

Tesis Doctoral

Estudio biofísico del movimiento de agua en membranas biológicas: de las monocapas celulares a las membranas aisladas de ovocitos de *Xenopus laevis*

Ozu, Marcelo

2008

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:

Ozu, Marcelo. (2008). Estudio biofísico del movimiento de agua en membranas biológicas: de las monocapas celulares a las membranas aisladas de ovocitos de *Xenopus laevis*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Ozu, Marcelo. "Estudio biofísico del movimiento de agua en membranas biológicas: de las monocapas celulares a las membranas aisladas de ovocitos de *Xenopus laevis*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2008.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Estudio biofísico del movimiento de agua en
membranas biológicas: de las monocapas celulares a
las membranas aisladas de ovocitos de *Xenopus laevis***

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires en el área **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Lic. Marcelo Ozu

Director de tesis: Dr. Mario Parisi
Consejero de Estudios: Dr. Osvaldo Uchitel

Lugar de trabajo: Laboratorio de Biomembranas, Departamento de Fisiología y Biofísica,
Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2008

Estudio biofísico del movimiento de agua en membranas biológicas: de las monocapas celulares a las membranas aisladas de ovocitos de *Xenopus laevis*

El objetivo de esta tesis fue profundizar, con enfoque biofísico, el estudio del transporte de agua a través de membranas biológicas impulsado por gradientes osmóticos o hidrostáticos, o por el acoplamiento con el movimiento de solutos.

El contenido de esta tesis se divide en dos partes: 1) El estudio del movimiento de agua y solutos a través de una barrera epitelial, tomando como modelo, el de células T84 (de origen intestinal humano) y 2) El análisis de las propiedades osmóticas del primer canal hídrico clonado, la acuaporina-1 (AQP-1), en condiciones de control de las composiciones de los medios que bañan ambos extremos de la proteína insertada en una membrana biológica.

La primera parte lleva a la conclusión de que no es posible estimar directamente el flujo de agua a partir del movimiento electrogénico de iones, aún en condiciones de hiperestimulación, como se probó con potentes secretagogos.

La segunda parte presenta una nueva tecnología que permite, por primera vez, controlar las condiciones experimentales a ambos lados de una acuaporina expresada de manera natural en una membrana biológica. También presenta los resultados experimentales obtenidos, que fueron complementados con simulaciones computacionales sobre la base de modelos matemáticos. Se aportan nuevos datos sobre el comportamiento osmótico de la AQP-1, así como su regulación.

Palabras Clave: permeabilidad al agua, células T84, *Xenopus laevis*, acuaporinas, técnica de ovocitos vaciados

Biophysical study of water movements across biological membranes: from cellular monolayers to isolated membranes from *Xenopus laevis* oocytes

The objective of this thesis was to deepen, from a biophysical approach, into the study of water transport through biological membranes driven by osmotic or hydrostatic gradients, or by its coupling to solute movements.

The content of this thesis is divided into two parts: 1) The study of water and solute movements through an epithelial barrier, using the T84 cells (from human intestine origin) as model; and 2) The analysis of the osmotic properties of the first cloned water channel, the aquaporin-1 (AQP-1), controlling the compositions of the media on both sides of the protein inserted into a biological membrane.

The first part arrives to the conclusion that is not possible to suppose that estimating the magnitude of the transepithelial ions movements from electrical records it could be possible to estimate the associated water movement, even under conditions of electrogenic hyper-stimulation.

The second part presents a new methodology that allows, for the first time, controlling the experimental conditions on both sides of an aquaporin expressed on a natural way into a biological membrane. In addition, it presents the obtained experimental results, which were complemented with computational simulations based on mathematical models. New data contribute to the acknowledgement of the osmotic behaviour of AQP-1, just as its regulation.

Key words: water permeability, T84 cells, *Xenopus laevis*, aquaporins, emptied-out technique, water solute coupling

Agradecimientos

A la Universidad de Buenos Aires y al CONICET por formarme y darme los medios para trabajar en la ciencia

A Mario, por darme las oportunidades para conocer el mundo de la biofísica

A Ricardo, porque armamos un equipo que se inició con un desafío científico y me enseñó los valores más nobles de un ser humano

A Osvaldo, porque encontré un amigo, quien me llevó a encontrar a Lía; y porque es una fuente de ideas con una tremenda fuerza impulsora

A Roxana, porque me abrió la puerta al mundo de la biofísica y por las charlas compartidas

A Karina, Moira, Valeria, Paula M., Paula F., Claudia y Gabriela porque con ellos compartí los primeros mates, además de las charlas, los seminarios y el trabajo

A Pilar y Luciano, a quienes conocí hace poco y que son personas muy afectuosas

A María y a Rosalía

A todos quienes mencioné porque son el Laboratorio de Biomembranas que yo conocí y donde viví muy lindos momentos

A mis padres Roberto y Marta y a mi hermano Nicolás porque siempre trabajaron para darme lo mejor, que es su amor

Y a Lía, porque siempre estuvo y está a mi lado

**A Lía,
mi amor
y mi vida**

Indice General

Capítulo 1

Introducción General

1.1.	Introducción al estudio biofísico del transporte de agua	1
1.1.1.	El flujo de agua y sus fuerzas impulsoras	2
1.1.2.	Las vías y los mecanismos para el transporte de agua a través de las membranas biológicas	3
1.1.2.1.	El movimiento de agua a través de la membrana celular	3
1.1.2.2.	El movimiento de agua a través de las barreras epiteliales	5
1.1.2.3.	La existencia de canales específicos para el agua recibe nuevos aportes experimentales: Hacia la clonación de los canales específicos para agua	7
1.1.2.4.	Las vías moleculares para el pasaje de agua	8
1.1.2.4.1.	La bicapa lipídica	9
1.1.2.4.2.	Las acuaporinas	10
1.1.2.4.3.	Los cotransportadores agua-soluto	15
1.1.3.	Métodos experimentales utilizados para estudiar el transporte de agua	17
1.1.3.1.	Medición del transporte de agua a través de membranas plasmáticas celulares	17
1.1.3.2.	Medición de la permeabilidad al agua en membranas lipídicas planas	18
1.1.3.3.	Medición del transporte de agua a través de epitelios	19
1.1.3.4.	Estudio del transporte de agua a través de las acuaporinas	19
1.1.4.	Modelización del transporte de agua	20
1.1.5.	Introducción al estudio biofísico del transporte de solutos	22
1.1.5.1.	Métodos experimentales utilizados para estudiar el transporte de solutos	22
1.2.	Objetivos	23

Capítulo 2

Transporte de agua y solutos en un modelo de epitelio digestivo: las células T84

2.1.	La utilización de líneas celulares como modelo para el estudio del transporte transepitelial de agua y solutos	24
2.1.1.	La línea celular T84	25
2.2.	Objetivos e hipótesis	28
2.3.	Materiales y Métodos	29
2.3.1.	Cultivo y mantenimiento de las células	29
2.3.2.	Medida de los flujos de agua	30
2.3.2.1.	Descripción del sistema	30
2.3.2.2.	Sistema de detección	31
2.3.2.3.	Calibración del equipo	32
2.3.3.	Determinación de P_{osm} y P_{hid}	32
2.3.4.	Estudios electrofisiológicos	33
2.3.5.	Estudios farmacológicos	34
2.3.5.1.	Experimentos con 1-EBIO, DC-EBIO y bumetanida	34
2.3.6.	Análisis estadístico	35
2.4.	Resultados	36
	Caracterización biofísica de las células T84: las	
2.4.1.	permeabilidades hidrostática y osmótica	36
2.4.2.	Mediciones de I_{SC} y J_w en la línea celular T84	37
2.4.2.1.	Flujos basales de agua e iones en las células T84	37
	Comparación de los efectos producidos por 1-EBIO mucoso y	
2.4.2.1.1.	1-EBIO seroso	38
	Efectos producidos por distintas concentraciones de 1-EBIO	
2.4.2.1.2.	seroso	39
	Efecto del DC-EBIO sobre J_w y los parámetros eléctricos de	
2.4.2.2.	las células T84	41
2.4.2.2.1.	Efectos producidos por 25 μ M de DC-EBIO	41

2.4.2.2.1.1.	Efectos de DC-EBIO 25 μM sobre J_w	41
2.4.2.2.1.2.	Efectos de DC-EBIO 25 μM sobre I_{SC}	42
2.4.2.2.1.3.	Efectos de DC-EBIO 25 μM sobre ΔV_T	43
2.4.2.2.2.	Efectos producidos por 50 μM de DC-EBIO	43
2.4.2.2.2.1.	Efectos de 50 μM de DC-EBIO sobre I_{SC} y J_w	43
2.4.2.2.2.2.	Efectos de 50 μM de DC-EBIO sobre ΔV_T	44
2.5.	Discusión	45
2.5.1.	La permeabilidad al agua en T84	45
	El acoplamiento entre agua e iones durante la absorción y la	
2.5.2.	secreción	45
2.5.2.1.	Los efectos producidos por 1-EBIO sobre las células T84	45
2.5.2.2.	Los efectos producidos por DC-EBIO sobre las células T84	46
2.5.2.3.	El desacople de I_{SC} y J_w en las células T84	47
2.6.	Conclusiones	49

Capítulo 3

Desarrollo de técnicas originales para la medición del transporte de agua y solutos en células aisladas

3.1.	Introducción	50
3.1.1.	Antecedentes	51
3.1.2.	La técnica del ovocito vaciado	53
3.2.	Objetivos	54
3.3.	Materiales y métodos	55
3.3.1.	Preparación de los ovocitos	55
3.3.1.1.	Mantenimiento de las ranas de <i>Xenopus laevis</i>	55
3.3.1.2.	Obtención de los ovocitos	55
3.3.1.3.	Soluciones	56
3.3.2.	Descripción de la técnica del ovocito vaciado	57
3.3.2.1.	Descripción del pegado del ovocito sobre el soporte de acrílico	57
3.3.2.2.	Ensamblado y cierre de la cámara experimental	58
3.3.2.3.	Video-microscopía y análisis de imágenes	60
3.4.	Resultados	62

3.4.1.	Puesta a punto de la técnica de vaciado (“emptied-out”)	62
3.4.2.	Efecto de la presión hidrostática sobre la posición de la membrana del ovocito	62
3.4.3.	Efecto del aumento de la presión hidrostática hasta la ruptura de la membrana	63
3.5.	Conclusiones	65

Capítulo 4

Estudios de la respuesta osmótica en ovocitos vaciados nativos y con expresión de acuaporina-1

4.1.	Objetivos e hipótesis	66
4.2.	Estudios de permeabilidad en ovocitos nativos vaciados	67
4.2.1.	Materiales y métodos	67
4.2.2.	Resultados	68
4.2.2.1.	Estudio comparativo de la permeabilidad osmótica usando la técnica de vaciado en ovocitos de estadios IV y VI	68
4.2.2.2.	Determinación del cambio máximo del volumen relativo	69
4.2.3.	Discusión	70
4.3.	Estudios de permeabilidad en ovocitos vaciados que expresan acuaporina-1	70
4.3.1.	Introducción	70
4.3.2.	Materiales y Métodos	71
4.3.2.1.	Construcción del plásmido y síntesis <i>in vitro</i>	71
4.3.2.2.	Inyección de ARNc de AQP-1 en ovocitos	72
4.3.2.3.	Estudio de la respuesta osmótica en ovocitos enteros	72
4.3.2.4.	Configuración para trabajar con ovocitos vaciados expresando AQP-1	73
4.3.2.5.	Modelos matemáticos y simulaciones	74
4.3.2.5.1.	El modelo de transporte de agua	74
4.3.2.5.2.	El modelo de transporte de agua y solutos	75
4.3.2.5.3.	Simulaciones	75
4.3.2.5.3.1.	Comparación entre los modelos	75

4.3.2.5.3.2.	Ajuste de curvas en ovocitos enteros	76
4.3.2.5.3.3.	Predicciones	77
4.3.2.6.	Estudio de la respuesta osmótica de ovocitos vaciados con solutos permeables	77
4.3.2.7.	Estudio del efecto del HgCl ₂ en ovocitos vaciados	77
4.3.2.8.	Estudio de la respuesta osmótica en ovocitos vaciados con solutos no permeables	78
4.3.2.8.1.	Protocolo para el gradiente hipo-osmótico	78
4.3.2.8.2.	Protocolo para el gradiente hiper-osmótico	79
4.3.2.9.	Análisis estadístico	79
4.3.3.	Resultados	79
4.3.3.1.	Los valores de permeabilidad osmótica medidos en ovocitos enteros	79
4.3.3.2.	Predicción de la respuesta osmótica en ovocitos vaciados	80
4.3.3.3.	El efecto asimétrico del HgCl ₂ sobre la permeabilidad de la membrana en ovocitos vaciados	82
4.3.3.4.	Respuestas largas y respuestas cortas en ovocitos vaciados con altos valores de P _{osm}	84
4.3.3.5.	Existencia de un fenómeno no osmótico en las poblaciones de respuesta larga	87
4.3.3.6.	Estudio de la permeabilidad osmótica de ovocitos vaciados, con AQP-1 y en presencia de solutos impermeables	89
4.3.3.6.1.	Respuesta de los ovocitos vaciados con AQP-1 ante un gradiente HIPO-osmótico	89
4.3.3.6.2.	Respuesta de los ovocitos vaciados con AQP-1 ante un gradiente HIPER-osmótico	89
4.3.3.6.3.	Simulaciones	89
4.3.4.	Discusión	91
4.3.4.1.	La técnica del ovocito vaciado	91
4.3.4.2.	Adquisición y análisis de imágenes	91
4.3.4.3.	Efecto del HgCl ₂	92
4.3.4.4.	Los experimentos con solutos permeables	92
4.3.4.5.	Los experimentos con solutos no permeables	93

4.3.5.	Conclusiones	94
	Anexo metodológico	95
1.	Desarrollo de los modelos	95
1.1.	El modelo de agua	95
1.2.	El modelo de agua y solutos	96
2.	Modificaciones hechas a los modelos para simular los cambios de volumen en presencia de solutos impermeables	97

Capítulo 5

Resumen y perspectivas futuras

5.1.	El acoplamiento agua-solutos en las barreras epiteliales	98
5.2.	Las acuaporinas como facilitadoras del movimiento de agua en la membrana celular	99
5.3.	El acoplamiento agua-solutos en el transporte a través de la membrana celular	100

Capítulo 6

Bibliografía	101
---------------------	-----

Índice de Figuras

Figura 1.1.	Vías implicadas en el transporte de agua a través de un epitelio.	6
Figura 1.2.	Esquema de las posibles vías implicadas en el transporte transcelular de agua.	8
Figura 1.3.	Estructura de la acuaporina-1.	11
Figura 2.1.	Representación esquemática del dispositivo automático para la medición de flujos de agua.	31
Figura 2.2.	Determinación de P_{osm} en T84.	37
Figura 2.3.	Comparación de los efectos producidos por el 1-EBIO ($5 \cdot 10^{-4}$ M) mucoso (n=5) o seroso (n=3).	38
Figura 2.4.	Efecto del 1-EBIO en ambos lados de la monocapa de células T84 sobre J_w .	39
Figura 2.5.	Efecto del 1-EBIO seroso sobre la I_{sc} estimulada por 1-EBIO mucoso.	40
Figura 2.6.	Efecto del 1-EBIO sobre la diferencia de potencial transepitelial (ΔV_T).	40
Figura 2.7.	Efecto del DC-EBIO (25 μ M) y la bumetanida sobre el flujo de agua.	42
Figura 2.8.	Efecto del DC-EBIO (25 μ M) sobre la corriente de cortocircuito.	42
Figura 2.9.	Efecto del DC-EBIO (25 μ M) sobre la diferencia de potencial transepitelial.	43
Figura 2.10.	Efecto del DC-EBIO (50 μ M) sobre la corriente de cortocircuito.	44
Figura 2.11.	Comparación del desacople entre el flujo electrogénico de iones (I_{sc}) y el flujo de agua (J_w) observado en células T84 estimuladas con STa y con DC-EBIO (50 μ M mucoso y 50 μ M seroso).	48
Figura 3.1.	Fotografías de una hembra adulta de <i>Xenopus laevis</i> y de sus ovocitos.	56

Figura 3.2.	Esquema del soporte para pegar los ovocitos y del método de vaciado.	58
Figura 3.3.	Esquema de la cámara experimental para la técnica de ovocitos vaciados.	59
Figura 3.4.	Detalle de la videocámara montada sobre la lupa estereoscópica.	60
Figura 3.5.	Imagen de un ovocito vaciado montado en la cámara experimental.	62
Figura 3.6.	Desplazamiento de la membrana al aumentar la presión hidrostática en la cámara cerrada.	63
Figura 3.7.	Volumen de un ovocito maduro parcialmente vaciado, sometido al aumento de la presión hidrostática.	64
Figura 4.1.	Respuesta de un ovocito de <i>Xenopus</i> nativo de estadio IV ante un gradiente hipo-osmótico.	69
Figura 4.2.	Permeabilidad osmótica de la membrana de los ovocitos nativos de <i>Xenopus laevis</i> en respuesta a un gradiente hipo-osmótico.	69
Figura 4.3.	Fotografía de la inyección de los ovocitos de <i>Xenopus</i> .	72
Figura 4.4.	Descripción de la metodología utilizada para trabajar con ovocitos inyectados con AQP-1.	74
Figura 4.5.	Curso temporal del volumen relativo de ovocitos enteros ante la imposición de un gradiente osmótico.	80
Figura 4.6.	Desplazamiento osmótico de la membrana de ovocitos inyectados con AQP-1 estudiados con la técnica de vaciado.	81
Figura 4.7.	Predicción de la respuesta osmótica en ovocitos vaciados.	82
Figura 4.8.	Efecto asimétrico del Hg^{2+} sobre la permeabilidad osmótica de la membrana de ovocitos vaciados.	83
Figura 4.9.	Respuesta osmótica de los ovocitos vaciados inyectados con AQP-1.	85
Figura 4.10.	Respuesta osmótica de los ovocitos inyectados con AQP-1, vaciados y tratados con $HgCl_2$ del lado citoplasmático de la membrana.	86

Figura 4.11.	Diferencias entre los datos experimentales y las simulaciones con el modelo de agua en las poblaciones de respuesta larga.	87
Figura 4.12.	Superposición de los datos experimentales y las simulaciones con el modelo de agua y solutos en las poblaciones de respuesta larga.	88
Figura 4.13.	Respuesta osmótica de los ovocitos con AQP-1 sometidos a gradientes hipo e hiper-osmóticos con solutos no permeables.	90

Indice de Tablas

Tabla 1.1.	Distribución y funciones propuestas para las distintas AQPs en mamíferos.	12
Tabla 2.1.	Resultados de los registros simultáneos de J_w , I_{SC} , R_T y ΔV_T , en T84 bajo condiciones basales.	37
Tabla 2.2.	Comparación de los efectos producidos por STa y DC-EBIO (50 μ M mucoso y 50 μ M seroso) sobre I_{SC} y J_w en monocapas de células T84.	47
Tabla 4.1.	Valores de P_{osm} obtenidos durante los primeros 40 s después de un shock hipotónico en ovocitos vaciados.	83

Glosario de abreviaturas

1-EBIO	1-1-Etil-1,3-dihidro-2H-benzimidazol-2-ona (benzimidazolona)
A	Área de membrana
ADH	Hormona anti-diurética
AIC	Puntaje asignado por el método de Akaike para un modelo dado
AQP	Acuaporina
AQPs	Acuaporinas
AQP-1	Acuaporina-1
AQP-1+HgCl ₂ (cit)	Ovocitos inyectados con AQP-1 tratados con HgCl ₂ en el lado citoplasmático de la membrana
AQP-1+HgCl ₂ (ext)	Ovocitos inyectados con AQP-1, tratados con HgCl ₂ en el medio extracelular de la membrana
ar/R	Región aromática/Arginina en el poro de las acuaporinas
Caco-2	Línea celular originada a partir de un tumor de colon humano
CHIP28	Primer nombre dado a la acuaporina-1
Cis189	Cisteína en la posición 189 de secuencia aminoacídica de la acuaporina-1
CFTR	Canal de Cl ⁻ regulador de la fibrosis quística
DC-EBIO	5,6-dichloro-1-ethyl-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-ona (benzimidazolona)
DMSO	Di-metil-sulfóxido
Ea	Energía de Activación
Estadio IV	Estadio intermedio de la maduración de los ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>
Estadio VI	Estadio tardío de la maduración de los ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>
HIPER	Gradiente hiper-osmótico
HIPO	Gradiente hipo-osmótico
HgCl ₂	Cloruro de mercurio
I _{sc}	Corriente de Corto-Circuito
ISO	Condición iso-osmótica
J _w	Flujo neto de agua
J _w -hid	Flujo neto de agua debido a un gradiente de presión hidrostática
J _w -osm	Flujo neto de agua debido a un gradiente osmótico
J _w -transp	Flujo neto de agua asociado a transporte
LLC-PK-1	Línea celular derivada del riñón de cerdo
L _p	Coefficiente fenomenológico
L _x	Coefficiente fenomenológico
MA	Modelo de Agua
MAS	Modelo de Agua y Solutos

MDCK	Epitelio modelo de túbulo proximal renal
$m\text{Osmol.Kg}_w^{-1}$	Osmolaridad expresada como miliosmoles de soluto por kilogramo de agua
NHE-2	Isoforma 2 del intercambiador Na^+/H^+
NPA	Región consenso de las acuaporinas (Asparragina-Prolina-Alanina)
OE	Ovocitos enteros
OR-2	Solución para ovocitos
P_{dw}	Permeabilidad difusional de una membrana al agua
P_f	Permeabilidad de una membrana al agua debido a una fuerza impulsora
pf	Permeabilidad de las acuaporinas por canal
P_{hid}	Permeabilidad de una membrana al agua debido a una diferencia de presión hidrostática
P_{osm}	Permeabilidad de una membrana al agua debido a una diferencia de presión osmótica
P_s	Permeabilidad de una membrana al soluto
RC	Ovocitos de respuesta osmótica corta
RCCD-1	Línea celular originada a partir del túbulo colector cortical de rata
RE	Relación de evidencia para el método de Akaike
REG	Regresión lineal
RG-C	Receptor de uroguanilina
RL	Ovocitos de respuesta osmótica larga
R_T	Resistencia transepitelial
STa	Toxina Termoestable de <i>Escherichia coli</i>
T84	Línea celular originada a partir de un adenocarcinoma de colon humano
UGN	Uroguanilina
V_w	Volumen molar parcial del agua
ΔAIC	Diferencia entre los valores de Akaike para dos modelos diferentes
Δosm	Diferencia de osmolaridad entre ambos lados de una membrana
ΔP_{dw}	Diferencia de permeabilidad difusional al agua
ΔP_{hid}	Diferencia de permeabilidad hidrostática al agua
ΔP_{osm}	Diferencia de permeabilidad osmótica al agua
ΔV_T	Diferencia de potencial eléctrico transepitelial
ΔX	Diferencia de presión hidrostática u osmótica a ambos lados de una membrana
σ	Coefficiente de reflexión de Staverman para un soluto con respecto a una determinada membrana

Capítulo 1

Introducción general

La tesis que aquí se presenta aborda el estudio del transporte de agua a través de membranas biológicas impulsado por gradientes osmóticos o hidrostáticos, o por el acoplamiento de agua con el movimiento de solutos. El objetivo fue profundizar el conocimiento sobre las bases biofísicas de estos fenómenos.

El contenido de esta tesis se divide en dos partes: 1) El estudio del movimiento de agua y solutos a través de una barrera epitelial modelo, formada por células T84 (de origen intestinal humano) y 2) El análisis de las propiedades osmóticas del primer canal hídrico clonado, la acuaporina-1 (AQP-1), en condiciones de control de las composiciones de los medios que bañan ambos extremos de la proteína insertada en una membrana biológica. Para esto último, fue necesario desarrollar una nueva técnica de medición, ya que las metodologías empleadas hasta la fecha no permiten trabajar en tales condiciones.

A continuación, como introducción al tema, se presentarán las bases biofísicas de los movimientos de agua y solutos a través de las membranas biológicas.

1.1. Introducción al estudio biofísico del transporte de agua

El estudio de los fenómenos osmóticos es una actividad interdisciplinaria a la que se dedicaron muchos científicos de distintas áreas de la ciencia.

El fisiólogo Henri Dutrochet (1776 - 1847) fue quién acuñó el concepto de “*presión osmótica*”. Luego, científicos como el botánico Wilhelm Pfeffer (1845 - 1920) y los físicoquímicos Jacobus Henricus Van't Hoff (1852 - 1911) y Josiah Willard Gibbs (1839 - 1903) continuaron un camino que desarrolló, cada vez con mayor profundidad, las bases físicas del fenómeno del transporte de agua.

Sin embargo, a pesar del enorme número de estudios efectuados sobre ósmosis durante los casi dos siglos que transcurrieron desde que se postulara este mecanismo, aún restan esclarecer muchos aspectos vinculados con él.

En el estudio de los fenómenos osmóticos se produjo un punto de inflexión con la identificación y el clonado de las acuaporinas (AQPs), hechos que ocurrieron muchos años

después de que se propusiera la hipótesis de la existencia de canales para el pasaje de agua. Este hallazgo abrió un campo de estudio muy amplio en el que se mezclan las técnicas experimentales más clásicas de la fisiología con las más modernas de la biofísica y la biología molecular, complementadas con el desarrollo de simulaciones computacionales basadas en modelos matemáticos.

1.1.1. El flujo de agua y sus fuerzas impulsoras

El movimiento neto de agua a través de una membrana puede describirse mediante el formalismo de la termodinámica de los procesos irreversibles (Katchalsky & Curran, 1965). Si el sistema en estudio no está muy lejos del equilibrio termodinámico, esta rama de la física propone una relación lineal entre las fuerzas impulsoras de un determinado flujo y el flujo resultante. En el caso que nos ocupa, nos referimos a diferencias de presiones hidrostática u osmótica y al flujo de volumen de agua que estas fuerzas impulsan a través de una dada membrana. De este modo:

$$J_w = L_x \Delta X ,$$

donde J_w es el flujo de volumen de agua a través de la membrana, ΔX es la diferencia de presión hidrostática u osmótica entre ambos lados de la membrana y L_x es un coeficiente fenomenológico a partir del cual se puede calcular la permeabilidad hidráulica (P_f) de la membrana en estudio (Finkelstein, 1987). P_f y L_x están relacionados por la siguiente ecuación:

$$P_f = \frac{L_x RT}{V_w A} ,$$

donde, R es la constante universal de los gases, T es la temperatura termodinámica, V_w es el volumen molar parcial del agua, A es el área de la membrana atravesada por el agua y P_f es la permeabilidad hidrostática (P_{hid}) o la permeabilidad osmótica (P_{osm}), de acuerdo a la fuerza impulsora empleada (Parisi y col, 1997).

La permeabilidad da una idea de la facilidad que tienen las moléculas de agua para atravesar una membrana, impulsadas por un determinado gradiente (fuerza impulsora). Estos gradientes pueden darse por diferencias de concentración de solutos osmóticamente activos o por diferencias de presión hidrostática que se manifiestan entre ambos lados de la membrana. La magnitud de la permeabilidad da información acerca de cómo es la membrana en cuanto

al transporte de agua que ocurre a su través. Por otro lado, la inversa de la permeabilidad es proporcional a la resistencia hidráulica que la membrana le ofrece al flujo.

Como se mencionó, la fuerza impulsora del flujo (ΔX), puede estar dada por una diferencia de presión osmótica o por una de presión hidrostática; magnitudes que tienen unidades interconvertibles entre sí. Un primer interrogante surge cuando se observa la imposibilidad física de aplicar la presión hidrostática equivalente a la presión osmótica observable a través de ciertas membranas biológicas: un gradiente de 100 mOsm/l, corrientemente observable en los sistemas biológicos, equivale a una presión hidrostática de 2,24 atmósferas, magnitud que no es compatible con un sistema biológico.

1.1.2. Las vías y los mecanismos para el transporte de agua a través de las membranas biológicas

Los mecanismos por los cuales el agua pasa a través de las membranas biológicas fueron estudiados intensamente desde mediados del siglo XX, y se propusieron diferentes hipótesis para explicarlos.

1.1.2.1. El movimiento de agua a través de la membrana celular

Durante muchos años se discutió si el pasaje de agua a través de la membrana celular ocurría o no por vías específicas. Quienes afirmaban que éstas no eran necesarias planteaban que el agua pasaba solamente por difusión atravesando los lípidos que forman la estructura básica de la membrana, de la misma forma en que lo hacen gases como el oxígeno o el dióxido de carbono. Sin embargo, en ciertos tipos celulares y, en particular, en tejidos donde se producen grandes movimientos de agua, se reunían cada vez más evidencias –aunque indirectas– de que la simple difusión a través de la bicapa lipídica no podía justificar los flujos observados. Es por ello que otros investigadores sostenían la existencia de estructuras específicas (canales), que permitían explicar, no sólo rápidos cambios de volumen celular, sino también la regulación del pasaje de agua, un evento que es fundamental tanto en procesos fisiológicos como fisiopatológicos.

En general, se tienen en cuenta cuatro parámetros para explorar la posibilidad de la existencia de una vía específica para el paso de agua: 1) el coeficiente de permeabilidad difusional al agua de la membrana (P_{dw}); 2) el coeficiente de permeabilidad osmótica de la membrana (P_{osm}); 3) la energía de activación (E_a) para ambos parámetros, y 4) el coeficiente

de reflexión de Staverman de la membrana (σ) para una serie de moléculas no-electrolíticas no-liposolubles (Parisi y col., 1997; Verkman, 2000).

El coeficiente de permeabilidad difusional P_{dw} considera la tasa de transporte de agua a través de la membrana en ausencia de un gradiente osmótico; por el contrario, P_{osm} refleja el transporte de agua a través de la membrana en presencia de éste. El cociente entre la permeabilidad osmótica y la difusional ($\Delta P_{osm}/\Delta P_{dw}$) se considera como un parámetro que aporta información acerca de la existencia o no de los canales para el agua. Si el movimiento de transferencia de agua es similar en presencia o en ausencia de un gradiente osmótico, la relación $\Delta P_{osm}/\Delta P_{dw}$ será igual a 1. Si en cambio, la presencia de un gradiente determina una diferencia en el flujo de agua y si existe una vía de pasaje con menor resistencia, se observará que $\Delta P_{osm}/\Delta P_{dw} > 1$. La base teórica de esta diferencia se basa en suponer que, al establecer un gradiente osmótico, aparece un flujo acoplado de agua a través de los canales que sigue, en primera aproximación, la ley de Poiseuille. En ausencia de gradiente osmótico, los movimientos de agua ocurren por difusión, de acuerdo a la ley de Fick. Si bien esto es aceptable en el caso de poros o canales con un cierto diámetro mínimo (Hammel y col., 1979), la posibilidad de un “flujo acoplado” se hace inviable si las moléculas de agua se mueven a través de canales angostos de un diámetro similar a la propia molécula de agua en un movimiento en “fila india” (“single file”) (Parisi & Bourguet, 1983; Finkelstein, 1987). En este último caso se acepta que la relación $\Delta P_{osm}/\Delta P_{dw}$ indica la cantidad de moléculas simultáneamente presentes en el interior del canal en una sola fila (Rosemberg & Finkelstein, 1978).

La energía de activación (E_a) provee una medida de la barrera energética que enfrenta el agua al atravesar la membrana. Si el movimiento implica un proceso de partición-difusión, la E_a del movimiento de agua a través de una membrana debe ser mayor que la del movimiento de agua a través de canales.

El último parámetro considerado, el coeficiente de reflexión (σ), tiene en cuenta las propiedades de una determinada membrana en relación a un determinado soluto y la posibilidad que éste tiene de atravesarla con mayor o menor dificultad. Los límites de σ son: 0 cuando la dificultad de este soluto para atravesar esa membrana es mínima (entonces se dice que la membrana es permeable a ese soluto) y 1 cuando dicha membrana es impermeable al mismo. Asumida (o demostrada) la presencia de canales en la membrana, este parámetro permite calcular el diámetro de los mismos.

Los trabajos pioneros sobre el estudio de la permeabilidad al agua a través de membranas celulares fueron realizados por A. K. Solomon y colaboradores a finales de la década de 1950 (Paganelli & Solomon, 1957; Goldstein & Solomon 1960). La metodología experimental, usando glóbulos rojos humanos, incluía mediciones de flujos de agua tritiada para estimar P_{dw} , y análisis de dispersión de la luz (“light-scattering”) para evaluar los cambios del volumen celular, y así calcular P_{osm} . De estos trabajos se desprendía que una diferencia entre las constantes de permeabilidad osmótica y difusional es indicativa de la presencia de canales que atraviesan la membrana y están completamente ocupados por agua en su interior (Ussing & Zeranh, 1951; Seidel & Solomon, 1957).

Éstos y otros estudios realizados en las décadas de 1950 y 1960 llevaron a postular la hipótesis que sostenía que la permeabilidad al agua de ciertas membranas biológicas se debía a la presencia de poros específicos presentes en las células. Se aceptaba el modelo que consideraba que estos poros atravesaban la membrana, eran rectilíneos y cilíndricos y debían ser una especie molecular ampliamente difundida entre los seres vivos.

Si bien la imagen de una membrana atravesada por poros cilíndricos y uniformes era una aproximación geométrica ideal, fue considerada como un medio conveniente de descripción (Hohmann & Nielsen, 2000). Los estudios que relacionaban mediciones de la velocidad de entrada de moléculas no-electrolíticas y no-liposolubles de diferentes tamaños en el glóbulo rojo humano, con la generación de curvas teóricas que utilizaban el radio del poro como parámetro, dieron como resultado (teniendo en cuenta el coeficiente de reflexión σ) una estimación del radio del poro de 4.2 Å (Goldstein & Solomon, 1960).

Un formalismo similar se aplicó en aquellos años para medir las propiedades de permeabilidad al agua en diferentes células, por ejemplo en la fibra aislada del músculo de la rana (Zadunaisky y col., 1963) y en el axón gigante del calamar (Villegas & Villegas, 1960) complementando las observaciones con técnicas de microfotografía óptica y electrónica, respectivamente.

1.1.2.2. El movimiento de agua a través de las barreras epiteliales

El estudio del acoplamiento entre el transporte de solutos y agua en las barreras epiteliales es un aspecto importante de los estudios de la permeabilidad hídrica que será abordado en detalle en el Capítulo 2 de esta tesis.

En el caso de las barreras epiteliales, el movimiento neto de agua a través del epitelio es la resultante de una interacción compleja entre los flujos inducidos por gradientes

osmóticos e hidrostáticos y aquellos acoplados al transporte de iones (Escobar y col, 1990; Capurro & Parisi, 1992).

Los movimientos de agua a través de los epitelios celulares pueden ocurrir tanto entre las células (vía paracelular) como a través de ellas (vía transcelular), como está esquematizado en la Figura 1.1. Tradicionalmente se acepta que la importancia relativa de estas vías difiere según las características de las uniones intercelulares del epitelio, hablándose de epitelios abiertos (“leaky”) o cerrados (“tight”) (Whittembury y col, 1985; Naftalin & Tripathi, 1986).

Además, por estar los epitelios compuestos por células polarizadas, la permeabilidad transepitelial resulta de las permeabilidades de dos membranas en serie, diferentes entre sí morfológica y funcionalmente, la apical (que mira al lado luminal del epitelio) y la basolateral (que mira al lado seroso del epitelio). El límite entre ambas membranas es la unión estrecha (“tight junction”).

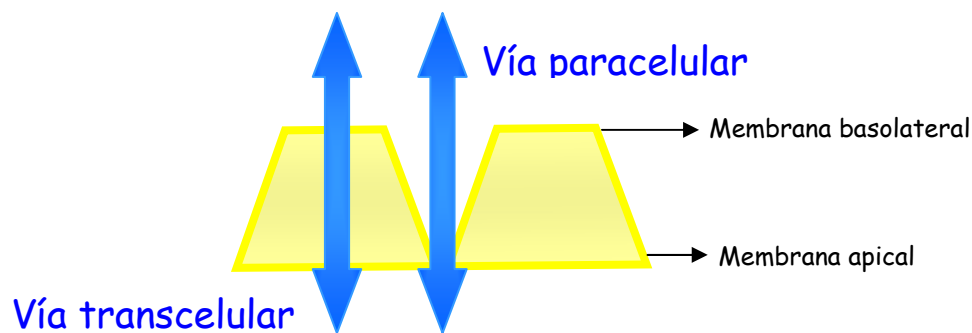


Figura 1.1. Vías implicadas en el transporte de agua a través de un epitelio. Las flechas indican el flujo neto de agua transepitelial cuya dirección dependerá del gradiente aplicado.

