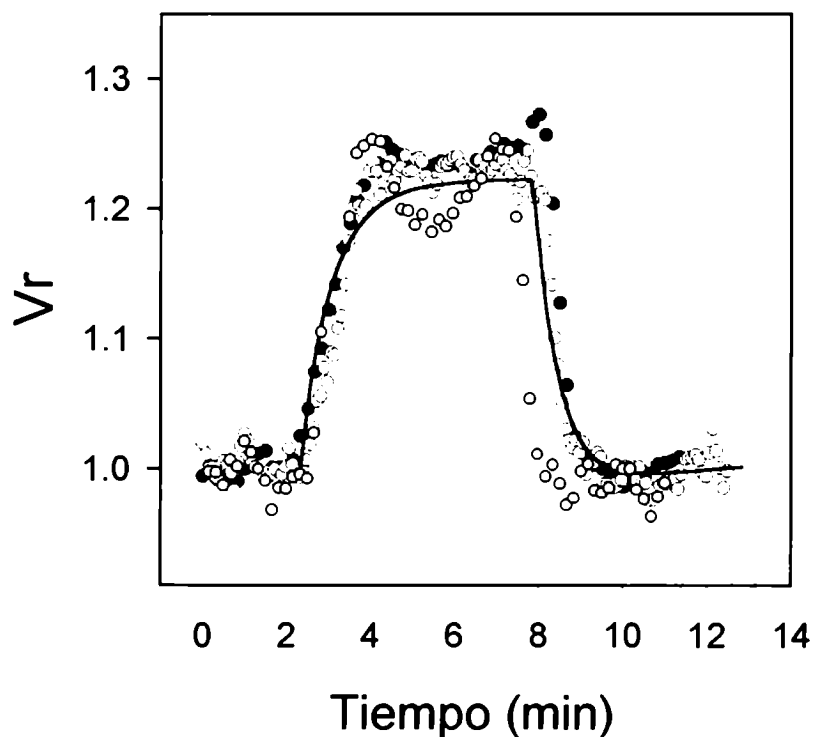


Figura 21. Variaciones de volumen relativo en el tiempo de hepatocitos de goldfish sometidos a medios iso-, hipo- (255 mosM) e isosmótico. Resultados obtenidos por microscopía de epifluorescencia de acuerdo a lo descrito en el Cap. II. Efecto de medio hiposmótico (255 mosM) sobre el volumen celular. Cada símbolo representa el volumen celular de una única célula. La línea continua representa el ajuste modelo dependiente a un los datos experimentales.

- *Influjo y eflujo de K^+*

En presencia de medios hiposmóticos y en ausencia de vse el modelo matemático predijo que V_r aumentaba de manera no lineal hacia un valor constante (Fig. 22A). Por el

Tabla 3. Resultados de los ajustes modelo dependientes del volumen de hepatocitos de goldfish expuestos a medios anisomóticos y a ALA-AOA. Los valores que se muestran fueron obtenidos luego de 100 min de exposición a los distintos medios.

Valores de las principales variables					
	120 mosM	180 mosM	ALA-AOA	503 mosM	UNIDADES
V	$3.94 \cdot 10^{-9}$	$2.01 \cdot 10^{-9}$	$1.63 \cdot 10^{-9}$	$5.42 \cdot 10^{-10}$	cm ³
Jp	$1.03 \cdot 10^{-12}$	$9.87 \cdot 10^{-13}$	$1.28 \cdot 10^{-12}$	$1.21 \cdot 10^{-12}$	mol cm ² s ⁻¹
Vm	$-3.6 \cdot 10^{-2}$	$-3.2 \cdot 10^{-2}$	$-3.7 \cdot 10^{-2}$	$-4.9 \cdot 10^{-2}$	V
Na ⁺ _i	$5.4 \cdot 10^{-6}$	$7.8 \cdot 10^{-6}$	$1.1 \cdot 10^{-5}$	$2.6 \cdot 10^{-5}$	mol cm ⁻³
K ⁺ _i	$5.6 \cdot 10^{-5}$	$8.7 \cdot 10^{-5}$	$1.1 \cdot 10^{-4}$	$1.8 \cdot 10^{-4}$	mol cm ⁻³
Cl ⁻ _i	$3.5 \cdot 10^{-5}$	$4.2 \cdot 10^{-5}$	$3.4 \cdot 10^{-5}$	$2.2 \cdot 10^{-5}$	mol cm ⁻³
ALA _i	0	0	$2.4 \cdot 10^{-5}$	0	mol cm ⁻³

V= volumen celular , Jp= flujo de la Na⁺/K⁺-ATPasa, Vm= potencial de membrana. Na⁺_i, K⁺_i, Cl⁻_i y ALA_i indican las concentraciones intracelulares de sodio, potasio, cloruro y L-alanina, respectivamente. ALA-AOA indica el medio isomótico en presencia de 10 mM L-alanina mas 2.5 mM de ácido aminooxiacético. Valores de referencia (t= 0) de las principales variables: V= $1.36 \cdot 10^{-9}$ cm³, Jp= $1.90 \cdot 10^{-12}$ mol cm⁻²s⁻¹, Vm= $-2.1 \cdot 10^{-2}$ V, Na⁺_i= $1.6 \cdot 10^{-5}$ mol cm⁻³, K⁺_i= $1.3 \cdot 10^{-4}$ mol cm⁻³, Cl⁻_i= $6.7 \cdot 10^{-5}$ mol cm⁻³, ALA_i= 0.

Tabla 4. Valores de los parámetros utilizados para el modelo matemático de hepatocitos de goldfish.

Parámetro	Valor	Referencia
Ac	$5.94 \cdot 10^{-6}$ cm ²	este estudio
P _{Na+} , P _{K+} , P _{Cl-}	$1.15 \cdot 10^{-8}$ (f), $6 \cdot 10^{-8}$ (f), $9 \cdot 10^{-7}$ (f)	este estudio
Pf	$1.7 \cdot 10^{-3}$ cm s ⁻¹	este estudio
Na ⁺ _o , K ⁺ _o , Cl ⁻ _o	$1.465 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-6}$, $1.515 \cdot 10^{-4}$ mol cm ⁻³	este estudio
Xi	$1.12 \cdot 10^{-13}$ mol (f)	este estudio
OSMo	$3 \cdot 10^{-4}$ mol cm ⁻³	este estudio
f1	$2.5 \cdot 10^{20}$ cm ⁹ mol ⁻³ s ⁻¹	Chapman y col. 1983
f3	172 s ⁻¹	
f4	$1.5 \cdot 10^{-13}$ cm ⁶ mol ⁻² s ⁻¹	
f5	$2 \cdot 10^9$ cm ³ mol ⁻¹ s ⁻¹	
f6	$1.15 \cdot 10^4$ s ⁻¹	
B1	10 ⁵ s ⁻¹	
B2	10 ⁸ cm ³ mol ⁻¹ s ⁻¹	
B3	$1.72 \cdot 10^{13}$ cm ⁹ mol ⁻³ s ⁻¹	
B4	$2 \cdot 10^8$ cm ³ mol ⁻¹ s ⁻¹	
B5	30 s ⁻¹	
B6	$6 \cdot 10^{14}$ cm ⁶ mol ⁻² s ⁻¹	
Keq	239 mol cm ⁻³	Hernandez y Cristina 1998
ET	$2 \cdot 10^{-13}$ mol cm ⁻²	Schwarzbaum y col. 1992 (#)
mATP, mADP, mPi	$3.38 \cdot 10^{-15}$, $3 \cdot 10^{-15}$, $6.4 \cdot 10^{-15}$ mol	Krumschnabel y col. 1996, Van den Thillart y col. 1980
JALA	$1.21 \cdot 10^{-10}$ mol cm ⁻² (f)	este estudio

"f" indica los valores de los parámetros obtenidos por el ajuste dependiente del modelo. El valor de f2 se determinó por los valores de las constantes de reposo del ciclo de la Na⁺/K⁺-ATPasa y de Keq. # El valor de ET se derivó de los obtenidos para los hepatocitos de *Rutilus rutilus*, un teleosteo de agua dulce perteneciente a la misma familia que el goldfish.

contrario, la activación de RVD indujo un eflujo neto de KCl (llamado $J_{K^+:Cl^-}$ en el modelo, ver Fig. 22B) y un aumento de V_r que no ajustó a los resultados experimentales (Fig. 22A).

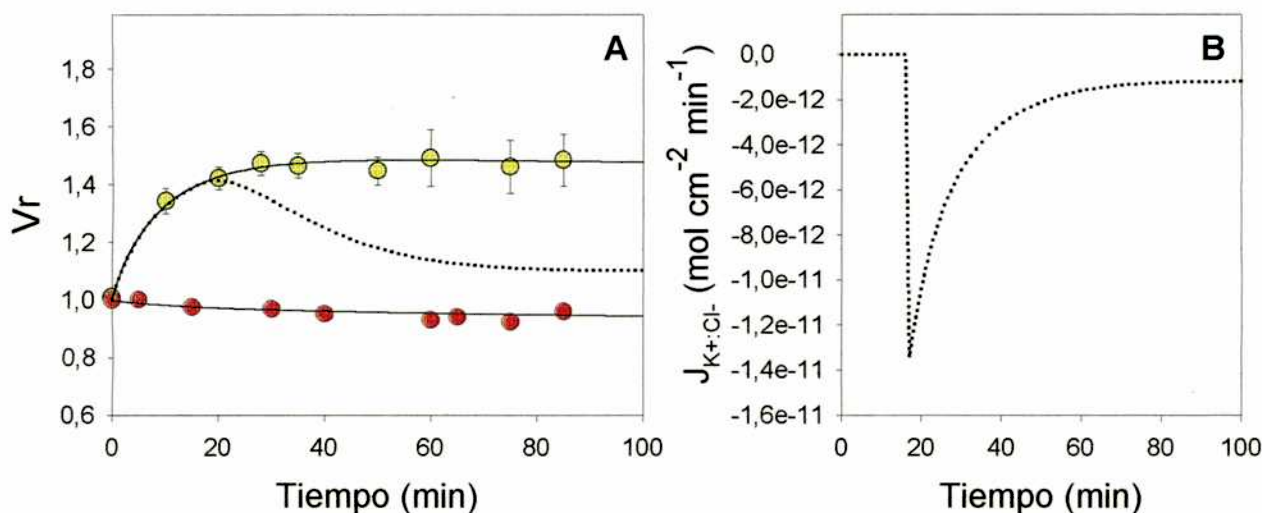


Figura 22. Resultados experimentales y teóricos de hepatocitos de goldfish expuestos a medio 180 mosM. A: Cambios de V_r vs tiempo de células expuestas a medio iso- (●) e hiposmótico (●). Los valores son medias \pm SEM de cuatro experimentos independientes. Las líneas continuas representan el ajuste dependiente del modelo a los resultados experimentales, con los valores de los parámetros y variables de las Tablas 3 y 4. La línea punteada indica la predicción hecha por el modelo matemático del cambio de volumen inducido hiposmóticamente en presencia de vse. B: Activación hipotética del $J_{K^+:Cl^-}$ que permitiría la respuesta RVD que se ilustra con línea punteada en A.

- *Cambios de volumen en hepatocitos de trucha y rata.*

En la Fig. 23, los símbolos representan los resultados experimentales de V_r vs tiempo para hepatocitos de trucha y rata sometidos a medios iso- e hiposmóticos (idem Fig. 13B, Cap. II).

Las líneas continuas de las Figs. 23A (rata) y 23C (trucha) representan el ajuste modelo dependiente de V_r vs t con los parámetros de mejor ajuste que se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados del ajuste modelo dependiente para hepatocitos de trucha y rata expuestos a medio 180 mosM. Los valores de las permeabilidades (cm s^{-1}) fueron: Trucha, $P_{K^+} = 6 \cdot 10^{-8}$, $P_{Na^+} = 1 \cdot 10^{-8}$ y $P_{Cl^-} = 1.5 \cdot 10^{-6}$. Rata, $P_{K^+} = 2.5 \cdot 10^{-7}$, $P_{Na^+} = 3 \cdot 10^{-8}$ y $P_{Cl^-} = 2.7 \cdot 10^{-6}$. El valor de vse para rata y trucha fue 1.02.

Valores de las principales variables			
Trucha			
	t = 0	t = $6 \cdot 10^3$ s	UNIDADES
V	$1.36 \cdot 10^{-9}$	$1.38 \cdot 10^{-9}$	cm^3
Jp	$3.67 \cdot 10^{-12}$	$6.69 \cdot 10^{-13}$	$\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$
Vm	$-2.3 \cdot 10^{-2}$	$-5.1 \cdot 10^{-2}$	V
Na ⁺ i	$1.8 \cdot 10^{-5}$	$1.7 \cdot 10^{-5}$	mol cm^{-3}
K ⁺ i	$1.3 \cdot 10^{-4}$	$7.9 \cdot 10^{-5}$	mol cm^{-3}
Cl ⁻ i	$6.2 \cdot 10^{-5}$	$1.9 \cdot 10^{-5}$	mol cm^{-3}
Rata			
	t = 0	t = $7.5 \cdot 10^3$ s	UNIDADES
V	$4.24 \cdot 10^{-9}$	$4.83 \cdot 10^{-9}$	cm^3
Jp	$7.17 \cdot 10^{-12}$	$5.73 \cdot 10^{-13}$	$\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$
Vm	$-2.8 \cdot 10^{-2}$	$-5.6 \cdot 10^{-2}$	V
Na ⁺ i	$2.8 \cdot 10^{-5}$	$7.9 \cdot 10^{-6}$	mol cm^{-3}
K ⁺ i	$1.2 \cdot 10^{-4}$	$8.0 \cdot 10^{-5}$	mol cm^{-3}
Cl ⁻ i	$5.1 \cdot 10^{-5}$	$1.6 \cdot 10^{-5}$	mol cm^{-3}

V = volumen celular, Jp = flujo de la Na⁺/K⁺-ATPasa, Vm = potencial de membrana. Na⁺i, K⁺i y Cl⁻i son las concentraciones intracelulares de sodio, potasio o cloruro, respectivamente.

Se observa que la exposición al medio hiposmótico induce la salida de K⁺ ($J_{K^+:Cl^-}$) (Figs. 23B y 23D). De acuerdo al modelo propuesto, esta salida es acompañada por un flujo de salida de Cl⁻ y por agua para mantener el equilibrio osmótico (Ecs. 11 y 12). Dicha pérdida de agua es la que origina la RVD.

En el caso de las células de trucha, el valor de Vr al cual se inició la RVD (vse en el modelo) es 1.02; esto implica un valor de volumen 2% superior al valor isosmótico de Vr. Para obtener un buen ajuste se requirió un tiempo de retardo de 17 min (LAG) antes de activar $J_{K^+:Cl^-}$. Hacia el final de la simulación, $J_{K^+:Cl^-}$ es 0.

En hepatocitos de rata, el valor de vse de mejor ajuste también fue 1.02, pero el LAG fue el doble que el de trucha (34 min). Esto se debe a que tanto $J_{K^+:Cl^-}$ y, por ende la RVD, fueron mas lentos que en el caso de hepatocitos de trucha. El $J_{K^+:Cl^-}$ aún se encontraba activo hacia el final de la simulación.

Las líneas punteadas de las Figs. 23A y 23C ilustran Vr vs t para el caso hipotético en el cual las células de trucha y rata no presentan RVD. En el modelo esto se logra bloqueando la RVD.

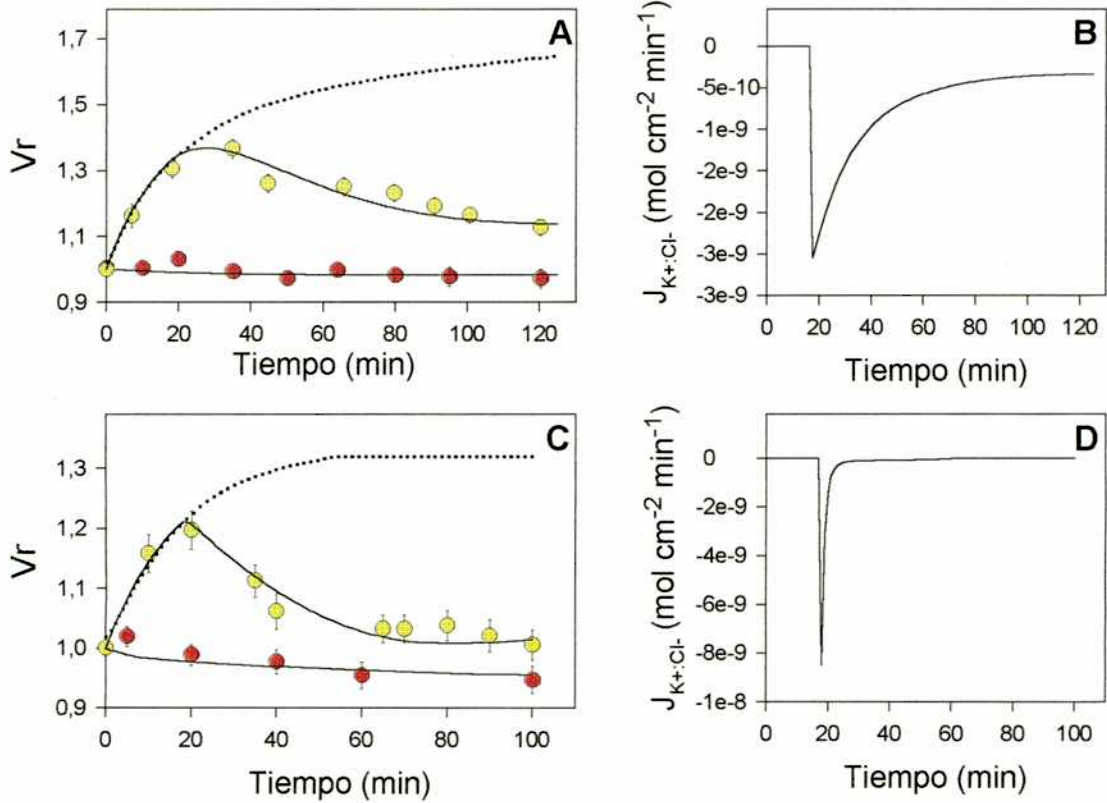


Figura 23. Resultados experimentales y teóricos obtenidos de hepatocitos de rata (A, B) y trucha (C, D) expuestos a medios hipo- (180 mosM) e isosmótico. A y C: curso temporal de V_r de hepatocitos expuestos a medio iso- (●) e hiposmótico (●). Los valores son medias \pm ESM de cuatro preparaciones independientes. Las líneas continuas y punteadas representan las predicciones realizadas por el modelo matemático de los cambios de volumen inducidos hiposmóticamente en presencia (línea continua) y en ausencia (línea punteada) de vse (sensor de volumen), utilizando los valores de los parámetros y de las variables de la Tabla 5. B, D: Simulación del flujo de cloruro de potasio ($J_{K^+:Cl^-}$) que permite la respuesta regulatoria RVD observada en A y C (Ecs. 11 y 12).

Discusión

Al menos tres componentes se encuentran involucrados en la RVD (Altamirano y col., 1998): a) un sensor de volumen, que detecta cambios en el volumen celular y los transduce en algún tipo de señal (generalmente intracelular); b) un mecanismo efector, que provoca la pérdida de agua y osmolitos, y c) una señal que acopla el sensor con el efector. En el presente modelo la célula sentiría el cambio de volumen cuando el volumen celular iguala un valor determinado (v_{se}). Luego se incluye un retardo en el tiempo (LAG) necesario para acoplar la secuencia sensor-signal-efector, desencadenándose la RVD.

La respuesta volumétrica de los hepatocitos de goldfish sometidos a medios anisomóticos fue simulada con el modelo matemático presentado. El mismo utilizó todos los resultados experimentales obtenidos en este y anteriores trabajos (Tabla 4). La versatilidad del modelo se evidencia en el hecho de que se realizó un único ajuste para todos los resultados experimentales obtenidos. Es decir, que el modelo utilizó un único grupo de constantes y generó un único grupo de parámetros de mejor ajuste. Un único grupo de parámetros implica suponer que las permeabilidades del agua e iónicas se mantienen constantes e independientes del gradiente osmótico. Esta suposición es consistente con la literatura (Hernández y Cristina, 1998).

Como ya se explicó, el modelo matemático predice la RVD cuando se activa un flujo neto de KCl vía un sensor de volumen. Sin embargo, los resultados experimentales (Fig. 16 del Capítulo II) mostraron que en hepatocitos de goldfish tanto el influjo como el eflujo de K^+ fueron similares en medios isomóticos y en medios hiposmóticos. Esto indica que experimentalmente no se generó un flujo neto de K^+ a través de la membrana celular. Paralelamente se observó que los hepatocitos en medios hiposmóticos no presentaron RVD (Fig. 21). Por ende, la ausencia de RVD y de flujo neto de K^+ observados en los hepatocitos de goldfish llevó a realizar una simulación de V_r vs t en ausencia de RVD por bloqueo del elemento sensor v_{se} (Fig. 20 y Ecs. 11 y 12). Así, al incubar las células de goldfish en medios hiposmóticos se observó un aumento de volumen hacia un valor constante, sin presentar RVD (Fig. 20).

Hasta aquí los resultados mostraban el aumento volumétrico hiposmótico de las células. Pero... ¿Qué ocurre cuando los hepatocitos de goldfish son incubados en medios

isosmóticos pero en presencia de un soluto permeable, es decir, en presencia de un medio isosmótico-hipotónico?

La incubación de hepatocitos con M2 + ALA-AOA provocó un aumento de volumen celular sin RVD (Fig. 20). En el modelo matemático, esta situación se simuló por medio de un flujo constante de L-alanina hacia el interior de la célula. Esta sería una suposición correcta ya que en presencia de las concentraciones milimolares de sodio extracelular y L-alanina utilizadas en el presente estudio, el flujo L-alanina sería máximo (Wilson y col., 1996).

El presente modelo provee evidencia de la ausencia o inactivación de vse en hepatocitos de goldfish. En efecto, para obtener un buen ajuste del modelo a los datos experimentales en presencia de vse, la permeabilidad al sodio debería haber sido 4 veces mayor a la permeabilidad al potasio ($8 \cdot 10^{-8}$ y $2 \cdot 10^{-8} \text{ cm s}^{-1}$, respectivamente) pero estos valores no son compatibles con un buen ajuste del modelo a los valores de Vr vs tiempo para medios isosmóticos*, y además no representa la situación *in vivo*.

Los ajustes se realizaron utilizando un valor de Pf similar al obtenido experimentalmente (entre $1.4 \cdot 10^{-4}$ y $1.7 \cdot 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$). Es decir que en este caso el valor de mejor ajuste de Pf modelo dependiente coincide con el valor de mejor ajuste utilizando una ecuación empírica.

En medios hiperosmóticos, si bien se pudo simular una disminución no lineal de Vr con el modelo matemático, la magnitud del cambio predicha fue mayor que aquella obtenida experimentalmente. La diferencia observada no puede deberse a cambios en el Pf ya que no se encuentra considerada esa posibilidad en el modelo matemático. Además nuestros resultados muestran que el valor de este parámetro no depende de la osmolaridad extracelular. Una discrepancia similar se observó entre el cambio de volumen desarrollado en medio hiperosmótico y el cambio de volumen predicho en hepatocitos de ratón (Khalbuss y Wondergem, 1990). Como la sacarosa utilizada para preparar el medio hiperosmótico no atraviesa la membrana del hepatocito (Alpini y col., 1986) parecería que la disminución de volumen hiperosmótica involucra mecanismos que no se toman en cuenta en nuestro modelo. Por ejemplo, podría ocurrir que las permeabilidades iónicas no fueran constantes.

* Cabe recordar que el valor de permeabilidad osmótica es constante e independiente de la osmolaridad de los medios de incubación utilizados

En el caso de hepatocitos de rata y trucha que presentan RVD, el efector de la respuesta propuesto fue la salida de la célula de un flujo neto de K^+Cl^- (Fig. 23). Esto no implica que otros osmolitos no jueguen un papel importante en la respuesta volumétrica de células de vertebrados. En el caso de las células de trucha, al igual que en las de rata, el valor de V_r al cual se inició la RVD fue 2% superior al valor isosmótico de V_r . La respuesta difirió en el LAG que precede la activación de $J_{K^+Cl^-}$, siendo en hepatocitos de rata (LAG=34 min) el doble que en la trucha.

Si bien el modelo desarrollado pudo ser utilizado con éxito para simular los cambios volumétricos en presencia y en ausencia de RVD, es necesario tener en cuenta que el mecanismo sensor de cambios de volumen del presente modelo es una simplificación de un sistema más complejo que opera a nivel celular, que podría sensar tanto el nivel de electrolitos (Emma y col., 1997) como la velocidad de cambio de volumen (Bond y col., 1999).

Capítulo IV

Efecto de la inhibición metabólica sobre el volumen de hepatocitos de goldfish.

Introducción

Una propiedad fundamental que poseen las células animales es la habilidad de mantener su volumen constante. El volumen celular se encuentra determinado principalmente por el contenido total de partículas osmóticamente activas (osmolitos) y la osmolaridad del medio que baña las células. La alteración del balance entre la entrada y salida de osmolitos del interior celular provoca cambios en el contenido intracelular de los mismos acompañados por movimientos netos de agua. Un ejemplo de la aparición de este desbalance de flujos se observa en anoxia fisiológica y en anoxia química.

En los hepatocitos de la mayoría de las especies animales, la anoxia lleva al bloqueo de la producción de ATP mitocondrial, desencadenando una serie de eventos que incluyen: despolarización de las membranas plasmática y mitocondrial, acidificación y pérdida de la capacidad buffer intracelular, aumento de sodio y efectos citotóxicos promovidos por el aumento del calcio citosólico libre. Estos cambios provocan el aumento de la osmolaridad intracelular seguido de captación de agua y aumento del volumen celular.

En hepatocitos de goldfish la secuencia de eventos recién enunciada se produce muy lentamente o nunca llega a desarrollarse. Durante la anoxia los hepatocitos de goldfish presentan respuestas metabólicas dinámicas que prolongan la supervivencia celular. Éstas incluyen: (1) el realojamiento de la energía metabólica disponible para proveer ATP solamente a las funciones básicas para la célula (Krumschnabel y col., 1994); (2) el bloqueo del aumento del Ca^{2+} citosólico por medio de un flujo neto de salida de ese catión (Krumschnabel y col., 1997), (3) el bloqueo de la acidificación intracelular debido al aumento de la capacidad buffer intracelular y a la secreción neta de H^+ (Krumschnabel y col., 2001) y (4) la acumulación de los mayores niveles de glucógeno detectados en hepatocitos de vertebrados (Dorigatti y col., 1996).