El túbulo colector renal de los mamíferos y la vejiga urinaria de los anfibios (que se toma como modelo experimental del anterior) son prototipos de epitelios cerrados. Su borde apical (luminal) es, en ausencia de hormona antidiurética (ADH) circulante o en el medio seroso, prácticamente impermeable al agua. Se acepta entonces que el aumento de la permeabilidad epitelial inducido por la acción de la hormona refleja un aumento de la permeabilidad al agua de la membrana apical de las células epiteliales. En 1979, Parisi y colaboradores propusieron que el efecto de la ADH en la vejiga urinaria de rana era un fenómeno cuántico, es decir, resultaba de la adición de unidades de permeabilidad que aumentaban en número durante el desarrollo de la acción de la hormona. Todas estas evidencias apoyaban la hipótesis de poros que atravesaban la membrana. Fue en esa época

que nació la hipótesis que explicaba el paso de las moléculas de agua, una detrás de la otra sin espacios entre ellas a través de los poros (la ya mencionada “hipótesis de la fila india”). En el caso de la vejiga urinaria de rana, la transferencia de las moléculas de agua a través del canal controlado por la ADH se explicaba razonablemente según esta hipótesis en un trabajo de Parisi y Bourguet (1983), donde los cambios de P_{dw} y P_{osm} eran seguidos bajo diferentes condiciones de temperatura y agitación, durante la acción de la hormona antidiurética. En este trabajo se demostró que después de la corrección por los efectos externos de las capas no mezcladas, la relación entre los coeficientes de permeabilidad osmótica y difusional ($\Delta P_{osm}/\Delta P_{dw}$) en presencia de ADH era constante y mayor que 9. Por el contrario, en preparaciones no estimuladas, esta relación no resultó ser significativamente diferente de 1. Estos resultados, junto con observaciones previas que demostraban que otras moléculas pequeñas (como la urea) quedaban excluidas del canal inducido por ADH, indicaban que probablemente 9 moléculas de agua se estaban moviendo en fila india a través de esta estructura (Parisi & Bourguet, 1983). Finkelstein y colaboradores propusieron un modelo similar a partir de resultados independientes (Levine y col., 1984).

1.1.2.3 La existencia de canales específicos para el agua recibe nuevos aportes experimentales: Hacia la clonación de los canales específicos para agua

A mediados de la década de 1980, había suficiente evidencia de la existencia de las vías facilitadoras para el pasaje de agua a través de la membrana plasmática de diferentes células y tejidos, por ejemplo en el glóbulo rojo humano (Macey, 1984; Solomon y col., 1984), en el túbulo proximal del riñón (Whittembury y col., 1984; Meyer & Verkman, 1987) en el túbulo colector del riñón estimulado por vasopresina (Al-Zahid y col., 1977; Verkman y col., 1988) y en la vejiga urinaria de anfibios (Parisi y col., 1979; Parisi & Bourguet, 1983).

La idea de que la permeabilidad al agua en tejidos estaba asociada con una estructura proteica fue ganando fuerza rápidamente (Brown, 1989).

En 1990, los experimentos de A. Verkman inyectando ARNm total de diferentes tejidos en ovocitos de *Xenopus laevis*, demostraron la expresión funcional de canales de agua, indicando que estas estructuras son efectivamente proteínas (Zhang y col., 1990).

A pesar de considerables esfuerzos, los intentos por identificar un canal específico fueron infructuosos durante años. La ubicuidad del agua en los sistemas investigados, la permeabilidad basal de la bicapa lipídica, la falta de un inhibidor específico para el pasaje acuoso y la característica de ser canales “silenciosos” a diferencia de los canales iónicos, impedían reunir evidencias más directas.

Recién en 1992 P. Agre y sus colaboradores informaron la aparición de canales de agua en ovocitos de *Xenopus laevis* cuando expresaron una proteína de la membrana del glóbulo rojo humano llamada CHIP28 (Preston y col., 1992). Este trabajo representó el primer clonado de un canal de agua, canales que luego fueron genéricamente llamados acuaporinas.

Es interesante destacar que los parámetros medidos, utilizados para establecer la expresión funcional de canales de agua después de la inyección de material genético, fueron otra vez aquellos usados durante los cuarenta años previos: el coeficiente de permeabilidad difusional al agua (P_{dw}), el coeficiente de permeabilidad osmótica (P_{osm}), la relación entre ellos, y la energía de activación (E_a) de ambos parámetros.

1.1.2.4. Las vías moleculares para el pasaje de agua

Actualmente se acepta que el agua puede atravesar las membranas celulares, al menos a través de dos vías (Figura 1.2): la bicapa fosfolipídica (Finkelstein, 1987) y los canales específicos para el agua (las acuaporinas) (Preston y col., 1992).

Adicionalmente, Zeuthen, Wright y colaboradores propusieron el pasaje conjunto de agua y solutos a través de cotransportadores conocidos, como por ejemplo el cotransportador Na^+ -glucosa (Loo y col., 1996). Si bien los experimentos que sustentan la hipótesis del cotransporte de agua y solutos vienen siendo publicados desde hace más de 10 años, la misma es aún controvertida (Duquette y col., 2001).

A continuación se esquematizan cada una de las posibles vías de paso de agua a través de una membrana celular.

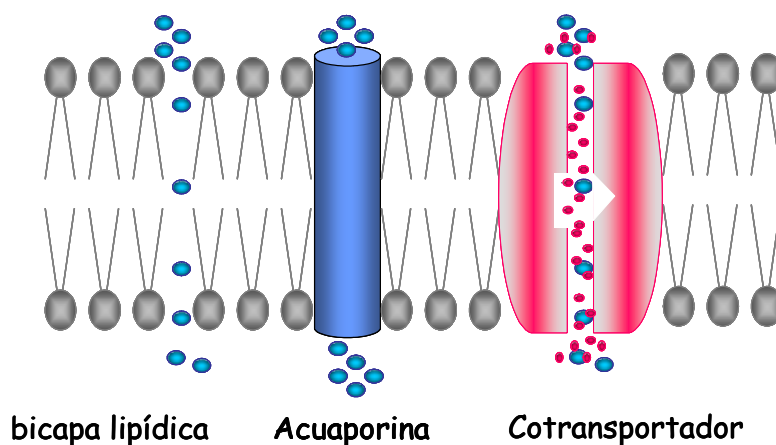


Figura 1.2. Esquema de las posibles vías implicadas en el transporte transcelular de agua.

1.1.2.4.1. La bicapa lipídica

A mediados de la década de 1960, determinaciones de P_{dw} realizadas en la piel de rana, demostraron que los valores de este coeficiente cambiaban con la tasa de agitación del medio que bañaba al epitelio. Estos experimentos demostraron que las mediciones de los flujos difusionales de agua eran subestimadas a causa de los artefactos producidos en una región cercana a la membrana donde, debido a la falta de mezcla, las especies que atravesaban la membrana tenían una concentración que no era igual a la que tenían en el seno de la solución. A estas delgadas regiones cercanas a la membrana, consideradas sin mezcla de la solución, se las denominó “capas no mezcladas” (Dainty & House, 1966a y Dainty & House, 1966b).

En la misma época que se demostraba la existencia de capas no mezcladas, también se hicieron mediciones cuidadosas de flujos unidireccionales de agua tritiada y de flujos netos de agua en bicapas artificiales de lípidos puros. Éstas estaban formadas por fosfolípidos que constituían una bicapa lipídica cuando se “pintaba” con ellos un pequeño orificio hecho sobre un soporte adecuado, el cual separaba dos cámaras. Esta metodología hizo posible medir P_{dw} y P_{osm} usando agua tritiada e imponiendo una diferencia de concentración de solutos a través de estas membranas. Los resultados de estos experimentos demostraron que, después de corregir los efectos de las capas no mezcladas, P_{dw} era igual a P_{osm} en este sistema (Hanai y col., 1966; Hanai & Haydon, 1966). Como consecuencia, la diferencia entre P_{osm} y P_{dw} , observada previamente en forma experimental en estos sistemas, fue explicada en términos de las capas no mezcladas.

Por lo tanto, el agua atravesaría la bicapa mediante un mecanismo mixto de partición-difusión (Finkelstein, 1987). Luego de impuesto un gradiente osmótico, se observaría un movimiento neto de agua desde el compartimiento de mayor actividad de agua (mayor potencial químico) hacia el de menor actividad de agua. En la frontera con la membrana, el agua sufriría una partición entre la solución y la membrana, difundiendo a través de la misma. Al llegar al otro extremo de la bicapa lipídica ocurriría una nueva partición, ahora entre la membrana y la solución del otro compartimiento difundiendo a través de esta. Los fenómenos de partición como de difusión en la membrana estarían determinados por la compleja composición de la bicapa lipídica. Los lípidos que componen las membranas biológicas varían el grupo de su cabeza polar, la longitud de su cadena de ácidos grasos, el grado de saturación y la concentración de colesterol. Se sabe que la mayoría de las células poseen diferentes composiciones lipídicas en cada una de las caras de sus membranas plasmáticas (Simons & van Meer, 1988; Roelofsen & Op den Kamp, 1994).

Es importante destacar que la vía de pasaje a través de la bicapa fosfolipídica es pasiva; es decir, la bicapa ofrece una resistencia al flujo de volumen de agua, motivado por una fuerza impulsora dada. Esta vía no es muy permeable al agua; por ejemplo, en presencia de gradientes osmóticos, el rango de P_{osm} para esta vía es menor que $10^{-3} \text{ cm.s}^{-1}$ (Verkman, 2000).

1.1.2.4.2. Las acuaporinas

Las acuaporinas son pequeñas proteínas integrales de membrana, de alrededor de 270 aminoácidos. Los perfiles hidropáticos de las secuencias aminoacídicas de todas las acuaporinas son similares. Las acuaporinas tienen seis α -hélices transmembrana y dos loops largos, uno citosólico (loop B) y otro extra-citosólico (Loop E). Los extremos N y C terminal de estas proteínas son intracelulares. Los tamaños predichos para los monómeros de las acuaporinas de mamíferos varían entre los 27 y 31 kDa. (Verkman & Mitra, 2000). Los alineamientos de sus secuencias muestran varios motivos altamente conservados, incluyendo dos repeticiones Asn-Pro-Ala (NPA) (Jung y col., 1994). Esta secuencia identifica a estas proteínas, y cada una se localiza en un loop. Estos motivos NPA se yuxtaponen, y junto con otra secuencia altamente conservada, la región aromática/arginina (ar/R), forman los sitios de restricción más estrechos para el pasaje de agua, constituyendo el filtro de selectividad del canal (Figura 1.3).

Las acuaporinas están presentes en las membranas como tetrámeros, pero el canal para la permeabilidad al agua no reside en el centro del tetrámero (como ocurre en los canales iónicos). En su lugar, cada monómero contiene un canal (Jung y col., 1994). Por lo tanto, un tetrámero tiene 4 canales de agua. Estudios estructurales aportaron información importante acerca de los requerimientos para la formación del homotetrámero y la expresión de la actividad transportadora de agua (Walz y col., 1994; Mathai & Agre, 1999), al menos en las acuaporinas animales. Hasta ahora, la AQP-4 es la única de las acuaporinas animales que también se encontró formando heterotetrámeros. Estos están integrados por subunidades de dos variantes de splicing alternativo (M1 and M23) (Nelly y col., 1999).

Reactivos mercuriales como el HgCl_2 inhiben la permeabilidad al agua mediada por canales, con excepción de la AQP-4. En la AQP1, el residuo cisteína 189 es el sitio de unión al mercurio, y el responsable de la inhibición del transporte de agua (Preston y col., 1993). Otras AQPs tienen residuos cisteína en posiciones idénticas de acuerdo al alineamiento de la secuencia y comparación con la AQP-1.

La mayoría de las acuaporinas poseen secuencias consenso para N-glicosilación y se encuentran glicosiladas en los tejidos donde se expresan. Sin embargo la glicosilación no sería importante para cumplir su función como canales o para que la proteína alcance su destino subcelular correspondiente (Verkman & Mitra, 2000).

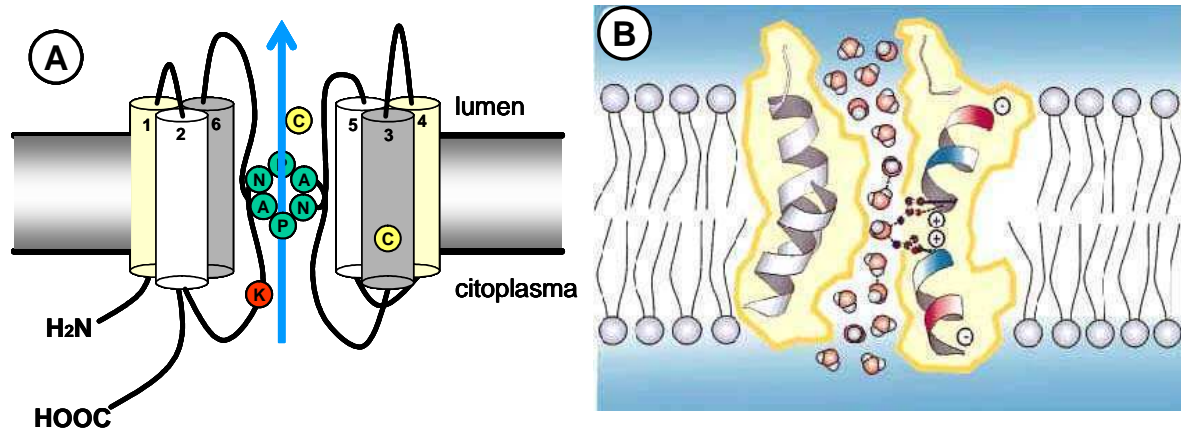


Figura 1.3. Estructura de la acuaporina-1. **A:** Modelo del *reloj de arena*. Se aprecian las 6 hélices (enfrentadas tres contra tres), el amino y carboxilo terminales citoplasmáticos y los residuos relevantes para su función: los dos motivos NPA enfrentados conformando el poro, las dos Cisteínas (C) reguladoras y la Lisina (K) que otorga selectividad. **B:** Mecanismo de alta selectividad al agua de las acuaporinas. En el centro del poro puede apreciarse un dipolo que genera la repulsión electrostática que repele a los iones hidronio. En esa misma región puede apreciarse la reorientación que sufre la molécula de agua, al pasar por el poro (Adaptado de Murata y col., Nature 407: 599, 2000).

Desde 1992 hasta la fecha se clonó un número inmenso de acuaporinas presentes en organismos de todos los reinos (Zardoya, 2005). En las plantas, solo en *Arabidopsis thaliana* se detectaron 35 genes que codifican para acuaporinas. En los mamíferos, la familia de acuaporinas presenta 13 miembros (desde AQP0 a AQP12). En este último grupo las acuaporinas están expresadas en muchos epitelios involucrados, como función principal, en el transporte de fluido (ver Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Distribución y funciones propuestas para las distintas AQP's en mamíferos.

Acuaporina	Localización celular y/o tisular	Funciones conocidas
AQP 0	Ojo: Cristalino	Balance de fluido intraocular Forma uniones intercelulares
AQP 1	Glóbulos rojos: Riñón: túbulo proximal y asa descendente de Henle Ojo: Epitelio ciliar Cerebro: Plexo coroideo Pulmón: Epitelio alveolar Endotelio capilar: Oído: Músculos esquelético, cardíaco, y liso	Protección contra cambios de concentración del medio Concentración de la orina Producción de humor acuoso Producción de fluido cerebroespinal Hidratación alveolar Intercambio de fluido con los tejidos ? ?
AQP 2	Riñón: Células principales de los túbulos colectores Testículo: vasa deferente	Concentración de la orina mediada por AVP o ADH
AQP 3	Riñón: Túbulos colectores Tráquea: células epiteliales Glándulas salivales: en los acinos secretores Piel: Pulmón: Ojo: Colon:	Reabsorción de agua hacia los vasos sanguíneos Secreción de agua hacia la traquea
AQP 4	Riñón: Túbulos colectores Cerebro: Célula epindemal Cerebro: Hipotálamo Pulmón: epitelio bronquial Glándulas salivales: conducto Músculo	Reabsorción de agua hacia los vasos sanguíneos Balance del fluido cerebro-espinal Detección de cambios de concentración en el plasma? Secreción de fluido bronquial

	Estómago Intestino delgado	
AQP 5	Glándula salival: en el acino y en el conducto Glándula lacrimal Pulmón Cornea	Producción de saliva Producción de lágrimas
AQP 6	Riñón: Células principales de los túbulos colectores	?
AQP 7	Riñón: túbulo proximal Testículo Espermatozoides Tejido adiposo	Concentración de la orina ? ?
AQP 8	Testículo Espermatozoides Páncreas Hígado Placenta Riñón Intestino delgado Colon	? ? ? Secreción biliar ?
AQP 9	Leucocitos Hígado Bazo Óvulos / espermatozoides Cerebro Osteoclastos	? Secreción biliar ? ? ?
AQP 10	Duodeno, yeyuno	?
AQP 11	Riñón, Hígado: mitocondrias de hepatocitos Testículo	Regulación del volumen mitocondrial
AQP 12	Páncreas: Células del acino pancreático	?

La magnitud para caracterizar un canal de agua es la permeabilidad osmótica por monómero (p_f). Este parámetro puede relacionarse con la permeabilidad osmótica de la membrana (P_{osm}), el número de poros (n) en la membrana y el área (A) de la misma (Finkelstein, 1987) según la siguiente ecuación:

$$p_f = \frac{P_{osm}A}{n}$$

Sobre la base de sus características de permeabilidad, los miembros de esta familia pueden ser divididos en dos grupos: las acuaporinas que son principalmente permeables al agua (AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5, AQP6 y AQP8) y las acuagliceroporinas (AQP3, AQP7, AQP9 y AQP10) que también transportan solutos pequeños, en particular glicerol (Agre et al., 2002; Yasui, 2004; King y col., 2004; Takata y col., 2004). Históricamente, el parámetro medido para diferenciar a las acuagliceroporinas de las acuaporinas, en relación con su permeabilidad a pequeños solutos, fue el coeficiente de reflexión (σ) para una serie de moléculas no-electrolíticas no-liposolubles.

Muchas son las funciones de las acuaporinas descritas en la actualidad y su rol va más allá de un simple facilitador del pasaje de agua.

El caso de la AQP0 es particular porque tiene una permeabilidad al agua muy baja (Harries y col., 2004). Pero además, este canal forma uniones estrechas entre las fibras oculares (donde abunda), por unión directa de los tetrámeros en la membrana de una célula con la vecina (Gonen y col., 2005).

Por otro lado, se demostró que las AQPs están involucradas en la migración celular facilitando el rápido recambio de protrusiones de membrana en el borde donde se produce el desplazamiento (Papadopoulos y col., 2008).

La AQP4, expresada en las células de la astroglia alteraría las propiedades del espacio extracelular, así como su volumen y concentraciones iónicas, modulando la función de las células eléctricamente excitables de esas zonas (Verkman, 2005).

En relación a la regulación del volumen celular, algunos estudios han dado lugar a la posibilidad de que las acuaporinas cumplan alguna función en estos mecanismos (Krane y col., 2001; Kuang y col., 2004). O que incluso estas proteínas cumplan una función más amplia que la de ser un simple canal y sean, además, sensores de osmolaridad (Hill y col., 2004). Otros trabajos indican que las acuaporinas también están involucradas en la fisiología de las organelas de las células, en el hinchamiento de la vesícula (Cho y col., 2002) y en el metabolismo mitocondrial (Calamita y col., 2005).

Por otro lado, AQP7 y AQP9 transportarían iones como el arsénico (Liu y col, 2002), y AQP6 transportaría cloruro a bajo pH (Yasui y col, 1999). También se sugirió que AQP1 podría transportar gases como el dióxido de carbono (Cooper & Boron, 1998) y amoníaco (Nakhoul y col, 2001), aunque otros trabajos (Verkman, 2002) llegaron a la conclusión de que el transporte de gas dependiente de AQP1, si ocurriese, no sería biológicamente significativo (Jochen & de Groot, 2006).

Las AQP11 y AQP12 parecen estar menos relacionadas con las otras acuaporinas y acuagliceroporinas de mamíferos en sus funciones de transporte. Estas dos acuaporinas se localizan en estructuras subcelulares y pertenecen al grupo de acuaporinas que tienen mutaciones en las secuencias NPA y se las reconoce como una “subfamilia de acuaporinas subcelulares”. Estas mutaciones son muy características en acuaporinas homólogas de invertebrados (Ishibashi, 2006).

Al igual que el caso de la bicapa lipídica, esta es una vía pasiva; es decir, las acuaporinas ofrecen una resistencia al flujo de volumen de agua, generado por una fuerza impulsora dada. La diferencia con la bicapa es que en ésta la resistencia es significativamente menor. En efecto, algunas acuaporinas son altamente permeables al agua, de manera tal que, en presencia de gradientes osmóticos, el rango de P_{osm} es $10^{-3} - 10^{-1} \text{ cm.s}^{-1}$ (Zeidel, 1998).

1.1.2.4.3. Los cotransportadores agua-soluto

Varios autores proponen que, además de las acuaporinas, algunos cotransportadores también serían capaces de transportar agua. Algunos de ellos son el cotransportador Na^+ -Glutamato (EAAT1), el Na^+ /glucosa (SGLT), y el Na^+ - K^+ - 2Cl^- (NKCC) cuyas permeabilidades al agua son no nulas (King y col, 2004, Hamann y col, 2005). La hipótesis de este mecanismo propone que estos transportadores cotransportarían solutos y agua activamente. Esta idea de cotransporte de agua fue propuesta inicialmente por T. Zeuthen y E. Wright (Loo y col., 1996), sobre la base de dos hallazgos experimentales. El primero fue que las células epiteliales de la vesícula, un epitelio abierto, mantenían el medio interno en hiperosmolaridad, aún en presencia de soluciones externas muy diluidas. El segundo hallazgo fue que los flujos osmóticos de agua inducían un flujo simultáneo de iones K^+ . Estos experimentos, en donde el agua era capaz de ser transportada en contra de su gradiente osmótico, sugerían que la explicación podría ser la existencia de una proteína de membrana a través de la cual ambos flujos se desarrollarían asociados. Estas proteínas de membrana, a las que Zeuthen denominó "bombas moleculares de agua", serían cotransportadores en las que el flujo de agua se acoplaría al flujo de solutos mediante algún mecanismo desconocido interno

de la proteína. De esta manera, un flujo de soluto a favor de gradiente aportaría la energía libre, necesaria para poder transportar agua en contra de un gradiente osmótico. Es por ello que se los denomina cotransportadores de agua (Zeuthen & MacAulay, 2002).

La hipótesis fue avalada por otros estudios hechos en sistemas de expresión de proteínas heterólogas, como los ovocitos de *Xenopus laevis*. Loo y colaboradores (1996) demostraron mediante la inyección del cotransportador Na⁺/glucosa (SGLT) que el mismo era capaz de producir un flujo de agua asociado a su funcionamiento. Se postuló que por cada molécula de Na⁺ y de glucosa se transportarían unas 240 moléculas de agua. Se propuso que el mecanismo por el cual ocurriría este tipo de transporte estaría asociado al mecanismo de translocación del transportador en la membrana.

Sin embargo, el mecanismo propuesto para el pasaje de agua a través de estas proteínas generó controversias. Duquette y colaboradores (2001) propusieron la hipótesis de “ósmosis local” para explicar los resultados obtenidos por Zeuthen. De acuerdo a esta hipótesis, debido a la activación del transportador en estudio, se produciría un incremento de osmolaridad localmente, en la vecindad de la membrana plasmática. Esto permitiría un movimiento de agua impulsado por la ósmosis local generada. En este caso, la vía de pasaje de agua podría ser a través de la membrana plasmática o de las acuaporinas.

Sea cual fuere el mecanismo por el cual estos transportadores movilicen agua a través de la membrana plasmática, tendrían un papel importante en el transporte epitelial de agua.

Es importante destacar que la vía de pasaje que involucra cotransportadores sería activa. Por otro lado, esta vía sería, según los autores, muy permeable al agua, siendo el orden de P_{osm} para esta vía de $10^{-3} \text{ cm.s}^{-1}$ (Hamann y col, 2005).

1.1.3. Métodos experimentales utilizados para estudiar el transporte de agua

Distintos métodos, basados en diferentes principios biofísicos, se utilizaron para medir la permeabilidad osmótica al agua (Verkman, 2000). A grandes rasgos se pueden dividir en 1) mediciones de transporte de agua a través de epitelios y en 2) mediciones de transporte de agua a través de membranas plasmáticas celulares. Un caso particular es la medida de la permeabilidad al agua en membranas lipídicas planas.

A partir del clonado de las acuaporinas no solo se aplicaron los métodos ya conocidos, sino que se desarrollaron otras técnicas experimentales y de simulación computacional, basadas en modelización matemática para estudiar las propiedades de estos canales.

1.1.3.1. Medición del transporte de agua a través de membranas plasmáticas celulares

Entre las técnicas más utilizadas para estudiar las propiedades de permeabilidad de membrana se encuentra la de bicapas lipídicas artificiales (Saparov y col., 2001) y la de reconstitución de liposomas (Lagrée y col., 1998) a partir de membranas naturales. Ambas técnicas permiten incorporar canales, transportadores u otras moléculas para su estudio.

Determinar la permeabilidad al agua en la membrana de una célula es, básicamente, un problema de medición del cambio del volumen celular en presencia de gradientes osmóticos. Distintas alternativas surgen para determinar el volumen celular; esencialmente la idea es medir propiedades físicas que dependan de éste. Así, es posible medir la variación del volumen celular mediante el cambio en el patrón de luz dispersada (Verkman y col., 1985; Ma y col., 1993). Experimentalmente, esta técnica (“light-scattering”) implica una rápida mezcla de la suspensión celular con una solución anisotónica para crear un gradiente osmótico a través de la membrana. El flujo osmótico de agua produce un cambio en el volumen celular y la intensidad de la luz dispersada. P_{osm} puede ser calculado a partir de los cambios temporales.

Por otro lado, la dilución que sufre el citoplasma cuando se produce un aumento del volumen celular debido a una hipotonía, produce un pequeño cambio en el índice de refracción intracelular, el cual puede medirse mediante interferometría laser (Farinas & Verkman, 1996) o filtrado espacial (Farinas y col, 1997).

Otros métodos se basan en emplear sondas fluorescentes distribuidas en el citoplasma de las células. Algunos ejemplos son la microscopia fluorescente con reflexión interna total (TIRF en inglés) (Kao y col, 1993, Farinas y col., 1995), la microscopia fluorescente confocal, o el empleo de sondas fluorescentes dependientes del volumen (Hamann y col, 2002; Galicia y col, 2007).

Otro método es el análisis de Fourier sobre imágenes de microscopía óptica de campo oscuro y contraste de fase (Farinas y col., 1997).

Por último, también es posible medir el cambio de volumen mediante microscopia óptica en ovocitos de *Xenopus* (Fischbarg y col, 1990; Dorr y col., 2007).

1.1.3.2. Medición de la permeabilidad al agua en membranas lipídicas planas

Inicialmente, las metodologías de base utilizadas en estos sistemas fueron dos: 1) La medición de flujos unidireccionales empleando moléculas marcadas, lo que permitió estimar los valores de P_{dw} y 2) La medición del flujo neto a partir de la evaluación óptica de la deformación de la membrana inducida por el movimiento neto de agua (Rosenberg & Finkelstein, 1978).

Después de la resolución de la controversia en los resultados debido a las capas no mezcladas, la adición de canales de gramicidina A a las bicapas lipídicas dio lugar al segundo nacimiento de la “hipótesis de los canales para el agua”. Los experimentos hechos por el grupo de Finkelstein en bicapas de lípidos puros, confirmaron que, ΔP_{osm} era igual a ΔP_{dw} ($\Delta P_{osm}/\Delta P_{dw} = 1$), sosteniendo en este caso el modelo de “partición-difusión”. Sin embargo, si se agregaba una molécula formadora de canales como la gramicidina A (un antibiótico polipeptídico), era posible demostrar que $\Delta P_{osm}/\Delta P_{dw} = 5$, donde este número caracterizaba al canal insertado, indicando que los movimientos de agua ocurrían principalmente a través de los poros (Rosenberg & Finkelstein, 1978; Finkelstein & Andersen, 1981). Estos resultados revitalizaron la teoría del poro y dieron origen a la ya mencionada “hipótesis de fila india” (Urban y col., 1980; Parisi & Bourguet, 1983). Como el radio del poro del canal formado por la gramicidina A es aproximadamente de 2Å , entonces las moléculas de agua pueden atravesarlo, una atrás de la otra sin pasarse entre ellas.

Más tarde, se combinó la técnica de bicapas artificiales con microelectrodos para medir la concentración de iones. Esta metodología se utilizó para determinar el espesor de las capas no mezcladas, desplazando los microelectrodos desde la membrana hacia el seno de la solución, midiendo las concentraciones de diversos iones (Pohl y col., 1998). Posteriormente,

utilizando la misma metodología para determinar la permeabilidad al agua de la AQP-1 insertada en las bicapas, midiendo la dilución de un determinado ion debido al flujo de agua impulsado por un gradiente osmótico (Saparov y col., 2001). Con este mismo sistema se demostró que esta acuaporina solo transporta agua (Tsunoda y col., 2004), y que la acuagliceroporina de *Escherichia coli* (GlpF) no transporta H⁺ (Saparov y col., 2005), como lo habían predicho los trabajos de simulación (de Groot & Grubmuller, 2001; Tajkhorshid y col., 2002).

1.1.3.3. Medición del transporte de agua a través de epitelios

La determinación de la permeabilidad osmótica en epitelios implica la imposición de un gradiente osmótico entre las caras del mismo y la medición del flujo transepitelial del volumen de agua. Uno de los primeros métodos fue el *gravimétrico* en la vejiga urinaria de anfibio, el cual involucraba mediciones seriadas del peso del fluido en un compartimiento (Bentley, 1958). Otro método, fue el de medición del transporte de agua en túbulos cilíndricos perfundidos (Al-Zahid y col, 1977). La técnica volumétrica automática desarrollada por Bourguet y Jard (1964) era más sensible que la anterior y permitió registrar cinéticas a tiempos cortos. En esta técnica, el epitelio era insertado en una cámara de Üssing, una cámara que interpone el epitelio como una membrana entre dos compartimientos. Esta técnica fue utilizada posteriormente con mínimas modificaciones (Escobar y col., 1990; Capurro & Parisi, 1992) y posteriormente se desarrolló una técnica basada en la de Bourguet y Jard, que mejoraba las mediciones de flujo de agua mediante la detección del desplazamiento del menisco de un líquido foto-opaco en un capilar conectado en serie con uno de los compartimientos de la cámara de Üssing. El sistema de detección de esta metodología se basa en la utilización de fotodiodos que detectan la luz transmitida a través del capilar y la conexión a una computadora que permite, como se describirá en detalle en el capítulo dos, la medición automática del flujo de agua con elevada sensibilidad y en ambos sentidos (Dorr y col, 1997).

1.1.3.4. Estudio del transporte de agua a través de las acuaporinas

El desarrollo de la técnica de ovocitos de *Xenopus* como sistema de expresión de proteínas heterólogas aportó la ventaja de poder estudiar distintos canales o transportadores en la membrana de la célula permitiendo el análisis de las propiedades de estas moléculas. Con esta técnica se estudiaron acuaporinas de distintos organismos (Preston y col., 1992; Ma y col., 1998; Ford y col., 2000) y los propuestos cotransportadores de agua y solutos (Zhang y

col., 1991; Zeuthen y col., 1997; Yang & Verkman, 1998; Loo y col., 1999; Schreiber y col., 1999).

La diferencia de esta técnica con la de las membranas artificiales es que se mide el cambio de volumen de la célula, el cuál tiene una relación directa con el flujo de agua.

1.1.4. Modelización del transporte de agua

Muchas veces se ha recurrido a la modelización matemática para estudiar el movimiento de agua en sistemas biológicos. La modelización es una rama de la matemática aplicada mediante la cual se desarrolla un modelo del objeto de estudio aplicando relaciones matemáticas que describen ciertos aspectos que se consideran relevantes de éste. En particular, dentro de estas relaciones, las ecuaciones diferenciales suelen aparecer a menudo en la estructura de los modelos matemáticos. La razón de ello estriba en que estas ecuaciones suelen ser muy apropiadas para describir fenómenos que sufren cambios en el tiempo – entre otras cosas –. De este modo, la resolución de estas ecuaciones permite llevar a cabo simulaciones, mediante las cuales el modelo puede emular el fenómeno en estudio.

Existen dos clases de modelización matemática (Haberman, 1998; Bender, 2000): Modelización Determinística y Modelización Estocástica.

La primera se basa en leyes determinísticas vinculando variables mediante conexiones causales esclarecidas. La segunda se basa en conexiones entre variables aleatorias sujetas, como es de esperar, al azar. Suele ocurrir que la primera está asociada a la resolución de complicadas ecuaciones diferenciales que implican una labor matemática más ardua al principio, pero que va asociada a una ejecución computacional ulterior más sencilla (es posible emplear programas comerciales muy amigables como el Matlab o el Mathematica). Por otro lado, la segunda suele estar asociada a resoluciones de ecuaciones más simples pero en número considerablemente mayor, lo que amerita implementaciones computacionales más costosas (tiempos de máquina más prolongados, desarrollo de programación paralela, etc.). Por otro lado, en aras de la simplificación del cálculo, se estudian sistemas en intervalos de tiempos sumamente cortos (del orden del nanosegundo, en el caso de la simulación mediante dinámica molecular del transporte de agua).

El transporte de agua ya fue objeto de modelización determinística, tanto en epitelios (Weinstein & Stephenson, 1979) como en células (Hernández & Cristina, 1998). De este modo, es posible predecir el curso temporal del flujo de agua y electrolitos con una mirada

amplia, a escala espacial y temporal. Por otro lado, se ha empleado modelización estocástica, y, en particular, dinámica molecular, para estudiar el comportamiento del agua en el interior de membranas fosfolipídicas (Berendsen & Marrink, 1993) y de los canales de agua (de Groot y col., 2001; Tajkhorshid y col., 2002). Esta clase de modelización permitió predecir el mecanismo molecular del transporte de agua que tiene lugar a una escala espacio-temporal más reducida.

Durante la década de 1990 se hicieron simulaciones computacionales para estudiar el comportamiento del agua moviéndose a través de una membrana lipídica conteniendo poros (Chui y col., 1991; Chui y col., 1999). El modelo consideraba a la gramicidina A como el canal incorporado en la membrana. La permeabilidad al agua fue calculada usando la correspondencia formal entre difusión y movimiento al azar sobre las membranas conteniendo gramicidina A. Los resultados concordaron con los obtenidos experimentalmente por Rosenberg y Finkelstein en 1978.

Pocos años después del clonado de la AQP-1, se resolvió la estructura de esta acuaporina por cristalografía (Walz y col., 1994; Walz y col., 1997; Cheng y col., 1997; Mitsuoka y col., 1999; Ren y col., 2000). Más tarde se dilucidó la estructura atómica de ésta y otras acuaporinas (Murata y col., 2000; Fu y col., 2000; Sui y col., 2001; Gonen y col., 2005). Este hecho permitió simular los movimientos de agua a través de las AQPs insertadas en una membrana. Usando esta metodología, de Groot y Grubmüller (2001) demostraron que la AQP-1 actúa como un filtro de dos pasos, el NPA y la región ar/R.