Aunque los principales mecanismos que permiten a los hepatocitos de goldfish tolerar la inhibición metabólica ya fueron caracterizados, el desbalance osmótico asociado no había

sido estudiado. Se sabe que en hepatocitos de mamíferos la inhibición metabólica por anoxia promueve el aumento de la osmolaridad intracelular cuando los gradientes iónicos se relajan hacia el equilibrio termodinámico. Esto provoca un aumento del volumen celular y activación de mecanismos compensatorios (Hochachka, 1986; Boutilier, 2001).

En estudios previos sobre la regulación de volumen de hepatocitos de mamífero (Häussinger y Lang, 1991; Wehner y Tinel, 2000) y de trucha (Bianchini y col., 1988, 1991) se caracterizó la forma en que las células responden a gradientes osmóticos en ausencia y en presencia de inhibidores metabólicos.

En hepatocitos de rata, el bloqueo de la fosforilación oxidativa promueve un aumento del Na^+ intracelular y consiguiente aumento de volumen (Carini y col., 1995). Más aún, la exposición a la hipoxia y anoxia de hepatocitos de rata (Anundi y de Groot, 1989), trucha y goldfish (Krumschnabel y col., 1996) provoca la activación del flujo glucolítico, aumentando de esta manera la concentración de intermediarios glucolíticos en el interior celular. La degradación del glucógeno a glucosa-1P y el aumento anaeróbico de intermediarios glucolíticos producirían un aumento de solutos osmóticamente activos en el citosol celular, causando el aumento en el volumen del hepatocito (Wehner y col., 1992; Corassanti y col., 1990; Häussinger y Lang, 1991; Lang y col., 1998).

Otra consecuencia importante de la activación del metabolismo anaeróbico es el aumento en el flujo de salida de osmolitos orgánicos de la célula. Un ejemplo de ello fue reportado para hepatocitos de trucha y goldfish en los que la anoxia química indujo un aumento de la salida de glucosa y lactato hacia el exterior celular (Krumschnabel y col., 2001). La expulsión de osmolitos de las células podría contrarrestar el aumento potencial de la osmolaridad intracelular de células anóxicas.

Objetivos

- ❖ Estudiar el efecto de la inhibición metabólica sobre el volumen de hepatocitos de goldfish y los flujos transmembranales de K^+ en hepatocitos de goldfish.
- ❖ Realizar estudios comparativos con hepatocitos de trucha y de rata.

Resultados

- *Efectos de la inhibición metabólica en hepatocitos de goldfish, trucha y rata*

Volumen celular

Mediciones de volumen celular por videomicroscopía.

En ausencia de inhibidores metabólicos (condición control), el volumen celular de los hepatocitos de las tres especies se mantuvo constante en $1.31 \cdot 10^{-9} \pm 2.02 \cdot 10^{-11} \text{ cm}^3$ (n=56, goldfish), $5.05 \cdot 10^{-9} \pm 8.95 \cdot 10^{-11} \text{ cm}^3$ (n=49; rata) y $1.17 \cdot 10^{-9} \pm 2.08 \cdot 10^{-11}$ (n=44, rata), durante 100 min.

En la Fig. 24 se observa el efecto de CN y otros inhibidores del metabolismo (IAA+CN, IAA) sobre el volumen celular de hepatocitos de goldfish (A), trucha (B) y rata (C).

Efecto del CN- En presencia de CN el volumen de los hepatocitos de goldfish se mantuvo constante durante todo el experimento. En hepatocitos de trucha, la superfusión con CN produjo solo oscilaciones de volumen alrededor del valor control. En hepatocitos de rata, el Vr no sufrió cambios significativos con el CN.

Efecto del IAA+CN En hepatocitos de goldfish, la inhibición simultánea de la glucólisis y la fosforilación oxidativa no produjo ningún efecto sobre el Vr. Lo mismo sucedió en hepatocitos de trucha y rata. Los experimentos con hepatocitos de rata se realizaron durante 60 min debido a la pérdida de viabilidad.

Efecto del IAA- Los hepatocitos de goldfish, trucha y rata no sufrieron cambios significativos de volumen.

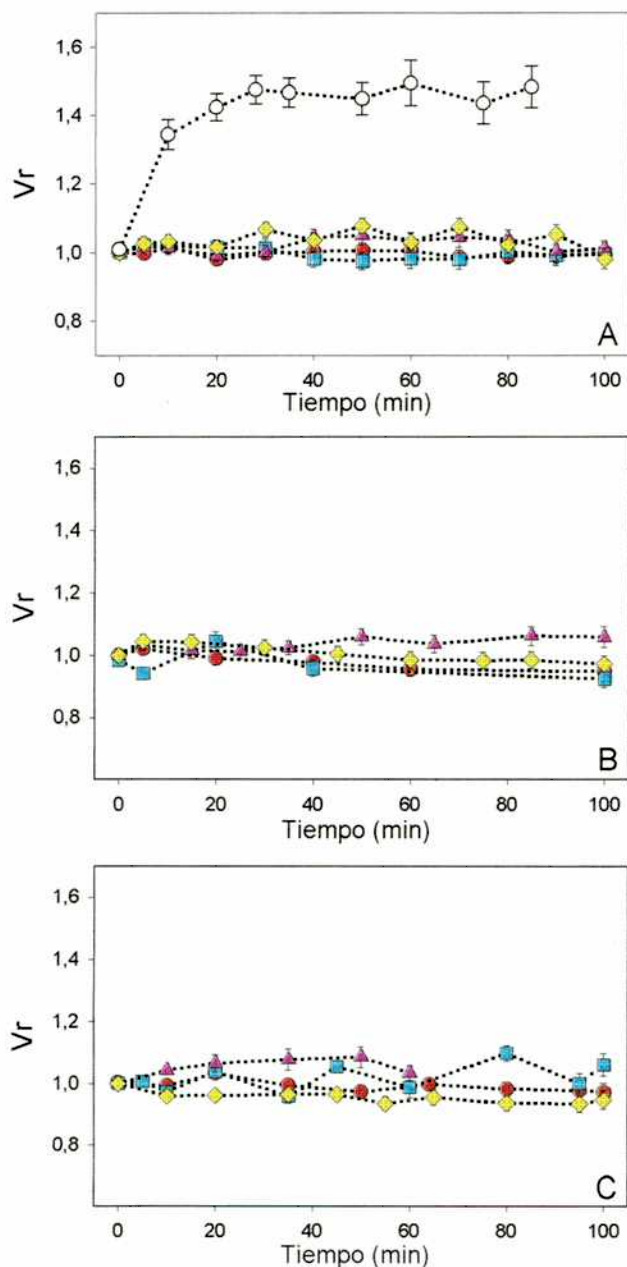


Figura 24- Volumen relativo en función del tiempo de hepatocitos expuestos a inhibición metabólica. Las células de goldfish (A), trucha (B), o rata (C) fueron superfundidas con M2 en presencia o ausencia (●) de los siguientes inhibidores: IAA (▲), CN (◇) o IAA+CN (■). Se muestra el Vr de hepatocitos de goldfish cuando fueron expuestos a medio hiposmótico (180 mosM, ○). Los experimentos fueron realizados utilizando videomicroscopía. Los resultados son la media±ESM de cuatro preparaciones independientes.

Mediciones de volumen celular por microscopía de epifluorescencia.

En el caso de las mediciones por videomicroscopía, a diferencia de los cambios de volumen que se producen en presencia de medios anisomóticos (Fig. 24A), la inhibición metabólica produjo variaciones del Vr que se encontraron en el límite de resolución de la técnica. Por esa razón se repitieron los experimentos de inhibición metabólica pero utilizando una metodología más sensible como la microscopía de epifluorescencia. Esta técnica permitió detectar variaciones en el Vr iguales o superiores al 2%.

Hepatocitos de goldfish sometidos a inhibición metabólica. En presencia de CN se produjo una disminución del volumen de un $3.2 \pm 0.51\%$ (Fig. 25A). Luego se observó una recuperación hacia valores de volumen cercanos al control. Este patrón de disminución del Vr también se observó cuando las células fueron incubadas en presencia de IAA+CN. Bajo este último tratamiento, el volumen disminuyó un $6.6 \pm 1.6\%$ por debajo del nivel control a los 42 min (Fig. 25B). El agregado de IAA no tuvo efecto significativo sobre el Vr de los hepatocitos de goldfish (Fig. 25C) en los que el volumen se mantuvo constante durante todo el experimento.

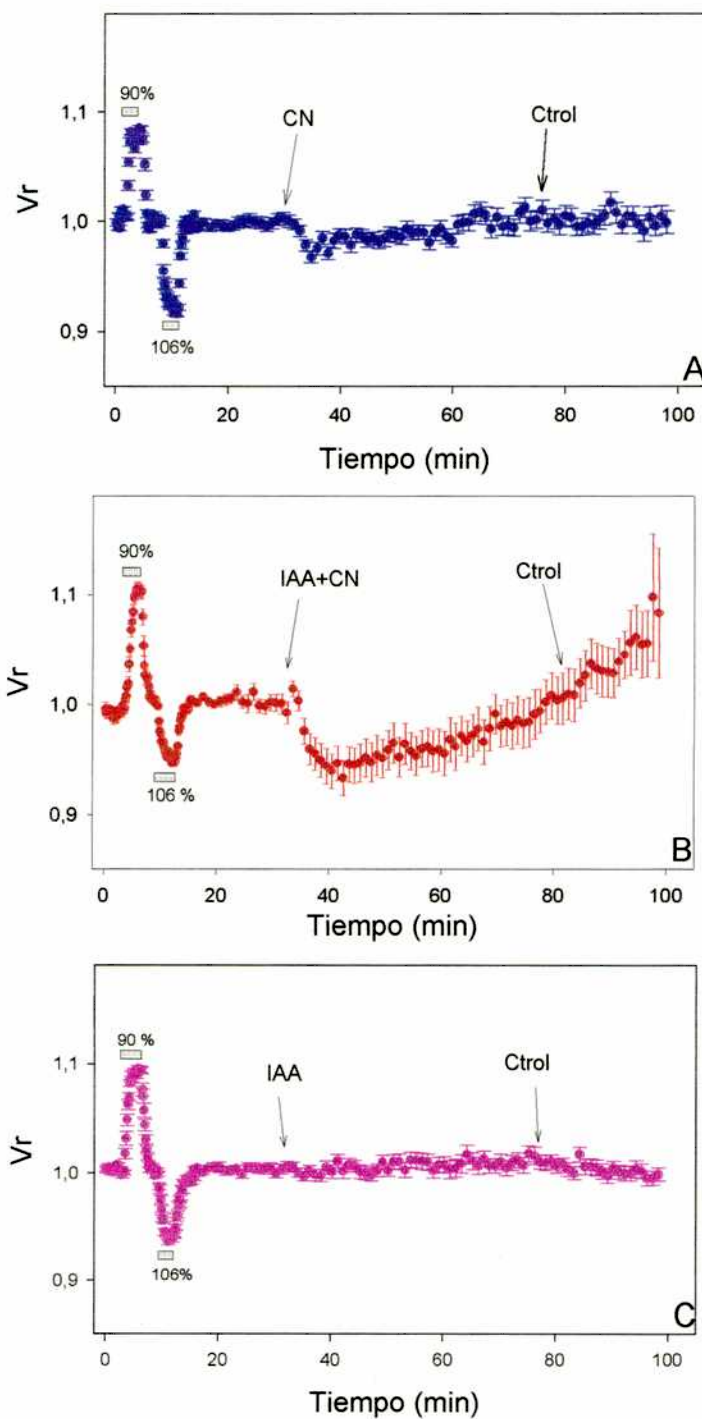


Figura 25. Volumen relativo (V_r) versus tiempo en hepatocitos de goldfish incubados en medio control conteniendo CN (A), IAA+CN (B), o IAA (C). La calibración se realizó con medios hipo- e hiperosmóticos con las osmolaridades del medio extracelular expresadas como porcentaje del medio control. Los resultados son medias \pm ESM de cuatro preparaciones independientes.

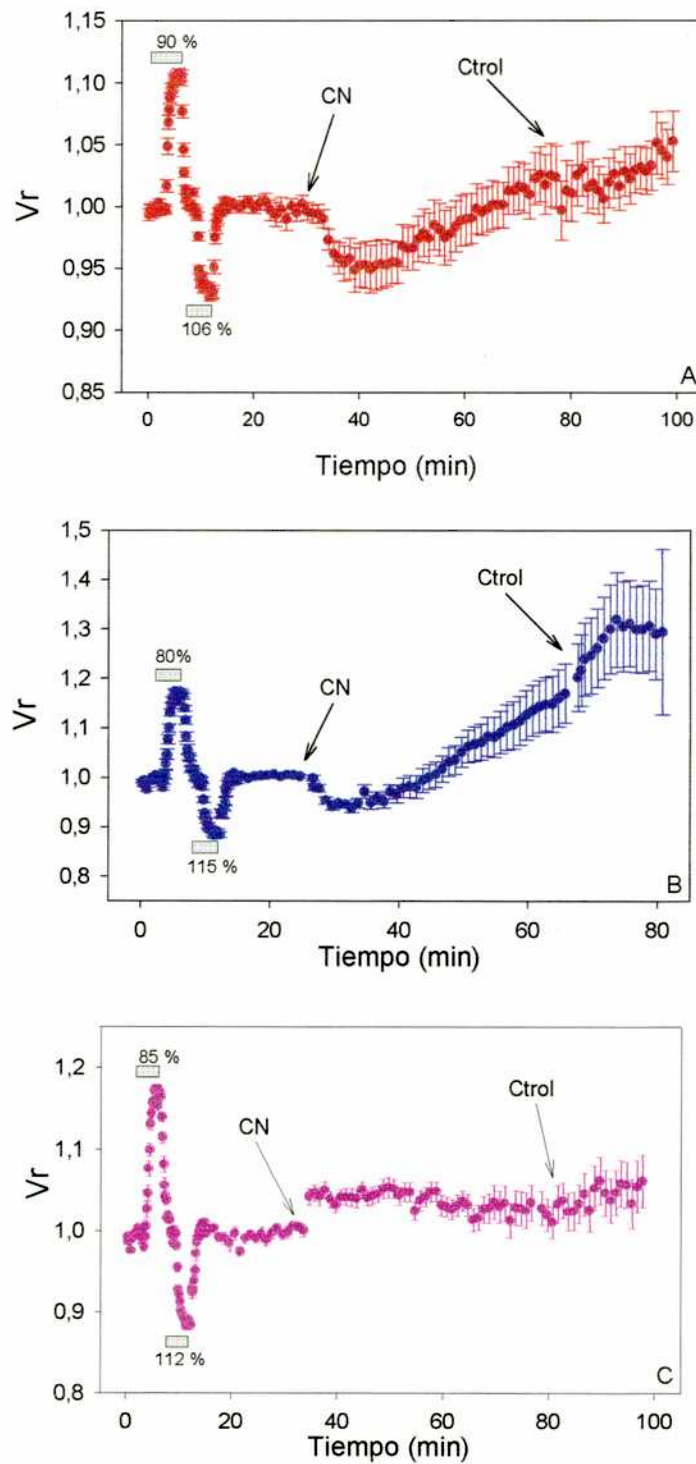


Figura 26. Volumen relativo (V_r) versus tiempo en hepatocitos de (A) goldfish, trucha (B) y rata (C) en presencia de CN. Las células fueron superfundidas en medio control a pH= 7.6 (goldfish y trucha), y pH=7.4 (rata) en presencia de CN. La calibración se realizó con medios hipo- e hiperosmóticos con osmolaridades del medio extracelular expresadas como porcentaje del medio control. Los resultados son medias \pm ESM de cuatro preparaciones independientes.

Experimentos comparativos: hepatocitos de goldfish, trucha y rata sometidos a intoxicación por CN. En la Fig. 26 se observa la evolución temporal del Vr de hepatocitos de goldfish (A), trucha (B) y rata (C) expuestos a CN. El tratamiento con CN produjo una disminución del Vr de 5 ± 1.5 % con respecto al valor control. A los 23 min el volumen de las células fue similar a los valores iniciales para permanecer constante durante el resto del tratamiento. Seguidamente, la exposición al medio control produjo un aumento de Vr de 8 ± 3.8 % por encima del valor inicial.

Por otro lado, en hepatocitos de trucha (Fig. 26B) la incubación con CN produjo una disminución del volumen de las células a un 6 ± 0.78 % por debajo del control a los 4 min de tratamiento. Más tarde Vr aumentó hasta 16 ± 5.6 % sobre el valor control al final de la superfusión con CN. La exposición subsiguiente al medio control aumentó Vr a 29 ± 9.2 % sobre el valor control.

La respuesta observada en hepatocitos de rata en las mismas condiciones fue diferente. Estas células aumentaron su volumen a un 5.1 ± 1.1 % sobre el valor control a los 3 min de incubación con CN, manteniéndose en ese valor hasta el final del experimento (Fig. 26C).

- *Flujos transmembranales de K^+*

En ausencia de inhibidores metabólicos, tanto el influjo como el eflujo de K^+ se mantuvieron constantes por 44 min. El influjo de K^+ fue de 0.21 ± 0.03 nmol 10^{-6} céls $^{-1}$ min $^{-1}$, mientras que el eflujo fue de 0.14 ± 0.01 cpm 10^{-6} céls $^{-1}$ min $^{-1}$.

Eflujo de K^+

En la Fig. 27 se observa el eflujo de K^+ cuando los hepatocitos de goldfish fueron incubados en presencia de inhibidores metabólicos. Dichos flujos no fueron afectados por ninguno de los inhibidores utilizados (IAA, CN, IAA+CN).

El eflujo de K^+ en anoxia química no fue alterado al preincubar los hepatocitos con 1 mM $BaCl_2$ y 5 mM tetraetilamonio (ambos compuestos bloquean los canales de K^+ sensibles al voltaje) y con 1 mM quinina (bloqueante de los canales de K^+ sensibles al Ca^{2+}).

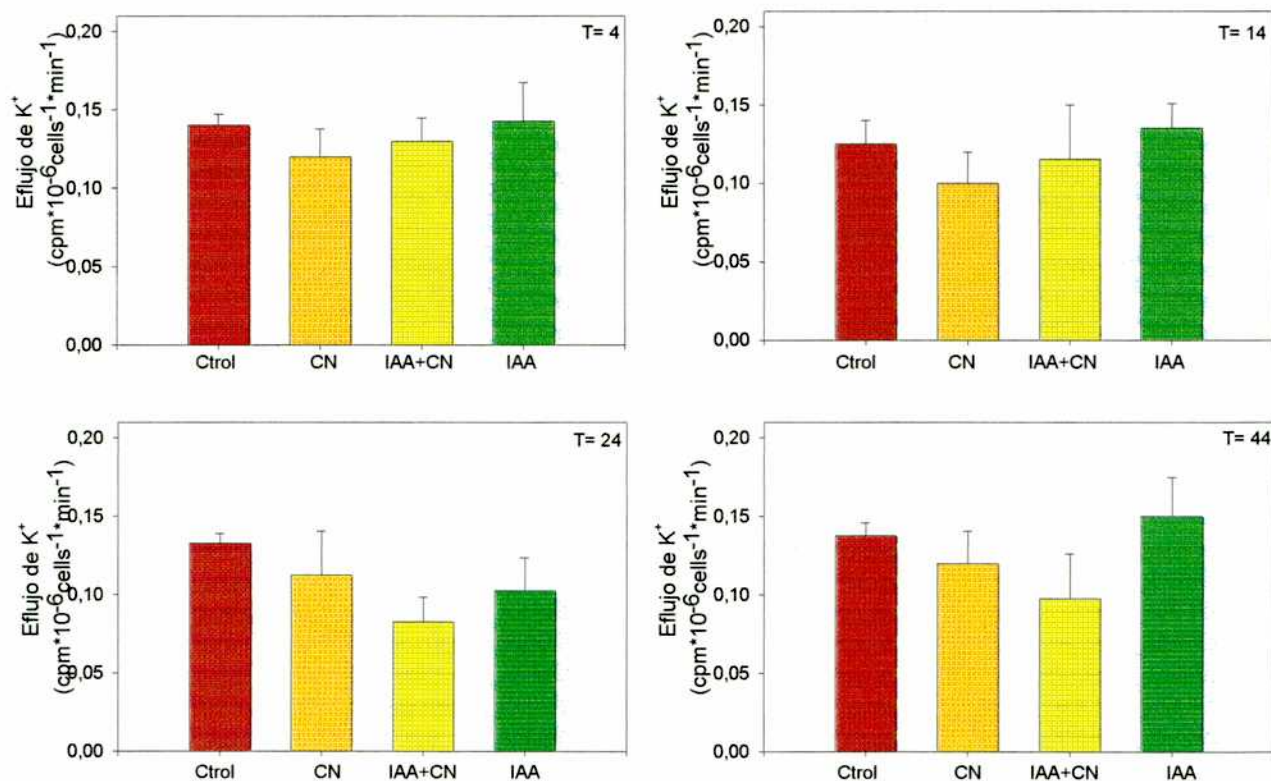


Figura 27. Eflujo de K⁺ en hepatocitos de goldfish expuestos a inhibición metabólica. Las células fueron expuestas durante 44 min a M2 en presencia o ausencia (Ctrol) de los siguientes inhibidores: CN, IAA, y IAA+CN. Los flujos fueron medidos a los 4 min, 14 min, 24 min y 44 min luego del comienzo del experimento. Los resultados son medias+ESM de cuatro preparaciones independientes.

Influjo de K^+

En la Fig. 28 se observa el influjo de K^+ cuando los hepatocitos de goldfish fueron incubados con inhibidores metabólicos. En presencia de IAA el influjo de K^+ no fue significativamente distinto del control. En cambio, a los 4 min de incubación con CN y con IAA+CN se observa una disminución del mismo al $47 \pm 11\%$ (IAA+CN) y al $34 \pm 5\%$ (CN) del valor control.

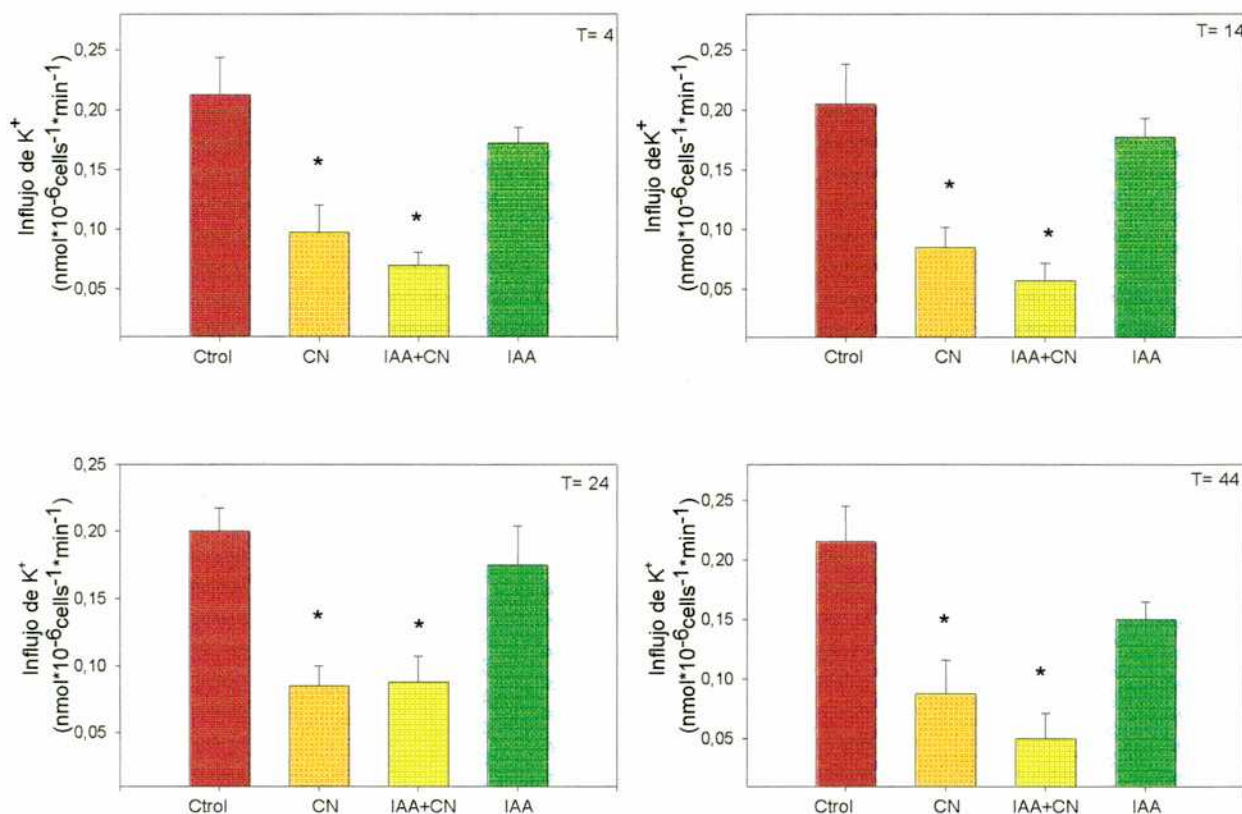


Figura 28. Inlujo de K^+ en hepatocitos de goldfish expuestos a inhibición metabólica. Las células fueron expuestas durante 44 min a M2 en presencia o ausencia (Ctrl) de los siguientes inhibidores: CN, IAA, y IAA+CN. Los flujos fueron medidos a los 4 min, 14 min, 24 min y 44 min luego del comienzo del experimento. Los resultados son medias+ESM de cuatro preparaciones independientes. El asterisco indica $p < 0.05$ con respecto al M2.

En los experimentos que se describen en el párrafo precedente, la condición control y los distintos tratamientos fueron evaluados en preparaciones independientes. Para confirmar el efecto inhibitorio del CN sobre el influjo de K^+ , se realizó un experimento en el que los hepatocitos fueron incubados secuencialmente con medios control y con CN (Fig. 29). Al igual que lo observado en la Fig. 28, la presencia de CN en el medio de incubación produjo una disminución aguda del influjo de K^+ a $39 \pm 6.7\%$ del valor control.