La cristalografía de las acuaporinas y la determinación de su estructura a una resolución de 2.2 Angstroms (Sui y col., 2001) se mostró compatible con el modelo del canal propuesto por Parisi y colaboradores (1997) basado en mediciones biofísicas (Figura 1.3). Las simulaciones por dinámica molecular son también compatibles con las hipótesis previas como la del movimiento de agua en fila india adentro del canal.

El hecho de si los protones pueden o no atravesar el canal de las acuaporinas generó controversia durante la década de 1990 debido a diferencias en los resultados obtenidos con las bicapas artificiales y los ovocitos de *Xenopus* (Agre y col., 1997). Desde los trabajos experimentales se demostró que los protones no pueden pasar a través del canal de la AQP-1 (Tsunoda y col., 2004). Luego, varios trabajos trataron de resolver por simulación la cuestión de por qué esto no es posible (Jensen y col., 2003; Burykin & Warshel, 2003), indicando que esto no ocurriría debido a interacciones electrostáticas dentro del canal (de Groot y col., 2003; Chakrabarti y col., 2004).

1.1.5. Introducción al estudio biofísico del transporte de solutos

Un flujo neto de fluido (J_w) está frecuentemente asociado con el movimiento de sales por un proceso que no está comprendido claramente (Whittembury & Echevarría, 1994; Spring, 1999).

Las barreras epiteliales se clasifican como “cerradas” (“tight”) o “abiertas” (“leaky”) de acuerdo a su conductancia eléctrica (Fromter & Diamond, 1972), cuyo valor, en general, disminuye a medida que las barreras son más “cerradas”.

1.1.5.1. Métodos experimentales utilizados para estudiar el transporte de solutos

Las técnicas para estudiar el transporte de solutos se pueden separar en aquellas que utilizan moléculas radiactivas (Tupper & Maloff, 1973; Toriano y col., 1998), las que se basan en la medición de la intensidad de fluorescencia (Galizia y col., 2008), las técnicas de modelización (Hernandez & Cristina, 1998) y simulación (Jensen y col., 2003) y las que se basan en mediciones eléctricas, como la técnica de “patch-clamp” y la de fijación del voltaje (“voltage-clamp”). La primera, utilizada en ovocitos de *Xenopus*, permitió detectar corrientes iónicas por estimulación mecánica (Saitou y col., 2000) y canales mecanosensibles presentes en estas células (Zhang & Hamill, 2000). Por otro lado, esta misma técnica también fue aplicada sobre liposomas reconstituidos con gramicidina (Martinac & Hamill, 2002). La técnica de “voltaje-clamp” también se usa mucho en ovocitos (Bryan-Sisneros y col., 2003) y en bicapas artificiales (Saparov y col., 2005).

1.2. Objetivos

El objetivo general de esta tesis fue profundizar el conocimiento que se tiene de la biofísica del transporte de agua a través de membranas biológicas y su asociación al movimiento de solutos.

Los objetivos específicos, desarrollados cronológicamente, fueron: 1) Estudiar la relación que existe entre el movimiento de agua y el movimiento de solutos en un epitelio reconstituido sobre un soporte permeable, empleando células T84; 2) Estudiar los movimientos de agua controlando la composición de los medios a ambos lados de una membrana celular en su estado natural o expresando una acuaporina. Para poder llevar a cabo este objetivo, fue necesario desarrollar una nueva metodología experimental; 3) Predecir y analizar, mediante modelos matemáticos y simulación computacional, la respuesta osmótica de ovocitos de *Xenopus* expresando AQP-1 en su membrana. y 4) Determinar las propiedades de rectificación de la AQP-1, utilizando las bondades de la técnica del ovocito vaciado, desarrollada ad hoc.

Capítulo 2

Transporte de agua y solutos en un modelo de epitelio digestivo: las células T84

2.1. La utilización de líneas celulares como modelo para el estudio del transporte transepitelial de agua y solutos

Como se señaló en el capítulo 1, los flujos netos de agua e iones pueden ocurrir a través de las barreras epiteliales tanto por la vía transcelular como por la paracelular (Parisi y col., 1997; Kovbasnjuk y col., 1998; Whittembury & Hill, 2000; Cereijido y col., 2000).

Numerosas líneas celulares, principalmente de origen intestinal y renal, se utilizaron como modelos para estudiar el transporte de agua a través de epitelios animales.

En presencia de un gradiente osmótico, la permeabilidad al agua de las células epiteliales (P_{osm}) observada, es la resultante de la combinación de las permeabilidades de sus membranas apical y basolateral (las cuáles varían según la presencia o no de acuaporinas y/o cotransportadores) y de la vía paracelular. Los datos bibliográficos indican que en un epitelio con altos valores de permeabilidad hidrostática (P_{hid} , ver capítulo 1), como Caco-2 (originada a partir de un tumor de colon humano), y en ausencia de acuaporinas, la vía paracelular sería la más significativa para el flujo osmótico. Por el contrario, en un epitelio con bajos valores de P_{hid} , como LLC-PK-1 (una línea celular derivada del riñón de cerdo), la presencia de acuaporinas resulta fundamental para disipar el gradiente osmótico externo a través de un flujo transcelular (Toriano y col., 1998). Esta condición sería similar a la descrita para los órganos blancos de la ADH, tanto el túbulo colector renal como la vejiga urinaria de rana.

La vía para el movimiento de agua asociado al transporte de solutos es un tema altamente controversial (Spring, 1999), especialmente en lo que se refiere a procesos secretores (Masyuk y col., 2002). El modelo de “gradiente sostenido” presentado por Diamond y Bossert (1967), postula que los espacios intercelulares juegan un papel central en el llamado “movimiento isotónico de agua asociado a transporte”. Según este modelo, el Na^+ entra por la membrana apical siguiendo un gradiente electroquímico y luego es bombeado activamente hacia el espacio intersticial. Esto crea un gradiente de concentración que induce

la entrada de agua por la unión estrecha entre las células epiteliales (“tight junction”). Por el extremo basal del interespacio, sale una solución isotónica de NaCl.

Pronto se vio que la situación era mucho más compleja y que, en distintos epitelios y circunstancias, el fluido transportado puede ser isotónico, hipotónico o hipertónico. En este sentido, ha sido informado que en células MDCK, un epitelio modelo de túbulo proximal renal, no existe un flujo significativo de fluido a través de la unión estrecha (“tight junction”) aún cuando la absorción de fluido se acelere por la imposición de un gradiente osmótico externo (Kovbasnjuk y col., 1998).

El descubrimiento de la expresión de acuaporinas en distintas células epiteliales y particularmente en epitelios abiertos (“leaky”), como el túbulo proximal renal, ha enfatizado el rol del transporte transcelular de agua mediado por canales. Sin embargo, se demostró que, en el caso de las células RCCD-1 (una línea celular originada a partir del túbulo colector cortical de rata), en ausencia de gradiente osmótico externo y de acuaporinas puede desarrollarse un flujo neto de agua asociado a transporte (J_w -transp) inducido por ADH (Capurro y col., 2001).

2.1.1. La línea celular T84

La regulación del balance de electrolitos y sus mecanismos de secreción han sido estudiados extensamente en las células T84, una línea celular humana establecida a partir de un adenocarcinoma colónico y que mantiene el transporte vectorial de electrolitos (Dharmathaphorn y col., 1984). La línea celular T84 forma monocapas de alta resistencia eléctrica transepitelial (epitelio “tight”), y es un sistema modelo para el transporte de Cl⁻ inducido por diversos secretagogos y modificado por la acción de distintas toxinas.

En el modelo T84 la medida de corriente de cortocircuito (I_{SC}) se ha utilizado para estimar la salida electrogénica de Cl⁻. Es importante destacar que además, a partir de los valores de I_{SC} se infería la magnitud del fluido asociado al transporte de iones en estas células (Singh y col., 2001).

Sin embargo, utilizando la técnica desarrollada en el laboratorio para medir flujos transepiteliales de agua (J_w) en monocapas celulares (Dorr y col., 1997), se demostró que en las células T84 estimuladas con la toxina termoestable de *Escherichia coli* (STa), aumentaba J_w en el sentido de la secreción y que, si bien esto se asociaba a un flujo secretor de Cl⁻, no podía ser completamente explicado por el mismo (Toriano y col., 2001).

La STa es un agonista del receptor guanilato ciclase C (RG-C), presente en la membrana apical de estas células (Rao, 1985), que provoca un aumento significativo del GMPc intracelular (Hamra y col., 1993).

Así como en humanos el efecto de STa es descontrolado y capaz de provocar diarrea, el uroguanilin (UGN) se describe como una hormona que interviene en la homeostasis normal de agua y Na^+ del organismo, provocando una respuesta fisiológica y de menor magnitud que STa (Giannella y col., 1983). El uroguanilin es un péptido endógeno secretado por las células intestinales de mamíferos, de estructura homologa a la STa. Está descrito que el aumento en los niveles de GMPc, por la unión de este péptido al RG-C, produce una disminución en la absorción de Na^+ y un aumento en la secreción de Cl^- (Schulz y col., 1990; Singh y col., 1991; Sheppard & Welsh, 1992;).

La caracterización de la línea celular T84 indicaba que no expresaba ninguna de las acuaporinas conocidas hasta el momento (Toriano y col., 2001), pero sí presentaba evidencias funcionales de los intercambiadores Na^+/H^+ y $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ y del cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (Ramirez y col., 2000). Posteriormente, se informó que las isoformas del intercambiador Na^+/H^+ presentes en esta línea celular son el NHE-2 en la membrana apical y el NHE-1 y el NHE-4 en la membrana basolateral (Toriano y col., 2007). Al estimular células T84 con UGN apical (lado mucoso de la monocapa) en ausencia de gradientes químico, osmótico o hidrostático, J_w aumentaba significativamente en el sentido de la secreción, sin cambios en I_{SC} ni en R_T , indicando que J_w estaba asociado al transporte no electrogénico de solutos. También se observó una disminución significativa en la recuperación del pH intracelular ante un pulso ácido de NH_4Cl en células tratadas con UGN apical. Dado que la actividad de transportadores Na^+/H^+ es el único mecanismo de extrusión de H^+ en T84, estos resultados indicaban que el UGN apical provocaba la inhibición de la isoforma apical NHE-2 del intercambiador, produciendo una inhibición de la absorción de Na^+ y por ende una disminución de la componente absorptiva del flujo de agua asociada a este ion (Toriano y col., 2007).

El modelo T84 también se utiliza para probar los efectos de drogas con posibles efectos terapéuticos en el tratamiento de la fibrosis quística (FQ). Esta enfermedad se caracteriza por una deficiente secreción de Cl^- hacia el lumen alveolar, que produce como consecuencia una disminución de la subsiguiente secreción de agua y Na^+ , provocando en última instancia la congestión mucosa de las vías aéreas.

Algunos ejemplos de las drogas que se diseñaron para tratar la FQ son el 1-EBIO (1-Etil-1,3-dihidro-2H-benzimidazol-2-ona) y el CD-EBIO (5,6-dichloro-1-ethyl-1,3-dihydro-

2H-benzimidazol-2-ona). Ambos pertenecen a la familia de las benzimidazolonas y tienen la capacidad de aumentar la secreción de Cl^- . El DC-EBIO fue desarrollado a partir del 1-EBIO y es más potente que este, induciendo una importante secreción de Cl^- en las células T84, determinado por mediciones de I_{SC} . Sobre la base de inferir la magnitud de J_{W} a partir de mediciones eléctricas, ambas drogas se propusieron como posibles estimuladoras del flujo de agua asociado al movimiento de Cl^- (Singh y col., 2001).

El mecanismo de secreción de Cl^- en epitelios como el del colon requiere que el K^+ que entra a la célula por la bomba de Na^+/K^+ y por el cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$, salga por canales basolaterales. Estos movimientos de K^+ hiperpolarizan a las células de la mucosa del colon manteniendo la fuerza impulsora para la secreción de Cl^- . Las benzimidazolonas como el 1-EBIO y el DC-EBIO provocan la estimulación de canales de K^+ de conductancia intermedia dependientes de Ca^{2+} (IK_{Ca}^+) y del CFTR apical, estimulando la secreción de Cl^- en las células T84 (Devor y col., 1996). Sin embargo, la secreción de Cl^- no es el único evento secretor que ocurre en el colon de mamíferos. El colon también secreta y absorbe K^+ . La secreción ocurre por un mecanismo electrogénico similar al de la secreción de Cl^- , es completamente sensible a la bumetanida, un inhibidor específico del cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ y regulada por la relación entre las tasas de salida de K^+ por los canales apicales y basolaterales. El proceso de absorción es no electrogénico y está impulsado por la entrada activa de K^+ a través de la bomba H^+/K^+ apical y la salida por los canales basolaterales de K^+ . (Halm y col., 2006).

Por otro lado, en monocapas de células CFT1 (derivadas de vías aéreas que expresan la variante DF508 del CFTR), se probó que los flujos basolaterales de K^+ modulan la absorción de Na^+ (Dawson & Richards, 1990; Gao y col., 2001). Y en células T84, Iordache y col. (2007) demostraron que el butirato aumenta la expresión de ENaC y la absorción de Na^+ .

2.2. Objetivos e hipótesis

La correlación entre las propiedades de permeabilidad al agua y a los iones es especialmente importante cuando se observa lo que se llama un transporte iónico electrogénico, el cual resulta en una transferencia neta de iones a través de la barrera biológica.

Sobre el antecedente de la disociación provocada por STa en los registros de I_{SC} y J_W , se propuso como objetivo de este capítulo medir simultáneamente el flujo de agua (J_W) y la I_{SC} estimulada por benzimidazolonas para probar si efectivamente se produce un flujo de agua que acompañe al de Cl^- y estudiar los mecanismos por los cuales el agua es transportada transepitelialmente en este sistema relacionándolo con el movimiento de solutos

Como objetivos específicos se plantearon: 1) caracterizar la línea celular T84 desde un punto de vista biofísico, determinando sus coeficientes de permeabilidad hidrostática (P_{hid}) y osmótica (P_{osm}); y 2) dado que se demostró que el 1-EBIO y el DC-EBIO generan importantes flujos secretores de Cl^- , estudiar simultáneamente el efecto de estas drogas sobre el transporte electrogénico de solutos (I_{SC}) y el transporte de agua (J_W).

2.3. Materiales y Métodos

2.3.1. Cultivo y mantenimiento de las células

Las células T84 fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (Rockville, Md, USA) y crecidas como monocapas en botellas de 25 cm², usando una mezcla de medios: medio mínimo esencial modificado por Dulbecco (DMEM) y Ham's F-12 en proporción 1:1 y suplementado con 14 mM NaHCO₃; 3,2 mM glutamina; 100 unidades/ml penicilina-100 µg/ml estreptomicina; 15 mM HEPES/Na (pH 7,4) y 5% de suero fetal bovino, en una atmósfera de 5% CO₂ a 37°C. Para el mantenimiento de la línea, las células T84 se cultivaron en frascos plásticos, con un área útil de 25 cm², sembrándose con una densidad de 1.10⁶ células/botella, en medio de cultivo completo compuesto por medio mínimo esencial de Eagle, modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con suero fetal bovino al 10%, aminoácidos no esenciales, antibióticos (100 U/ml Penicilina –100 µg/ml estreptomicina) y 25 mM NaHCO₃. Las botellas se incubaron en una estufa de cultivo a 37°C, en una atmósfera de 10% de CO₂. El medio de cultivo se reemplazó cada dos días con medio fresco.

Para mantener la línea, las células se subcultivaron toda vez que hubieron alcanzado el 80-90 % de confluencia utilizando, para disgregar la monocapa, una solución de 0,5 g/l tripsina-0,53 mM EDTA.4Na disueltos en solución salina de Hank libre de Ca²⁺ y Mg²⁺ (5,4 mM KCl; 0,4 mM KH₂PO₄; 137 mM NaCl; 4,2 mM NaHCO₃; 0,3 mM Na₂HPO₄; 5,5 mM glucosa; 0,01 g/l rojo fenol). Las monocapas se lavaron primero con la solución de tripsina y luego se incubaron a 37°C durante 15-20 minutos con 0,5 ml de la misma solución. Una vez que las células se hubieron despegado de la superficie de soporte y entre sí, se hizo una suspensión lo más homogénea posible en medio de cultivo completo, usando una pipeta Pasteur de punta fina. La suspensión se sembró en distintas botellas haciendo, en general, una dilución 1:5 (es decir con las células provenientes de una botella madre, podían sembrarse cinco botellas hijas). Los subcultivos se hicieron una vez a la semana.

Para los experimentos, la suspensión de células entre los pasajes 60 y 78 obtenida de la manera que se describió en el párrafo anterior, se sembró sobre filtros permeables de policarbonato (Transwells®) de 24 mm de diámetro, 4,5 cm² de superficie y con poros de 3 µm (1.200.000 poros.cm⁻²), los cuales no representan una barrera al movimiento de agua. La densidad de los cultivos fue de 1-2.10⁶ células/ Transwell® y se crecieron a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO₂ durante 15 días.

2.3.2. Medida de los flujos de agua

2.3.2.1. Descripción del sistema

El registro del flujo neto de agua se realizó utilizando un dispositivo de medición automático computarizado desarrollado en nuestro laboratorio (Dorr y col., 1997). Este sistema permite el registro continuo del movimiento de agua a través del epitelio y detectar flujos absortivos o secretorios con una sensibilidad de 50 nl.

Para llevar a cabo los experimentos, las células sembradas sobre los filtros permeables se montaron en una cámara de Üssing modificada (Figura 2.1, A). Esta cámara principal (Figura 2.1, B) define dos compartimientos independientes, el mucoso (de 22 ml), al que se expuso la cara apical de las células, y el seroso (de 15,7 ml), al que quedó expuesta la cara basal de las mismas. El compartimiento seroso estuvo abierto a la atmósfera mientras que el mucoso se mantuvo herméticamente cerrado, salvo por una abertura conectada a un capilar de polietileno de diámetro pequeño (Figura 2.1, C). Este catéter, lleno de solución fisiológica, se conecta con una cámara de lucite intermediaria (Figura 2.1, D). La cámara D consta a su vez de dos compartimientos (D1 y D2), separados entre sí por una membrana impermeable de látex, colocada holgadamente como para permitir el movimiento de fluido (Figura 2.1, E). El compartimiento D1 se llena de solución fisiológica y el D2 de una solución foto-opaca (Negro Vilmacid 10B, 2 mg.ml⁻¹, Vilmax, Argentina). Esta última solución debe ser foto opaca para maximizar la señal de detección. Desde la hemicámara D2 la solución coloreada se conecta con un segundo capilar de polietileno (Figura 2.1, F), que conecta la cámara intermediaria con un capilar de vidrio abierto en el extremo opuesto (Figura 2.1, G).

Debido a las conexiones descritas, cualquier movimiento de agua (absortivo o secretor) a través del epitelio, provoca un movimiento de la solución foto-opaca dentro del capilar de vidrio en el sentido correspondiente. Este último es proporcional a la cantidad de agua moviéndose a través de la monocapa de tejido.

Sobre el compartimiento mucoso se aplicó todo el tiempo una presión hidrostática ejercida por una columna de 4,5 cm de H₂O, para mantener a la monocapa apoyada sobre el filtro de policarbonato y sin despegarse a lo largo de todo el experimento.

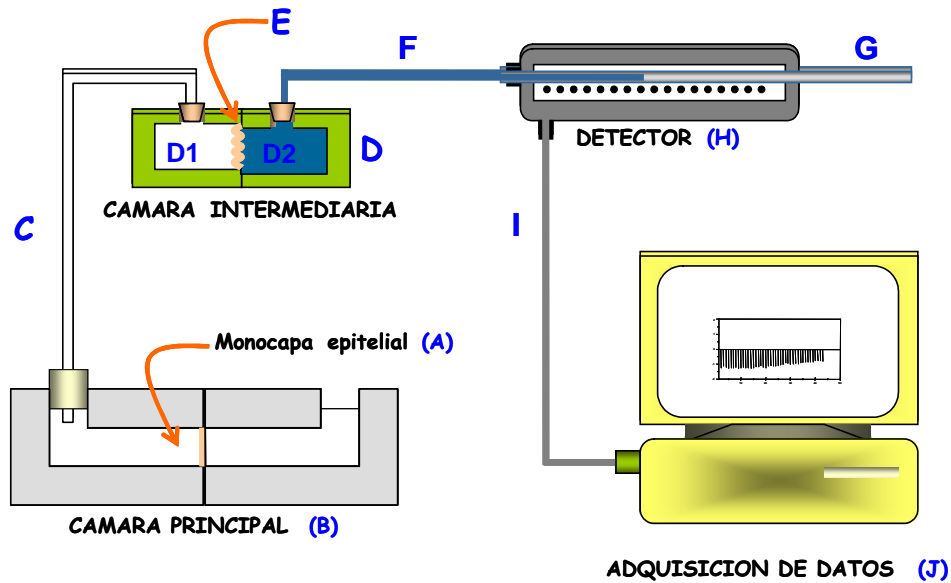


Figura 2.1. Representación esquemática del dispositivo automático para la medición de flujos de agua. A- monocapa celular. B- Cámara de Ussing. C- Capilar con solución fisiológica conectado al lado mucoso. D- Segunda cámara. E- Membrana impermeable plegada. F- Capilar con solución foto opaca. G- Capilar de vidrio. H- Sistema de detección. I- Conexión a la computadora. J- Registro de flujo.

2.3.2.2. Sistema de detección

El capilar de vidrio está inserto en un dispositivo que contiene el sistema de detección (Figura 2.1, H). El principio de este sistema es detectar la posición del menisco de líquido del capilar utilizando un sistema electro-óptico. Dentro del dispositivo de detección hay diodos alineados que emiten luz sobre el capilar de vidrio. Entre los diodos y el capilar un difusor de acrílico homogeneiza la luz incidente. Del lado opuesto a la emisión de luz hay lentes que focalizan la luz que atraviesa el capilar sobre otro dispositivo. En éste están dispuestos linealmente fotodiodos. La luz sólo puede atravesar la zona no opaca del capilar. Cuando esto sucede un número de fotodiodos se activa. Esto produce una señal de video análoga que se convierte a señal binaria y se envía a una computadora (Figura 2.1, I). Un software especialmente desarrollado mide el número de fotodiodos activados y no activados. Los datos obtenidos en un intervalo de tiempo establecido (en general 1 minuto) se convierten a un valor de flujo volumétrico ($\mu\text{l. min}^{-1}$), luego se guardan en soporte magnético y se grafican en la pantalla (Figura 2.1, J). Por convención los valores negativos indican una secreción neta mientras que los positivos indican una absorción neta. Debe destacarse que un flujo neto es la resultante de un componente absorbivo y uno secretor.

El flujo neto transepitelial de fluido se midió usando el dispositivo descrito y los datos se computaron en unidades de $\mu\text{l. min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$. Las hemicámaras que quedaron definidas

por la presencia de la monocapa celular, se llenaron con medio experimental, compuesto por DMEM-Ham's F12 en proporción 1:1 con 14 mM NaHCO₃ más 15 mM HEPES/Na (pH 7,4), burbujeado con 5% CO₂ / 95% O₂.

2.3.2.3. Calibración del equipo

Con el objeto de efectuar la calibración del equipo medidor de flujo se necesita un sistema que genere caudales conocidos. Para ello se desarrolló un sistema mediante un tornillo micrométrico (Palmer) unido a una jeringa tipo Hamilton, que descargaba una solución (de las características de las empleadas durante los experimentos) sobre una balanza Mettler. Este sistema permite inyectar cantidades sumamente pequeñas de fluido en un determinado tiempo, determinándose un flujo másico con suma sensibilidad (del orden de 10^{-4} g.s^{-1}). La determinación de la densidad de las soluciones mediante picnometría (contra patrones) conduce al cálculo de los flujos de volumen. Uniendo este sistema al catéter C del equipo de medición de flujos pudimos llevar a cabo la calibración del equipo.

2.3.3. Determinación de P_{osm} y P_{hid}

Para el cálculo de las permeabilidades osmóticas (P_{osm}) e hidrostática (P_{hid}) se utilizaron las ecuaciones descritas en el capítulo 1.

Los coeficientes de permeabilidad hidrostática (P_{hid}) y osmótica (P_{osm}) se calcularon a partir de la pendiente de la recta que relaciona el flujo de volumen de agua (J_w) con las diferencias de presión hidrostática (ΔP_{hid}) y osmótica (ΔP_{osm}) y que responde a la siguiente ecuación:

$$J_w = L_p \cdot (\Delta P_{\text{hid}} + \Delta P_{\text{osm}}) \quad (1),$$

donde L_p es el coeficiente de permeabilidad hidráulica de la membrana.

En el caso que $\Delta P_{\text{osm}} = 0$, entonces podemos asumir que el flujo de agua se debe solo al gradiente de presión hidrostática, por lo tanto

$$J_{w\text{-hid}} = L_p \cdot \Delta P_{\text{hid}} \quad (2),$$

y por otro lado

$$P_{\text{hid}} = L_p \cdot R \cdot T / A \cdot V_w \quad (3)$$

donde A es el área de la membrana, R es la constante general de los gases ideales, T es la temperatura absoluta y V_w es el volumen molar parcial del agua.

Pero si ΔP_{hid} es constante, entonces se puede asumir que el flujo de agua se debe sólo al gradiente de presión osmótica, por lo tanto la ecuación 1 se convierte en

$$J_{W-osm} = Lp' \cdot \Delta P_{osm} \quad (4),$$

donde Lp' incluye a la diferencia de presión hidrostática constante; y por lo tanto

$$P_{osm} = Lp' \cdot R \cdot T / A \cdot V_W \quad (5),$$

Para el cálculo del coeficiente de permeabilidad hidrostática (P_{hid}), sometimos la monocapa celular, montada en la cámara de medición, a distintas diferencias de altura (Δh), las cuales, según la ecuación 6 son directamente proporcionales a las diferencias de presión hidrostática (ΔPh) entre ambos lados del epitelio:

$$\delta_{H_2O} \cdot g \cdot \Delta h = \Delta Ph \quad (6)$$

En esta ecuación, δ_{H_2O} es la densidad del medio experimental (como es una solución diluida, se aproxima a la densidad del agua), y g es la constante de atracción gravitatoria de la Tierra.

Para la determinación de P_{hid} los gradientes se generaron colocando a la cámara experimental que contiene a la monocapa a diferentes alturas respecto del capilar que contiene a la solución foto-opaca. Estas diferencias de altura corresponden a diferencias de presión hidrostática producidas por columnas de agua de 5,3 cm, 6,2 cm y 7,1 cm. La condición inicial fue una presión hidrostática producida por una columna de 4,5 cm de H_2O , como se explicó en la descripción del sistema.

Para la determinación de P_{osm} , El J_W osmótico (J_{W-osm}) se midió en monocapas de células T84 crecidas durante 15 días sobre el soporte permeable en presencia de diferentes concentraciones serosas de manitol (12 mM, 50 mM y 100 mM).

2.3.4. Estudios electrofisiológicos

Los registros de los parámetros eléctricos se hicieron en simultáneo con los registros de flujo de agua (J_W). La corriente de cortocircuito (I_{SC}) se registró continuamente usando un sistema de fijación de voltaje (Physiological Instruments, USA), con electrodos Navycite (ME2AG4) de alambre de Ag^+ clorurado ($Ag^+/AgCl$). En intervalos periódicos a los largo del experimento, se sacaba al sistema de la condición de cortocircuito para registrar, a circuito abierto, los valores de diferencia de potencial transepitelial (ΔV_T) y de resistencia transepitelial (R_T).

Los electrodos de registro estaban colocados del lado seroso de la monocapa. Por lo tanto se tomó como convención que un ión positivo moviéndose desde el lado mucoso al seroso (“ión positivo entrante”) produciría una corriente positiva, y si se moviera en sentido opuesto, es decir de seroso a mucoso (“ión positivo saliente”) produciría una corriente negativa. Lo opuesto ocurriría con un ión negativo. Un ión negativo moviéndose desde el lado mucoso al seroso (“ión negativo entrante”) produciría una corriente negativa y moviéndose de seroso a mucoso (“ión negativo saliente”) produciría una corriente positiva.

Respecto a ΔV_T , los valores positivos indican que el lado seroso es positivo y los valores negativos indican que este lado es negativo.

La R_T inicial se testeó, antes del montado de los Transwells® en la cámara de medición, como una forma de verificar la integridad y confluencia de la monocapa, utilizando un sistema de resistencia eléctrica Millicell-ERS (Millipore). Durante los experimentos, R_T se estimó, a lo largo del tiempo, por las deflexiones en la corriente eléctrica provocadas por la inyección de un pulso de 1mV/segundo (cada 90 s) con un equipo automático de fijación de voltaje (Physiological Instruments, San Diego, CA, USA) y electrodos Navycite (ME2AG4).

2.3.5. Estudios farmacológicos

2.3.5.1. Experimentos con 1-EBIO, DC-EBIO y bumetanida

Las células T84 fueron cultivadas en seis Transwell®, de los cuales tres fueron rutinariamente tomados como control y tres testeados con la droga empleada. Dichas drogas (1-EBIO, DC-EBIO y bumetanida) se agregaron en los compartimientos seroso y/o mucoso, según el protocolo utilizado.

El 1-EBIO y el DCEBIO no eran drogas comerciales en el momento en que se realizaron los experimentos y por eso una muestra de ellas fue gentilmente facilitada por el Dr. Robert Bridges, de la Universidad de Pittsburg, Pennsylvania, quién las desarrolló (Singh y col., 2001).

Tanto el DCEBIO como la bumetanida se disolvieron en DMSO (di-metil sulfóxido), por lo cual se realizaron experimentos control con este vehículo, verificando que no se produjeron cambios significativos en los parámetros medidos (J_w , I_{SC} , R_T ni ΔV).

2.3.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó por la prueba T de Student. Se consideró significativo un $p < 0,05$. Cuando se compararon resultados de protocolos diferentes, los datos se analizaron como datos no pareados, y cuando se compararon condiciones dentro del mismo protocolo se compararon como datos pareados. Todos los resultados se presentan como el promedio \pm SEM.

2.4. Resultados

2.4.1. Caracterización biofísica de las células T84: las permeabilidades hidrostática y osmótica

Como se mencionó en la introducción de este capítulo, las células T84 forman monocapas de alta resistencia eléctrica transepitelial presentando características de epitelio cerrado (“tight”). Para poder analizar la relación entre los transportes asociados de agua y solutos en T84 era necesario hacer primero la determinación de los coeficientes de permeabilidad hidrostática (P_{hid}) y osmótica (P_{osm}).

Como se señalara en la introducción de este Capítulo, las monocapas celulares implican la existencia de dos membranas ubicadas en serie (la basolateral y la apical) y dos vías de pasaje posible, la transcelular y la paracelular. Se asume que P_{hid} da idea de la posibilidad de pasaje de fluido a través de las uniones entre las células y que P_{osm} es una sumatoria de los flujos tanto paracelulares como transcelulares.

Para la determinación de P_{osm} se registró el flujo neto de agua (J_W) en presencia de diferentes concentraciones serosas de manitol. Por su tamaño, este soluto es impermeable a la barrera epitelial, generando un gradiente de presión osmótica, directamente proporcional a su gradiente de concentración. La Figura 2.2 A muestra un registro típico de J_W -osm.

El coeficiente de permeabilidad osmótica (P_{osm}) se obtuvo a partir de la pendiente de la regresión lineal ($R = 0.99 \pm 0.04$) realizada sobre los valores de J_W -osm graficados en función de las concentraciones de manitol (Figura 2.2 B). El valor calculado de P_{osm} fue $(1,30 \pm 0,01) \times 10^{-3} \text{ cm.s}^{-1}$ ($n=7$).

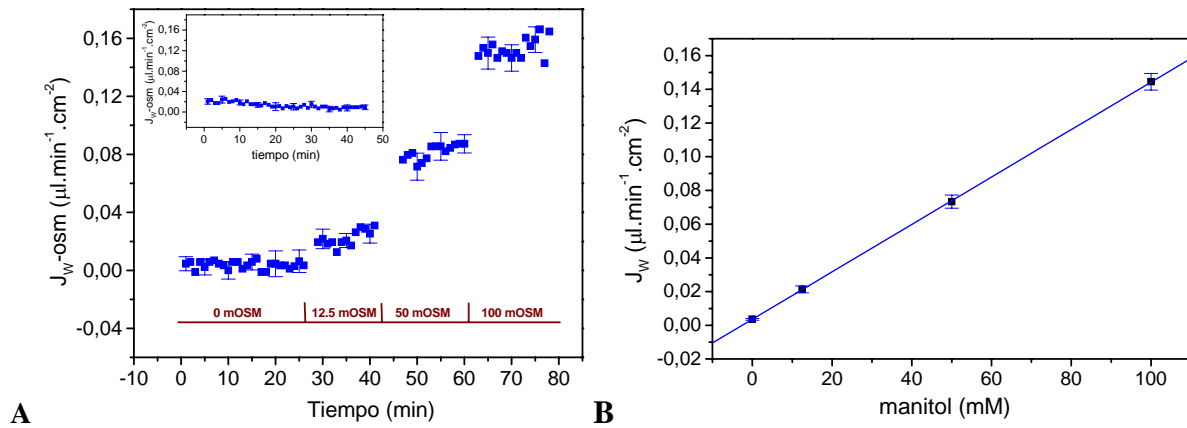


Figura 2.2. Determinación de P_{osm} en T84. A. Variación del J_w osmótico ($J_w\text{-osm}$) a lo largo del tiempo. Debajo del registro se indican los valores de osmolaridad producidos por el agregado de manitol en el lado seroso. En el inserto se muestra el flujo a lo largo del tiempo en condiciones basales. **B.** Determinación de P_{osm} . El valor de P_{osm} se calcula de la pendiente de J_w en función del gradiente aplicado ($n=7$).

Para el cálculo de P_{hid} , el sistema se sometió a diferentes valores de presión hidrostática y se observó la variación del flujo de agua a lo largo del tiempo.

De la pendiente de la recta de regresión lineal realizada sobre los datos de J_w en función de ΔP_{h} se obtuvo el valor de P_{hid} ($0,27 \pm 0,02 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$, $n=3$).

2.4.2. Mediciones de I_{SC} y J_w en la línea celular T84

2.4.2.1. Flujos basales de agua e iones en las células T84

Antes de probar las drogas 1-EBIO y DC-EBIO se realizó una serie experimental para observar los flujos de agua e iones en condiciones basales (sin estimulación). Una vez montadas las monocapas, y luego de su estabilización, se registraron simultáneamente los valores de I_{SC} y J_w (Tabla 2.1).

	Basal
J_w ($\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$)	$0,0092 \pm 0,0050$
I_{SC} ($\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$)	$2,18 \pm 2,49$
R_T ($\Omega\cdot\text{cm}^2$)	$998,12 \pm 22,36$
ΔV (mV)	$0,37 \pm 0,38$

Tabla 2.1. Resultados de los registros simultáneos de flujos netos de agua (J_w), corriente de cortocircuito (I_{SC}), resistencia transepitelial (R_T) y diferencia de potencial transepitelial (ΔV_T) en monocapas de células T84 sin estimular y en ausencia de gradientes químicos y osmóticos (condiciones basales, $n=7$). Los resultados se muestran como el promedio \pm SEM.

Como se ve en la Tabla 2.1, en estas condiciones no se observaron flujos netos de agua ni de iones (los valores de I_{SC} y J_W no son significativamente distintos de cero).

Luego se realizaron distintos protocolos experimentales para probar los efectos de las drogas.

2.4.2.1.1. Comparación de los efectos producidos por 1-EBIO mucoso y 1-EBIO seroso

Las Figuras 2.3 A y B muestran la comparación de J_W y de I_{SC} al estimular las células T84, alternativamente con 1-EBIO seroso y mucoso.

Comparando ambas condiciones entre sí, se puede observar que el 1-EBIO ($5 \cdot 10^{-4} M$) seroso ($n=3$) produjo un flujo absorbivo mayor ($p<0,01$) que el 1-EBIO mucoso ($n=5$).

Con respecto al movimiento de iones, el 1-EBIO seroso produjo un valor de I_{SC} que no fue significativamente distinto de cero ($n=3$). Sin embargo, la misma concentración de 1-EBIO en el lado mucoso ($n=5$) produjo una I_{SC} negativa, significativamente diferente respecto del basal ($-22,38 \pm 6,56 \mu A \cdot cm^{-2}$, $p<0,05$).