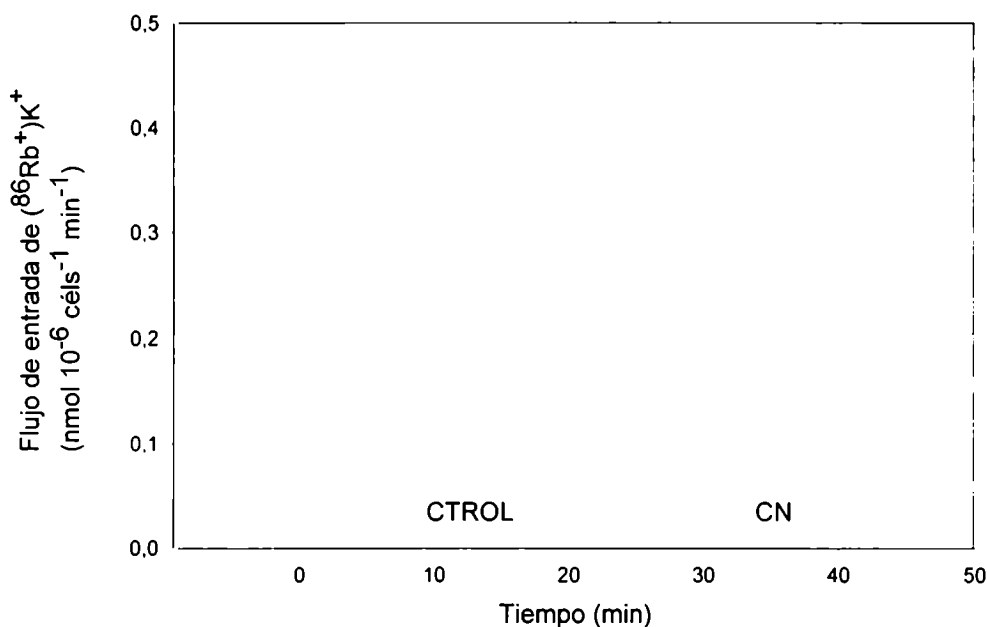


Figura 29. Efecto del CN sobre el influjo de K^+ en hepatocitos de goldfish. Las células fueron incubadas durante 20 min en M2 (Ctrl) y luego durante otros 20 min en M2+CN. Los resultados son medias \pm ESM de cuatro preparaciones independientes.

Para determinar la importancia relativa de la actividad Na^+/K^+ -ATPasa para mediar el influjo de K^+ se incubaron hepatocitos en condiciones control (M2), en M2+ouabaina (OB), y en presencia de M2+OB+CN (Fig. 30A).

El agregado de OB produjo una disminución del influjo de K^+ a $14.82\pm 3.15\%$ del valor control, mientras que en presencia de OB+CN la caída fue de $10.95\pm 2.06\%$. No hubo diferencias significativas en el porcentaje de inhibición del influjo con OB y con OB+CN.

En presencia de concentraciones milimolares de glucosa en el medio extracelular, las células de goldfish presentan niveles de ATP 3 veces superiores que en ausencia de glucosa (Dorigatti y col., 1996). Se utilizó esta información para determinar si el efecto del CN sobre el influjo de K^+ se debe a una disminución de la concentración intracelular de ATP. Previamente, se había observado que en ausencia de glucosa y en presencia de CN el influjo de K^+ disminuía tres veces (Figs. 28 y 29). En la Fig. 30B se observa el efecto del CN sobre el influjo de K^+ , en presencia y en ausencia de glucosa. En presencia de glucosa el influjo de K^+ fue $194\pm 40\%$ con respecto al control, mientras que en medios con glucosa+CN este flujo se vio inhibido en un factor de 3 ($59.34\pm 0.93\%$).

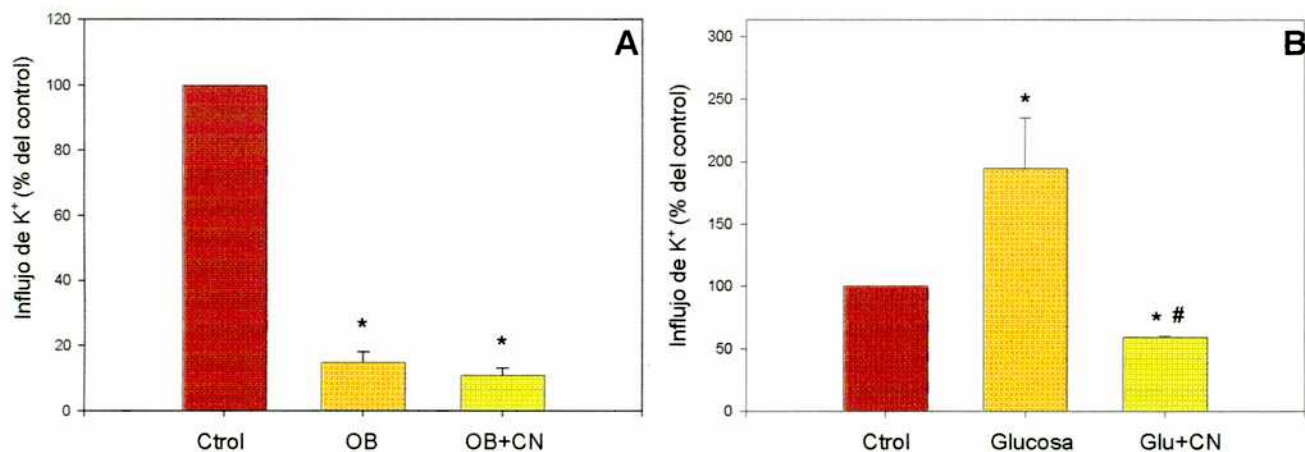


Figura 30. Efecto del CN, OB y glucosa sobre el influjo de K⁺ en hepatocitos de goldfish. Las células fueron incubadas en A: M2 (Ctrl), M2+ouabaína (OB), M2+OB+CN (OB+CN); B: M2 (Ctrl), glucosa, glucosa+CN (Glu+CN). Los resultados son media+ESM de cuatro preparaciones independientes. * indica $p < 0.05$ con respecto al control. # indica $p < 0.05$ con respecto al flujo con glucosa.

• *pH intracelular (pHi)*

La acumulación de lactato como consecuencia de la activación de la glucólisis y la hidrólisis de nucleósidos fosfato son los principales factores responsables de la acidificación citosólica (Carini y col., 1995; Krumschnabel y col. 2001). En especies sensibles a la anoxia, como la rata, la acidificación celular produce el aumento de Na⁺ intracelular y un consiguiente aumento de volumen (Carini y col., 1995). Debido a que en los hepatocitos de goldfish en anoxia no se observó dicho aumento, se analizó el pHi de células anóxicas.

El pHi de los hepatocitos de goldfish incubados en medio control fue 7.51 ± 0.02 ($n=48$, Fig. 31A). Luego de 2 min en presencia de CN, este valor disminuyó significativamente a 7.44 ± 0.02 y se estabilizó en los valores iniciales al final del tratamiento.

Por otro lado, el pHi de hepatocitos de trucha incubados en medio control fue 7.51 ± 0.01 ($n=48$, Fig. 31B). El tratamiento con CN produjo una caída aguda del pHi que alcanzó 7.30 ± 0.01 ($n=48$) a los 5 min. El valor de pHi aumentó progresivamente hasta alcanzar 7.38 ± 0.02 al final de la incubación con el inhibidor. La superfusión con medio control al finalizar el tratamiento llevó el pHi de las células de trucha a valores cercanos al control (7.55 ± 0.02 , $n=48$).

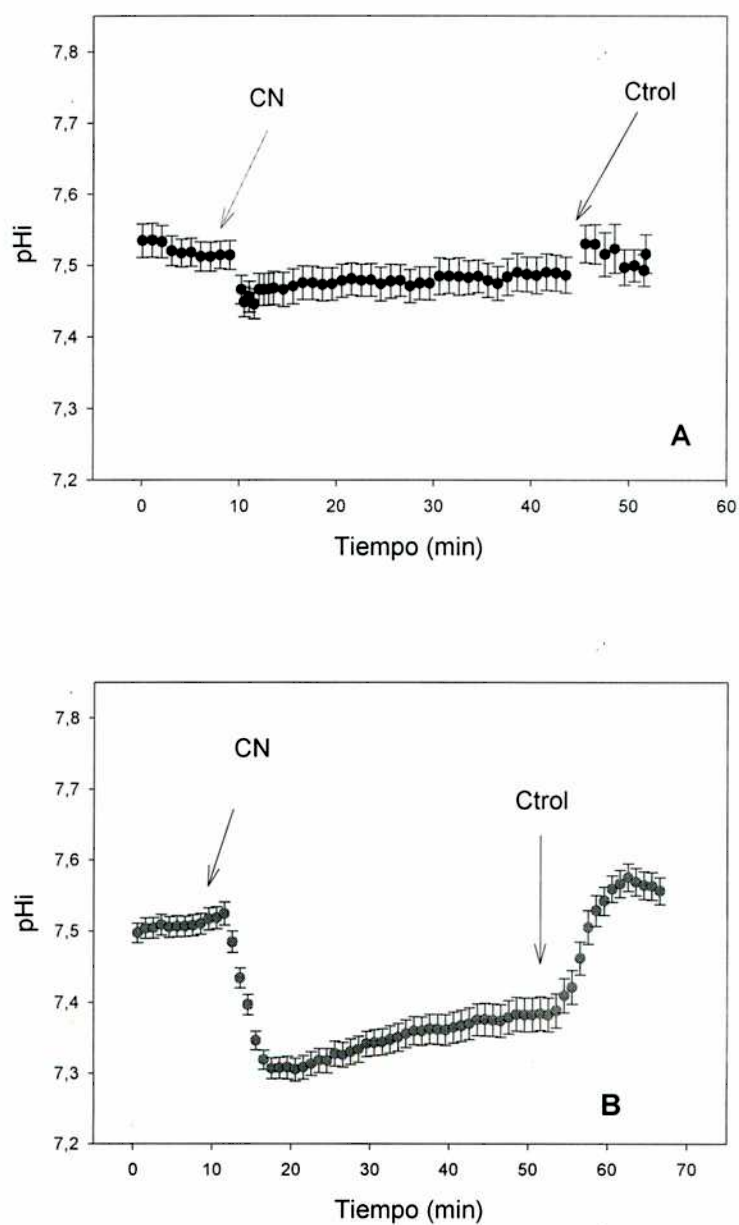


Figura 31. Efecto del CN sobre el pHi. Resultados obtenidos por microscopía de epifluorescencia con BCECF. Las células de goldfish (A) y trucha (B), fueron superfundidas en medio control en ausencia o presencia de CN. Los resultados son medias \pm ESM de cuatro preparaciones independientes.

Relación entre el pHi y el Vr de hepatocitos de goldfish y trucha en presencia de CN.

Como se explicó anteriormente, el pHi se encontraría relacionado con el Vr ya que el aumento de Na^+ a pH ácidos provocaría un aumento del volumen celular. Sin embargo, no se observó ninguna correlación entre el pHi y el Vr tanto en hepatocitos de trucha como de goldfish (Fig. 31).

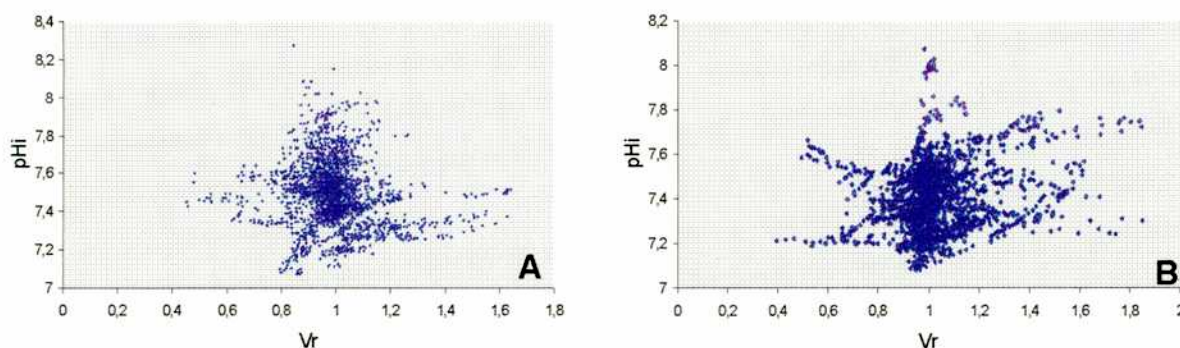


Figura 32. Correlación pHi vs Vr en hepatocitos de goldfish (A) y trucha (B) expuestos a CN. Las células fueron perfundidas en M2 con CN. Resultados obtenidos por microscopía de epifluorescencia con BCECF. Se utilizaron 48 células provenientes de 4 preparaciones independientes para cada especie.

- *Contenido intracelular de Na^+*

En hepatocitos de rata (Carini y col., 1995) y de trucha (Krumschnabel y col., 2001) la anoxia química induce la inhibición de la actividad Na^+/K^+ -ATPasa y la acidosis intracelular, seguida por la activación del intercambiador Na^+/H^+ . Esto último produce la entrada de Na^+ a la célula, el aumento del volumen celular y la pérdida progresiva de viabilidad celular. El efecto de la anoxia química sobre la homeostasis del Na^+ en hepatocitos de goldfish puede evaluarse en la Fig. 32. En medios control, el nivel intracelular de sodio se mantuvo constante en $22.10 \pm 0.31 \text{ nmol } 10^{-6} \text{ céls}^{-1}$ durante los 40 min del experimento. En presencia de CN no se produjeron cambios significativos. Por otro lado, en presencia de OB el contenido de Na^+ aumentó a $50 \text{ nmol } 10^{-6} \text{ céls}^{-1}$. Cuando los hepatocitos fueron preincubados en un medio isosmótico libre de Na^+ durante 30 min, el contenido del ion disminuyó a un 16% del valor control sin mostrar un cambio significativo durante los 40 minutos del experimento.