En la Figura 2.3 B se comparan los valores de I_{SC} observados con 1-EBIO ($5 \cdot 10^{-4} M$) mucoso o seroso, siendo significativa la diferencia entre ambas condiciones ($p<0,02$).

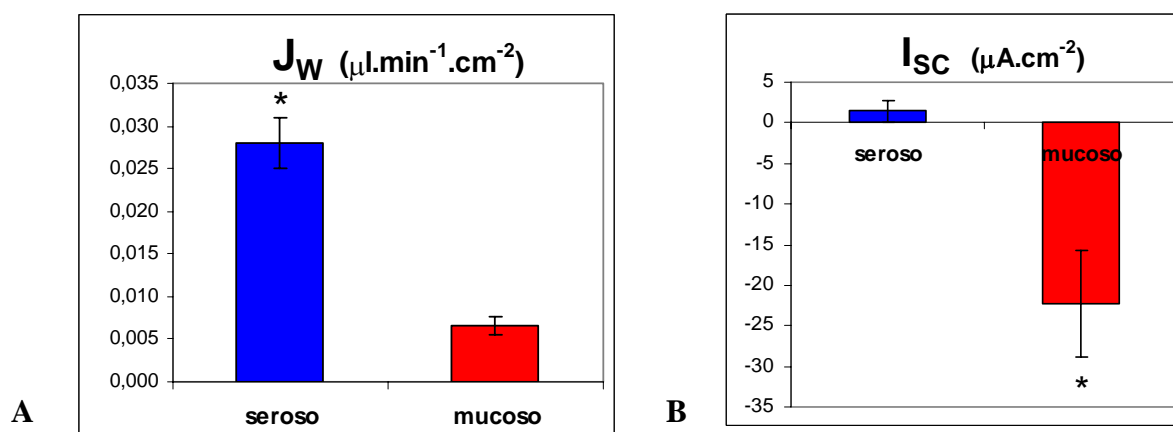


Figura 2.3. Comparación de los efectos producidos por el 1-EBIO ($5 \cdot 10^{-4} M$) mucoso ($n=5$) o seroso ($n=3$). Los resultados se muestran como el promedio \pm SEM.

2.4.2.1.2. Efectos producidos por distintas concentraciones de 1-EBIO seroso

El aumento de la concentración de 1-EBIO en el lado seroso (1.10^{-3} M) no produjo un aumento significativo de J_w ($0,0353 \pm 0,0058 \mu\text{l}.\text{min}^{-1}.\text{cm}^{-2}$) respecto de la concentración anterior (5.10^{-4} M) que se mostró en la Figura 2.3 A.

Sobre I_{SC} , si bien se observó una tendencia al aumento de los valores de este parámetro, los cambios provocados por 1-EBIO seroso no resultaron significativamente distintos de cero.

En cuanto al ΔV_T y la R_T registrados a circuito abierto, tampoco hubo cambios significativos.

El agregado de concentraciones crecientes de 1-EBIO seroso (5.10^{-4} M y 1.10^{-3} M) sobre las monocapas estimuladas con 1-EBIO mucoso (5.10^{-4} M), provocó un aumento del flujo absorbivo (Figura 2.4 A). Esta respuesta fue dependiente de la concentración ($p < 0,02$ y $p < 0,01$, respectivamente) (Figura 2.4 B).

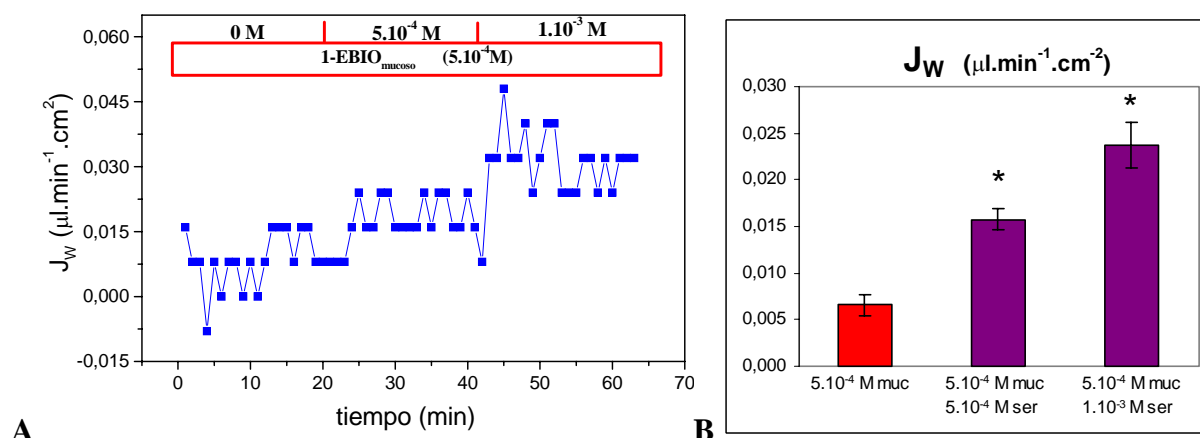


Figura 2.4. Efecto del 1-EBIO en ambos lados de la monocapa de células T84 sobre J_w . El 1-EBIO mucoso (5.10^{-4} M) estuvo presente a lo largo de todo el experimento. **A.** Registro tipo. Sobre el registro se indican las concentraciones de 1-EBIO (5.10^{-4} M, 1.10^{-3} M) aplicadas del lado seroso de la monocapa. ($n=5$); **B.** Valor medio de los flujos registrados en cada condición.

Con respecto al flujo de iones, el agregado de 5.10^{-4} M de 1-EBIO en el lado seroso produjo una disminución significativa del valor absoluto de I_{SC} ($\Delta I_{SC} = 2,16 \pm 0,63 \mu\text{A}.\text{cm}^{-2}$; $p < 0,05$). Posteriormente, cuando se duplicó la concentración en ese mismo compartimiento (1.10^{-3} M) se produjo una disminución aún mayor ($\Delta I_{SC} = 15,58 \pm 3,97 \mu\text{A}.\text{cm}^{-2}$; $p < 0,02$). (Figura 2.5). Es decir que la corriente de cortocircuito se hizo cada vez menos negativa (o más positiva) con el agregado de 1-EBIO en el lado seroso respecto de la corriente producida por el 1-EBIO mucoso.

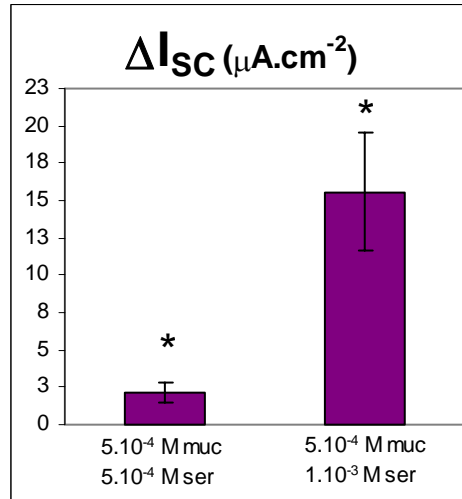


Figura 2.5. Efecto del 1-EBIO seroso sobre la I_{SC} estimulada por 1-EBIO mucoso. Las barras representan el cambio producido en la corriente de cortocircuito ($\Delta I_{SC} \pm SEM$, $n=5$) por el agregado de 1-EBIO del lado seroso ($5 \cdot 10^{-4} M$ y $1 \cdot 10^{-3} M$) sobre la condición con 1-EBIO mucoso ($5 \cdot 10^{-4} M$).

El ΔV_T de las monocapas estimuladas con 1-EBIO mucoso ($5 \cdot 10^{-4} M$) resultó de signo negativo y significativamente diferente del registrado en condiciones basales ($\Delta V_{1-EBIO \text{ mucoso}} = -2.40 \pm 0.27 \text{ mV}$, $n=4$, $p<0.01$). Al agregar $5 \cdot 10^{-4} M$ de 1-EBIO en el lado seroso se produjo una leve disminución de los valores absolutos de ΔV_T ($-1.95 \pm 0.25 \text{ mV}$) respecto del observado con la estimulación en la cara mucosa, pero significativamente diferente del basal ($p<0,01$). Cuando se duplicó la concentración en este compartimiento ($1 \cdot 10^{-3} M$) el ΔV_T volvió a los valores basales ($-0,14 \pm 0,80 \text{ mV}$), revirtiendo el efecto producido por el 1-EBIO mucoso (Figura 2.6).

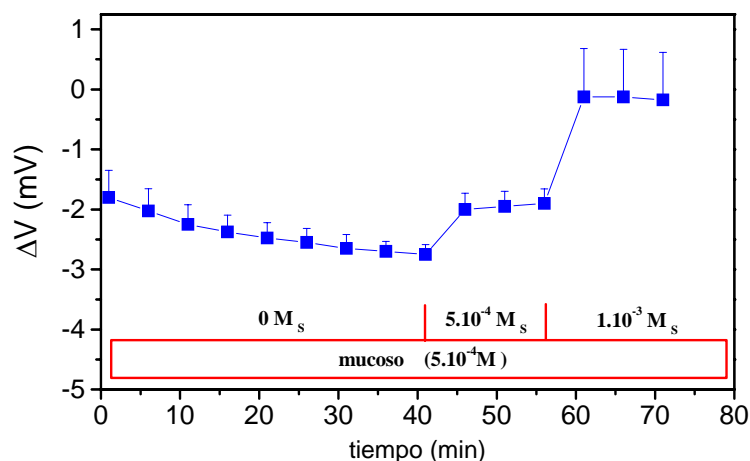


Figura 2.6. Efecto del 1-EBIO sobre la diferencia de potencial transepitelial (ΔV_T). Curso temporal de ΔV_T en presencia de 1-EBIO mucoso y los cambios producidos por el agregado de 1-EBIO en el lado seroso ($n=4$).

En la serie experimental con 1-EBIO mucoso tampoco se observaron cambios en los valores de R_T , en todas las condiciones ensayadas indicando que esta droga no altera la integridad de las monocapas.

2.4.2.2. Efecto del DC-EBIO sobre J_w y los parámetros eléctricos de las células T84

Como se dijo en la introducción de este capítulo, el DC-EBIO es un agente estimulador mucho más potente que el 1-EBIO.

En series experimentales separadas, se probaron dos concentraciones de DC-EBIO (25 μM y 50 μM) y el efecto de bumetanida, un inhibidor específico del cotransportador basolateral $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ que se asume como el sitio de entrada del Cl^- basolateral en las células T84.

2.4.2.2.1. Efectos producidos por 25 μM de DC-EBIO

En estos experimentos ($n=5$) se ensayó al mismo tiempo DC-EBIO mucoso (25 μM) con DC-EBIO seroso (25 μM). Luego se aumentó la concentración serosa a 50 μM . Finalmente, se ensayó la inhibición del cotransportador basolateral con bumetanida (1.10^{-5} M).

2.4.2.2.1.1. Efectos de DC-EBIO 25 μM sobre J_w

El DC-EBIO (25 μM) colocado simultáneamente en ambos lados de la monocapa, no produjo efectos sobre el flujo neto de agua ($J_w = 0,0055 \pm 0,0073 \mu\text{l}.\text{min}^{-1}.\text{cm}^{-2}$, $n=5$). Tampoco se observaron cambios significativos cuando se aumentó la concentración de DC-EBIO en el lado seroso hasta 50 μM ($J_w = 0,0111 \pm 0,0059 \mu\text{l}.\text{min}^{-1}.\text{cm}^{-2}$). Sin embargo el agregado de bumetanida (1.10^{-5} M) produjo un cambio significativo del flujo en el sentido de la absorción ($p<0,01$) (Figura 2.7).

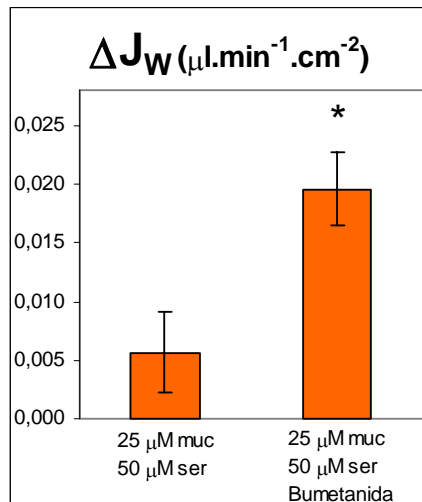


Figura 2.7. Efecto del DC-EBIO (25 μM) y la bumetanida sobre el flujo de agua. Las barras representan el cambio en el flujo de agua (ΔJ_w promedio \pm SEM, respecto de la condición anterior) producido por el agregado secuencial de DC-EBIO (25 μM) y bumetanida (1.10^{-5} M) en el lado seroso de las monocapas de células T84, después de ser estimuladas simultáneamente con la misma concentración de DC-EBIO (25 μM) en los lados mucoso y seroso.

2.4.2.2.1.2. Efectos de DC-EBIO 25 μM sobre I_{SC}

Con respecto al movimiento neto de iones, el DC-EBIO en ambos lados de la monocapa (25 μM mucoso y 25 μM seroso) produjo valores positivos de I_{SC} significativamente diferentes del basal ($p < 0,01$). El incremento de la concentración en el lado seroso (50 μM) no produjo un aumento significativo adicional de I_{SC} (Figura 2.8). Aunque el agregado de bumetanida (1.10^{-5} M) provocó una disminución en los valores de I_{SC} , este cambio no llegó a ser significativo (análisis de datos pareados para $n=3$) (Figura 2.8).

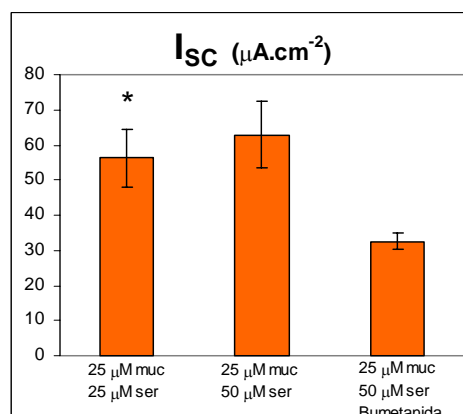


Figura 2.8. Efecto del DC-EBIO (25 μM) sobre la corriente de cortocircuito. Las barras representan el valor promedio de la corriente de cortocircuito ($I_{SC} \pm$ SEM) registrado en las distintas condiciones experimentales con DC-EBIO ($n=5$).

2.4.2.2.1.3. Efectos de DC-EBIO 25 μM sobre ΔV_T

El DC-EBIO 25 μM mucoso y 25 μM seroso produjo un aumento significativo de la diferencia de potencial transepitelial respecto de los valores basales ($p < 0.02$), que se mantuvo al aumentar la concentración de DCEBIO en el lado seroso a 50 μM . La adición de bumetanida ($1 \cdot 10^{-5}$ M) produjo una disminución significativa de los valores de este parámetro ($p < 0,05$) (Figura 2.9).

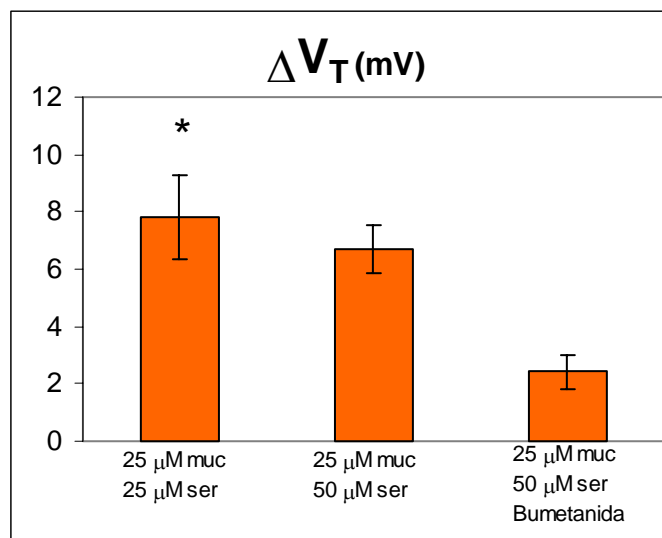


Figura 2.9. Efecto del DC-EBIO (25 μM) sobre la diferencia de potencial transepitelial. Las barras representan el valor promedio del potencial ($\Delta V_T \pm \text{SEM}$) registrado en las distintas condiciones experimentales con DC-EBIO y el agregado de bumetanida ($1 \cdot 10^{-5}$ M) en el lado seroso ($n=5$).

2.4.2.2.2. Efectos producidos por 50 μM de DC-EBIO

En la última serie experimental con DC-EBIO se duplicó la concentración inicial en los lados mucoso y seroso (50 μM de cada lado). Luego se agregó DC-EBIO en el lado seroso de manera que la concentración final fuese 75 μM . Finalmente, igual que en la serie anterior, se ensayó la inhibición con bumetanida del lado seroso ($1 \cdot 10^{-5}$ M).

2.4.2.2.2.1. Efectos de 50 μM de DC-EBIO sobre I_{SC} y J_w

En esta serie experimental, ninguna de las condiciones produjo cambios significativos de J_w con respecto al basal.

Sin embargo, se observó un aumento significativo de I_{SC} con 50 μM de DCEBIO mucoso y 50 μM seroso, hacia valores positivos respecto de las condiciones basales ($p < 0,01$). Al aumentar la concentración de DC-EBIO en el lado seroso no se observaron diferencias significativas con la condición anterior (Figura 2.10). Aunque con bumetanida ($1 \cdot 10^{-5}$ M) se

observa una disminución de la I_{SC} , este cambio no llega a ser significativo respecto de la condición anterior (Figura 2.10).

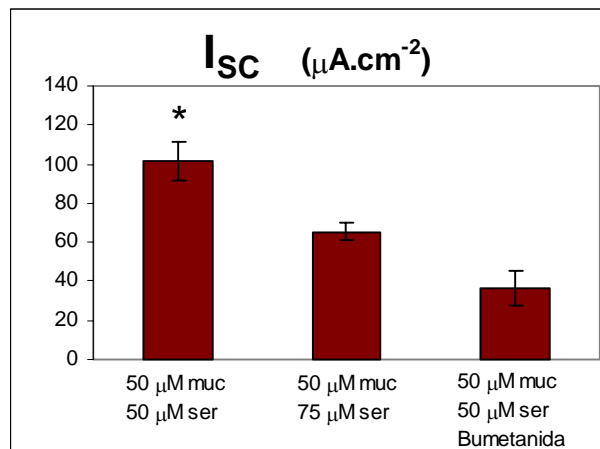


Figura 2.10. Efecto del DC-EBIO (50 μM) sobre la corriente de cortocircuito. Las barras representan el valor promedio de la corriente de cortocircuito ($I_{SC} \pm SEM$) registrado en las distintas condiciones experimentales con DC-EBIO (n=5) y el agregado de bumetanida ($1 \cdot 10^{-5}$ M) en el lado seroso.

2.4.2.2.2. Efectos de 50 μM de DC-EBIO sobre ΔV_T

Con respecto a la diferencia de potencial transepitelial, el DC-EBIO (50 μM mucoso y 50 μM seroso) produjo un aumento significativo respecto de los valores basales ($\Delta V_T = 11,29 \pm 2,49$; $p < 0,05$, n=3). Sin embargo, el aumento de la concentración de DC-EBIO seroso y el agregado de bumetanida no produjeron cambios significativos respecto de lo observado en la condición inicial de estos experimentos.

2.5. Discusión

2.5.1. La permeabilidad al agua en T84

La caracterización biofísica de la línea T84, con la determinación de los valores de P_{hid} y P_{osm} , permitió una evaluación de cuánto era lo que cada una de estas vías aportaba al movimiento transepitelial de fluido.

Como se señaló en la introducción, se asume que P_{hid} da cuenta del pasaje de fluido entre las células de un epitelio (vía paracelular). Esto es así porque ninguna diferencia de presión hidrostática puede forzar el movimiento de fluido a través de las membranas celulares. P_{osm} en cambio, pone en evidencia los movimientos de fluido que ocurren por cualquier vía que ofrezca una baja resistencia al transporte de fluido, sea paracelular o transcelular.

El valor de P_{hid} obtenido para la línea celular T84 ($0,27 \pm 0,02 \text{ cm.s}^{-1}$, $n=3$) permite deducir que la vía paracelular muestra una alta resistencia al flujo de fluido. Esto está en concordancia con el valor obtenido de R_T , que también da cuenta de un epitelio “tight”.

En cuanto a los valores de P_{osm} ($(1,30 \pm 0,01) \times 10^{-3} \text{ cm.s}^{-1}$, $n=7$), estos son del mismo orden que valores informados para epitelios con alta resistencia eléctrica y que no expresan acuaporinas en ninguna de sus membranas (Toriano y col., 1998; Chara y col., 2005).

2.5.2. El acoplamiento entre agua e iones durante la absorción y la secreción

2.5.2.1. Los efectos producidos por 1-EBIO sobre las células T84

Al estimular T84 con 1-EBIO mucoso se observó una I_{SC} negativa importante y un ΔV_T también negativo. En términos del movimiento neto de iones, este valor de I_{SC} se puede interpretar como la secreción de un ión positivo. Como se mencionó en la introducción, está descrita la secreción electrogénica de K^+ en las células de las criptas colónicas. Este mecanismo ocurre a través de canales apicales de K^+ , por un mecanismo similar al de la secreción de Cl^- . Si bien las células T84 provienen de un adenocarcinoma de colon, han sido descritas como células que guardan características de las células de la cripta colónica (Dharmathaphorn y col., 1984).

En los resultados provocados por el agregado de 1-EBIO seroso (sobre monocapas estimuladas del lado mucoso), I_{SC} se vuelve más positiva evidenciando el movimiento de un catión (Na^+) en el sentido de la absorción (mucoso-seroso), sumado al movimiento de un anión (Cl^-) en el sentido de la secreción. Igual que en la serie experimental anterior, J_w es absorbivo, como consecuencia del predominio de la absorción de Na^+ por sobre la secreción de Cl^- .

Dado que los flujos netos de agua (J_w) son siempre en el sentido de la absorción, y que I_{SC} es positiva, parecería ser que el movimiento neto estaría regido por un catión, posiblemente Na^+ o K^+ .

La componente secretora de J_w se puso en evidencia recién en los experimentos con DC-EBIO y bumetanida (ver 2.5.2.2).

Por otra parte las diferencias observadas entre los resultados mencionados con 1-EBIO a cada lado de la monocapa, estarían indicando diferentes mecanismos de acción según el dominio de membrana sobre el que actúe en primera instancia. Este resultado concuerda con los de otros autores, que estimulando canales basolaterales de K^+ (IK_{ca}) en duodeno de ratones, observaron que cuando estimulaban el lado seroso del epitelio los valores de I_{SC} y la secreción de HCO_3^- eran significativamente mayores que cuando lo hacían sobre el lado mucoso (Dong y col., 2006).

2.5.2.2. Los efectos producidos por DC-EBIO sobre las células T84

Como se había informado antes (Singh y col., 2001), los valores de I_{SC} observados con DC-EBIO fueron muy superiores a los observados con 1-EBIO. Estos pueden interpretarse como la suma algebraica del movimiento de dos iones en sentido opuesto, la salida de Cl^- y la entrada de Na^+ , ambas aportando a una corriente neta positiva. En cambio, en el caso de los movimientos de agua acoplados a estos movimientos iónicos, los flujos unidireccionales se anulan entre sí, resultando un J_w igual a cero. Esta interpretación queda en evidencia ante la acción de bumetanida, la cual al inhibir el cotransportador basolateral $Na^+/K^+/2Cl^-$, disminuye la salida de Cl^- , disminuyendo el valor de I_{SC} y consecuentemente la componente secretora de J_w . Es por esto que se observa un aumento del flujo neto de agua en el sentido de la absorción. Los cambios observados en ΔV_T concuerdan con estas explicaciones.

El hecho de que R_T no varíe significa que DC-EBIO tampoco altera la integridad de las monocapas de T84.

2.5.2.3. El desacople de I_{SC} y J_W en las células T84

En el caso en que se estimuló ambos lados simultáneamente de la monocapa con DC-EBIO, se observó la contribución de la componente secretora de Cl^- cuando se inhibió el cotransportador basolateral $Na^+/K^+/2Cl^-$, pero además se hizo evidente la absorción de Na^+ de manera no electrogénica, mecanismo que fue descrito por Toriano y colaboradores (2007), y que según estos resultados predomina por sobre la secreción de Cl^- cuando se estimulan simultáneamente con DC-EBIO ambos lados de las monocapas de T84.

Midiendo simultáneamente el flujo neto de agua (J_W) con la corriente de cortocircuito (I_{SC}), se puede concluir que en las células T84 también se evidencia el desacople entre I_{SC} y J_W cuando se estimula con DC-EBIO (Ozu y col. 2005a). Si se toman los valores observados de I_{SC} y J_W en monocapas estimuladas con DC-EBIO (50 μM mucoso y 50 μM seroso) y se restan los valores basales, se puede calcular cuál sería el J_W asociado a transporte (J_W -transp) que se esperaría por la estimulación, asumiendo que el único ión que se mueve es Cl^- y que el flujo de fluido es isotónico. El mismo análisis se puede realizar sobre los datos publicados para la toxina STa, y compararlos con los anteriores (Tabla 2.2 y Figura 2.11).

	DC-EBIO (n=5)	STa (n=8)
ΔJ_W -Exp ($\mu l \cdot min^{-1} \cdot cm^{-2}$)	- 0,009 \pm 0,008	- 0,180 \pm 0,040
ΔI_{SC} ($\mu A \cdot cm^{-2}$)	99,24 \pm 12,34	16,9 \pm 4,32
ΔJ_W -Teórico ($\mu l \cdot min^{-1} \cdot cm^{-2}$)	- 0,482 \pm 0,060	- 0,070 \pm 0,018

Tabla 2.2. Comparación de los efectos producidos por STa y DCEBIO (50 μM mucoso y 50 μM seroso) sobre I_{SC} y J_W en monocapas de células T84. Los valores teóricos fueron calculados asumiendo un flujo isotónico derivado del transporte electrogénico de Cl^- , medido por I_{SC} . Para los cálculos se tuvo en cuenta que una corriente de 1 μA equivale a un flujo de $6,22 \cdot 10^{-7}$ mmol de Cl^- por minuto y que un volumen de 1 $\mu l \cdot min^{-1}$ equivale a un flujo de $1,28 \cdot 10^{-4}$ mmol de Cl^- por minuto. Para el caso de STa, los datos fueron tomados de Toriano y col., 2001.

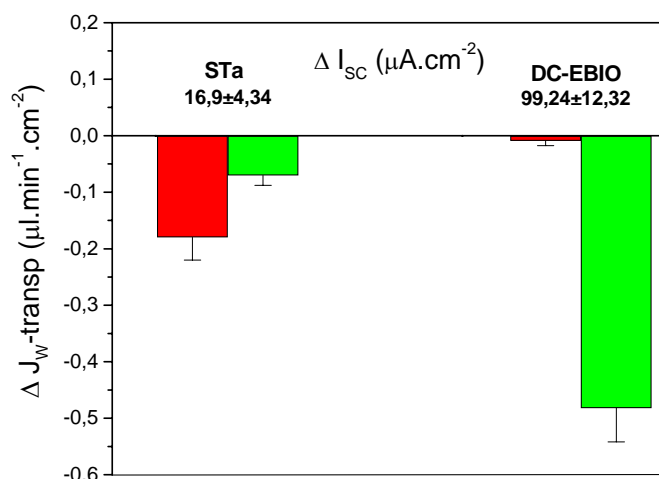


Figura 2.11. Comparación del desacople entre el flujo electrogénico de iones (I_{SC}) y el flujo de agua (J_w) observado en células T84 estimuladas con STa y con DC-EBIO (50 μM mucoso y 50 μM seroso). Las barras rojas representan la variación de J_w asociado a transporte (ΔJ_w -transp) medido bajo condiciones de estimulación del flujo iónico, respecto del J_w observado sin estimulación. Arriba están indicados los valores de la variación del flujo de iones medido en las respectivas condiciones de estimulación (STa y DC-EBIO) respecto del registrado sin estimulación (ΔI_{SC}). Las barras verdes representan el flujo de agua teórico que se esperaría a partir de los valores de ΔI_{SC} asumiendo que el único ión que se mueve a través de la monocapa es el Cl^- y que el flujo de fluido es isotónico. Los datos de STa fueron tomados de Toriano y colaboradores, 2001.

En su conjunto, los resultados con 1-EBIO y DC-EBIO demuestran que el desacople producido por estas drogas en T84, ocurre de manera inversa a como lo hace la toxina STa. Esta observación es claramente evidente en el caso del DC-EBIO.

2.6. Conclusiones

El análisis de los resultados indica que, en monocapas de células T84 estimuladas con la benzimidazolonas utilizadas, el valor de los flujos de fluido no puede ser determinado a partir de mediciones de I_{SC} , ya que no se observa el efecto esperado para el 1-EBIO y el DC-EBIO: el arrastre de agua siguiendo a la secreción de Cl^- que estas drogas provocan.

Concretamente, los datos aquí presentados demuestran que el flujo de agua asociado al transporte de solutos (J_w -transp), observado en la línea celular T84 en diferentes situaciones experimentales, no puede ser explicado como el resultado de un movimiento de agua impulsado por un gradiente osmótico, generado “en algún lugar” del epitelio por el transporte de soluto. Distintos mecanismos pueden ser posibles para encontrar una explicación a estas observaciones experimentales: la existencia de cotransportes agua-solutos (Loo y col., 1996; Hamann y col., 2005), un efecto electrosmótico paracelular (Fischbarg y col., 2006), etc. Dada la complejidad estructural de la barrera epitelial es difícil estudiar y evaluar estas posibilidades.

Capítulo 3

Desarrollo de técnicas originales para la medición del transporte de agua y solutos en células aisladas

3.1. Introducción

En el caso en que el agua se mueve a través de canales que atraviesan la membrana, y que tienen propiedades similares a las observadas en las acuaporinas, la naturaleza molecular del fenómeno conocido como “ósmosis” aún no está plenamente clarificada. (Hammel y col., 1979; Janáček & Sigler, 2000; Ben-Sasson & Grover, 2003). Esto se debe, entre otras cosas, a la dificultad técnica de controlar la composición de los medios que bañan ambos extremos del canal. Una solución cuasi-ideal para resolver este problema fue la descrita al estudiar el canal de gramicidina en membranas lipídicas artificiales (Finkelstein & Andersen, 1981). En este caso se pudo demostrar sólidamente que al establecer un gradiente osmótico a través del canal de gramicidina, el flujo neto registrado fue varias veces superior al medido en condiciones isotónicas. El desarrollo de una técnica adaptada a membranas celulares podría profundizar observaciones obtenidas con estructuras más complejas como células aisladas o en distintos epitelios.

Aunque las líneas celulares como T84, tratada en el capítulo anterior, son –por su practicidad experimental– una importante herramienta para el estudio de los movimientos de agua y soluto en comparación con tejidos enteros, aún distan de la simplicidad de una única membrana celular con canales incorporados a ella. La ventaja de trabajar con membranas aisladas se hace más evidente si existe la posibilidad de manipular la expresión del canal que se desea estudiar y las características de los ambientes que interactúan con sus caras intracelular y extracelular.

El presente capítulo describe el desarrollo, para esta tesis, de una técnica que denominamos “del ovocito vaciado” (o “emptied-out” por su nombre en inglés), que da por resultado un sistema más sencillo de estudio que un epitelio, y que fue desarrollado para estudiar los fenómenos de transporte osmóticos con la evidente ventaja de controlar las condiciones experimentales a ambos lados de la membrana celular.

3.1.1. Antecedentes

Antes de que se clonaran las acuaporinas, el estudio del transporte de agua se hacía insertando antibióticos en las membranas de las células. El principio por el cual estas moléculas cumplen con la función antibiótica es que forman canales que permeabilizan a las células bacterianas produciendo su muerte. Entre estas moléculas con propiedades antibióticas, algunas de las más utilizadas fueron la anfotericina B y la gramicidina A (Finkelstein & Andersen, 1981; Finkelstein, 1987). Aunque algunos de estos canales permitían no solo el pasaje de agua sino también el de algunos iones, su inclusión en bicapas artificiales fue muy útil para estudiar fenómenos osmóticos, y para el desarrollo de las hipótesis de “fila india” y “capas no mezcladas”, que se planteaban en relación al transporte de agua a través de epitelios (Ver Capítulo 1).

A partir del clonado de las acuaporinas, el estudio del transporte de agua se centró en las propiedades de estas moléculas. Para esto se utilizan técnicas de biología molecular que permiten realizar mutaciones en los canales nativos (Kuang y col., 2001; Beitz y col., 2006), y animales transgénicos para el desarrollo de, por ejemplo, ratones knock-out para distintas AQPs (Yang y col., 2005). Curry y colaboradores (2001) postularon que el canal de agua formado por la acuaporina-1 no obedece a las ecuaciones de Kedem y Katchalsky (1963), y propusieron que la observación de coeficientes de reflexión menores que 1 no resulta necesariamente de una interacción agua-soluto en el flujo intra-canal. La hipótesis plantea que el resultado observado se explicaría por diferencias en la naturaleza fundamental del flujo de agua que ocurre en regiones ya sean accesibles o inaccesibles al soluto, como resultado de secciones de corte de diámetro variable en el interior del canal.

Como vimos en el Capítulo 1, para medir flujos netos de agua en células aisladas se usan técnicas volumétricas, como la de dispersión de la luz (“light scattering”) (Paganelli & Solomon, 1957), la variación en la concentración o señal de fluoróforos, o aquellas que de manera directa por observación óptica, permiten medir los cambios en el volumen celular (Zadunaisky y col., 1963). Entre estas últimas, es ampliamente utilizado el ovocito del anfibio *Xenopus laevis*. El mismo fue usado para medir la permeabilidad al agua después de la inserción de un antibiótico formador de canales, como la anfotericina B (Capurro y col., 1994) o antes y después de la expresión de acuaporinas en su membrana (Preston y col., 1992). En este último caso, es posible monitorear por video-microscopía los cambios del

volumen del ovocito sometido a la disminución inmediata de la osmolaridad de la solución extracelular, y determinar el coeficiente de permeabilidad osmótica (P_{osm}) (Zhang y col., 1990; Dorr y col., 2007).

Tal vez desde su descripción (Zhang y col., 1990), la técnica de inyección de ácidos nucleicos (que codifican o podrían contener una secuencia codificante para acuaporinas) en ovocitos de *Xenopus*, fue la de mayor utilidad a la hora de identificar moléculas de esta familia de canales (Ford y col., 1996). Sin embargo, aunque el uso de ovocitos de *Xenopus* permite trabajar con acuaporinas expresadas de manera natural en verdaderas membranas biológicas, esta técnica no resuelve la incertidumbre de la composición interna de la célula, lo cual no permite hacer exactas mediciones de permeabilidad. En general se asume que toda el agua de las células tiene las mismas propiedades ideales, cinéticas y coligativas, que el agua en estado líquido contenida en un reservorio (Cameron y col., 1997). Sin embargo, el contenido citoplasmático del ovocito es un medio viscoso y heterogéneo con la presencia de barreras de difusión y áreas que pueden ser osmóticamente insensibles (Wiggins, 1996), por lo que el ovocito está lejos de ser un reservorio de agua ideal.

Para el estudio de los movimientos de agua a nivel de membranas con canales insertados, es útil una técnica que permita controlar las condiciones a ambos lados de ellos.

Las membranas artificiales permiten tener este control, y aunque han sido muy prácticas para el estudio de las AQP's por la inserción de los canales en las bicapas (Saparov y col., 2001; Tsunoda y col., 2004), se alejan de las condiciones naturales de las células. Lo mismo sucede con otras técnicas como el estudio de acuaporinas insertadas en liposomas (Zeidel y col., 1992; Zeidel y col., 1994).

Aunque no abundan, probablemente debido a dificultades técnicas, en la bibliografía se encuentran trabajos donde se controlaron simultáneamente las composiciones de los medios intra y extracelular. Algunos logros destacados son el método "cut-out" (Tagliatela y col., 1992) y el de Dascal y col. (1992) para la perfusión interna del ovocito de *Xenopus laevis*, ambos para resolver mediciones eléctricas, y el método utilizado por el grupo de Rasgado-Flores para estudiar las propiedades osmóticas de las células de cangrejo (Bitner y col., 2001), un sistema donde no se describe la expresión de proteínas foráneas.

3.1.2. La técnica del ovocito vaciado

La técnica de “cut-out” fue desarrollada por el grupo de Enrico Stefani (Tagliatela y col., 1992) para fijar el voltaje de la membrana del ovocito de *Xenopus* aislando parte de la misma con un sello de vaselina; luego el contenido citoplasmático es intercambiado, cortando o permeando parte de la membrana remanente para realizar mediciones eléctricas. Basados en dicha técnica, pero con la necesidad de realizar mediciones de movimientos de agua a través de la membrana, desarrollamos la técnica de vaciado del ovocito (“emptied-out oocyte”), que nos permite monitorear constantemente la respuesta osmótica de la membrana de un ovocito controlando la composición química y la presión hidrostática a ambos lados de la misma (Ozu y col., 2005b). La técnica resultó una herramienta de suma importancia para la obtención de los resultados de la presente tesis. La ventaja de usar membranas naturales en lugar de artificiales es evidente debido a la presencia de estructuras celulares que dan condiciones más genuinas. Además, el modelo de ovocitos provee potencialmente de un medio idóneo para la expresión de acuaporinas (Sutka y col., 2005; Alleva y col., 2006).

3.2. Objetivos

El objetivo fue desarrollar una técnica que nos permitiera controlar las condiciones experimentales aproximándonos a aquellas empleadas por Rosenberg y Finkelstein (1978) cuando medían los flujos de agua a través de membranas lipídicas artificiales que contenían estructuras permeables al agua, pero en una membrana natural expresando canales específicos para el agua, las acuaporinas.

Para lograrlo era necesario vaciar al ovocito de su contenido citoplasmático, para luego montar su membrana plasmática como un diafragma entre dos cámaras independientes, del mismo modo que se montan los epitelios en una cámara de Ussing.

3.3. Materiales y métodos

3.3.1. Preparación de los ovocitos

3.3.1.1. Mantenimiento de las ranas de *Xenopus laevis*

La fuente de ovocitos fueron hembras adultas de *Xenopus laevis* (Figura 3.1 A) adquiridas comercialmente (Nasco, Wisconsin, USA) mantenidas en un cuarto con temperatura controlada y un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas provisto por tubos fluorescentes manejados por un reloj programado. Cada rana estaba ubicada en un recipiente de plástico con ranuras de ventilación en la tapa y lleno hasta la mitad con agua. Esto le permite al anfibio estar completamente sumergido y poder respirar en la superficie del agua.

Los animales se alimentaban dos veces por semana y el agua se cambiaba tres veces en el mismo lapso de tiempo. El agua se filtraba utilizando carbón activado y recibía un tratamiento de decloración que consistía en dejarla reposar en recipientes de 20 litros por más de tres días. Luego se verificaba que tuviera bajos niveles de cloro utilizando un *kit* comercial.

Cada animal estaba identificado y se operaba a intervalos de al menos cuatro semanas, alternando en cada operación la extracción de ovocitos del ovario izquierdo y del derecho.

3.3.1.2. Obtención de los ovocitos

El animal era adormecido por hipotermia, colocándolo en hielo durante 25 min previos a la operación. En todos los casos, una vez dormido, el animal se colocó sobre una bandeja conteniendo hielo, con el vientre hacia arriba, y se realizó un corte en la parte baja del abdomen por donde se extrajeron los lóbulos conteniendo los ovocitos. Luego de la extracción de los ovocitos y finalizada la operación, la herida se suturó con hilo quirúrgico reabsorbible.

Los lóbulos se colocaron en solución OR2 (la composición de todas las soluciones se detalla más adelante) y los ovocitos se separaron con pinzas en grupos de 20, aproximadamente. Una vez separados, los ovocitos se incubaron en solución OR2 suplementada con 1 U.ml^{-1} de colagenasa (Sigma, St. Louis, USA) durante 1 hora con agitación suave a 18°C . Luego se realizaron lavados con solución OR2 + 0.1 % (p/v) BSA (Sigma, St. Louis, USA) y luego se incubaron en Tampón K durante 1 h con agitación suave

a 18°C. Cada 15 minutos se hizo pasar a los ovocitos por una pipeta de plástico tipo Pasteur con punta gruesa, para completar la liberación de la membrana vitelina provocada por la incubación en Tampón K.

Posteriormente, los ovocitos se lavaron con solución Barth's suplementada con 0.1 % (p/v) BSA. En este paso se seleccionaron los ovocitos de estadio VI que se consideraron más sanos teniendo en cuenta los siguientes criterios: a) el tamaño (se descartaron los más pequeños, inferiores a 0.8 mm de diámetro); b) la forma (descartando los deformes o aplastados); c) la pigmentación (el polo animal debe verse amarronado, bien oscuro y diferenciado del polo vegetal); d) presencia de manchas o decoloración (ambas son motivo de descarte). Así los ovocitos finalmente seleccionados se colocaron en una caja de Petri y se mantuvieron en solución Barth's a la que se le agregó $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de gentamicina (GIBCO, Maryland, USA), para así ser conservados a 18 °C hasta su empleo experimental (Figura 3.1 B).

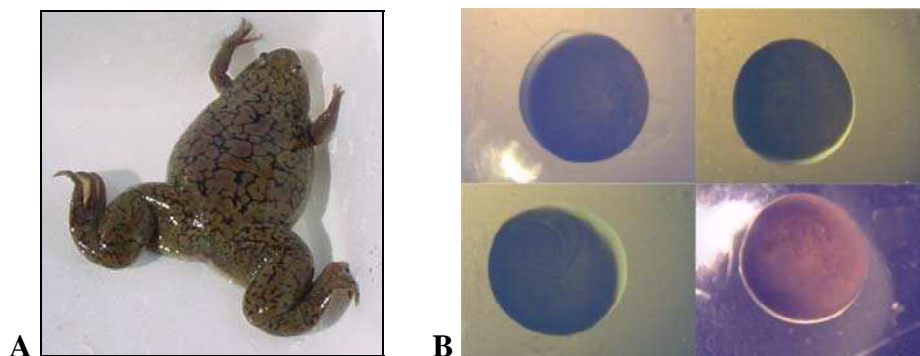


Figura 3.1. **A.** Fotografía de un hembra adulta de *Xenopus laevis*. **B.** Fotografías de ovocitos de *Xenopus* de estadio VI después de haber sido aislados como se describió en el texto.

3.3.1.3. Soluciones

Composición de la solución de Barth (en mM): NaCl 88, KCl 1, NaHCO₃ 2.4, HEPES 10, Ca(NO₃)₂·4H₂O 0.33, CaCl₂·2H₂O 0.41, MgSO₄·7H₂O 0.82, pH 7.4.

Composición de la solución de alto K⁺: 100 mM K₂HPO₄·3H₂O, BSA (0.1 g/100ml), pH 6.5.

Composición de la solución OR-2 (en mM): NaCl 82.5, KCl 2, HEPES 5, MgCl₂·6H₂O 1, pH 7.5.

3.3.2. Descripción de la técnica del ovocito vaciado

Brevemente, antes de la descripción detallada, la técnica consiste en la colocación y el pegado de un ovocito extraído de *Xenopus laevis* sobre un orificio realizado en una pieza de acrílico. El orificio permite la llegada de una fina aguja que perfora la célula para permitir su vaciado. La pieza con el ovocito luego formará parte de una cámara que delimita un compartimiento que representa el lado intracelular de la membrana, y otro que representa su lado extracelular.

3.3.2.1. Descripción del pegado del ovocito sobre el soporte de acrílico

La Figura 3.2a muestra el detalle del soporte sobre el cual se adhiere el ovocito (pieza A). X: largo = 10 mm; Y: espesor = 2 mm; Z: diámetro externo del orificio = 2 mm; U: diámetro interno del orificio: 0.8 mm; V: diámetro de la cama para el ovocito = 1.5 mm.

Una fina capa de grasa de silicona (KLS-G4 de Silicon Argentina SRL) se coloca cuidadosamente en la cara externa del orificio en la superficie A1 sin obstruir el canal interno que conecta ambos lados de la placa A (Figura 3.2b). La capa de silicona permite acomodar el ovocito y estabilizarlo sobre la pieza de acrílico (Figura 3.2c y d). El adhesivo utilizado es cianoacrilato (Akapol S.A.C.I.F.I.A, Argentina) y se aplica desde el interior del canal (Figura 3.2e).

La superficie expuesta del ovocito se mantiene constantemente bañada en solución de Barth, y se deja 60 min hasta completar la solidificación del adhesivo.

La membrana del ovocito se pincha utilizando una fina aguja de metal introducida por el canal desde el lado A2 (Figura 3.2f) y la salida del citoplasma se acelera mediante un sistema de microperfusión que inyecta y remueve en forma simultánea un mismo volumen de solución en el canal. De esta manera, el ovocito es vaciado parcial o totalmente (Figura 3.2g y h), según las necesidades experimentales.

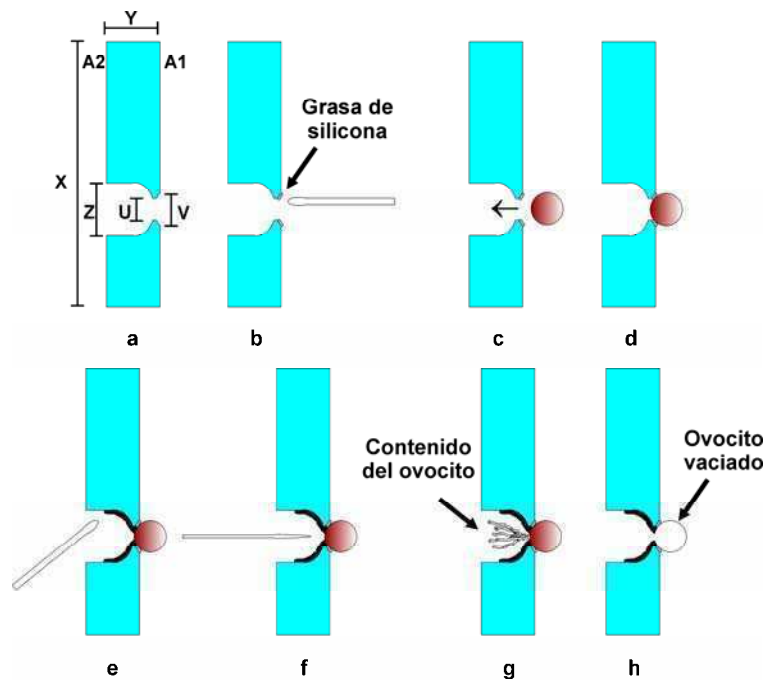


Figura 3.2. Esquema del soporte para pegar los ovocitos y del método de vaciado. Los detalles de la técnica están descritos en el texto.

3.3.2.2. Ensamblado y cierre de la cámara experimental

La pieza B es adosada herméticamente al lado A2 de la pieza A (donde está pegado el ovocito). En esta configuración de cámara sellada, el volumen del baño interno (0.2 ml) reemplaza al medio intracelular. El sistema se acopla a la pieza C cuyo volumen representa el medio extracelular. Esta parte está abierta a la atmósfera y debido a su gran volumen (3.4 ml) puede considerarse como un reservorio infinito (Figura 3.3).

Una jeringa Hamilton de 0.1 ml se manipula con la ayuda de un sistema de traslación micrométrica (Figura 3.3B), y se usa para inyectar o remover solución de Barth hacia y desde la cámara cerrada para dar inicialmente al ovocito un diámetro similar al observado antes de la manipulación.

El conducto y el tapón de drenaje son necesarios para disipar presiones hidrostáticas no deseadas que pueden dañar la membrana celular cuando se cierra la cámara.

La pieza D se coloca sobre el conjunto formado por las piezas A, B y C.

La chimenea permite controlar la altura de la columna de la solución para regular la presión hidrostática extracelular. Como las imágenes se toman desde arriba de la cámara, la ventana de vidrio de la pieza C, en contacto con la solución experimental, asegura un foco fijo sobre la membrana del ovocito aún durante el cambio del medio extracelular.

3.3.2.3. Video-microscopía y análisis de imágenes

Se realizó la adaptación de una cámara Web sobre una lupa trinocular para realizar el seguimiento óptico de los cambios de volumen en el sistema descrito (Dorr y col., 2007), lo que redundó en un ahorro importante en costos en comparación con sistemas de obtención de imágenes comerciales, sin sacrificar la calidad las mismas y la sensibilidad del sistema.

Los registros de los experimentos se realizaron con una videocámara O'Rite MC-350 (O'Rite Technology Co. Ltd., Taiwan) montada sobre una lupa estereoscópica Olympus SZ40 (Figura 3.4). La cámara (con un CCD color de $\frac{1}{4}$ de pulgada y 350000 pixeles, fabricado por Sony, Japón) está conectada a una computadora con sistema operativo Windows (Microsoft) a través de un puerto USB 1.0.



Figura 3.4. Detalle de la videocámara montada sobre la lupa estereoscópica.

La captura de los videos se realizó con el software AMCap (desarrollado por Noël Danjou, <http://www.noeld.com/programs.asp?cat=video#AMCap>). Se eligió un formato de captura digital RGB24 de 24 bit (color verdadero) sin compresión para obtener un video con una resolución de 640 pixeles horizontales x 480 verticales con la posibilidad de adquirir hasta 15 cuadros/s, que se almacenó como un archivo AVI. Los videos de todos los experimentos se grabaron con 1 imagen por segundo.

Las imágenes individuales se extrajeron de los videos y se guardaron en formato BMP. Para esto se utilizó el programa VirtualDub (<http://www.virtualdub.org>).

Para el cálculo del radio del ovocito en cada imagen se utilizó el programa ImageJ (desarrollado por Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental

Health, Bethesda, USA; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Los datos fueron cuantificados digitalmente y se usaron para calcular los cambios de volumen asumiendo una morfología esférica del ovocito.

Para analizar las imágenes se utilizó un software específico para detectar bordes, Canny Edge Detector (desarrollado por Nikos Papamarkos, Democritus University of Thrace of Greece; <http://ipml.ee.duth.gr/~papamark/>), el cual permite delimitar la ubicación de la membrana en cada imagen. Luego, usando el software ImageJ, es posible superponer los bordes de la membrana obtenidos a distintos tiempos como se muestra en los resultados (Figura 3.6).

Vale aclarar que, con excepción del sistema operativo utilizado, el software descrito pertenece a la categoría de software libre o gratuito. La implementación de tal tipo de solución alcanzó una productividad similar a la de software científico comercial sin gasto monetario alguno.

3.4. Resultados

3.4.1. Puesta a punto de la técnica de vaciado (“emptied-out”)

La puesta a punto de esta técnica arrojó resultados novedosos sobre la respuesta de los ovocitos de *Xenopus* ante la imposición de gradientes osmóticos e hidrostáticos externos. La metodología implementada para el registro y el análisis de las imágenes de alta resolución, permitieron alcanzar una alta sensibilidad con un error de 2 píxeles, equivalentes a $2 \cdot 10^{-6} \mu\text{l}$ de volumen, asumiendo una geometría esférica (Figura 3.5).

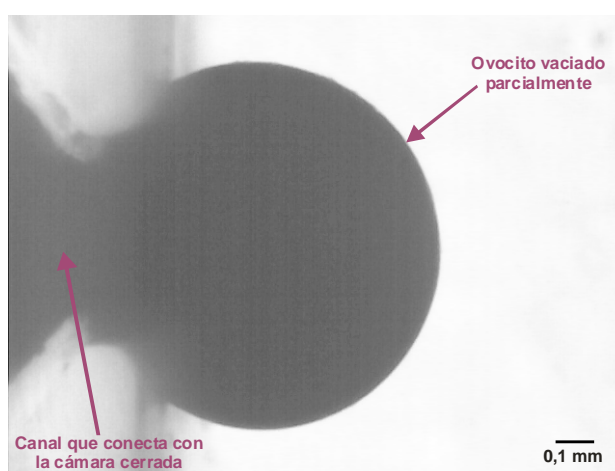


Figura 3.5. Imagen de un ovocito vaciado montado en la cámara experimental, tomada como se describió en el texto.

3.4.2. Efecto de la presión hidrostática sobre la posición de la membrana del ovocito

El incremento de la presión hidrostática intracelular mediante la inyección de solución al lado intracelular causa el desplazamiento de la membrana hacia la cámara que representa el medio extracelular. Contrariamente, la aplicación de una presión negativa en el interior “citoplasmático” lleva la posición de la membrana en sentido inverso.

La capacidad de controlar estos desplazamientos se muestra en la Figura 3.6. En ella se observan los bordes de dos imágenes adquiridas que se superpusieron para detectar el desplazamiento de la membrana. El inserto en la figura muestra las imágenes originales superpuestas.

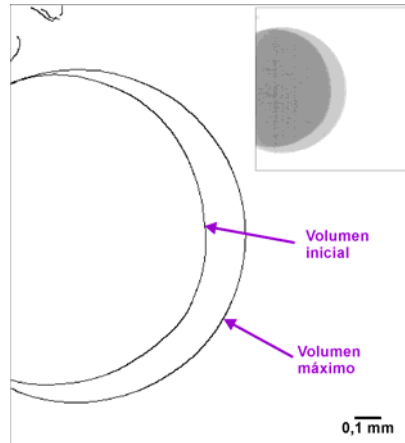


Figura 3.6. Desplazamiento de la membrana al aumentar la presión hidrostática en la cámara cerrada. La membrana se desplazó desde la posición inicial hasta su ruptura mediante la inyección de volumen en la cámara cerrada, con la jeringa Hamilton. El volumen máximo fue calculado a partir de la imagen obtenida 1 segundo antes de la ruptura.

3.4.3. Efecto del aumento de la presión hidrostática hasta la ruptura de la membrana

Con el objeto de caracterizar los límites de resistencia de la membrana al estiramiento (ver capítulo siguiente) se incrementó la presión hidrostática en el lado intracelular hasta la explosión del ovocito (Figura 3.7). En todos los casos estudiados, la repentina liberación del contenido se produjo en la zona que rodea al sello, y causó la consecuente disminución del volumen.

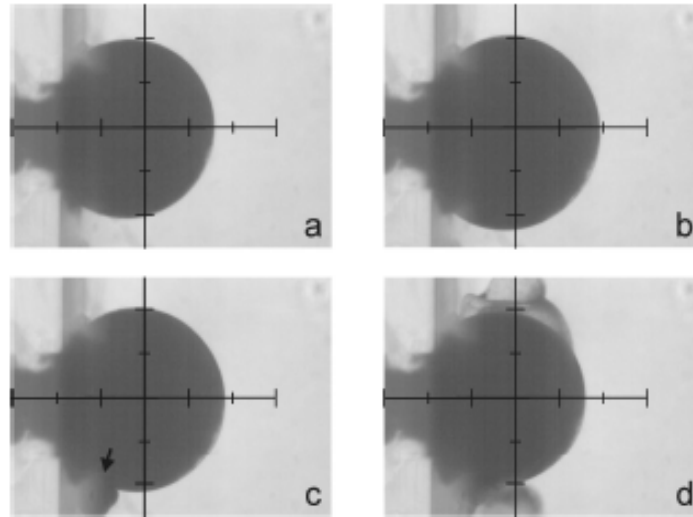


Figura 3.7. **a.** Volumen de un ovocito maduro parcialmente vaciado en el comienzo del experimento hidrostático. **b.** Volumen máximo que el ovocito puede alcanzar 1 segundo antes de romperse. **c.** La flecha señala el punto de ruptura en el anillo del sello membrana-acrílico; puede observarse que en este momento el volumen disminuye. **d.** El material citoplasmático es liberado del ovocito por el sitio de ruptura.

3.5. Conclusiones

1) Se logró desarrollar un sistema original que, por primera vez, permite la medición de movimiento de agua a través de una membrana biológica con la posibilidad de controlar las presiones hidrostática y osmótica y la composición de los medios no sólo del lado extracelular sino también intracelular.

2) La técnica permite el vaciado del contenido citoplasmático en forma integral o parcial.

3) La técnica demostró ser lo suficientemente sensible, con la posibilidad de detectar cambios de volumen de $2 \cdot 10^{-6}$ μl .

4) La técnica abre la posibilidad de realizar mediciones biofísicas tanto en membranas nativas como en membranas en las cuales se expresan proteínas foráneas (ver el siguiente capítulo).

5) Mediante adaptaciones realizadas a las cámaras de medición sería posible acoplar un sistema de electrodos que permita medir simultáneamente movimientos de agua y movimientos iónicos.

6) La adaptación de elementos informáticos estándares como cámaras web y de software gratuito hacen que el sistema de captación y análisis de imágenes utilizado reduzca ostensiblemente los costos requeridos para su implementación en comparación con los comercializados tradicionalmente, cuyo valor se mide en miles de dólares.

Capítulo 4

Estudios de la respuesta osmótica en ovocitos vaciados nativos y con expresión de acuaporina-1

El haber desarrollado la herramienta de medición de permeabilidad descrita en el capítulo anterior, permitió comparar las propiedades de permeabilidad obtenidas con la técnica clásica en ovocitos de *Xenopus* enteros con las obtenidas con el método del ovocito vaciado. La nueva técnica permitió obtener nuevos resultados que son presentados en este capítulo.

4.1. Objetivos e hipótesis

Los objetivos de la presente parte de la tesis fueron:

- 1) Profundizar en el estudio de transporte de agua y de solutos en un sistema biológico más sencillo que el de las monocapas celulares;
- 2) Habiendo desarrollado la tecnología necesaria para hacer mediciones de permeabilidad en ovocitos de *Xenopus*, tanto enteros como vaciados, validar esta última metodología para el caso de la expresión de acuaporina-1;
- 3) Utilizando simulación y modelización, predecir y analizar los resultados experimentales;
- 4) Comparar resultados de permeabilidad obtenidos con la técnica clásica con los de ovocitos vaciados, teniendo en cuenta la nueva posibilidad de controlar la composición de las soluciones que bañan la cara interna de una acuaporina;
- 5) Estudiar los efectos de los bloqueantes mercuriales sobre la cara interna del canal, algo que la metodología clásica no permite;
- 6) Estudiar si únicamente se observa movimiento de agua al aplicar un gradiente osmótico a una membrana biológica que expresa acuaporina-1, o si es necesario postular movimientos paralelos de soluto.
- 7) Probar la bidireccionalidad de los flujos de agua a través de la AQP-1 controlando

estrictamente las condiciones de los gradientes aplicados mediante el sistema del ovocito vaciado.

Los resultados alcanzados se presentan en los siguientes conjuntos temáticos: 1) Estudios de permeabilidad en ovocitos nativos; 2) Estudios de permeabilidad en ovocitos que expresan AQP-1.

4.2. Estudios de permeabilidad en ovocitos nativos vaciados

De acuerdo a la clasificación establecida por J. N. Dumont (1972), existen varios estadios distinguibles durante el desarrollo de los ovocitos en los ovarios de las hembras de *Xenopus laevis*. Los estadios son distinguibles especialmente por el tamaño alcanzado por la célula, las características de su pigmentación y diferenciación de los hemisferios animal y vegetal. Es así que los ovocitos se clasifican como pertenecientes a los estadios I a VI, siendo este último el estadio de mayor maduración antes de la ovulación. Los estadios de mayor tamaño (V y VI) son los tradicionalmente utilizados para la expresión de proteínas foráneas mediante la inyección de material genético.

Para los estudios de la permeabilidad osmótica y el efecto de la presión hidrostática sobre ovocitos nativos (a los que no se inyectó material genético para la expresión de proteínas) se seleccionaron ovocitos de estadio IV para comparárselos con los de estadio VI, y a ambos se los estudió mediante la técnica de “vaciado de ovocito” descrita en el capítulo anterior.

4.2.1. Materiales y métodos

Los detalles de la técnica y preparación de ovocitos nativos se detallaron en el capítulo anterior.

Para el estudio de la respuesta osmótica de los ovocitos nativos se generaron gradientes por dilución de la solución Barth. En cada experimento, la cámara cerrada, incluyendo al interior del ovocito, y la cámara abierta se llenaron con solución Barth. Luego, se dejó estabilizar en estas condiciones, sin gradiente osmótico. Los gradientes aplicados fueron de $110 \text{ mOsmol.Kg}_w^{-1}$, y se realizaron reemplazando la solución de la cámara abierta por una solución Barth diluída. El momento del cambio de la solución se tomó como tiempo cero ($t=0$).

El coeficiente de permeabilidad osmótica fue calculado a partir de la siguiente ecuación:

$$P_{osm} = J_w/A \cdot V_w \cdot \Delta Osm$$

donde J_w es el flujo de volumen de fluido a través de la membrana calculado como $\Delta V/\Delta t$, donde ΔV es el volumen del ovocito en un determinado intervalo de tiempo (Δt), A es el área medida del ovocito, V_w es el volumen molar parcial del agua ($18 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$) y ΔOsm es la diferencia de osmolaridad entre el interior y el exterior del ovocito.

4.2.2. Resultados

4.2.2.1. Estudio comparativo de la permeabilidad osmótica usando la técnica de vaciado en ovocitos de estadios IV y VI

La Figura 4.1 muestra el curso temporal del volumen relativo de un ovocito inmaduro de estadio IV, obtenido luego del montaje y vaciado que se describieron en el capítulo 3 de esta tesis. La técnica permitió establecer la solución citoplasmática inicial en $154 \text{ mOsmol} \cdot \text{Kg}_w^{-1}$, y los cambios de volumen se siguieron antes y después de la imposición de un gradiente osmótico cambiando la solución “extracelular”, de $154 \text{ mOsmol} \cdot \text{Kg}_w^{-1}$ a $44 \text{ mOsmol} \cdot \text{Kg}_w^{-1}$. La permeabilidad osmótica (P_{osm}) ($\times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{sec}^{-1}$) de los ovocitos de estadio IV ($6,46 \pm 0,72$, $n=5$) se calculó a partir de la pendiente al origen del gráfico volumen relativo vs tiempo (figura 3.10).

Al compararla con la permeabilidad osmótica de ovocitos tratados de la misma forma, pero de estadio VI ($0,05 \pm 0,01$, $n=6$), se observó que resultaba significativamente mayor ($p < 0.001$) (Figura 4.2), indicando una disminución en la permeabilidad osmótica a lo largo de la maduración de los ovocitos de *Xenopus*.

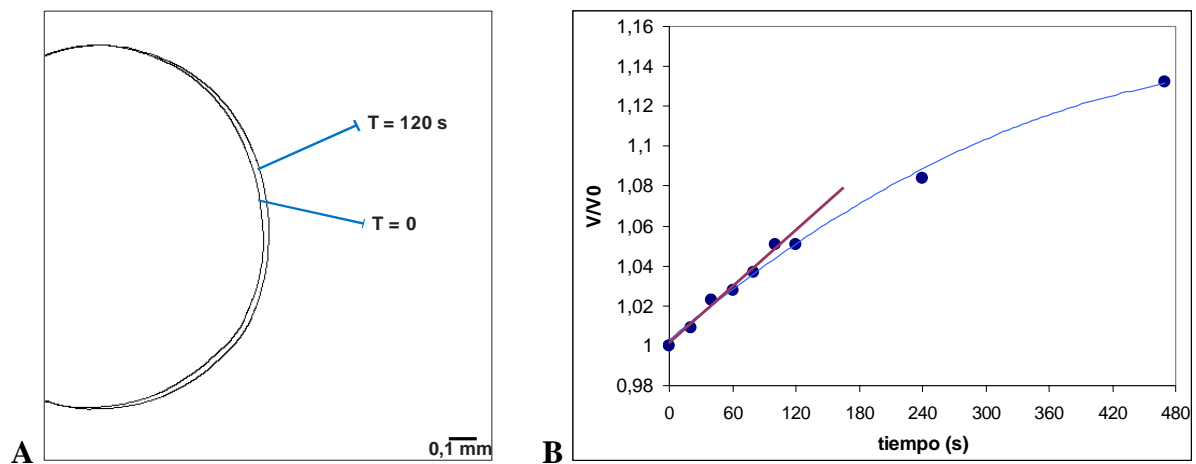


Figura 4.1. Respuesta de un ovocito de *Xenopus* nativo de estadio IV ante un gradiente hiposmótico. **A.** El análisis de las imágenes permite visualizar el desplazamiento de la membrana a los 120 segundos ($t=120$ s) después del cambio de la solución de la cámara abierta por otras de menor osmolaridad ($t=0$ s). **B.** Representación gráfica del curso temporal del volumen relativo de un experimento tipo, registrado con la técnica del ovocito vaciado. El cálculo de P_{osm} se realizó con los primeros 40 segundos de la pendiente de la recta de regresión lineal tangente al inicio de la respuesta.

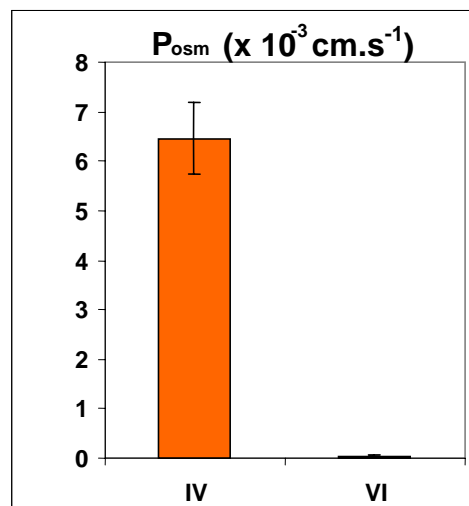


Figura 4.2. Permeabilidad osmótica de la membrana de los ovocitos nativos de *Xenopus laevis* en respuesta a un gradiente hipo-osmótico. **IV:** ovocitos de estadio IV ($n=5$); **VI:** ovocitos de estadio VI ($n=6$).

4.2.2.2. Determinación del cambio máximo del volumen relativo

Al final de cada experimento osmótico se midió el máximo volumen tolerado por la membrana del ovocito antes de romperse, aumentando la presión hidrostática por medio de la inyección de volumen en el lado interno. De esta forma fue posible calcular el valor de máximo cambio de volumen relativo en las poblaciones de ovocitos de estadio IV y VI. Este valor fue similar en los ovocitos maduros y en los inmaduros (1.26 ± 0.07 y 1.27 ± 0.03 , respectivamente). Estos valores concuerdan con los informados por Kelly y Macklem (1991) mediante otra técnica con ovocitos enteros y en respuesta a un cambio osmótico.

4.2.3. Discusión

Los resultados presentados, obtenidos con ovocitos de *Xenopus* nativos permitieron sacar las siguientes conclusiones:

- 1) La técnica demostró ser confiable para distinguir entre ovocitos de diferentes estadios mediante sus valores de permeabilidad osmótica;
- 2) La permeabilidad osmótica disminuye con la maduración de los ovocitos;
- 3) Esta característica justifica la utilización de ovocitos de estadio VI para la expresión de acuaporinas;
- 4) A pesar de las diferencias morfológicas y de tamaño entre los ovocitos de estadio IV y VI, el valor de volumen relativo máximo que pueden alcanzar al aumentar la presión hidrostática interna es el mismo, y reproduce los obtenidos con otras técnicas;
- 5) La sensibilidad en la medición de cambio osmótico abre el camino para el estudio de canales de agua insertados en la membrana, aún de los que se espera baja permeabilidad (como la acuaporina-0).

4.3. Estudios de permeabilidad en ovocitos vaciados que expresan acuaporina-1

4.3.1. Introducción

La AQP-1 es el canal de agua que mejor se ha caracterizado. Esta proteína opera como un canal abierto constitutivamente y estrictamente selectivo (Tsunoda y col., 2004; Beitz y col., 2006; Lahajnar y col., 2007). Se postula que AQP-1 podría ser regulada por GMPc (Anthony y col., 2000; Boassa & Yool, 2003), se cuestiona si existe un mecanismo de gating (Hedfalk y col., 2006) que permita regular el pasaje de agua, y se conoce su mecanismo de plegamiento en la membrana mientras es sintetizada (Pitonzo & Skach, 2006).

Por otra parte, el cloruro de mercurio es el clásico compuesto usado para inhibir el pasaje de agua mediado por canales a través de membranas, y su efecto se describió incluso antes del descubrimiento de la AQP-1. Se sabe que el sitio sensible al mercurio se encuentra en la cisteína 189 ubicada en el lado extracelular de la AQP-1 (Preston y col., 1993; Zhang y col., 1993), pero se sabe poco acerca de un posible efecto del mercurio desde el lado

intracelular (Kuang y col., 2001).

Los estudios clásicos de permeabilidad de las acuaporinas utilizando ovocitos enteros se limitan a obtener el valor de P_{osm} o el de permeabilidad por canal (p_f) (Zeidel y col., 1992; Hashido y col., 2005). El valor de P_{osm} se calcula tradicionalmente a partir de la pendiente a tiempo cero del curso temporal del volumen del ovocito sometido a un shock osmótico (Preston y col., 1992; Moshelion y col., 2004).

En este apartado se presentan los resultados obtenidos en ovocitos vaciados que expresan AQP-1, tanto en sus valores de permeabilidad como los del efecto de soluciones de composición conocida sobre los lados intra y extracelular de la membrana, y por lo tanto del canal.

Los resultados están organizados de la siguiente manera:

- 1) La predicción de la respuesta osmótica en ovocitos vaciados con expresión de AQP-1, a partir de las simulaciones con los valores de los parámetros obtenidos por ajuste de los experimentos con ovocitos enteros;
- 2) El estudio de la respuesta osmótica de los ovocitos vaciados que expresan AQP-1 ante gradientes de solutos permeables (iones);
- 3) El estudio del efecto del inhibidor de transporte de agua, $HgCl_2$, en ambos lados de la membrana; y
- 4) El estudio de la respuesta osmótica en ovocitos vaciados ante gradientes de solutos no permeables.

4.3.2. Materiales y Métodos

4.3.2.1. Construcción del plásmido y síntesis *in vitro*

Las regiones codificantes del clon entero de AQP1 se insertaron en los sitios EcoRI y XhoI en ambos extremos del vector pSP64T derivado de Bluescript, llevando secuencias 5' y 3' no traducibles del gen de la β -globina de *Xenopus laevis* (Abrami y col., 1994).

Se sintetizaron, *in vitro*, RNAs complementarios capeados (Daniels y col., 1994) usando el kit T3 de la RNA polimerasa (kit T3 mMESSAGE mMACHINE de Ambion, Austin, USA) y purificados como fuera descripto por Preston y colaboradores (1992).

Los productos sintetizados se suspendieron en agua libre de RNAsa en una

concentración final de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y se mantuvieron a -20°C hasta la inyección.

4.3.2.2. Inyección de ARNc de AQP-1 en ovocitos

Para la expresión de AQP-1 se seleccionaron ovocitos de estadio VI, según la clasificación de Dumont (1972).

La inyección de ARNc se realizó con un inyector comercial (Drumond Nanoject, USA) que permite inocular volúmenes fijos de 50 nl. Las pipetas de inyección se prepararon a partir de capilares (3.5" Drumond #3-000-203-G/X, Drumond Scientific Company, USA), utilizando un estirador de pipetas calibrado para obtener puntas de grosor adecuado (10 a 40 μm de diámetro) (microestirador PP-83, Narishigie Japan). Estas se colocaron en una caja de Petri apoyadas sobre un soporte para impedir que se dañara la punta, luego se esterilizaron y se liberaron de nucleasas por calentamiento en estufa a 240°C durante 2 h. La pipeta se cargó en primer lugar con un aceite mineral (Biodynamics) coloreado y luego con agua (control negativo) o con 1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ del ARNc de AQP-1. El aceite coloreado permite seguir visualmente los desplazamientos de toda la columna de líquido de la micropipeta.

Las inyecciones se hicieron en el polo vegetal de cada uno de los ovocitos seleccionados (Figura 4.3) (ver en detalle más adelante), que luego se conservaron en Barth's con gentamicina (1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a 18°C hasta el momento de los experimentos.