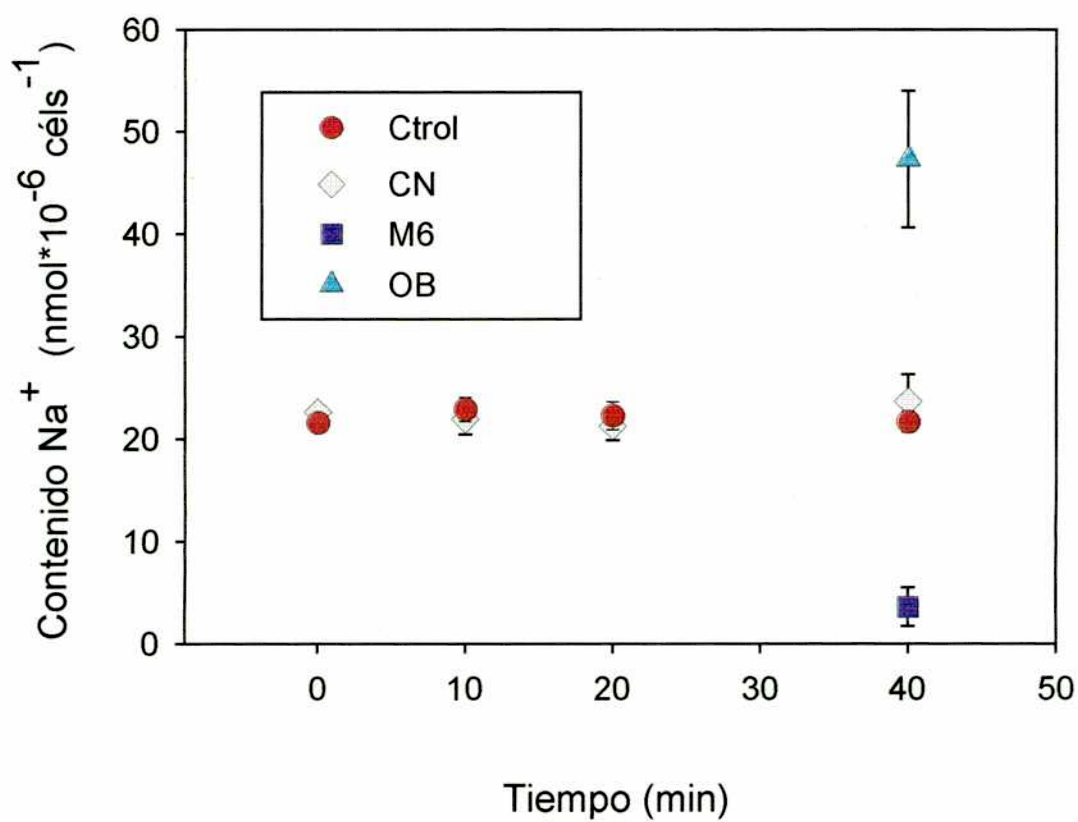


Figura 33. Evolución en el tiempo del contenido de Na^+ intracelular de hepatocitos de goldfish. Las células fueron incubadas en M2 (Ctról) en ausencia (●) o en presencia de CN (◇), OB (▲). Los cuadrados (■) representan el contenido de sodio de las células expuestas a M6 (sin sodio). Los resultados son medias \pm ESM de cuatro preparaciones independientes.

En el presente capítulo se presentan los resultados de volumen celular y flujos transmembranales de K^+ cuando los hepatocitos de goldfish fueron sometidos a la inhibición de las dos principales vías productoras de ATP: la glucólisis y la fosforilación oxidativa. A efectos comparativos, los experimentos más relevantes fueron repetidos con hepatocitos de animales sensibles a la anoxia como la rata y la trucha.

Inhibición de las vías productoras de ATP

Si bien el bloqueo de la glucólisis con IAA no provocó cambios en el volumen de las células de goldfish, el bloqueo de la fosforilación oxidativa por CN, tanto en presencia como en ausencia de IAA, provocó una disminución volumétrica de aproximadamente 3% (CN; Fig. 25A) y 7% (IAA-CN; Fig. 25B). Esta caída fue aguda y transitoria, dado que se verificó un aumento posterior de volumen hacia valores control (CN) o incluso hacia valores mayores (IAA+CN).

La presencia de CN o IAA+CN redujo el influjo de K^+ en 60-67%, mientras que no se observó ningún efecto de estos inhibidores sobre el eflujo. La diferencia entre influjo y eflujo de K^+ en presencia de CN resultó en un eflujo neto del $0.1 \pm 0.04 \text{ nmol } 10^{-6} \text{ céls}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Debido a que en células controles entre el 85-89% del influjo de K^+ fue mediado por la Na^+/K^+ -ATPasa, y que este porcentaje no cambió cuando las células fueron incubadas en presencia de CN (Fig. 30A), se concluyó que la salida neta del ión fue una consecuencia directa de la inhibición de la bomba.

Relación entre el volumen celular y los flujos de K^+ :

En hepatocitos de vertebrados, la pérdida de K^+ o KCl generalmente se asocia a la salida de agua de la célula. El grado de correlación entre la salida de K^+ y la disminución volumétrica de hepatocitos anóxicos puede evaluarse utilizando los siguientes datos: 1) concentración intracelular de K^+ libre citosólico en condiciones control; 2) eflujo neto de K^+ desarrollado durante la anoxia química. El cambio de volumen se calcula a partir de la salida de agua que resultaría de la pérdida de potasio, suponiendo equilibrio rápido de agua entre los compartimentos intra- y extracelular.

Las líneas discontinuas de la Fig. 34 muestran el curso temporal teórico de cambio de volumen considerando que la salida de agua de la célula es consecuencia directa de la pérdida de K^+ . De la comparación de la disminución volumétrica teórica y experimental (proveniente de la Fig. 25A) se concluye que los cambios de volumen observados no pueden ser explicados por la pérdida de potasio intracelular.

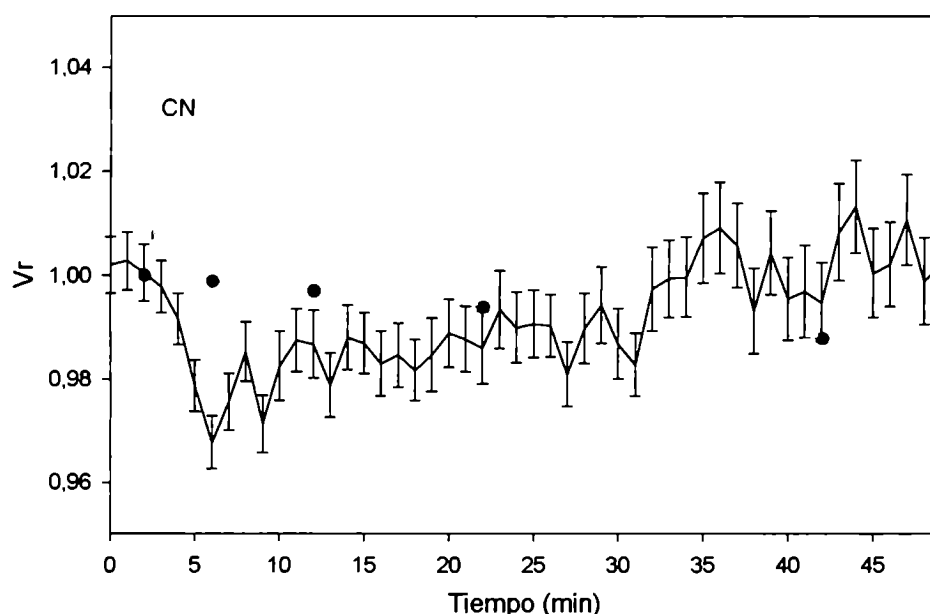


Figura 34. Volumen relativo (V_r) vs tiempo en hepatocitos de goldfish incubados en M2 (Ctrl) conteniendo CN. Las líneas continuas son los resultados experimentales extraídos de la Fig 25A. Las líneas discontinuas indican los cambios de V_r teóricos. Los resultados son medias \pm ESM ($n=48$).

Experimentos comparativos

Para poder entender los cambios volumétricos observados en un contexto mas amplio, se incubaron con CN hepatocitos de trucha y rata, dos especies que, a diferencia del goldfish, son altamente sensibles a la falta de oxígeno.

En hepatocitos anóxicos de trucha, se observó una disminución aguda del V_r (Fig. 26B), pero luego el volumen sufrió un aumento continuo hasta 116 % del valor control. Al finalizar el experimento ($t=80$ min) el aumento de volumen fue mayor al observado en hepatocitos de goldfish incubados con IAA+CN o CN (Fig. 25A y 25B).

Por otro lado en hepatocitos de rata la respuesta al CN fue diferente. Se observó un aumento agudo del V_r de 5% por encima del valor control, manteniéndose en este valor hasta finalizar el experimento (Fig. 26C).

Significado biológico de los cambios volumétricos observados

En principio el aumento de volumen de hepatocitos sometidos a anoxia química, tal como ocurre en la rata, ha sido descrito con anterioridad. En hepatocitos de rata el IAA+CN lleva a un aumento de V_r del 59% (Gores y col., 1989) mientras que el CN lleva a un 15-20% (Carini y col., 1999). Se ha interpretado que estos aumentos volumétricos representan un evento temprano de cambios morfológicos que culminan en la muerte celular (Gores y col., 1989). Primero se formarían pequeñas vesículas en la membrana celular (*blebs*) junto con un incremento moderado en el tamaño de la célula. Los hepatocitos de rata mantendrían esta morfología por algún tiempo hasta el desarrollo de un aumento abrupto en el tamaño de los *blebs* y la ruptura de los mismos seguido por la pérdida de viabilidad (Herman y col., 1988). Es decir que el aumento volumétrico de células anóxicas está asociado con la muerte celular.

Los resultados de la presente tesis muestran claramente que en hepatocitos de especies sensibles a la anoxia, el edema celular aparece de manera aguda (rata, Fig. 26C), o con posterioridad a una disminución transitoria de volumen (trucha, Fig. 26B). Por el contrario, en hepatocitos anóxicos de goldfish el edema celular es inexistente. Es decir que las células de goldfish poseerían mecanismos que impiden o evitan el aumento volumétrico que, como se mencionó mas arriba, llevan a la muerte celular.

Pero ¿cuáles son estos mecanismos?

La ausencia de aumento del volumen en hepatocitos de goldfish implica que varios de los desbalances iónicos y/o energéticos que ocurren en hepatocitos de especies sensibles no ocurren u ocurren más lentamente.

En hepatocitos anóxicos de especies sensibles, el edema celular es consecuencia directa de la pérdida de la homeostasis iónica y subsiguiente entrada de sodio. La misma es provocada por dos eventos que ocurren simultáneamente: 1) la caída de la actividad Na^+/K^+ -ATPasa, con la consiguiente pérdida del gradiente electroquímico transmembranal de sodio y 2) la acidificación celular, que estimula el intercambiador Na^+/H^+ provocando el influjo neto de sodio.

En hepatocitos de goldfish en anoxia, por el contrario, si bien la disminución del influjo de K^+ implicó una caída significativa de la actividad Na^+/K^+ -ATPasa (Fig. 28), la concentración intracelular de sodio se mantuvo constante (Fig. 33). Se podría inferir que

la leve disminución del pH intracelular (Fig. 31) previno la entrada masiva de sodio por estimulación del intercambiador Na^+/H^+

Es decir que los gradientes electroquímicos de sodio y de protones se mantienen constantes en los hepatocitos de goldfish. En cuanto a los gradientes electroquímicos de K^+ , vimos previamente que si bien la anoxia química provocó un desacople importante del influjo y el eflujo de K^+ , la magnitud de estos flujos en relación a la concentración intracelular del catión es tal que sólo se pierde 2.5 % del potasio intracelular.

Estos resultados implican que en los hepatocitos de goldfish, a diferencia de lo que ocurre en especies anoxia sensibles, la homeostasis iónica y el balance osmótico no sufren cambios drásticos.

En el caso de hepatocitos de rata y trucha que presentan RVD, el efector de la respuesta propuesto fue la salida de la célula de un flujo neto de K^+-Cl^- (Fig. 23). Esto no implica que otros osmolitos no jueguen un papel importante en la respuesta volumétrica de células de vertebrados. En el caso de las células de trucha, al igual que en las de rata, el valor de V_r al cual se inició la RVD fue 2% superior al valor isosmótico de V_r . La respuesta difirió en el LAG que precede la activación de J_{K^+,Cl^-} , siendo en hepatocitos de rata (LAG=34 min) el doble que en la trucha.

Si bien el modelo desarrollado pudo ser utilizado con éxito para simular los cambios volumétricos en presencia y en ausencia de RVD, es necesario tener en cuenta que el mecanismo sensor de cambios de volumen del presente modelo es una simplificación de un sistema más complejo que opera a nivel celular, que podría sensar tanto el nivel de electrolitos (Emma y col., 1997) como la velocidad de cambio de volumen (Bond y col., 1999).