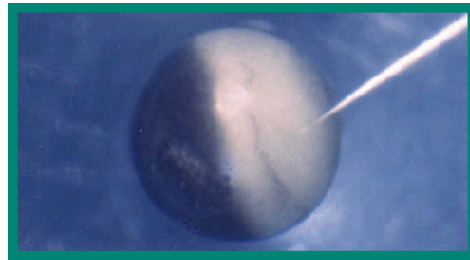


Figura 4.3. Fotografía de la inyección de los ovocitos de *Xenopus*.

4.3.2.3. Estudio de la respuesta osmótica en ovocitos enteros

Para los experimentos con ovocitos expresando AQP-1 se apeló a la técnica clásica de ovocitos enteros como control de la técnica de los ovocitos vaciados, realizando experimentos en paralelo.

Como se mencionó en el capítulo 1, la técnica de ovocitos enteros fue la utilizada por el grupo de Agre para detectar funcionalmente la primera acuaporina en el año 1992 (Preston y col., 1992). La adaptación de la técnica en nuestro laboratorio se basa en la observación

directa, mediante una lupa estereoscópica, de los cambios de volumen del ovocito cuando se lo somete a cambios de osmolaridad en el medio externo. Para esto, el ovocito se coloca sobre una cápsula con medio Barth, isosmótico con el interior del ovocito. Se acepta que la osmolaridad del interior del ovocito es $200 \text{ mOsmol.kg}_w^{-1}$. Se deja equilibrar el sistema y luego se reemplaza la solución externa por otra de diferente osmolaridad.

En el sistema de medición utilizado, cada experimento se graba en video en formato AVI, mediante una cámara de video conectada a la lupa y que transmite la información a una computadora. Posteriormente se extraen del video las imágenes individuales que se van a analizar. El volumen del ovocito se calcula asumiendo una geometría esférica.

Para cada experimento, se inyectaron aproximadamente 15 ovocitos con el ARNc de la AQP-1 y 6 con agua (controles).

Una vez inyectados, los ovocitos se colocaron en placas de 24 *wells* con solución Barth's, individualizando cada uno de ellos. La incubación se realizó durante 24 horas a 18°C . Para analizar el cambio de volumen y, consecuentemente, la expresión y la actividad de la AQP-1, los ovocitos se sometieron a un *shock* osmótico transfiriéndolos desde Barth's ($170 \text{ mOsmol.Kg}_w^{-1}$) a una dilución 1/10 del mismo ($40 \text{ mOsmol.Kg}_w^{-1}$). El coeficiente de permeabilidad osmótica fue calculado a partir de la siguiente ecuación:

$$P_{osm} = J_w/A \cdot V_w \cdot \Delta Osm$$

donde J_w es el flujo de volumen de fluido a través de la membrana calculado como $\Delta V/\Delta t$, donde ΔV es el volumen del ovocito en un determinado intervalo de tiempo (Δt), A es el área medida del ovocito, V_w es el volumen molar parcial del agua ($18 \text{ cm}^3.\text{mol}^{-1}$) y ΔOsm es la diferencia de osmolaridad entre el interior y el exterior del ovocito.

4.3.2.4. Configuración para trabajar con ovocitos vaciados expresando AQP-1

A diferencia de la técnica de ovocitos enteros, en la de ovocitos vaciados es crucial identificar el lugar de la inyección para que la membrana libre esté intacta. Es por eso que para facilitar la identificación del lugar de la inyección, ésta se realiza sistemáticamente en el centro del polo vegetal (Figura 4.4 A). El volumen de inyección utilizado es de 50 nl, con una concentración de ARNm inyectado de 1ug/ul.

Luego el ovocito se monta sobre el soporte de acrílico, alineando el lugar de incisión (en rojo) con el conducto, y se vacía el ovocito de la manera descrita en el capítulo anterior (Figura 4.4 B). Este procedimiento permite medir los movimientos de agua sobre la parte intacta de la membrana celular de células que expresaron AQP-1.

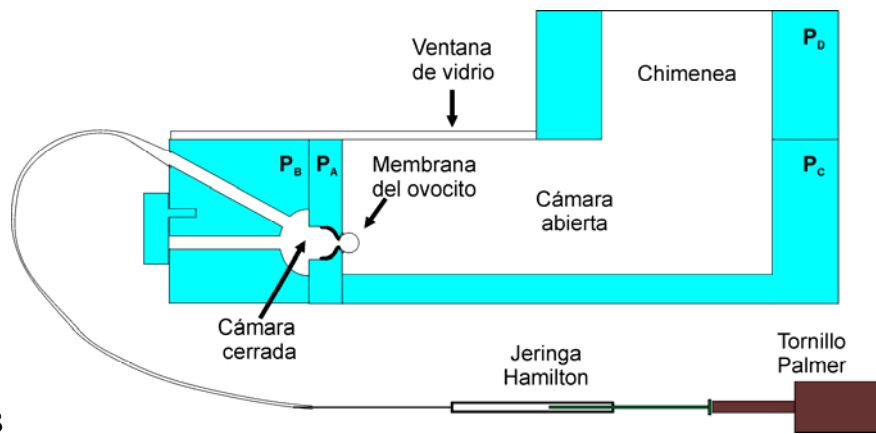
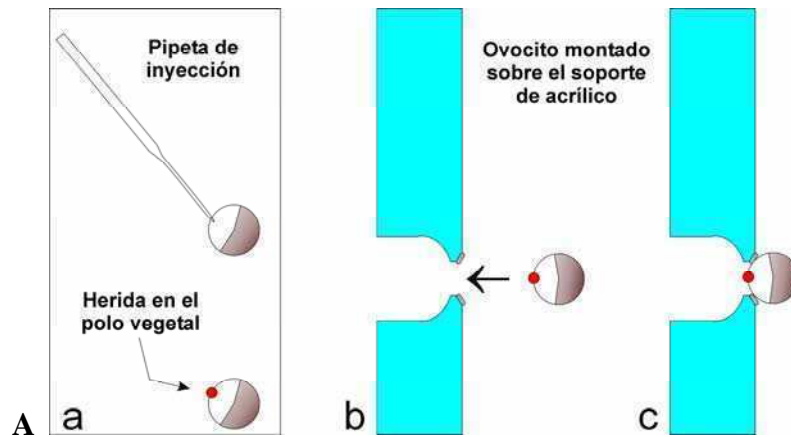


Figura 4.4. Descripción de la metodología utilizada para trabajar con ovocitos inyectados con AQP-1. **A.** Esquema del protocolo de inyección y del pegado del ovocito en el soporte de acrílico. Para identificar el lugar de la inyección, esta se realiza sistemáticamente en el centro del polo vegetal, para luego poder alinear este punto con el canal del soporte de acrílico. **B.** Luego, el armado de la cámara experimental se realiza de la manera descrita en el capítulo 3.

4.3.2.5. Modelos matemáticos y simulaciones

Con la colaboración del Dr. O. Chara se desarrollaron dos modelos matemáticos para el estudio de la permeabilidad. El “modelo de transporte de agua” (MA) considera al agua como la única especie transportada a través de la membrana, y el “modelo de transporte simultáneo de agua y solutos” (MAS) tiene en cuenta, además, el movimiento de solutos.

Ambos modelos son adaptaciones del formalismo de transporte de dos parámetros. Este formalismo fue usado por (Jacobs, 1933), revisado por Kedem y Katchalsky (1958) y, considerado por Kleinhans (1998).

4.3.2.5.1. El modelo de transporte de agua

Este modelo asume que sólo el agua puede ser transportada a través de la membrana

por un mecanismo osmótico y que los solutos no pueden atravesar la membrana. Este proceso fue modelado usando una expresión fenomenológica y el Teorema de Continuidad.

Esencialmente, el modelo establece que 1) existe una relación lineal entre el flujo de agua y la diferencia osmótica entre ambos lados de la membrana del ovocito y 2) la tasa de cambio de volumen del compartimiento intracelular es el flujo de volumen a través de la membrana.

La variable más importante del modelo es el volumen relativo delimitado por la membrana del ovocito. La concentración total de soluto es computada en el modelo. El parámetro relevante es la permeabilidad osmótica (P_{osm}). En el modelo aquí desarrollado, el área de la membrana del ovocito fue considerada como una variable dependiente del volumen del mismo. El modelo no considera interacción alguna entre el transporte de agua y el potencial de membrana.

4.3.2.5.2. El modelo de transporte de agua y solutos

A diferencia del modelo anterior, en este modelo se considera que puede haber transporte de soluto a través de la membrana del ovocito. Nuevamente, la concentración total de soluto es computada en el modelo. Se modeló el movimiento de solutos usando una expresión fenomenológica lineal entre el flujo de soluto y la diferencia osmótica. Este modelo incorpora la permeabilidad al soluto (P_s) como otro parámetro.

El desarrollo detallado de ambos modelos puede consultarse en el Anexo al final de este capítulo.

4.3.2.5.3. Simulaciones

Las simulaciones se hicieron usando el método de Euler con un programa original desarrollado en código de Visual Basic con un paso de integración de 1 s. Este paso garantiza el orden de precisión y la estabilidad del método de Euler. El procedimiento resultó en una predicción del curso temporal de los cambios de volumen relativo después del shock osmótico. El programa permite hacer ajustes modelo-dependientes sobre los datos experimentales para obtener los valores de mejor ajuste de los parámetros (P_{osm} y P_s), así como también la visualización simultánea de los datos simulados y experimentales.

4.3.2.5.3.1. Comparación entre los modelos

Para la comparación de los ajustes de los modelos a los datos experimentales se utilizó el método de Akaike (Motulsky & Christopoulos, 2002). Este método permite

comparar modelos frente a una serie de datos experimentales, estimando para cada modelo un puntaje, el número de Akaike (AIC). El ΔAIC es la diferencia entre los puntajes estimados para cada modelo, lo cuáles se calculan a partir de la suma de cuadrados (SC) y pondera el número de puntos experimentales, cuanto se aparta la simulación de cada modelo de estos puntos y el número de parámetros que conforman cada modelo. De este modo, el mejor modelo es aquel que, por un lado genera la simulación que menos se aparta de los datos experimentales, es decir, tiene la menor SC, y por el otro utiliza el menor número de parámetros. La clave está en que la relación entre el número de parámetros y el SC es inversa.

La ponderación de un modelo respecto de otro se lleva a cabo mediante la relación de evidencia (RE), la cual refleja la diferencia entre los números de Akaike correspondientes a los modelos considerados (ΔAIC). La RE es una función que tiene en cuenta el crecimiento exponencial del ΔAIC , indicando cuántas veces es más probable un modelo, comparado con otro, para explicar una serie de datos experimentales.

4.3.2.5.3.2. Ajuste de curvas en ovocitos enteros

Para analizar cuantitativamente las curvas experimentales generadas ante un cambio osmótico en ovocitos enteros (OE) se usó el modelo de agua (MA). Para simular la respuesta osmótica durante condiciones de ovocito entero se usaron los datos experimentales de estos ovocitos (volumen inicial, osmolaridad externa y volumen molar parcial del agua), excepto P_{osm} . La osmolaridad inicial interna se consideró igual a $200 \text{ mOsmol.kg}_w^{-1}$. Para cada experimento se cubrieron todas las combinaciones físicamente posibles.

Cada simulación se realizó hasta los 40 segundos posteriores al cambio de osmolaridad, que es el tiempo que clásicamente se utiliza para calcular el coeficiente de permeabilidad osmótica a partir de los registros de volumen relativo en función del tiempo, y en cada simulación se usó un valor distinto de P_{osm} . El rango de valores de P_{osm} que se probó fue de 10^{-7} a 1 cm.s^{-1} . Este intervalo cubre ampliamente los valores de P_{osm} informados en la literatura. Las simulaciones se hicieron en intervalos solapados, con un rango de 10^{-3} unidades cada uno y con un paso que variaba en 10^{-3} unidades entre una simulación y la siguiente.

Para cada experimento se seleccionó, por el método de cuadrados mínimos, el valor de P_{osm} capaz de generar la curva simulada que mejor ajustaba a los datos experimentales.

4.3.2.5.3.3. Predicciones

Los valores de P_{osm} seleccionados de la manera descrita se utilizaron para hacer otras simulaciones, esta vez como predicciones de la respuesta osmótica en las condiciones utilizadas con la técnica de los ovocitos vaciados. En este caso se simuló el curso temporal de los cambios de volumen de una semiesfera.

4.3.2.6. Estudio de la respuesta osmótica de ovocitos vaciados con solutos permeables

Se hicieron experimentos sometiendo a los ovocitos vaciados a gradientes hipotónicos, a partir del cambio de la solución Barth ($182,00 \pm 7,94 \text{ mOsmol.Kg}_w^{-1}$) del compartimiento extracelular por otra diluida cuya osmolaridad era $46,22 \pm 2,57 \text{ mOsmol.Kg}_w^{-1}$. De esta manera los ovocitos fueron sometidos a una diferencia de osmolaridad de $135,78 \pm 5,93 \text{ mOsmol.Kg}_w^{-1}$.

Usando el modelo de agua (MA) y los datos tomados de cada experimento (volumen inicial, osmolaridad interna y osmolaridad externa), se hicieron los ajustes individuales hasta los 40 segundos posteriores al cambio osmótico, para obtener así el valor de P_{osm} simulado que mejor ajustaba a los datos experimentales. Es importante destacar que en este caso la osmolaridad interna era controlada.

También se simuló, con el valor de P_{osm} obtenido y con los mismos datos iniciales, la misma respuesta osmótica, pero hasta los 180 segundos posteriores al cambio osmótico. Estos experimentos se simularon con el modelo de agua (usando como parámetro el valor promedio de P_{osm} obtenido en la predicción) y con el modelo de agua y solutos. En este último caso se obtuvieron los parámetros de P_{osm} y P_s que mejor ajustaban a los resultados experimentales. Estos valores se usaron para simular las respuestas osmóticas.

Se compararon los valores promedios de P_{osm} obtenidos por simulación y ajuste con los valores promedios de P_{osm} calculados por el método tradicional de regresión lineal (REG) realizada sobre los datos experimentales.

4.3.2.7. Estudio del efecto del HgCl_2 en ovocitos vaciados

Durante los experimentos con HgCl_2 se trabajó con una concentración de 0.3 mM final en cada compartimiento (Amodeo y col., 2002).

Los gradientes se generaron por dilución de la solución Barth ($182,67 \pm 7,67 \text{ mOsmol.Kg}_w^{-1}$). La osmolaridad de la solución hipotónica fue similar a la de los experimentos con AQP1 ($45,11 \pm 2,91 \text{ mOsmol.Kg}_w^{-1}$). De esta manera, el gradiente

osmótico aplicado fue igual al de los experimentos con AQP-1 ($137,56 \pm 5,18 \text{ mOsmol.Kg}_w^{-1}$).

Se hicieron controles de efecto de mercurio extracelular con los ovocitos enteros. En este caso se preincubó con HgCl_2 (0,3 mM) durante 7 minutos del lado extracelular y luego se lavó con solución Barth.

Los ajustes y las simulaciones para los casos en que se utilizó HgCl_2 se hicieron de la manera descrita anteriormente.

4.3.2.8. Estudio de la respuesta osmótica en ovocitos vaciados con solutos no permeables

En esta etapa se hicieron experimentos para estudiar las propiedades de permeabilidad osmótica de los ovocitos inyectados con AQP-1 mediante la técnica de vaciado, usando soluciones de distintas concentraciones de manitol que fueron preparadas con solución Barth. De esta manera se lograron soluciones de distinta osmolaridad pero con igual fuerza iónica a ambos lados del canal.

Se aplicaron dos protocolos distintos. Uno de ellos, para probar la respuesta de la membrana con AQP-1 ante un gradiente hipo-osmótico (HIPO) y, el otro, para probar la respuesta ante un gradiente hiper-osmótico (HIPER).

Además, para ambos protocolos se hicieron simulaciones de los cursos temporales del volumen y la concentración de la solución en el lado interno de la membrana, haciendo pequeñas modificaciones a los modelos descriptos, asumiendo que los solutos que se mueven a través de la membrana difunden de tal manera que la dilución en cada compartimiento es instantánea. Estas modificaciones están detalladas en el Anexo.

4.3.2.8.1. Protocolo para el gradiente hipo-osmótico

Los ovocitos se aislaron de la misma manera que en los experimentos anteriores y se inyectaron con la misma cantidad de AQP-1.

Los ovocitos se vaciaron de la manera descrita en el capítulo 3, pero en este caso, para vaciarlos de su contenido y reemplazarlo por la solución de trabajo, se perfundieron con una solución con una osmolaridad final de $288,67 \pm 6,04 \text{ mOsmol.Kg}_w^{-1}$ que se preparó con manitol diluido en Barth ($200,50 \pm 1,88 \text{ mOsmol.Kg}_w^{-1}$ de la solución Barth, más $88,17 \pm 4,16 \text{ mOsmol.Kg}_w^{-1}$ de manitol). El ovocito se montó en la cámara conteniendo esta solución en su interior, y tanto la cámara cerrada como la cámara abierta estaban cargadas con ella. A esta condición se la llamó iso-osmótica (ISO) y el sistema se dejó estabilizar durante 60 segundos después del armado de la cámara.

Luego se realizó el cambio de la solución de la cámara abierta. Se reemplazó por otra con una osmolaridad final de $239.50 \pm 5.14 \text{ mOsmol.Kg}_w^{-1}$ ($200,50 \pm 1,88$ de la solución Barth más $39,00 \pm 3,27$ de manitol). De esta manera se generó un gradiente de solutos no permeables de $49,17 \pm 0,74 \text{ mOsmol.Kg}_w^{-1}$ desde el lado interno hacia el lado externo de la membrana. A esta condición se la llamó hipo-osmótica (HIPO). Se dejó evolucionar al sistema en esta condición durante 60 segundos.

4.3.2.8.2. Protocolo para el gradiente hiper-osmótico

En este caso, los ovocitos se vaciaron perfundiendo con una solución de $230,00 \pm 0,46 \text{ mOsmol.Kg}_w^{-1}$ ($184,47 \pm 5,57$ de la solución Barth más $45,53 \pm 6,02$ de manitol), la cual se usó para reemplazar el contenido de los ovocitos. Cada ovocito se montó en la cámara conteniendo esta solución en su interior, y tanto la cámara cerrada como la cámara abierta estaban cargadas con ella. Al igual que en el caso anterior, el sistema se dejó estabilizar durante 60 segundos. En estos experimentos esta era la condición iso-osmótica (ISO).

Luego se hizo el cambio de solución en la cámara abierta. Se reemplazó por otra con una osmolaridad final de $280,53 \pm 1,92 \text{ mOsmol.Kg}_w^{-1}$ ($184,47 \pm 5,57$ de la solución Barth, más $96,07 \pm 7,49$ de manitol). De esta manera se generó un gradiente de solutos no permeables de $50,53 \pm 1,46 \text{ mOsmol.Kg}_w^{-1}$ desde el lado externo hacia el lado interno de la membrana. Esta diferencia de osmolaridad es de sentido inverso a la del protocolo anterior y no es significativamente diferente de aquella. A esta condición se la llamó hiper-osmótica (HIPER). Aquí también se dejó evolucionar al sistema durante 60 segundos.

4.3.2.9. Análisis estadístico

En todos los casos, los resultados se expresan como el promedio \pm SEM. Los datos se analizaron por el método de Student y se consideró significativo $P < 0.05$.

4.3.3. Resultados

4.3.3.1. Los valores de permeabilidad osmótica medidos en ovocitos enteros

Los experimentos con ovocitos enteros dieron resultados similares a los que se encuentran clásicamente en la bibliografía (Agre y col., 1993b): los ovocitos inyectados con AQP-1 mostraron un rápido aumento de volumen ante el shock osmótico, mientras que esta respuesta era mucho más lenta en ovocitos tratados con HgCl_2 (0,3 mM) en el medio

extracelular. En este caso se observó una inhibición del 76%. Los controles realizados con ovocitos inyectados con agua tuvieron una respuesta de cambio de volumen muy lenta.

La Figura 4.5 resume estos resultados y los cursos temporales de las respuestas osmóticas simuladas con los valores de P_{osm} que mejor ajustaron a los datos experimentales. Como puede apreciarse, los registros obtenidos por las simulaciones hechas con los valores de P_{osm} que mejor ajustaron a los datos experimentales se superponen muy bien sobre estos. En todos los casos, el valor promedio de los mejores ajustes no fue significativamente diferente del calculado por regresión lineal.

Los valores de P_{osm} de los ajustes ($\times 10^{-3} \text{ cm.s}^{-1}$) fueron $35,39 \pm 2,70$ para los ovocitos inyectados con AQP-1 ($n=7$), $10,63 \pm 3,72$ para los ovocitos inyectados con AQP-1 y tratados con HgCl_2 extracelular ($n=3$) y $3,49 \pm 1,84$ para los ovocitos inyectados con agua ($n=3$).

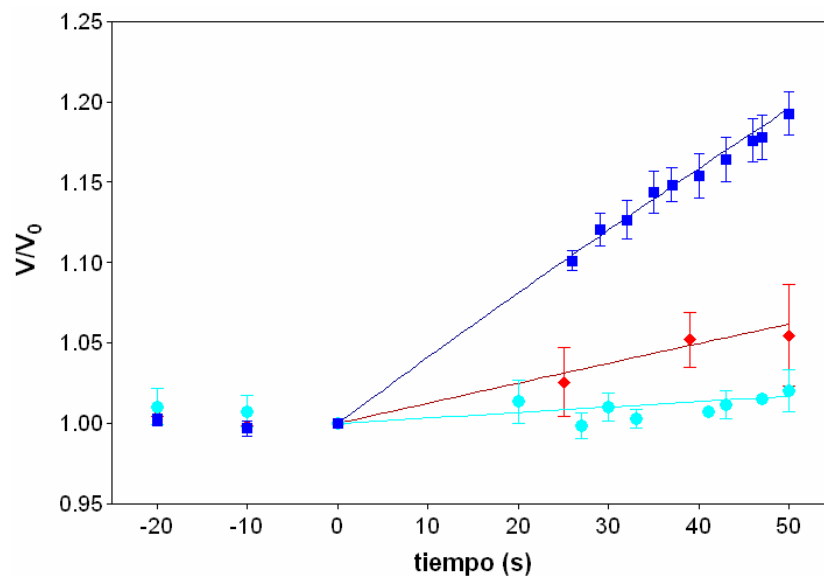


Figura 4.5. Curso temporal del volumen relativo de ovocitos enteros ante la imposición de un gradiente osmótico. Los cuadrados azules representan la respuesta de los ovocitos inyectados con AQP-1 ($n=7$). Los rombos rojos representan la respuesta de ovocitos inyectados con AQP-1, preincubados con HgCl_2 ($n=3$). Los círculos celestes representan la respuesta de los controles inyectados con agua ($n=3$). En todos los casos, se dejó estabilizar el sistema durante 60 segundos antes generar el gradiente osmótico. El tiempo $t=0$ indica el inicio del cambio de la solución en la cámara abierta. Las líneas continuas representan, para cada caso, las simulaciones realizadas con los valores promedio de P_{osm} que mejor ajustaron a los datos experimentales.

4.3.3.2. Predicción de la respuesta osmótica en ovocitos vaciados

En los experimentos con ovocitos inyectados con agua y luego vaciados (controles negativos), el shock hipotónico produjo un leve desplazamiento de la membrana reflejando un pequeño flujo neto de agua a través de la membrana celular. Sin embargo, el mismo shock

osmótico produjo un desplazamiento notorio de la membrana en los ovocitos vaciados inyectados con AQP-1 (Figura 4.6).

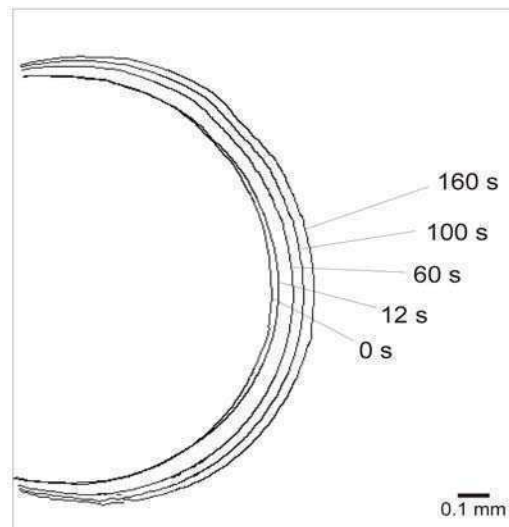


Figura 4.6. Desplazamiento osmótico de la membrana de ovocitos inyectados con AQP-1 estudiados con la técnica de vaciado. La figura muestra la superposición de los bordes de la membrana, obtenidos de las imágenes tomadas en los tiempos indicados en la figura (en segundos) después de la imposición del gradiente osmótico ($t=0$).

El valor promedio de P_{osm} de los ovocitos enteros fue tomado para predecir la respuesta de cambio de volumen hasta los 40 segundos en ovocitos vaciados, como se describió anteriormente en la sección de Materiales y Métodos y que se esquematiza en la Figura 4.1 B, en la sección de resultados con ovocitos nativos.

El análisis de los desplazamientos de membrana y las mediciones realizadas en experimentos con ovocitos vaciados, comparados con las simulaciones para predecir el comportamiento osmótico de estos ovocitos muestra que la predicción obtenida por simulación no difiere cualitativamente de la respuesta observada experimentalmente (Figura 4.7).

Este resultado confirma que, en el sistema de ovocito vaciado, la AQP-1 se expresa y que el vaciado citoplasmático no le impide ser funcional. El análisis del promedio de las permeabilidades experimentales, obtenido por ajuste y por regresión lineal, indica que esta correspondencia es también cuantitativa, ya que no se observan diferencias significativas entre los valores de permeabilidad medidos y simulados en los dos sistemas. El resumen de estos resultados está mostrado en la Tabla 4.1.

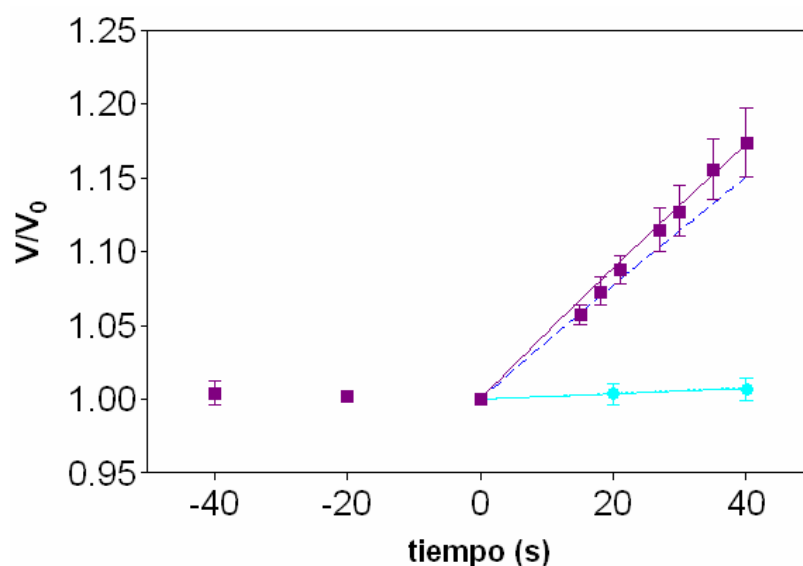


Figura 4.7. Predicción de la respuesta osmótica en ovocitos vaciados. Los cuadrados violetos representan el curso temporal de los ovocitos inyectados con AQP-1, vaciados y sometidos a un gradiente hipo-osmótico (n=9). Los círculos celestes representan la respuesta de los controles inyectados con agua (n=4). Las líneas continuas representan, para cada caso, las simulaciones realizadas con los valores promedios de P_{osm} que mejor ajustaron a los datos experimentales. La línea azul discontinua representa la predicción de la respuesta de los ovocitos vaciados hecha a partir del valor de P_{osm} de los ovocitos enteros.

4.3.3.3. El efecto asimétrico del $HgCl_2$ sobre la permeabilidad de la membrana en ovocitos vaciados

Obtenidos los valores de permeabilidad osmótica en ovocitos vaciados que expresan AQP-1, se probó el efecto del $HgCl_2$ no solo sobre la cara extracelular sino por primera vez sobre la cara interna de la membrana.

Como era de esperar, el agente mercurial agregado extracelularmente produjo la disminución de la permeabilidad osmótica de la membrana con AQP-1 (Tabla 4.1). En estas condiciones, el porcentaje de inhibición que produjo el Hg^{2+} fue del 83% (Figura 4.8).

Aunque se describió en la literatura que el Hg^{2+} produce la inhibición del flujo de agua a través de la AQP-1 actuando sobre el puente disulfuro de la Cis189 del lado extracelular, el efecto que este agente podía provocar desde el lado interno no había sido probado en condiciones controladas. Los resultados experimentales, representados en la Figura 4.9, mostraron un aumento no significativo en el valor de la permeabilidad (Tabla 4.1).

Los valores de P_{osm} obtenidos por ajuste con las simulaciones generadas por el modelo de agua hasta los 40 segundos (como se describió en Materiales y Métodos) no fueron significativamente diferentes de los calculados por regresión lineal (Tabla 4.1).

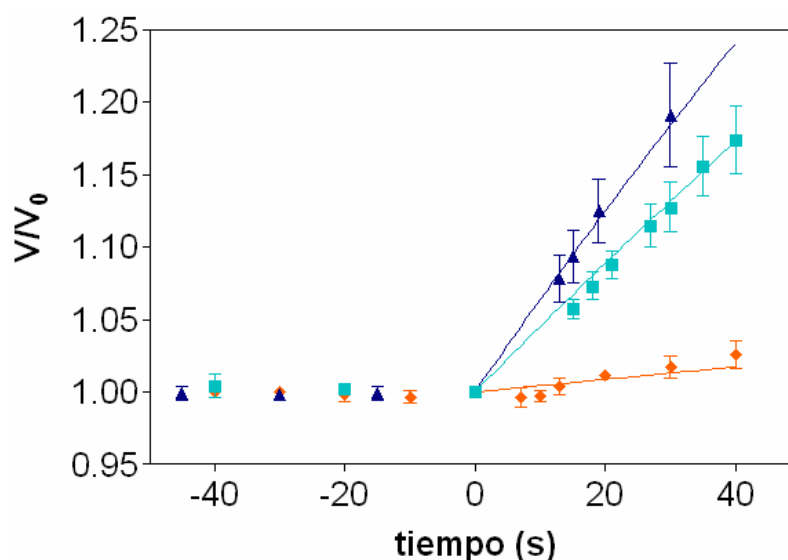


Figura 4.8. Efecto asimétrico del Hg^{2+} sobre la permeabilidad osmótica de la membrana de ovocitos vaciados. Los cuadrados celestes representan la respuesta osmótica de los ovocitos con AQP-1 ($n=9$). Los triángulos azules representan la respuesta de los ovocitos con AQP-1 que se trataron con $HgCl_2$ en el lado citoplasmático de la membrana ($n=9$). Los rombos naranjas representan la respuesta de los ovocitos con AQP-1 tratados con $HgCl_2$ en el lado externo de la membrana ($n=3$). Las líneas continuas representan, para cada caso, las simulaciones realizadas con los valores promedios de P_{osm} que mejor ajustaron a los datos experimentales.

Tabla 4.1. Valores de P_{osm} obtenidos durante los primeros 40 s después de un shock hipotónico en ovocitos vaciados

	Predicción por el MA	Regresión lineal	Ajuste por el MA
Agua	$3,08 \pm 0,96$ $n=3$	$3,67 \pm 1,73$ $n=4$	$3,15 \pm 1,31$ $n=4$
AQP-1	$35,39 \pm 2,70$ $n=7$	$41,62 \pm 6,38$ $n=9$	$40,28 \pm 5,75$ $n=9$
AQP-1+ $HgCl_2$ (ext)	$10,63 \pm 3,72$ $n=3$	$7,24 \pm 3,14$ $n=4$	$5,33 \pm 2,25$ $n=4$
AQP-1+ $HgCl_2$ (cit)	n.d.	$57,55 \pm 10,27$ $n=9$	$63,61 \pm 13,07$ $n=9$

Agua: ovocitos inyectados con agua; **AQP-1:** ovocitos inyectados con AQP-1; **AQP-1+ $HgCl_2$ (ext):** Ovocitos inyectados con AQP-1, tratados con $HgCl_2$ en el medio extracelular de la membrana; **AQP-1+ $HgCl_2$ (cit):** ovocitos inyectados con AQP-1 tratados con $HgCl_2$ en el lado citoplasmático de la membrana; **MA:** modelo de agua; **n.d.:** valor no determinado. Todos los valores están presentados como el promedio \pm SEM en $cm \cdot s^{-1}$ ($\times 10^{-3}$).

4.3.3.4. Respuestas largas y respuestas cortas en ovocitos vaciados con altos valores de P_{osm}

Como fue descrito en el capítulo 3, mediante la técnica de “emptied-out” pudo calcularse el volumen relativo máximo en el que los ovocitos nativos estallaban. Este valor de $1,26 \pm 0,07$ se obtuvo aumentando la presión hidrostática al inyectar solución Barth en el lado intracelular de la cámara de medición (Ozu y col., 2005b).

Usando este valor, y teniendo la posibilidad de simular las respuestas osmóticas, se realizaron simulaciones para predecir en cuánto tiempo se alcanzaría este volumen relativo en los ovocitos vaciados que habían sido inyectados con AQP-1, ante un shock osmótico.

El resultado obtenido predijo que los ovocitos con AQP-1 debían alcanzar el máximo aumento de volumen a los 80,5 segundos después de hacer el cambio de la solución externa. Sin embargo, los resultados experimentales mostraban dos comportamientos diferentes.

No todos los ovocitos se comportaron experimentalmente de la misma forma, pudiéndose los ubicar en dos poblaciones diferentes. Una población constaba de ovocitos que explotaban a los $55,00 \pm 5,38$ segundos ($n=4$) después de realizado el shock osmótico, y que fue llamada “población de respuesta corta” (RC). La segunda población agrupó a ovocitos que no solo no explotaron hasta después de 3 minutos de experimento ($n=5$), sino que tendieron hacia un estado estacionario, y que fue denominada “población de respuesta larga” (RL) (Figura 4.9).

Aunque los valores de los volúmenes relativos de estas dos poblaciones a los 40 segundos fueron significativamente diferentes (RC: $1,22 \pm 0,03$ vs RL: $1,12 \pm 0,02$; $p < 0,05$), los de P_{osm} ($\times 10^{-3} \text{ cm.s}^{-1}$) observados experimentalmente no diferían significativamente entre ellos (RC: $50,40 \pm 7,90$; RL: $31,64 \pm 9,50$, calculados por regresión lineal). Además, estos valores no diferían significativamente de los mejores ajustes obtenidos por simulación (RC: $48,7 \pm 6,50$ y RL: $31,19 \pm 9,70$).

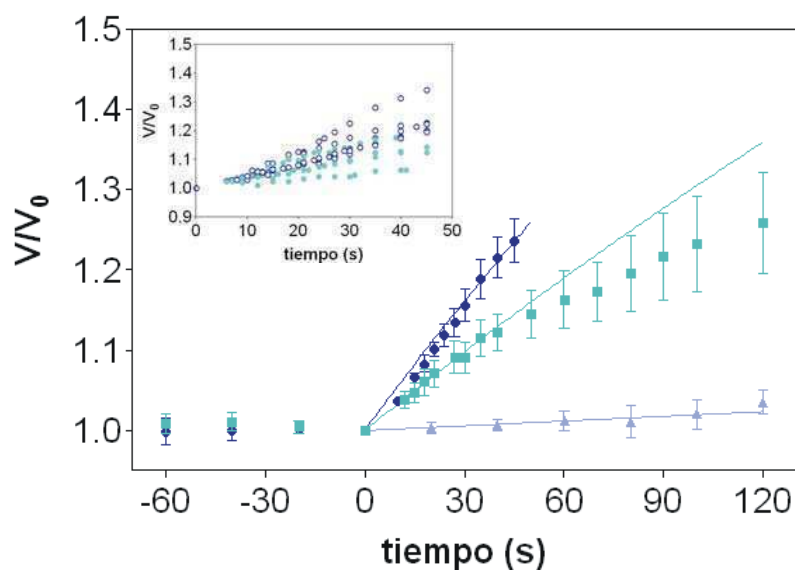


Figura 4.9. Respuesta osmótica de los ovocitos vaciados inyectados con AQP-1. Los rombos azules representan el curso temporal de la población respuesta corta (RC, n=4). Los cuadrados turquesa representan el curso temporal de la población de respuesta larga (RL, n=5). Los triángulos celestes representan el curso temporal de los controles inyectados con agua (n=4). Las líneas continuas representan, para cada caso, las simulaciones realizadas con los valores promedios de P_{osm} (obtenidos en los primeros 40 segundos) que mejor ajustaron a los datos experimentales. El inserto muestra la superposición de las respuestas de las dos poblaciones de ovocitos con AQP-1.

Resultados similares fueron encontrados en el grupo de ovocitos inyectados con AQP-1, vaciados y tratados con $HgCl_2$ en el lado intracelular de la membrana. (Figura 4.10). En este caso se usó el valor promedio de P_{osm} obtenido por el ajuste de estos experimentos hasta los 40 segundos para simular una respuesta de más de 3 minutos.

El tiempo esperado para alcanzar el volumen relativo máximo fue de $52,73 \pm 8,74$ segundos (n=9), observándose también dos comportamientos diferentes.

Un grupo de ovocitos (n=5) alcanzó este volumen a los $39,80 \pm 7,47$ segundos (“población de respuesta corta” (RC)), mientras que otro grupo (n=4) tendió hacia un estado estacionario y no explotó hasta el final del experimento (más de 3 minutos) (“población de respuesta larga” (RL)).

Otra vez, el valor del volumen relativo alcanzado por los dos grupos fue significativamente diferente en un determinado momento, en este caso a los 30 segundos ($1,15 \pm 0,04$, $p < 0,001$).

Como muestra el inserto de la Figura 4.10, las respuestas de las dos poblaciones se superponen en los primeros 40 segundos, y como en el caso de los ovocitos inyectados con AQP-1, los valores de P_{osm} ($\times 10^{-3} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$) calculados por regresión lineal no fueron significativamente diferentes entre ellos (RC: $71,30 \pm 13,40$, n=5 vs RL: $37,40 \pm 5,10$, n=4).

Ajustando los datos de las dos poblaciones por separado tampoco se observan

diferencias significativas en los valores de P_{osm} ($\times 10^{-3} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$) entre ellas (RC: $81,60 \pm 19,00$, $n=5$ vs RL: $40,80 \pm 9,80$, $n=4$). Estos valores tampoco fueron diferentes de los promedios.

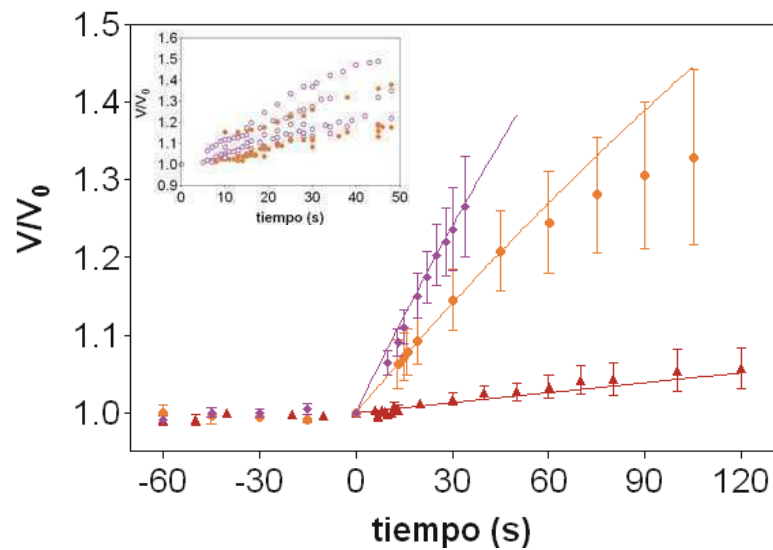


Figura 4.10. Respuesta osmótica de los ovocitos inyectados con AQP-1, vaciados y tratados con HgCl_2 del lado citoplasmático de la membrana. Los rombos violetas representan el curso temporal de la población respuesta corta (RC, $n=5$). Los círculos naranjas representan el curso temporal de la población de respuesta larga (RL, $n=4$). Los triángulos rojos representan el curso temporal de los ovocitos con AQP-1 tratados con HgCl_2 del lado extracelular de la membrana ($n=4$). Las líneas continuas representan, para cada caso, las simulaciones realizadas con los valores promedios de P_{osm} (obtenidos en los primeros 40 segundos) que mejor ajustaron a los datos experimentales. El inserto muestra la superposición de las respuestas de las dos poblaciones de ovocitos con AQP-1 tratados con HgCl_2 del lado citoplasmático.

En las Figuras 4.9 y 4.10 se observa que en ambos casos de respuesta corta, las curvas simuladas por los valores de P_{osm} que mejor ajustaron a los primeros 40 segundos se superponen muy bien a los registros experimentales.

Sin embargo, en el caso de las respuestas largas, las simulaciones hechas hasta los 120 segundos, a partir de los valores de P_{osm} obtenidos por ajuste con el modelo de agua hasta los 40 segundos, se superponen muy bien en los primeros 40 segundos y luego se alejan progresivamente del registro experimental.

Esto sugiere que el modelo que solo tiene en cuenta el movimiento de agua explica muy bien la respuesta osmótica durante los primeros 40 segundos, y que hasta este tiempo el comportamiento osmótico de la membrana de ovocitos con AQP-1 se explica por una respuesta lineal.

Sin embargo, un modelo que considera solo el movimiento de agua no es suficiente para explicar la segunda parte de la respuesta osmótica donde las curvas tienden hacia un estado estacionario.

Los resultados mencionados hacen referencia a coeficientes de alta permeabilidad (es decir, cuando AQP-1 está presente en la membrana). Contrariamente, no se observaron respuestas similares en ovocitos vaciados con bajos valores de P_{osm} , como se ve en los casos en que fueron inyectados con agua (Figura 4.9) y en los inyectados con AQP-1 pero tratados con $HgCl_2$ del lado extracelular (Figura 4.10). En ambos casos, el modelo de agua ajustaba muy bien al registro experimental en todos los tiempos.

4.3.3.5. Existencia de un fenómeno no osmótico en las poblaciones de respuesta larga

Dado que el modelo de agua (MA) asume solo el transporte de agua por un mecanismo osmótico, las diferencias observadas entre las curvas de las simulaciones y la de los datos experimentales, en los casos de alta permeabilidad y a tiempos largos, representan el efecto de un fenómeno no osmótico.

Para cuantificar este fenómeno, se realizó una sustracción matemática entre las dos curvas (Figura 4.11, A y B). La contribución no osmótica al volumen relativo muestra una latencia aproximada de 40 segundos seguida por un comportamiento monótono creciente. Entonces, es necesaria otra explicación para dar cuenta de la contribución no osmótica al volumen relativo.

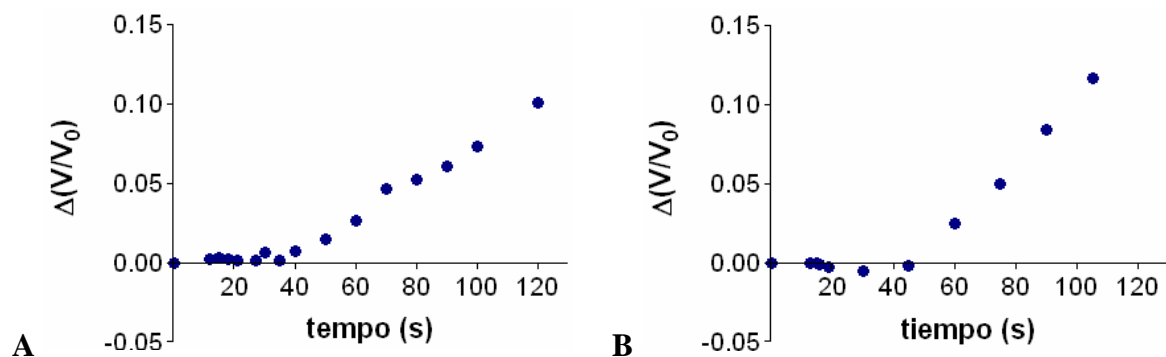


Figura 4.11. Diferencias entre los datos experimentales y las simulaciones con el modelo de agua en las poblaciones de respuesta larga. **A.** Los puntos representan las diferencias observadas entre los valores de volumen relativo observado experimentalmente y simulado en la población de RL de ovocitos con AQP-1. **B.** Los puntos representan las diferencias observadas entre los valores de volumen relativo observado experimentalmente y simulado en la población de RL de ovocitos con AQP-1, tratados con $HgCl_2$ en el lado citoplasmático de la membrana. En ambos casos se observa que la diferencia no es distinta de cero hasta los 40 segundos y que luego tiene un comportamiento monótono creciente.

Una posibilidad a explorar es que el agua podría no ser la única especie que se esté moviendo a través de la membrana. Para investigar esta hipótesis, se desarrolló el “modelo de agua y solutos”, que considera también el movimiento de estos últimos (ver Materiales y

métodos). Este modelo incorpora otra ecuación al algoritmo del “modelo de agua”, que considera la permeabilidad al soluto (P_s) como un parámetro adicional.

Los resultados obtenidos con las simulaciones hechas con esta modificación ajustaron muy bien a los datos experimentales tanto hasta los 40 segundos como en tiempos posteriores en la curva de cambio de volumen en función del tiempo de las poblaciones de respuesta larga, como muestran las líneas continuas en la Figuras 4.12 A y B.

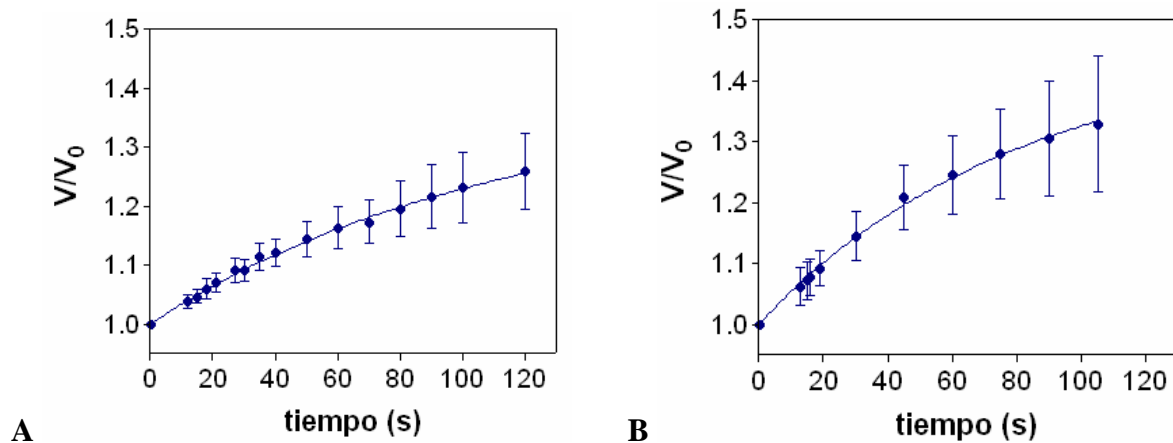


Figura 4.12. Superposición de los datos experimentales y las simulaciones con el modelo de agua y solutos en las poblaciones de respuesta larga. A. Cursos temporales de las respuestas osmóticas de la población de RL de ovocitos con AQP-1 (n=5). **B.** Cursos temporales de las respuestas osmóticas de la población de RL de ovocitos con AQP-1, tratados con $HgCl_2$ en el lado citoplasmático de la membrana (n=4). En ambos casos, los puntos representan el registro experimental promedio (\pm SEM), y las líneas continuas representan las simulaciones realizadas con el modelo de agua y solutos usando los parámetros promedios de P_{osm} y P_s obtenidos por el ajuste de cada experimento teniendo en cuenta todos los tiempos registrados.

En los dos casos de poblaciones de respuesta larga (RL), la relación de evidencia (RE) del método de Akaike, que se usó para comparar los ajustes obtenidos con los dos modelos (MA y MAS), indica que el de dos parámetros (P_{osm} y P_s) es al menos 10000 veces más probable que el de un solo parámetro (P_{osm}).

Los ajustes con el modelo de agua y solutos en ovocitos inyectados con AQP1 (n=4) arrojaron los siguientes valores para estos parámetros: $P_{osm} = (31,18 \pm 9,70) \times 10^{-3} \text{ cm.s}^{-1}$ y $P_s = (12,07 \pm 4,34) \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$.

Para el caso de los ovocitos inyectados con AQP-1 y tratados con $HgCl_2$ del lado citoplasmático de la membrana (n=4) los valores de los ajustes fueron: $P_{osm} = (40,08 \pm 9,80) \times 10^{-3} \text{ cm.s}^{-1}$ y $P_s = (30,00 \pm 6,79) \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$. Considerando que las soluciones usadas en los experimentos solo estaban compuestas por iones, y asumiendo que las principales especies involucradas en el movimiento a través de la membrana son Na^+ , K^+ y Cl^- , P_s podría

considerarse como la permeabilidad neta resultante del movimiento de estos iones. De acuerdo con Costa y colaboradores (1989), los coeficientes de permeabilidad de estos iones, medidos en ovocitos de *Xenopus*, serían del orden de 10^{-8} cm.s⁻¹. Sin embargo, mediciones directas de estos coeficientes, mediante flujos de iones radiactivos, dieron valores del orden de 10^{-6} cm.s⁻¹ (Tupper & Maloff, 1973), los cuales son más aproximados a los determinados por las simulaciones.

4.3.3.6. Estudio de la permeabilidad osmótica de ovocitos vaciados, con AQP-1 y en presencia de solutos impermeables

Con la intención de probar las propiedades de permeabilidad de la AQP-1 en condiciones de gradiente osmótico con un soluto impermeable y fuerza iónica controlada se hicieron experimentos con manitol diluido en solución Barth.

4.3.3.6.1. Respuesta de los ovocitos vaciados con AQP-1 ante un gradiente HIPO-osmótico

Después de un período de estabilización del sistema en condiciones iso-osmóticas (ISO), se cambió el medio de la cámara abierta por uno de menor osmolaridad (condición HIPO), y se dejó evolucionar el sistema durante 60 segundos (Figura 4.13 A).

El valor promedio de P_{osm} ($\times 10^{-3}$) registrado en estas condiciones fue $20,88 \pm 4,40$ cm.s⁻¹, n=6).

4.3.3.6.2. Respuesta de los ovocitos vaciados con AQP-1 ante un gradiente HIPER-osmótico

Cuando se realizó el protocolo inverso, es decir se generó un gradiente de condición HIPER, se observó como repuesta la imagen especular del protocolo anterior (Figura 4.13 A) y los valores de P_{osm} ($\times 10^{-3}$) en esta condición ($15,26 \pm 5,40$ cm.s⁻¹, n=5) no fueron significativamente distintos a los observados en la condición HIPO.

4.3.3.6.3. Simulaciones

En las simulaciones de estos experimentos, el modelo de agua ajustó mejor a los datos experimentales que el modelo de agua y solutos, según se probó por el método de Akaike (Ver Materiales y Métodos).

Los resultados de las simulaciones indicaron que los valores de P_{osm} ajustados por el modelo de agua no fueron significativamente diferentes de los observados

experimentalmente, calculados por regresión lineal. En la condición HIPO, el valor promedio de los P_{osm} ($\times 10^{-3}$) obtenidos por ajuste fue $21,87 \pm 4,02 \text{ cm.s}^{-1}$, $n=6$.

Las simulaciones de los experimentos en condición HIPER ($n=5$) ajustaban mejor con el modelo de agua por las mismas razones expuestas para el protocolo anterior. En este caso, los valores de P_{osm} ($\times 10^{-3}$) fueron $19,88 \pm 4,54 \text{ cm.s}^{-1}$. Como se puede ver, estos valores de P_{osm} no son significativamente distintos de los observados experimentalmente.

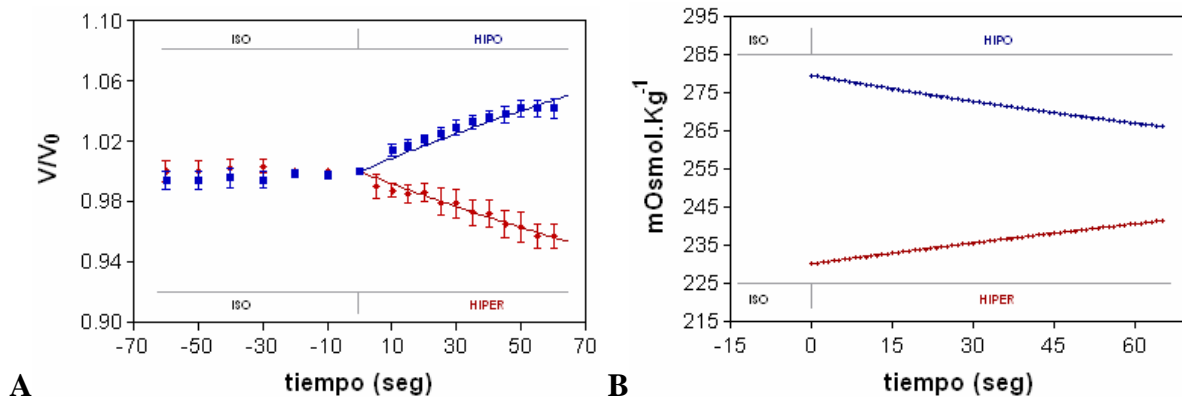


Figura 4.13. A. Respuesta osmótica de los ovocitos con AQP-1 sometidos a gradientes hipo e hiper-osmóticos con solutos no permeables. Los puntos azules representan la respuesta (promedio \pm SEM) ante un gradiente hipo-osmótico (HIPO) ($n=6$). Los puntos rojos representan la respuesta (promedio \pm SEM) ante un gradiente hiper-osmótico (HIPER) ($n=5$). Las líneas continuas representan las simulaciones realizadas con el modelo de agua modificado. **B.** Curso temporal de la osmolaridad del lado intracelular simulado para cada caso.

El valor de la osmolaridad del lado interno de la membrana obtenido por simulación al final de la condición HIPO fue $265,63 \pm 3,25 \text{ mOsmol.Kg}_w^{-1}$, $n=6$. Como se puede ver en la Figura 4.13 B, este valor teórico difiere en casi $20 \text{ mOsmol.Kg}_w^{-1}$ respecto de la osmolaridad inicial de la condición HIPO ($288,67 \pm 6,04 \text{ mOsmol.Kg}_w^{-1}$, ver Materiales y Métodos).

3.3.4. Discusión

3.3.4.1. La técnica del ovocito vaciado

Pueden mencionarse como desventajas de la técnica de vaciado (en comparación con la técnica clásica) su mayor complejidad para el montaje de la célula y el trabajo y tiempo invertido para cada medición. Sin embargo, las ventajas que se obtienen justifican su empleo para el tipo de mediciones requeridas para el trabajo presentado. Ellas son: 1) Poder controlar de la presión hidrostática ejercida sobre la membrana celular, tanto desde el lado interno como desde el lado externo de la misma; 2) Poder controlar la composición de las soluciones a ambos lados de la membrana, no solo el externo; 3) Permitir el vaciado parcial o total del contenido citoplasmático, según sea el interés de estudio; 4) Realizar mediciones sobre una membrana intacta, ya que se evita la zona de la membrana dañada en el momento experimental de la inyección de material genético en el ovocito; 5) Determinar al final de cada experimento el volumen máximo real que puede alcanzar cada ovocito y poder utilizar este dato como indicador cualitativo de la integridad de la membrana.

4.3.4.2. Adquisición y análisis de imágenes

En cuanto a la fase de adquisición y análisis de imágenes, en comparación con la técnica de ovocitos enteros, cabe destacar como ventajoso la capacidad técnica de no perder el foco del ovocito en estudio aun en el momento de realizarse el cambio externo de soluciones, como es el caso de efectuar un shock osmótico. De esta manera, se evitan los desplazamientos del ovocito característicos de la técnica clásica. Debido a las corrientes producidas durante el cambio experimental de solución se producen cambios de posición en el ovocito suelto, lo que perjudica el análisis de imágenes obtenidas secuencialmente sobre una misma cara de la célula. Cabe destacar que los aumentos de volumen en el ovocito no son siempre homogéneos, sino que muchas veces una zona celular aumenta de tamaño mientras que otra no lo hace. Esto provoca errores cuantitativos en la medición de la permeabilidad con la técnica clásica. Otro artefacto se produce en la técnica clásica por el empuje de desplazamiento que ejerce el ovocito sobre el fondo de la cámara al aumentar su volumen, variando la posición óptica de enfoque. En la técnica de vaciado las desventajas comentadas se descartan por estar el ovocito fijado a su soporte de acrílico. Esto permite obtener imágenes a tiempos más cortos respecto de los ovocitos enteros.

4.3.4.3. Efecto del HgCl₂

El HgCl₂, clásico inhibidor de las acuaporinas, no produjo efecto inhibitorio alguno desde el lado intracelular de la membrana (la falta de inhibición es consistente con el hecho de que el residuo sensible, la Cys189 en la AQP-1, se encuentra en el lado extracelular). Se descarta, por lo tanto, la existencia de residuos sensibles en el lado intracelular.

Pero también se descarta la posibilidad de que el Hg²⁺ atravesase la membrana desde el espacio intracelular al extracelular. Tal supuesto fue planteado por Kuang y colaboradores (2001), al proponerse que el mercurio atraviesa la membrana hacia dentro de la célula inhibiendo el pasaje de agua en mutantes de acuaporinas sensibles al mercurio en el lado intracelular.

También se descarta un efecto tóxico del mercurio sobre la parte interna de la membrana celular que provoque cambios en la permeabilidad ante un shock osmótico. Los controles realizados en ovocitos sin inyectar con HgCl₂ en el lado interno, y con ovocitos inyectados con agua con HgCl₂ en el lado interno, no tuvieron respuestas osmóticas diferentes de las de ovocitos inyectados con agua.

4.3.4.4. Los experimentos con solutos permeables

Los modelos matemáticos desarrollados en este trabajo validan por predicción y ajuste las mediciones efectuadas en ovocitos vaciados que tienen expresada la acuaporina-1 en su membrana celular.

Esta tesis extiende el estudio de la respuesta volumétrica más allá de los 40 segundos después de aplicarse un gradiente osmótico. Al hacerlo, se encontraron dos poblaciones en los casos de ovocitos con alta permeabilidad: los ovocitos de respuesta corta (RC) y los de respuesta larga (RL), según el tiempo en que se produzca o no su ruptura por aumento de volumen.

Los comportamientos de la primera población, así como la primera parte de la respuesta de la segunda población, hasta los 40 segundos, pueden ser explicados en términos estrictos de un fenómeno osmótico.

Por el contrario, más allá de los 40 segundos, la última parte de la curva de cambio de volumen en la población de respuesta larga debe ser comprendida teniendo en cuenta un fenómeno no osmótico.

Aunque en este trabajo se consideró de manera formal el movimiento difusivo del soluto a través de la membrana, queda abierto el interrogante de si este es el único fenómeno no osmótico que está teniendo lugar en este tipo de respuestas.

4.3.4.5. Los experimentos con solutos no permeables

Los resultados de los experimentos con manitol prueban de manera directa, en un sistema controlado, la bidireccionalidad de la AQP-1. Los resultados obtenidos en condiciones HIPO coinciden con los obtenidos en condiciones HIPER, ambas totalmente controladas. Si bien, había un antecedente de la bidireccionalidad de la AQP-1 en ovocitos de *Xenopus* (Meinild y col., 1998), nunca se había probado colocando el soluto impermeable del lado interno del canal, generando gradientes realmente simétricos y no solo inversos.

Los resultados también indican que la respuesta osmótica de los ovocitos con AQP-1 vaciados es la misma si el gradiente se invierte. Además, los ajustes de la respuesta osmótica hasta esos tiempos siguen favoreciendo al modelo de agua, sosteniendo que el movimiento de estas moléculas es mucho más rápido que el de los iones. Las simulaciones de la osmolaridad interna dan cuenta de ese movimiento.

4.3.5. Conclusiones

Esta sección de la tesis presenta los resultados experimentales obtenidos usando ovocitos de *Xenopus* nativos e inyectados con AQP-1, demostrando que la técnica de ovocitos vaciados puede reproducir cualitativa y cuantitativamente los resultados obtenidos con la técnica clásica de ovocitos enteros, con las ventajas propias de la técnica, y proveer de nueva información que de la otra forma no es posible obtener.

Anexo metodológico

1. Desarrollo de los modelos

1.1. El modelo de agua

Este modelo fue desarrollado teniendo en cuenta las siguientes suposiciones:

- 1) El shock hipotónico es modelado usando una función escalón (función Heviside). Se asume que a tiempo $t=0$, la concentración extracelular es igual a la intracelular. Con el shock osmótico, la concentración extracelular disminuye inmediatamente hasta el valor estacionario.
- 2) Cuando se usó el método clásico de medición del flujo de agua en ovocitos enteros, se asumió una geometría esférica para el compartimiento intracelular. Por otra parte, cuando se estudiaron ovocitos vaciados, se asumió una geometría semi-esférica para el compartimiento intracelular.
- 3) La membrana del ovocito es permeable al agua.
- 4) No existen interacciones entre el potencial eléctrico de la membrana y el flujo de agua.
- 5) El área de la membrana involucrada en el flujo de agua es considerada variable y dependiente del volumen intracelular. Entonces, la siguiente expresión relaciona el área con el volumen:

$$A(t) = \kappa V_i^{2/3} \quad (1)$$

donde κ era $(36\pi)^{1/3}$ o $(18\pi)^{1/3}$, cuando se simularon ovocitos enteros o vaciados, respectivamente.

- 6) El agua puede ser transportada por un mecanismo osmótico. Aquí se propone una expresión fenomenológica:

$$J_v(t) = P_{osm} A(t) V_w 10^{-3} (C_i(t) - C_e) \quad (2)$$

donde P_{osm} , $A(t)$, V_w , $C_i(t)$ y C_e , son la permeabilidad osmótica de la membrana del ovocito, el área de la membrana mencionada anteriormente, el volumen molar parcial del agua y las osmolaridades intra y extracelulares respectivamente.

- 7) La tasa de volumen intracelular solo es afectada por el flujo de agua (Teorema de Continuidad):

$$dV_i(t)/dt = J_w(t) \quad (3)$$

- 8) La concentración total de soluto es computada, como se hace habitualmente, en

términos del número total de osmolitos ($m_i(t)$) y el volumen intracelular ($V_i(t)$):

$$C_i(t) = m_i(t)/V_i(t) \quad (4)$$

9) La membrana es impermeable a los solutos. Entonces, el número total de osmolitos intracelulares es constante:

$$m_i(t) = m_i \quad (5)$$

A partir de las suposiciones previas se puede deducir la siguiente ecuación:

$$dV_i(t)/dt = P_{osm} \kappa (V_i(t))^{2/3} V_w 10^{-3} ((m_i/V_i(t)) - C_e) \quad (6)$$

Así, se obtiene una ecuación diferencial ordinaria no lineal. En esta ecuación, el parámetro V_w se asume igual a $18 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$, C_e es medido y m_i es obtenido a partir de las condiciones iniciales. La condición inicial para la concentración intracelular del ovocito entero se asume igual a 200 mOsm. En el ovocito vaciado, la concentración intracelular es controlada con exactitud.

1.2. El modelo de agua y solutos

Son válidas todas las suposiciones anteriores, excepto la número 9). En este modelo, esta es reemplazada por las siguientes:

9) La membrana es permeable a los solutos.

10) El movimiento de solutos ocurre por un mecanismo de difusión. Entonces, aquí se propone otra expresión fenomenológica:

$$J_s(t) = -P_s A(t) 10^{-3} (C_i(t) - C_e) \quad (7)$$

donde P_s es la permeabilidad de la membrana a los solutos. El signo menos es debido a que el flujo de solutos ocurre en sentido contrario al del agua.

11) El número total de osmolitos intracelulares es controlado por un proceso de difusión:

$$dm_i(t)/dt = J_s(t) \quad (8)$$

Las suposiciones previas nos llevan al sistema compuesto por las siguientes ecuaciones:

$$dV_i(t)/dt = P_{osm} \kappa (V_i(t))^{2/3} V_w 10^{-3} ((m_i(t)/V_i(t)) - C_e) \quad (9)$$

$$dm_i(t)/dt = -P_s A(t) 10^{-3} (C_i(t) - C_e) \quad (10)$$

Estas ecuaciones diferenciales controlan el comportamiento del modelo.

2. Modificaciones hechas a los modelos para simular los cambios de volumen en presencia de solutos impermeables

Como se puede ver en la descripción de los modelos, la osmolaridad del lado interno de la membrana (C_i) es función de la relación entre la masa de solutos permeables (m_i) y el volumen de solución (V_i) en el compartimiento cerrado en función del tiempo. En el modelo de agua la masa se considera constante porque no se mueven solutos a través de la membrana, y por lo tanto el cambio de la osmolaridad de la solución solo se debe al cambio del volumen interno, que es directamente la cantidad de agua que se mueve a través de la membrana. En cambio en el modelo de agua y solutos, C_i depende de V_i y de m_i porque ambos pueden variar a lo largo del tiempo.

En los experimentos donde los gradientes osmóticos se generaron por dilución de la solución Barth, los únicos solutos presentes eran los iones de la solución. Sin embargo, en los experimentos con manitol se suma un soluto impermeable, el propio manitol. Por lo tanto, es necesario tener en cuenta el comportamiento de este soluto para simular las respuestas osmóticas en estas condiciones. Por ello, es necesario tener en cuenta que en este caso m_i es ahora la suma de las masas de solutos permeables (m_{sp}) más la de solutos impermeables (m_{man}), es decir que $m_i = m_s + m_{man}$.

Estas modificaciones se aplicaron en ambos modelos, de manera que las ecuaciones que describen la variación del volumen en función del tiempo y de la masa en función del tiempo se reemplazaron por las siguientes:

$$dV_i(t)/dt = P_{osm} \kappa (V_i(t))^{2/3} V_w 10^{-3} \left(\left((m_{sp} + m_{man})(t) / V_i(t) \right) - C_e \right) \quad (11)$$

$$dm_i(t)/dt = -P_s A(t) 10^{-3} \left(\left((m_{sp} + m_{man})(t) / V_i(t) \right) - C_e \right) \quad (12)$$

Capítulo 5

Resumen y perspectivas futuras

El tema desarrollado en este trabajo de Tesis ha sido el estudio del movimiento de agua a través de las membranas biológicas y su eventual acoplamiento con el movimiento de solutos. A continuación se resumen los aportes de esta tesis al tema dedicado.

5.1. El acoplamiento agua-solutos en las barreras epiteliales

Inicialmente se intentó explicar el movimiento neto de agua asociado al transporte de solutos (especialmente iones, y más particularmente Na^+), como destinados a disipar un “gradiente de concentración de soluto” generado en “algún lugar” de la barrera epitelial. En el caso del transporte transepitelial de Na^+ , se propuso y fue aceptado como cierto por muchos años, que ese sitio era el espacio intersticial, de acuerdo al denominado “modelo del gradiente sostenido (“standing gradient model”), según el cual el movimiento de fluido es isotónico.

Pronto se vio que la situación era mucho más compleja y que, en distintos epitelios y circunstancias el fluido transportado puede ser isotónico, hipotónico o hipertónico. La complejidad del sistema parecía ser mayor en los epitelios secretorios en los que el modelo antes descrito no es evidentemente aplicable.

Los resultados presentados en esta tesis, aunque difíciles de analizar, permiten extraer una primera conclusión importante: no es posible conocer el flujo de agua asociado al movimiento electrogénico de iones, aún en condiciones de hiperestimulación como se probó con 1-EBIO y DC-EBIO. Midiendo simultáneamente la corriente de cortocircuito (I_{SC}) y el flujo de agua (J_w) no se observó la secreción de fluido que se esperaba que generaran estas drogas, asumiendo que dicha secreción estuviera acoplada isotónicamente a los altos valores de I_{SC} observados. Como en el caso de STa (Toriano y col, 2001), esto puede sugerir un movimiento de agua asociado a un transporte no electrogénico.

5.2. Las acuaporinas como facilitadoras del movimiento de agua en la membrana celular

Por la complejidad del sistema epitelial, para poder hacer un estudio minucioso del fenómeno de ósmosis y del transporte de agua asociado al de solutos es necesario contar con otro estructuralmente más sencillo, dónde los grados de libertad sean menores.

Quizás, el modelo fisiológico más simple sea el de una célula aislada sometida a un gradiente osmótico a través de su membrana plasmática. Tomemos ahora el ejemplo de exponer a esta célula a un medio hipotónico, con lo que aparecen simultáneamente dos gradientes: 1) Un gradiente osmótico que tenderá a hacer entrar agua en la célula y 2) un gradiente de concentración que tenderá a hacer salir solutos del interior de la misma. La presencia de acuaporinas en la membrana celular, facilita enormemente el movimiento de agua a través de la membrana.

Una contribución de este trabajo es haber demostrado, experimentalmente y haciendo simulaciones basadas en modelos matemáticos, que en el caso de la acuaporina-1 expresada en el ovocito de *Xenopus* solo hay movimientos significativos de agua durante los primeros cuarenta segundos posteriores a la aplicación del gradiente osmótico.

Un interrogante de peso con respecto a la situación anterior es conocer el mecanismo de transferencia de agua, a nivel molecular, en el caso de canales como las acuaporinas que poseen una estructura tal que implica el pasaje de las moléculas de agua en fila india a través de la estructura. Clásicamente se postuló la aparición de un flujo de volumen (“bulk flow”) a través del canal al aplicar un gradiente osmótico. Esto explicaría las diferencias observadas experimentalmente entre los coeficiente de permeabilidad por difusión (P_{dw}) y osmótico (P_{osm}).

Otra contribución de este trabajo, y quizás la de mayor relevancia, es haber diseñado y concretado un desarrollo experimental que permite hacer mediciones de permeabilidad conociendo las concentraciones de soluto en ambos extremos del canal. La técnica del “ovocito vaciado” fue validada por la expresión de la acuaporina-1, habiendo podido reproducir las propiedades estudiadas en el ovocito entero pero con ventajas adicionales.

El estudio de los efectos de distintos agentes químicos o farmacológicos sobre las acuaporinas, mucho ha contribuido al estudio de sus propiedades. Sin embargo, hasta ahora, particularmente se tenía información sobre la interacción directa de estos agentes con sitios extracelulares. La técnica del “ovocito vaciado” permite estudiar el efecto directo de estos

agentes sobre ambos extremos del canal. Aquí se aplicó para los casos del HgCl_2 intracelular y la introducción de un soluto no permeable (manitol) del lado citoplasmático de la membrana.

En futuros trabajos, con diferentes acuaporinas, se podrán estudiar los efectos de agentes como el Ca^{2+} o el pH sobre la regulación de estos canales, siendo esta una primera perspectiva de importancia como desarrollo futuro.

5.3. El acoplamiento agua-solutos en el transporte a través de la membrana celular

Hasta ahora hemos hablado en este resumen de las acuaporinas como facilitadores del pasaje de agua en células aisladas. Un segundo fenómeno de importancia es el denominado acoplamiento de agua y solutos transportados a través de la membrana. Por muchos años se creyó que los movimientos de solutos, activos o por co-transporte, inducían movimientos de agua a través de la bicapa lipídica tendiente a disipar los “gradientes de concentración de soluto” generados en “algún lugar” del interior celular. Hoy día se sabe que la situación es mucho más compleja y se ha propuesto la existencia de diversos mecanismos de co-transporte de agua y solutos. La expresión en el “ovocito vaciado” del cotransportador Na^+ -glucosa permitirá, por ejemplo, estudiar en inmejorables condiciones, la propuesta del cotransporte acoplado Na^+ -Glucosa-agua propuesta originalmente por Wright y Zeuthen (Loo y col., 1996).