Capítulo V

Discusión general

En la presente tesis se estudiaron los efectos de medios anisomóticos y de la anoxia química sobre el volumen de hepatocitos de goldfish. Asimismo se estudiaron los flujos transmembranales de K^+ asociados a los cambios de volumen celular. Por último, se realizaron experimentos comparativos en hepatocitos de especies sensibles a la anoxia como la trucha y la rata.

Uno de los resultados más importantes de la presente tesis refiere la ausencia de RVD en hepatocitos de goldfish expuestos a medios hiposmóticos. Se trata del primer reporte de hepatocitos de vertebrados que no presentan regulación de volumen en medios hiposmóticos. Es importante recalcar que en estas condiciones los hepatocitos de goldfish permanecieron viables, habiéndose descartado sistemáticamente todo tipo de artificio que pudiera haber generado la respuesta volumétrica observada. Más aun, se desarrolló un modelo teórico compatible con los resultados experimentales.

Otro resultado relevante del presente estudio refiere a la gran capacidad de los hepatocitos y de goldfish para retener K^+ cuando estas células son expuestas a gradientes osmóticos variables y a la inhibición de las principales vías productoras de ATP.

Significado fisiológico de los cambios de volumen

Anoxia química

En hepatocitos de especies anoxia sensibles, la inhibición del metabolismo aeróbico genera una serie de cambios que incluyen el aumento de volumen y que terminan con la muerte celular. En el presente estudio se muestra como, en hepatocitos de goldfish, si bien se verifican en algunos casos cambios leves en las concentraciones de los iones intracelulares, el mantenimiento de los gradientes iónicos (K^+ , Na^+ , H^+) evita cambios de volumen y por ende prolonga la viabilidad celular. En el caso del K^+ , su concentración solo

cambia levemente porque aun cuando los flujos transmembranales se desacoplan en anoxia, la magnitud de los mismos es relativamente baja. El pH intracelular se modifica muy levemente, debido que los hepatocitos de goldfish poseen una alta capacidad buffer al mismo tiempo que secretan protones de manera activa bajo anoxia (Krumschnable y col. 2001). Al evitar la acidez celular, el intercambiador Na^+/H^+ no se activa con lo cual el sodio intracelular también se mantiene constante.

En principio, la disminución de volumen observada al incubar los hepatocitos de goldfish con CN podría estimular la glucogenólisis y la glucólisis (Graf y col., 1988; Lang y col., 1998), aumentando la producción de ATP durante la anaerobiosis. Sin embargo, en la literatura subsisten controversias respecto del efecto del volumen celular sobre la glucólisis, dado que en distintos tejidos la disminución de volumen correlaciona directa o indirectamente con el flujo glucolítico (Clegg y col., 1990, Orfali y col., 1994, Peak y col., 1993).

Medios hiposmóticos

En esta condición los hepatocitos de goldfish se hincharon pero luego no regularon su volumen de manera significativa. Si bien se desconoce el significado preciso de este resultado, Lang y colaboradores (1998) postularon que el edema celular podría actuar como señal inhibitoria del metabolismo, particularmente si el estrés producido por el medio hiposmótico es transitorio o si el gradiente osmótico transmembrana no amenaza con la muerte celular (Strange y col., 1996). La baja metabólica inducida por aumento de volumen podría evitar el gasto de energía metabólica y prolongar la viabilidad celular. Los estudios de reversibilidad de la respuesta volumétrica a medios hiposmóticos (Cap. II) parecen estar de acuerdo con estas observaciones, dado que en medios hiposmóticos los hepatocitos hinchados de goldfish, a pesar de no mostrar RVD, pudieron recuperar su volumen y mantenerse viables al ser nuevamente incubados en medios isosmóticos.

Homeostasis del K^+ (Fig. 35)

Como se vio en el Cap. II, en medios hiposmóticos los hepatocitos de goldfish aumentaron su volumen pero no alteraron sus flujos transmembranales de K^+ . En el Cap. III vimos que estos resultados fueron compatibles con un modelo teórico en donde por lo menos un elemento del mecanismo de RVD estaba ausente o inactivado. Por el contrario, en hepatocitos de trucha la exposición a medios hiposmóticos promueve la salida de KCl

(Bianchini y col., 1988, 1991) y de agua, lo cual permite a estas células regular su volumen por RVD (Fig. 13B).

En cuanto a la anoxia química, en células de goldfish se activó un eflujo neto de K^+ de un 4 % (Cap. IV), pero la magnitud de este flujo fue pequeña en relación a la concentración de K^+ intracelular. En cambio en hepatocitos de trucha, este mismo tratamiento permite que se pierdan 5 veces más K^+ que en células de goldfish.

Para poder evaluar la presencia de un mecanismo efector de la RVD en células de goldfish se utilizó NEM, un activador del cotransportador K^+/Cl^- . En esas condiciones se verificó un aumento del 12% en el eflujo de K^+ de hepatocitos de goldfish, mientras que en hepatocitos de trucha el NEM induce un aumento de 30%. Entonces el mecanismo efector se encontraría presente en los hepatocitos de goldfish pero no sería activado por el aumento del volumen celular.

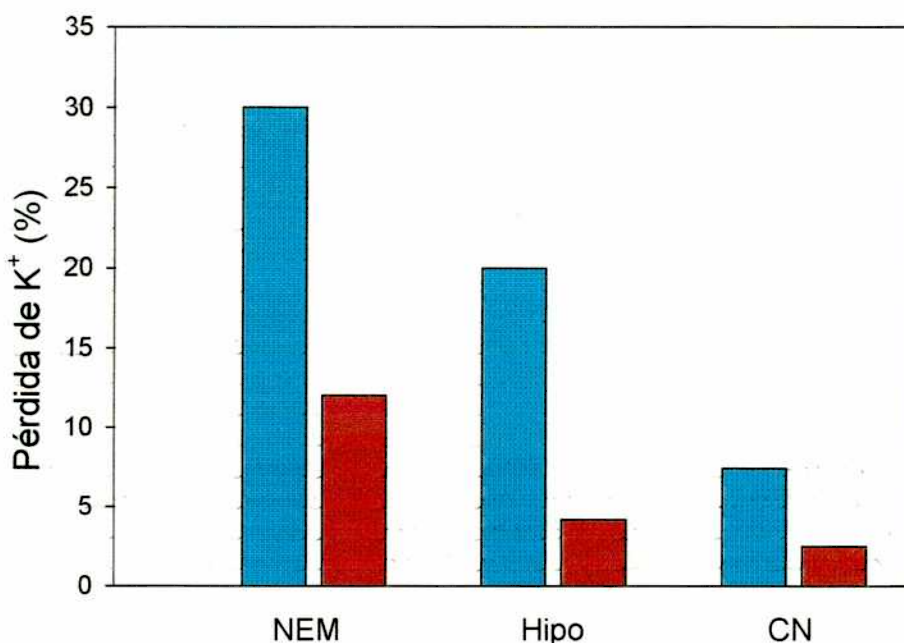
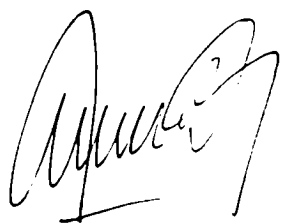


Figura 35. Pérdida de K^+ intracelular (como % de valores control). Hepatocitos de trucha (■) y goldfish (■) expuestos a NEM, Hipo (medio hiposmótico) y CN. Para los hepatocitos de trucha los valores se derivaron de los datos de Bianchini y col. (1988, 1991) y Krumschnabel y col. (1996)

Por lo tanto la evidencia experimental sintetizada en los párrafos precedentes indica que en hepatocitos de goldfish la concentración intracelular de K^+ y, por ende, su gradiente electroquímico transmembranal[&], no se modifican significativamente cuando las células son sometidas a cambios de su osmolaridad intra- y extracelular. Este resultado es consistente con la alta capacidad de estas células de mantener un estado estacionario para la distribución de iones difusibles a través de la membrana celular (ver Cap. IV de esta tesis, Krumschnabel y col, 1997, Krumschnabel y col., 1996). Como resultado de la alta retención del K^+ , no se generan cambios volumétricos asociados con la ganancia o pérdida de este catión-osmolito.

En resumen la presente tesis complementa el modelo anóxico de hepatocitos aislados de goldfish, mostrando que la integridad de estas células depende fuertemente de su capacidad para mantener los gradientes iónicos transmembranales en estado estacionario, aún a costa de perder la capacidad para regular su volumen frente a gradientes osmóticos y/o inhibición metabólica severa.



[&] Dado que en las condiciones experimentales la concentración extracelular de K^+ es constante

En la anoxia química, el CN bloquea la utilización del oxígeno por la mitocondria, pero el oxígeno sigue estando presente en los medios intra- y extracelular.

Si bien se demostró que la anoxia química (CN) permite identificar mecanismos celulares que median la muerte celular en células sensibles a la anoxia (Krumchnabel, y col., 2000), en algunos casos la respuesta a la anoxia química difiere de aquella obtenida en medios sin oxígeno. Para explicar esta discrepancia se postuló la existencia de sensores de oxígeno que mediarían la respuesta anóxica en todos los tipos celulares (Hochachka y Somero, 2002; Boutilier y St-Pierre, 2000), los cuales no serían activados en medios con CN pero sí en ausencia de oxígeno. Land y Hochachka (1995) demostraron que en hepatocitos de tortuga, un vertebrado anaerobo facultativo, la ausencia de oxígeno en el medio promueve la expresión de grupos específicos de proteínas, mientras que esta respuesta no se evidencia cuando las células son expuestas a medios con CN. Los cambios en la presión parcial de oxígeno del medio podrían ser sensados por hemoproteínas involucradas en el mecanismo de transducción de la respuesta a la anoxia (Buhn y Poyton, 1996).

Entonces para conocer mejor los mecanismos que determinan que los hepatocitos de goldfish toleren la anoxia sería importante caracterizar las diferencias que presentan las células frente al bloqueo de la producción de ATP por anoxia química y por anoxia fisiológica. Sabemos que en hepatocitos de goldfish el ATP intracelular disminuye 50% en presencia de CN y que, a diferencia de hepatocitos sensibles a la anoxia, la concentración del nucleótidos se mantiene estable en ese valor durante por lo menos 8 horas (Dorigatti y col. 1996). En cambio en presencia de anoxia fisiológica los niveles de ATP en hepatocitos de goldfish son similares a aquellos encontrados en condiciones control (es decir, en normoxia). Esto sugiere un papel importante para potenciales sensores de oxígeno en la respuesta anóxica. En este contexto se podrían intentar identificar los mencionados sensores y su papel en el arresto metabólico. También se podrían identificar patrones de expresión proteica y analizar su eventual papel en el mantenimiento del nuevo estado metabólico alcanzado.

Bibliografía

- Alpini, G., Garrick, R.A., Jones, M.J., Nunes, R., Tavoloni, N. (1986). Water and electrolyte permeability of isolated rat hepatocytes. *Am. J. Physiol.* 251, 872-882.
- Altamirano, J., Brodwick, M.S., Alvarez-Leefmans, F.J. (1998). Regulatory volume decrease and intracellular Ca²⁺ in murine neuroblastoma cells studied with fluorescent probes. *J. Gen. Physiol.* 112, 145-160.
- Alvarez-Leefmans, F.J., Altamirano, J., Crowe, W.E. (1995). Use of ion-selective microelectrodes and fluorescent probes to measure cell volume. *Meth. Neurosci.* 27, 361-391.
- Alvarez Leefmans, F.J., Reuss, L. (1996). Operación orquestada de los sistemas de transporte a través de la membrana plasmática: regulación y mantenimiento del volumen celular. En *Biofísica y Fisiología celular*. Eds. Latorre, R., López-Barneo, J., Bezanilla, F., Llinás, R. Universidad de Sevilla. 179-211.
- Alvarez-Leefmans, F.J., Altamirano, J., Crowe, W.E. (1997). Measurement of volume changes in single cells with fluorescent probes. *Axobits* 20, 10-13.
- Anundi, I., de Groot, H. (1989). Hypoxic liver cell death: critical PO₂ and dependence of viability on glycolysis. *Am. J. Physiol.* 20, 58-64.
- Baethmann, A., Kempster, O. (1989). Ischemic brain edema. *Prog. Appl. Microcirc.* 13, 38-53.
- Bakker-Grunwald, T. (1983). Potassium permeability and volume control in isolated rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 731. 239-242.

- Baumgarten, C.M., Feher, J.J. (1995). Osmosis and the regulation of the cell volume. En: Cell physiology source book. Ed. Sperelakis N. New York: Academic, 180-211.
- Berry, M.N., Friend, D.S. (1969). High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J. Cell Biol.* 43, 506-520.
- Berry, M.N. (1974). High-yield preparation of morphologically intact isolated parenchymal cells from rat liver. *Methods Enzymol.* 32, 625-632.
- Bianchini, L., Fossat, B., Porthé-Nibelle, J., Ellory, J.C., Lahlou, B. (1988). Effects of hypotonic shock on ion fluxes in isolated trout hepatocytes. *J. exp. Biol.* 137, 303-318.
- Bianchini, L., Fossat, B., Porthé-Nibelle, J., Lahlou, B. (1991). Activation by N-ethylmaleimide of a Cl⁻ dependent K⁺ flux in isolated trout hepatocytes. *J. exp. Biol.* 157, 335-348.
- Bickler, P., Buck, L.T. (1998). Adaptation of vertebrate neurons to hypoxia and anoxia: maintaining critical Ca²⁺ concentrations. *J. Exp. Biol.* 201, 1141-1152.
- Bogdanova, A. Y., Nikinmaa, M. (2001). Reactive oxygen species regulate oxygen-sensitive potassium flux in rainbow trout erythrocytes. *J. Gen. Physiol.* 117, 181-190.
- Bond, T., Basavappa, S., Christensen, M., Strange, K. (1999). ATP dependence of the ICl_{swell} channel varies with the rate of cell swelling. Evidence for two modes of channel activation. *J. Gen. Physiol.* 113, 441-56.

- Boutilier, R.G. (2001). Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia. *J. Exp. Biol.* 204, 3171-3181.
- Boutilier, R.G., St. Pierre, J. (2000). Surviving hypoxia without really dying. *Comp. Biochem. And Physiol. Part A* 126, 481-490.
- Boyer, J.L., Phillips, J.M., Graf, J. (1990) Preparation and specific applications of isolated hepatocyte couplets. En: *Methods in enzymology*. Ed: Academic Press. 501-515.
- Bruslé, J., González i Anadon, G. (1996). The structure and function of fish liver. In: *Fish Morphology*, edited by J. S. Data Munshi and H. M. Dutta. Lebanon, PA: Science, p. 77–93.
- Bunn, H.F., Poyton, R.O. (1996). Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol. Rev.* 76, 839-885.
- Burgess, G.M., Claret, M., Jenkinson, D.H. (1981). Effect of quinine and apamin on the calcium-dependent potassium permeability of mammalian hepatocytes and red cells. *J. Physiol. (Lond.)*. 317, 67-90.
- Carini, R., Autelli, R., Bellomo, G., Dianzani, M. U., Albano, E. (1995). Sodium-mediated cell swelling is associated with irreversible damage in isolated hepatocytes exposed to hypoxia or mitochondrial toxins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206, 180-185.
- Carini, R., Autelli, R., Bellomo, G., Albano, E. (1999). Alterations of cell volume regulation in the development of hepatocytes necrosis. *Exp. Cell. Res.* 248, 280-293.

- Catlett, R.H., Millich, D.R. (1976). Intracellular and extracellular osmoregulation of temperature acclimated goldfish: *Carassius auratus* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 55, 261-269.
- Chapman, I.B., Johnson, E.A., Kootsey, M. (1983). Electrical and biochemical properties of an enzyme model of the sodium pump. *J. Membr. Biol.* 74, 139-153.
- Corassanti, J.G., Gleeson, D., Boyer, J.L. (1990). Effects of osmotic stress on isolated rat hepatocytes. I. Ionic mechanisms of cell volume regulation. *Am. J. Physiol.* 258, 290-298.
- Donohoe, P.H., West, T.G., Boutilier, R.G. (2000). Factors effecting membrane permeability and ionic homeostasis in the cold-submerged frog. *J. Exp. Biol.* 203, 405-414.
- Dorigatti, M., Krumschnabel, G., Schwarzbaum, P.J., Wieser, W. (1996). Effects of hypoxia on energy metabolism in goldfish hepatocytes. *Comp. Biochem. Physiol.* 117B, 151-596.
- Emma, F., McManus, M., Strange, K. (1997). Intracellular electrolytes regulate the volume set point of the organic osmolyte/anion channel VSOAC. *Am. J. Physiol.* 272, 1766-1775.
- Foskett, J.V., Spring, K.R. (1985). Involvement of calcium and cytoskeleton in gallbladder epithelial cell volume regulation. *Am. J. Physiol.* 248, 27-36.
- Fossat, B., Porthe-Nibelle, J., Pedersen, S., Lahlou, B. (1997). Na^+/H^+ exchange and osmotic shrinkage in isolated trout hepatocytes. *J. exp. Biol.* 200:2369-2376.

- Fugelli, K., Kanli, H., Terreros, D.A. (1995). Taurine efflux is a cell volume regulatory process in proximal renal tubules from the teleost *Carassius auratus*. *Acta Physiol. Scand.* 155, 223-232.
- Gleeson, D, Corasanti, J.G., Boyer, J.L. (1990). Effects of osmotic stresses on isolated rat hepatocytes II. Modulation of intracellular pH. *Am. J. Physiol.* 21, G299-G307.
- Goldman, D.E. (1943). Potential, impedance and rectification in membranes. *J. Gen. Physiol.* 27, 37-60.
- Gores, G.J., Flarsheim, C.E., Dawson, T.L., Nieminen, A-L., Herman, B., Lemasters, J.J. (1989). Swelling, reductive stress, and cell death during chemical hypoxia in hepatocytes. *Am. J. Physiol.* 257, 347-354.
- Graf, J., Haddad, P., Haussinger, D., Lang, F. (1988). Cell volume regulation in liver. *Renal Physiol. Biochem.* 11, 202-220.
- Groot, J.A. (1981). Cell volume regulation in goldfish intestinal mucosa. *Pflügers Arch.* 392, 57-66.
- Häussinger, D.(1996). The role of cellular hydration for the regulation fo cell function. *Biochem. J.* 313, 697-710.
- Häussinger, D., Lang, F. (1991). Cell vollume in the regulation of hepatic function: a mechanism for metabolic control. *Biochim. Biophys. Acta.* 1071, 331-350.
- Herman, B., Nieminen, A., Gores, G.J., Lemasters, J.J. (1998). Irreversible injury in anoxic hepatocytes precipitated by an abrupt increase in plasma membrane permeability. *FASEB J.* 2, 146-151.

- Hernández, J.A., Cristina, E. (1998). Modeling cell volume regulation in nonexcitable cells: the roles of the Na⁺ pump and of cotransport systems. *Am. J. Physiol.* 275, 1067-1080.
- Hernández, J.A., Fischbarg, J., Liebovitch, L.S. (1989). Kinetic model of the effects of electrogenic enzymes on the membrane potential. *J. theor. Biol.* 137, 113-125.
- Hochachka, P.W., Somero, G.N. (1984). *Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Evolutionary Physiology*. Oxford University Press, New York, NY.
- Hochachka, P.W. (1986). Defence strategies against hypoxia and hypothermia. *Science* 231, 234-241.
- Hochachka, P.W., Lutz, P.L. (2001). Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comp. Biochem. Phys. Part B* 130, 435-459.
- Hochachka, P.W., Somero, G.N. (2002). Influence of oxygen availability. En: *Biochemical adaptation*. Ed.: Oxford university press. 101-157.
- Hodgkin, A.L., Katz, B. (1949). The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J. Physiol. (Lond.)* 108, 37-77.
- Jensen, F.B. (1994). Regulatory volume decrease in carp red blood cells: mechanisms and oxygenation-dependency of volume-activated potassium and amino acid transport. *J. exp. Biol.* 198, 155-165.
- Khalbuss, W.E., Wondergem, R. (1990). An electrophysiological technique to measure change in hepatocyte water volume. *Biochim. Biophys. Acta* 1029, 51-60.

- Kristensen, L.O. (1986). Associations between transports of alanine and cations across cell membrane in rat hepatocytes. *Am. J. Physiol.* 251, 575-584.
- Krumschnabel, G., Schwarzbaum, P.J., Wieser, W. (1994). Coupling of energy supply and energy demand in isolated goldfish hepatocytes. *Physiol. Zool.* 67, 438-448.
- Krumschnabel, G., Biasi, C., Schwarzbaum, P.J., Wieser, W. (1996). Membrane-metabolic coupling and ion homeostasis in anoxia-tolerant and anoxia-intolerant hepatocytes. *Am. J. Physiol.* 270, 614-620.
- Krumschnabel, G., Schwarzbaum, P.J., Biasi, C., Dorigatti, M., Wieser, W. (1997). Effects of energy limitation on Ca²⁺ and K⁺ homeostasis in anoxia-tolerant and anoxia-intolerant hepatocytes. *Am. J. Physiol.* 273, 307-316.
- Krumschnabel, G., Frischmann, M.E., Schwarzbaum, P.J., Wieser, W. (1998). Loss of K⁺ homeostasis in trout hepatocytes during chemical anoxia: a screening study for potential causes and mechanisms. *Arch. Biochem. Biophys.*, 353, 199-206.
- Krumschnabel, G. (2000). Cellular and molecular basis of anoxia-tolerance and -intolerance in vertebrates: Comparative studies using hepatocytes from goldfish and trout. *Recent Res. Devel. Comp. Biochem. And Physiol.* 1, 1-11.
- Krumschnabel, G., Manzl, C., Schwarzbaum, P. J. (2001). Regulation of intracellular pH in anoxia-tolerant and anoxia-intolerant teleost hepatocytes. *J. Exp. Biol.* 204, 3943-3951.

- Land, S.C., Hochachka, P.W.. (1995). A heme-protein-based oxygen-sensing mechanism controls the expression and suppression of multiple proteins in anoxia-tolerant turtle hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 7505-7509.
- Lang, F., Völkl, H., Häussinger, D. (1990). General principles in cell volume regulation. *Comp. Physiol. En: Cell volume regulation*, edited by K. W. Beyenbach. Karger, Basel. 4:1-25.
- Lang, F., Busch, G.L., Ritter, M., Volkl, H., Waldegger, S., Gulbins, E., Häussinger, D. (1998). Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Phys. Rev.* 78, 247-301.
- Lauf, P.K. (1982). Evidence for chloride dependent potassium and water transport induced by hyposmotic stress in erythrocytes of the marine teleost, *Opsanus tau*. *J. Comp. Physiol.* 146, 9-16.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, N.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Moon, T.W., Walsh, P.J., Mommsen, T.P.. (1985). Fish hepatocytes: a model metabolic system. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42,1772-1782.
- Nilsson, G.E. (1990). Long-term anoxia in crucian carp: changes in the levels of aminoacid and monoamine neurotransmitters in the brain, catecholamines in chromaffin tissue, and liver glycogen. *J. Exp. Biol.* 150, 295-320.
- Piironen J., Holopainen, I.J. (1986). A note on the seasonality in anoxia tolerance of crugian carp (*Carassius carassius*-(L)) in the laboratory. *Ann. Zool. Fennici.* 23, 335-338.

- Rolfe D.F.S., Brown, G.C. (1997). Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol. Rev.* 77, 731-758.
- Sackin, H. (1987). Stretch-activated potassium channels in renal proximal tubule. *Am. J. Physiol.* 253, 1253-1262.
- Sarkadi, B., Parker, J.C. (1991). Activation of ion transport pathways by changes in cell volume. *Biochim. Biophys. Acta.* 1071, 407-427.
- Schwarzbaum, P.J., Niederstätter, H., Wieser, W. (1992). Effects of temperature on the Na⁺/K⁺ ATPase and oxygen consumption in hepatocytes of two species of freshwater fish, roach (*Rutilus rutilus*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Physiol. Zool.* 65, 699-711.
- Schwarzbaum, P.J., Bernabeu, R.O., Krumschnabel, G., Biasi, C., Wieser, W. (1996). Effect of chemical anoxia on protein kinase C and Na⁺/K⁺ ATPase in hepatocytes of goldfish (*Carassius auratus*) and rainbow trout (*Onchorrhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.* 199, 1515-1521.
- Seddon, W.L., Prosser, C.L. (1999). Non-enzymatic isolation and culture of channel catfish hepatocytes. *Com. Biochem. and Physiol. Part A* 123, 9-15.
- Shoubridge, E.A., Hochachka, P.W. (1980). Ethanol: novel end product of vertebrate anaerobic metabolism. *Science* 209, 308-309.
- Strange, K., Emma, F., Jackson, P.S. (1996). Cellular and molecular physiology of volume-sensitive anion channels. *Am. J. Physiol.* 270, 711-730.
- Tsien, R.Y. (1981). A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature* 290, 527-528.

- Van den Thillart, G., Kesbeke, F., van Waarde, A. (1980). Anaerobic Energy-Metabolism of Goldfish, *Carassius auratus* (L.) Influence of Hypoxia and Anoxia on Phosphorylated Compounds and Glycogen. *J. Comp. Physiol.* 136, 45-52.
- Van den Thillart, G., Van Berge-Henegouwen, M., Kesbeke, F. (1983). Anaerobic metabolism of goldfish, *Carassius auratus* (L.) ethanol and CO₂ excretion rates and anoxia tolerance at 20, 10 and 5 °C. *Comp. Biochem. Physiol.* 76A (2), 295-300.
- Verkman, A.S. (1993). *Water Channels*. R.G. Landes Co., Austin.
- Wang, K., Wondergem, R. (1993) Hepatocyte water volume and potassium activity during hypotonic stress. *J. Memb. Biol.* 135, 137-144.
- Wehner, F., Beetz, G., Rosin-Steiner, S. (1992). Osmolarity reduction transiently increases K⁺ conductance of confluent rat hepatocytes in primary culture. *Am J. Physiol.* 263, 913-919.
- Wehner, F., Tinel, H. (2000). Osmolyte and Na⁺ transport balances of rat hepatocytes as a function of hypertonic stress. *Pflügers Arch.* 441, 12-24.
- Wilson, J.J., Randles, J., Kimmich, G.A. (1996). A model for the kinetic mechanism of sodium-coupled L-alanine transport in LLC-PK1 cells. *Am. J. Physiol.* 270, 49-59.
- Yano, M., Marinelli, R.A., Roberts, S.K., Balan, V., Pham, L., Tarara, J.E., de Groen, P.C., LaRusso, N.F. (1996). Rat hepatocytes transport water mainly via a non-channel-mediated pathway. *J. Biol. Chem.* 271, 6702-6707.