Acoplar mediciones eléctricas a las mediciones de permeabilidad al agua en ovocitos vaciados es una perspectiva futura de importancia originada en el trabajo aquí presentado, que permitirá profundizar tanto en la naturaleza del fenómeno osmótico como en el análisis del acoplamiento agua-solutos a nivel molecular. Sobre la base de lo observado en las células T84, un próximo paso es expresar el canal CFTR, que permitirá estudiar el desacople observado entre el flujo de agua y el de iones. Una vez obtenidos estos resultados, los mismos podrán ser extrapolados a las barreras epiteliales, ya que siempre serán necesarios estudios sobre las mismas para comprender cabalmente los fenómenos de transporte a nivel de estas estructuras.

Capítulo 6

Bibliografía

1. Abrami L., Simon M., Rousselet G., Berthouaud V., Buhler J. M., Ripoche P. (1994). Sequence and functional expression of an amphibian water channel, FA-CHIP: a new member of the MIP family. *Biochim. Biophys. Acta* 1192:147-51.
2. Agre P., Preston G. M., Smith B. L., Jung J. S., Raina S., Moon C., Guggino W. B., Nielsen S. (1993). Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel. *Am. J. Physiol.* 265:F463-76.
3. Agre P., Lee M.D., Devidas S., Guggino W.B. (1997). Aquaporins and Ion Conductance. *Science* 275, 1490-1492.
4. Agre P., King L.S., Yasui M., Guggino W.B., Ottersen O.P., Fujiyoshi Y., Engel A. (2002). Aquaporin water channels-from atomic structure to clinical medicine. *J. Physiol.* 542:3-16.
5. Al-Zahid G., Schafer J.A., Troutman S.L., Andreoli T.E. (1977). Effect of antidiuretic hormone on water and solute permeation, and the activation energies for these processes, in mammalian cortical collecting tubules: evidence for parallel ADH-sensitive pathways for water and solute diffusion in luminal plasma membranes. *J. Membrane Biol.* 31:103-129.
6. Alleva K., Niemietz C.M., Sutka M., Maurel C., Parisi M., Tyerman S.D., Amodeo G. (2006). Plasma membrane vesicles of *Beta vulgaris* storage root show high water channel activity that is regulated by cytoplasmic pH, and a dual range of calcium concentrations *J. Exp. Bot.* 57(3):609-21.
7. Amodeo G., Sutka M., Dorr R., Parisi M. (2002). Protoplasmatic pH modifies water and solute transfers in *Beta vulgaris* root vacuoles. *J. Memb. Biol.* 187:175-184.
8. Anthony T.L., Brooks H.L., Boassa D., Leonov S., Yanochko G.M., Regan J.W., Yool A.J. (2000). Cloned human aquaporin-1 is a cyclic GMP-gated ion channel. *Mol. Pharmacol.* 57:576-588.
9. Beitz E., Wu B., Holm L. M., Schultz J. E., Zeuthen T. (2006). Point mutations in the aromatic/arginine region in aquaporin 1 allow passage of urea, glycerol, ammonia, and protons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:269-74.

10. Bender E.A. (2000). An introduction to Mathematical modeling. Dover publications Inc. New York.
11. Ben-Sasson S. A., Grover N. B. (2003). Osmosis: a macroscopic phenomenon, a microscopic view. *Advances in Physiol. Educ.* 27(1):15-19.
12. Bentley P. (1958). The effects of neurohypophysial extracts on water transfer across the wall of the isolated urinary bladder of the toad *Bufo marinus*. *J. Endocrinol.* 17: 201-209.
13. Berendsen H.J.C., Marrink S. (1993). Molecular dynamics of water transport through membranes: water from solvent to solute. *Pure & Appl. Chem.* 12:2513-2520.
14. Bitner J. B., Peña-Rasgado C., Ruiz J., Cardona J., Rasgado-Flores H. (2001). Osmotic properties of internally perfused barnacle muscle cells. I. Isosmotic conditions. *Cell Mol. Biol.* 47:855-64.
15. Boassa D., Yool A. J. (2003). Single amino acids in the carboxyl terminal domain of aquaporin-1 contribute to cGMP-dependent ion channel activation. *BMC Physiology* 3:12.
16. Bourguet J., Jard S. (1964). Un dispositif automatique de mesure et d'enregistrement de flux net d'eau à travers la peau et la vessie des amphibiens. *Biochim. Biophys. Acta* 88: 442-444.
17. Brown D. (1989). Membrane recycling and epithelial cell function. *Am. J. Physiol.* 256, F1-F12.
18. Bryan-Sisneros A. A., Fraser S. P., Djamgoz M. B. (2003). Electrophysiological, mechanosensitive responses of *Xenopus laevis* oocytes to direct, isotonic increase in intracellular volume. *J. Neurosci. Methods.* 125:103-111.
19. Burykin A., Warshel A. (2003). What Really Prevents Proton Transport through Aquaporin? Charge Self-Energy versus Proton Wire Proposals. *Biophys. J.* 85: 3696-3706.
20. Calamita G., Ferri D., Gena P., Liquori G. E., Cavalier A., Thomas D., Svelto M. (2005). The inner mitochondrial membrane has aquaporin-8 water channels and is highly permeable to water. *J. Biol. Chem.* 280:17149-17153.
21. Cameron I.L., Kanal K.M., Keener C.R., Fullerton G.D. (1997). A mechanistic view of the non-ideal osmotic and motional behavior of intracellular water. *Cell Biology International.* 21(2):99-113.
22. Capurro C., Parisi M. (1992). Water handling in the rat jejunum: effects of acidification of the medium. *Pflugers Archives.* 421:17-21.

23. Capurro C., Ford P., Ibarra C., Ripoche P., Parisi M. (1994). Water permeability properties of the ovarian oocytes from *Bufo arenarum* and *Xenopus laevis*: a comparative study. *J. Membrane Biol.* 138:151-157.
24. Capurro C., Rivarola V., Kierbel A., Escoubet B., Farman N., Blot-Chabaud M., Parisi M. (2001). Vasopressin regulates water flow in a rat cortical collecting duct cell line not containing known aquaporins. *J. Membrane Biol.* 179: 63-70.
25. Cereijido M., Shoshani L., Contreras R.G. (2000). Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. I. Biogenesis of tight junctions and epithelial polarity. *American Journal of Physiology* 279: G477-G482.
26. Chakrabarti N., Roux B., Pomès R. (2004). Structural Determinants of Proton Blockage in Aquaporins. *J. Mol. Biol.* 343, 493-510.
27. Chara O., Ford P., Rivarola V., Parisi M., Capurro C. (2005). Asymmetry in the Osmotic Response of a Rat Cortical Collecting Duct Cell Line: Role of Aquaporin-2. *J. Membr. Biol.* 207(3):143-50.
28. Cheng, A., van Hoek, A.N., Yeager, M., Verkman, A.S., Mitra, A.K. (1997). Three-dimensional organization of a human water channel. *Nature* 387, 627-630.
29. Cho S. J., Sattar A. K., Jeong E. H., Satchi M., Cho J. A., Dash S., Mayes M. S., Stromer M. H., Jena B. P. (2002). Aquaporin 1 regulates GTP-induced rapid gating of water in secretory vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:4720-4724.
30. Chui S.W., Jakobsson E., Subramahiam S., McCammon J.A. (1991). Time-correlation analysis of simulated water motion in flexible and rigid gramicidin channels. *Biophys. J.* 60:273-285.
31. Chui S.W., Subramahiam S., Jakobsson E. (1999). Simulation Study of a Gramicidin/Lipid Bilayer System in Excess Water and Lipid. I. Rates and Mechanisms of Water Transport. *Biophys. J.* 76:1929-1938.
32. Cooper G.J., Boron W.F. (1998). Effect of PCMBs on CO₂ permeability of *Xenopus* oocytes expressing aquaporin 1 or its C189S mutant. *Am. J. Physiol.* 275:C1481-C1486.
33. Costa P. F., M. G. Emilio, P. L. Fernandes, H. G. Ferreira, K. G. Ferreira. (1989). Determination of ionic permeability coefficients of the plasma membrane of *Xenopus laevis* oocytes under voltage clamp. *J. Physiol.* 413:199-211.
34. Curry M.R., Shachar-Hill B., Hill A.E. (2001). Single Water Channels of Aquaporin-1 Do not Obey the Kedem-Katchalsky Equations. *J. Membr. Biol.* 181:115.
35. Dainty J., House C.R. (1966a). Unstirred layers in frog skin. *J. Physiol.* 182(1):66-78.

36. Dainty J., House C.R. (1966b). An examination of the evidence for membrane pores in frog skin. *J. Physiol.* 185(1):172-184.
37. Daniels M. J., Mirkov T. E., Chrispeels M. J. (1994). The Plasma Membrane of *Arabidopsis thaliana* Contains a Mercury-Insensitive Aquaporin that is a Homolog of the Tonoplast Water Channel Protein TIP. *Plant Physiol.* 106:1325-1333.
38. Dascal N., Chilcott G., Lester H.A. (1992). Intracellular perfusion of *Xenopus* oocytes. *Methods Enzymol.* 207:345-52.
39. Dawson D.C., Richards N. W. (1990). Basolateral K⁺ conductance: role in regulation of NaCl absorption and secretion. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 259: C181-C195.
40. de Groot B.L., Grubmüller H. (2001). Water Permeation Across Biological Membranes: Mechanism and Dynamics of Aquaporin-1 and GlpF. *Science* 294:2353-2357.
41. de Groot B.L., Engel A., Grubmüller H. (2003). The Structure of the Aquaporin-1 Water Channel: A Comparison between Cryo-electron Microscopy and X-ray Crystallography. *J. Mol. Biol.* 325:485-493.
42. Devor D.C., Singh A.K., Frizzell R.A., Bridges R.J. (1996). Modulation of Cl⁻ secretion by benzimidazolones. I. Direct activation of a Ca²⁺-dependent K⁺ channel. *Am. J. Physiol.* 271:L775-L784.
43. Dharmasathaphorn K., McRoberts J., Mandel K., Tisdale L., Masui H. (1984). A human colonic tumor cell line that maintains vectorial electrolyte transport. *Am. J. Physiol.* 246:204-208.
44. Diamond J.M., Bossert W.H. (1967). Standing-gradient osmotic flow. A mechanism for coupling of water and solute transport in epithelia. *Journal of General Physiology* 50:2061-2083.
45. Dong H., Smith A., Hovaida M., Chow J. Y. (2006). Role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in duodenal mucosal ion transport and bicarbonate secretion. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 291:G1120-G1128.
46. Dorr R., Kierbel A., Vera J., Parisi M. (1997). A new data acquisition system for the measurement of the net water flux across epithelia. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 53:9-14.
47. Dorr R., Ozu M., Parisi M. (2007). Simple and inexpensive hardware and software method to measure volume changes in *Xenopus* oocytes expressing aquaporins. *J. Neurosci. Methods.* 161:301-305.
48. Dumont J. N. (1972). Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.* 136:153-180.

49. Duquette P., Bissonnette P., Lapointe J. (2001). Local osmotic gradients drive the water flux associated with Na⁺/glucose cotransport. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98:3796-3801.
50. Escobar E., Ibarra C., Todisco E., Parisi M. (1990). Water and ion handling in the rat cecum. *Am. J. Physiol.* 259:786-791.
51. Farinas J., Simenak V., Verkman A.S. (1995). Cell volume measured in adherent cells by total internal reflection microfluorimetry: application to permeability in cells transfected with water channel homologs. *Biophys. J.* 68:1613-1620.
52. Farinas J., Verkman A.S. (1996). Measurement of cell volume and water permeability in epithelial cell layers by interferometry. *Biophys. J.* 71:3511-3522.
53. Farinas J., Kneen M., Moore M., Verkman A.S. (1997). Plasma membrane water permeability of cultured cells and epithelia measured by light microscopy with spatial filtering. *J. Gen. Physiol.* 110:283-296.
54. Finkelstein A., Andersen O.S. (1981). The gramicidin A channel: a review of its permeability characteristics with special reference to the single-file aspect of transport. *J. Membr. Biol.* 59(3):155-171.
55. Finkelstein A. (1987). Water movements through lipid bilayers, pores and plasma membranes. In: *Theory and Reality*. Vol. 4. John Wiley and Sons, New York.
56. Fischbarg J., Kunyan K., Vera J.C., Arant S., Silverstein S., Loike J., Rosen O.M. (1990). Glucose transporters serve as water channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:3244-3247.
57. Fischbarg J., Diecke FP, Iserovich P, Rubashkin A. (2006). The Role of the Tight Junction in Paracellular Fluid Transport across Corneal Endothelium. Electro-osmosis as a Driving Force. *J. Membr. Biol.* 210(2):117-30.
58. Ford P., Amodeo G., Capurro C., Ibarra C., Dorr R., Ripoche P., Parisi M. (1996). Progesterone inhibition of water permeability in *Bufo arenarum* oocytes and urinary bladder. *Am. J. Physiol.* 270:F880-885.
59. Ford P., Merot J., Jawerbaum A., Gimeno M.A.F., Capurro C., Parisi M. (2000). Water permeability in rat oocytes at different maturity stages: aquaporin-9 expression. *J. Membrane Biol.* 176:151.
60. Frömter E., Diamond J. (1972). Route of passive ion permeation in epithelia. *Nature New Biology* 235:9-13.

61. Fu D., Libson A., Miercke L.J.W., Weitzman C., Nollert P., Krucinski J., Stroud R.M. (2000). Structure of a Glycerol-Conducting Channel and the Basis for its Selectivity. *Science* 290:481-486.
62. Galizia L., Flamenco M.D., Rivarola V., Capurro C., Ford P. (2008). Role of AQP2 in Activation of Calcium Entry by Hypotonicity: Implications in Cell Volume Regulation. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 294(3):F582-90.
63. Gao L., Yankaskas J. R., Fuller C. M., Sorscher E. J., Matalon S., Forman H. J., Venglarik C. J. (2001). Chlorzoxazone or 1-EBIO increases Na⁺ absorption across cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 281:L1123-L1129.
64. Giannella R.A., Luttrell M., Thompson M. (1983). Binding of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin to receptors on rat intestinal cells. *Am. J. Physiol.* 245(4):G492-G498.
65. Goldstein D.A., Solomon A.K. (1960). Determination of equivalent pore radius for human red cells by osmotic pressure measurement. *J. Gen. Physiol.* 44:1-17.
66. Gonen T., Cheng Y., Sliz P., Hiroaki Y., Fujiyoshi Y., Harrison S. C., Walz T. (2005). Lipid-protein interactions in double-layered two-dimensional AQP0 crystals. *Nature.* 438(7068):633-638.
67. Haberman R. (1998). Mathematical models. Mechanical vibrations, population dynamics and traffic flow. Society for Industrial and Applied Mathematics. Philadelphia.
68. Halm S. T., Liao T., Halm D. R. (2006). Distinct K⁺ conductive pathways are required for Cl⁻ and K⁺ secretion across distal colonic epithelium. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 291:C636-C648.
69. Hamann S., Kiilgaard J.F., Litman T., Alvarez-Leefmans F.J., Winther B.R., Zeuthen T. (2002). Measurement of cell volume changes by fluorescence self-quenching. *J. Fluoresc.* 12:139-145.
70. Hamann S., Herrera-Perez J.J., Bundgaard M., Alvarez-Leefmans F.J., Zeuthen, T. (2005). Water permeability of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporters in mammalian epithelial cells. *J. Physiol.* 568:123-135.
71. Hammel H.T., Hildebrand J.H., Mauro A., Soodak H, Iberall A. (1979). Forum on osmosis. *Am. J. Physiol.* 237(3):R95-R125.
72. Hamra F.K., Forte L.R., Eber S.L., Pidhorodeckyj N.V., Krause W.J., Freeman R.H., Chin D.T., Tompkins J.A., Fok K.F., Smith C.E., et al. (1993). Uroguanylin: structure

- and activity of a second endogenous peptide that stimulates intestinal guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90(22):10464-10468.
73. Hanai T., Haydon D.A., Redwood W.R. (1966). The water permeability of artificial bimolecular leaflets: a comparison of radio-tracer and osmotic methods. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 137(2):731-739.
 74. Hanai T., Haydon D.A. (1966). The permeability to water of bimolecular lipid membranes. *J. Theor. Biol.* 11(3):370-382.
 75. Harries W.E.C., Akhavan D., Miercke L.J.W., Khademi S., Stroud R.M. (2004). The channel architecture of aquaporin 0 at a 2.2-Å resolution. *PNAS* 101(39):14045-14050.
 76. Hashido M., Ikeguchi M., Kidera A. (2005). Comparative simulations of aquaporin family: AQP1, AQPZ, AQP0 and GlpF. *FEBS Letters* 579:5549-5552.
 77. Hedfalk K., Törnroth-Horsefield S., Nyblom M., Johanson U., Kjellbom P., Neutze R. (2006). Aquaporin gating. *Current Opinion in Structural Biology* 16(4):447-456.
 78. Hernandez 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:C1067-1080.
 79. Hill A.E., Shachar-Hill B., Shachar-Hill Y. (2004). What are aquaporins for? *J. Membrane Biol.* 197:1-32.
 80. Hohmann S., Nielsen S. (2000). Preface. In: Hohmann S., Nielsen S. (eds.) *Molecular Biology and Physiology of Water and Solute Transport*, pp. v-vi. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
 81. Iordache C., Duszyk M. (2007). Sodium 4-phenylbutyrate upregulates ENaC and sodium absorption in T84 cells. *Exp. Cell. Res.* 313(2):305-311.
 82. Ishibashi K. (2006). Aquaporin subfamily with unusual NPA boxes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1758(8):989-93.
 83. Jacobs M.H. (1933). The simultaneous measurement of cell permeability to water and to dissolved substances. *J. Cell. Comp. Physiol.* 2:427-444.
 84. Janáček K., Sigler K. (2000). Osmosis: membranes impermeable and permeable for solutes, mechanism of osmosis across porous membranes. *Physiol. Res.* 49:191-195.
 85. Jensen M.Ø., Tajkhorshid E., Schulten K. (2003). Electrostatic Tuning of Permeation and Selectivity in Aquaporin Water Channels. *Biophys. J.* 85:2884-2899.
 86. Jochen S.H., de Groot B.L. (2006). Does CO₂ Permeate through Aquaporin-1? *Biophysical Journal* 91:842-848.

87. Jung J.S., Preston G.M., Smith B.L., Guggino W.B., Agre P. (1994). Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model. *J. Biol. Chem.* 269:14648-14654.
88. Kao H.P., Abney J.R., Verkman A.S. (1993). Determinants of the translational mobility of a small solute in cell cytoplasm. *J. Cell Biol.* 120:175-184.
89. Katchalsky A., Curran P.F. (1965). Nonequilibrium thermodynamics in Biophysics. Harvard University Press. Cambridge.
90. Kedem O., Katchalsky A. (1958). Thermodynamic analysis of the permeability of biological membranes to non-electrolytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 27:229-246.
91. Kedem O., Katchalsky A. (1963). Permeability of composite membranes. Part III. Series array of elements. *Trans. Faraday Soc.* 59:1941-1953.
92. Kelly S.M., Macklem P.T. (1991). Direct measurement of intracellular pressure. *Am. J. Physiol.* 260:C652-C657.
93. King L.S., Kozono D., Agre P. (2004). From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:687-698.
94. Kleinhans F.W. (1998). Membrane permeability modeling: Kedem-Katchalsky a two-parameter formalism. *Cryobiology.* 37:271-289.
95. Kovbasnjuk O., Leader J.P., Weinstein A.M., Spring K.R. (1998). Water does not flow across the tight junctions of MDCK cell epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95:6526-6530.
96. Krane C.M., Melvin J.E., Nguyen H.V., Richardson L., Towne J.E., Doetschman T., Menon A.G. (2001). Salivary acinar cells from aquaporin 5-deficient mice have decreased membrane water permeability and altered cell volume regulation. *J. Biol. Chem.* 276:23413-23420.
97. Kuang K., Haller J.F., Shi G., Kang F., Cheung M., Iserovich P., Fischbarg J. (2001). Mercurial sensitivity of aquaporin 1 endofacial loop B residues. *Protein Science* 10:1627-1634.
98. Kuang K., Yiming M., Wen Q., Li Y., Ma L., Iserovich P., Verkman, A.S., Fischbarg J. (2004). Fluid transport across cultured layers of corneal endothelium from aquaporin-1 null mice. *Exp. Eye Res.* 78:791-798.
99. Lagrée V., Pellerin I., Hubert J.F., Tacnet F., Le Cahérec F., Roudier N., Thomas D., Gouranton J., Deschamps S. (1998). A Yeast Recombinant Aquaporin Mutant That Is Not Expressed or Mistargeted in *Xenopus* Oocyte Can Be Functionally Analyzed in Reconstituted Proteoliposomes. *J. Biol. Chem.* 273(20):12422-12426.

100. Lahajnar G., Pecar S., Sepe A. (2007). Na⁺-nitroprusside and HgCl₂ modify the water permeability and volume of human erythrocytes. *Bioelectrochemistry* 70:462-8.
101. Levin M.H., Verkman A.S. (2006). Aquaporins and CFTR in Ocular Epithelial Fluid Transport. *J. Membrane Biol.* 210:105-115.
102. Levine S.D., Jacoby M., Finkelstein A. (1984). The water permeability of toad urinary bladder. II. The value of P_f/P_{dw} for the antidiuretic hormone-induced water permeation pathway. *J. Gen. Physiol.* 83(4):543-61.
103. Liu Z., Shen J., Carbrey J.M., Mukhopadhyay R., Agre P., Rosen B.P. (2002). Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:6053-6058.
104. Loo D., Zeuthen T., Chandy G., Wright E. (1996). Cotransport of water by the Na⁺/glucose cotransporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93:13367-13370.
105. Loo D.D., Hirayama B.A., Meinild A.K., Chandy G., Zeuthen T., Wright E.M. (1999). Passive water and ion transport by cotransporter. *J. Physiol.* 518:195-202.
106. Ma T., Frigeri A., Tsai S.T., Verbavatz J.M., Verkman A.S. (1993). Localization and functional analysis of CHIP28k water channels in stably transfected CHO cells. *J. Biol. Chem.* 268:22756-22764.
107. Ma T., Yang B., Gillespie A., Carlson E.J., Epstein C.J., Verkman A.S. (1998). Severely impaired urinary concentrating ability in transgenic mice lacking aquaporin-1 water channels. *J. Biol. Chem.* 273:4296-4299.
108. Macey R.I. (1984). Transport of water and urea in red blood cells. *Am. J. Physiol.* 246:C195-C203.
109. Martinac B., Hamill O.P. (2002). Gramicidin A channels switch between stretch activation and stretch inactivation depending on bilayer thickness. *PNAS* 99(7):4308-4312.
110. Masyuk A.I., Marinelli R.A., LaRusso N.F. (2002). Water transport by epithelia of the digestive tract. *Gastroenterology* 122:545-562.
111. Mathai J.C., Agre P. (1999). Hourglass pore-forming domains restrict aquaporin-1 tetramer assembly. *Biochemistry* 38:923-928.
112. Meinild A.K., Klaerke D.A., Zeuthen T. (1998). Bidirectional Water Fluxes and Specificity for Small Hydrophilic Molecules in Aquaporins 0–5. *J. Biol. Chem.* 273(49):32446-32451.

113. Meyer M.M., Verkman A.S. (1987). Evidence for water channels in renal proximal tubule cell membranes. *J. Membr. Biol.* 96:107-119.
114. Mitsuoka K., Murata K., Walz T., Hirai T., Agre P., Heymann J.B., Engel A., Fujiyoshi Y. (1999). The Structure of Aquaporin-1 at 4.5-Å Resolution Reveals Short Alpha-Helices in the Center of the Monomer. *J. Struct. Biol.* 128:34-43.
115. Moshelion M., Moran N., Chaumont F. (2004). Dynamic changes in the osmotic water permeability of protoplast plasma membrane. *Plant Physiol.* 135:2301-17.
116. Motulsky H., Christopoulos A. (2002). Comparing models and curves. © 2002, GraphPad Software, Inc.
117. Murata K., Mitsuoka K., Hirai T., Walz T., Agre P., Heymann J.B., Engel A., Fujiyoshi Y. (2000). Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature.* 407:599-605.
118. Naftalin R.J., Tripathi S. (1986). The roles of paracellular and transcellular pathways and submucosal space in isotonic water absorption by rabbit ileum. *J. Physiol.* 370:409-432.
119. Nakhoul N.L., Hering-Smith K.S., Abdulnour-Nakhoul S.M., Hamm L.L. (2001). Transport of NH₃/NH₄⁺ in oocytes expressing aquaporin-1. *Am J. Physiol. Renal Physiol.* 281:F255-F263.
120. Neely J.D., Christensen B.M., Nielsen S., Agre P. (1999). Heterotetrameric Composition of Aquaporin-4 Water Channels. *Biochemistry* 38:11156-11163.
121. Ozu M., Toriano R., Capurro C., Parisi M. (2005a). Electrical parameters and water permeability properties of monolayers formed by T84 cells cultured on permeable supports. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38(1):133-40.
122. Ozu M., Dorr R., Parisi M. (2005b). New method to measure water permeability in emptied-out *Xenopus* oocytes controlling conditions on both sides of the membrane. *J. Biochem. Biophys. Methods* 63:187-200.
123. Paganelli C.V., Solomon A.K. (1957). The rate of exchange of tritiated water across the human red cell membrane. *J. Gen. Physiol.* 41(2):259-277.
124. Papadopoulos M.C., Saadoun S., Verkman A.S. (2008). Aquaporins and cell migration. *Pflugers Arch – Eur. J. Physiol.* DOI 10.1007/s00424-007-0357-5.
125. Parisi M., Bourguet J., Ripoché P., Chevalier J. (1979). Simultaneous minute by minute determination of unidirectional and net water fluxes in frog urinary bladder. A reexamination of the two barriers in series hypothesis, *Biochim. Biophys. Acta* 556:509-523.

126. Parisi M., Bourguet J. (1983). The single file hypothesis and the water channels induced by antidiuretic hormone. *J. Membrane Biol.* 71:189-193.
127. Parisi M., Amodeo G., Capurro C., Dorr R., Ford P., Toriano R. (1997). Biophysical properties of epithelial water channels. *Biophysical Chemistry* 68:255-263.
128. Pitonzo D., Skach W.R. (2006). Molecular mechanisms of aquaporin biogenesis by the endoplasmic reticulum Sec61 translocon. *Bioch. Biophys. Acta* 1758(8):976-88.
129. Pohl P., Saparov S.M., Antonenko Y.N. (1998). The Size of the Unstirred Layer as a Function of the Solute Diffusion Coefficient. *Biophysical Journal* 75:1403-1409.
130. Preston G.M., Carroll T.P., Guggino W.B., Agre P. (1992). Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 256:385-387.
131. Preston G.M., Jung J.S., Guggino W.B., Agre P. (1993). The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP28 water channel. *J. Biol. Chem.* 268:17-20.
132. Ramirez M.A., Toriano R., Parisi M., Malnic G. (2000). Control of cell pH in the T84 colon cell line. *Journal of Membrane Biology* 177:149-157.
133. Rao M. (1985). Toxins which activate guanylate cyclase: heat-stable enterotoxins. *Ciba Found. Symp.* 112:74-93.
134. Ren G., Cheng A., Reddy V., Melnyk P., Mitra A.K. (2000). Three-dimensional Fold of the Human AQP1 Water Channel Determined at 4Å Resolution by Electron Crystallography of Two-dimensional Crystals Embedded in Ice. *J. Mol. Biol.* 301:369-387.
135. Roelofsen B., Op den Kamp J.A. (1994). Plasma membrane phospholipid asymmetry and its maintenance: the human erythrocyte as model. In *Cell Lipids*. D. Hoekstra, editor. Academic Press Inc., San Diego. 7-46.
136. Rosenberg P.A., Finkelstein A. (1978). Water permeability of gramicidin A-treated lipid bilayer membranes. *J. Gen. Physiol.* 72(3):341-350.
137. Saitou T., Ishikawa T., Obara K., Nakayama K. (2000). Characterization of whole-cell currents elicited by mechanical stimulation of *Xenopus* oocytes. *Pflugers Arch.* 440(6):858-65.
138. Saparov S.M., Kozono D., Rothe U., Agre P., Pohl P. (2001). Water and ion permeation of aquaporin-1 in planar lipid bilayers. Major differences in structural determinants and stoichiometry. *J. Biol. Chem.* 276:31515.
139. Saparov S.M., Tsunoda S.P., Pohl P. (2005). Proton exclusion by an aquaglyceroprotein: a voltage clamp study. *Biol. Cell.* 97:545-550.

140. Schreiber R., Nitschke R., Greger R., Kunzelmann K. (1999). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activates aquaporin 3 in airway epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 274:11811-816.
141. Schulz S., Green C., Yuen P., Garbers D. (1990). Guanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor. *Cell* 63:941-948.
142. Schwab A. (2001). Function and spatial distribution of ion channels and transporters in cell migration. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 280:F739-F747.
143. Sheppard D., Welsh M. (1992). Effect of ATP-sensitive K⁺ channel regulators on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride currents. *J. Gen. Physiol.* 100:573-91.
144. Sidel V.W., Solomon A.K. (1957). Entrance of water into human red cells under an osmotic pressure gradient. *J. Gen. Physiol.* 41(2):243-257.
145. Simons K., van Meer G. (1988). Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry.* 27:6197-6202.
146. Singh S., Singh G., Heim J., Gerzer R. (1991). Isolation and expression of a guanylate cyclase-coupled heat-stable enterotoxin receptor cDNA from a human colonic cell line. *Biophys. Res. Commun.* 179:1455-1463.
147. Singh S., Syme C., Singh A., Devor D., Bridges R. (2001). Benzimidazolone activators of chloride secretion: potential therapeutics for cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 296:600-611.
148. Solomon A.K., Chasan B., Dix J.A., Lukacovic M.F., Toon M.R., Verkman A.S. (1984). The aqueous pore in the red cell membrane: band 3 as a channel for anions, cations, nonelectrolytes, and water. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 414:79-124.
149. Spring K.R. (1999). Epithelial fluid transport - A century of investigation. *News in Physiological Sciences.* 14:92-98.
150. Sui H., Han B.G., Lee J.K., Walian P., Jap B.K. (2001). Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature.* 414:872-878.
151. Sutka M., Alleva K., Parisi M., Amodeo G. (2005). Tonoplast vesicles of *Beta vulgaris* storage root show functional aquaporins regulated by protons. *Biol. Cell.* 97(11):837-46.
152. Taglialatela M., Toro L., Stefani E. (1992). Novel voltage clamp to record small, fast currents from ion channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Biophys. J.* 61:78-82.

153. Tajkhorshid E., Nollert P., Jensen M.O., Miercke L.J., O'Connell J., Stroud R.M., Schulten K. (2002). Control of the selectivity of the aquaporin water channel family by global orientational tuning. *Science*. 296:525-530.
154. Takata K., Matsuzaki T., Tajika Y. (2004). Aquaporins: water channel proteins of the cell membrane. *Prog. Histochem. Cytochem.* 39:1-83.
155. Toriano R., Ford P., Rivarola V., Tamarappoo B.K., Verkman A.S., Parisi M. (1998). Reconstitution of a regulated transepithelial water pathway in cells transfected with AQP2 and an AQP1/AQP2 hybrid containing AQP2-C terminus. *Journal of Membrane Biology*. 161:141-149.
156. Toriano R., Kierbel A., Ramirez M.A., Malnic G., Parisi M. (2001). Spontaneous water secretion in T84 cells: effects of STa enterotoxin, bumetanide, VIP, forskolin, and A-23187. *American Journal of Physiology*. 281:G816-G822.
157. Toriano R., Curto M.A., Parisi M. (2007). Efecto del uroguanilín (UGN), un agonista endógeno de la toxina termoestable de *Escherichia coli*, sobre el pH intracelular y la secreción de fluido en un modelo celular de intestino humano. *Medicina*. 67(Supl.3):86.
158. Tsunoda S.P., Wiesner B., Lorenz D., Rosenthal W., Pohl P. (2004). Aquaporin-1, nothing but a water channel. *J. Biol. Chem.* 279:11364-7.
159. Tupper J.T., Maloff B.L. (1973). The ionic permeability of the amphibian oocyte in the presence or absence of external calcium. *J. Exp. Zool.* 185:133-44.
160. Urban B.W., Hladky S.B., Haydon D.A. (1980). Ion movements in gramicidin pores. An example of single-file transport. *Biochim. Biophys. Acta.* 602(2):331-354.
161. Ussing H.H., Zerahn K. (1951). Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol. Scand.* 23(2-3):110-127.
162. Verkman A.S., Dix J.A., Seifter J.L. (1985). Water and urea transport in renal microvillus membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* 248:F650-655.
163. Verkman A.S., Lencer W.I., Brown D., Ausiello D.A. (1988). Endosomes from kidney collecting tubule cells contain the vasopressin-sensitive water channel. *Nature*. 333:268-269.
164. Verkman A.S. (2000). Water permeability measurements in living cells and complex tissues. *J. Membrane Biol.* 173:73-87.
165. Verkman A.S., Mitra A.K. (2000). Structure and function of aquaporin water channels. *Am. J. Physiol.* 278:F13-F28.
166. Verkman A. (2002). Physiological importance of aquaporin water channels. *Annals of Medicine*. 34:192-200.

167. Verkman A.S. (2005). More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J. Cell Sci.* 118:3225-3232.
168. Villegas R., Villegas G.M. (1960). Characterization of the membranes in the giant nerve fiber of the squid. *J. Gen. Physiol.* 43:73-103.
169. Walz T., Smith B.L., Zeidel M.L., Engel A., Agre P. (1994). Biologically Active Two-dimensional Crystals of Aquaporin CHIP. *J. Biol. Chem.* 269:1583-1586.
170. Walz T., Hirai T., Murata K., Heymann J.B., Mitsuoka K., Fujiyoshi Y., Smith B.L., Agre P., Engel A. (1997). The three-dimensional structure of aquaporin-1. *Nature.* 387:624-627.
171. Weinstein A.M., Stephenson J.L. (1979). Electrolyte transport across a simple epithelium. Steady-state and transient analysis. *Biophys. J.* 27:165-186.
172. Whittembury G., Carpi-Medina P., Gonzalez E., Linares H. (1984). Effect of para-chloromercuribenzenesulfonic acid and temperature on cell water osmotic permeability of proximal straight tubules. *Biochim. Biophys. Acta.* 775(3):365-373.
173. Whittembury G., Paz Alliaga A., Biondi A., Carpi-Medina P., Gonzalez E., Linares H. (1985). Pathways for volume flow and volume regulation in leaky epithelia. *Pflugers Archives.* 405:S17-S22.
174. Whittembury G., Echevarria M. (1994). Pathways for water absorption in isosmotic transporting epithelia. *Mount Sinai Journal of Medicine.* 61:311-319.
175. Whittembury G., Hill H. (2000). Coupled transport of water and solutes across epithelia. In: Seldin D. & Giebisch G. (Editors), *Kidney Physiology and Pathophysiology.* Lippincott Williams, New York, 341-362.
176. Wiggins P.M. (1996). High and low density water and resting, active and transformed cells. *Cell Biology International.* 20(6):429-435.
177. Yang B., Verkman A. (1998). Urea transporter UT3 functions as an efficient water channel: direct evidence for a common water/urea pathway. *J. Biol. Chem.* 273: 9369-9372.
178. Yang B., Song Y., Zhao D., Verkman A.S. (2005). Phenotype analysis of aquaporin-8 null mice. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 288:C1161-C1170.
179. Yasui M., Kwon T. H., Knepper M. A., Nielsen S., Agre P. (1999). Aquaporin-6: An intracellular vesicle water channel protein in renal epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:5808-5813.
180. Yasui M. (2004). Molecular mechanisms and drug development in aquaporin water channel diseases: Structure and function of aquaporins. *J. Pharmacol. Sci.* 96:260-263.

181. Zadunaisky J.A., Parisi M.N., Montoreano R. (1963). Effect of antidiuretic hormone on permeability of single muscle fibres. *Nature* 200:365-366.
182. Zardoya R. (2005). Phylogeny and evolution of the major intrinsic protein family. *Biol. Cell.* 97:397-414.
183. Zeidel M.L., Ambudkar S.V., Smith B.L., Agre P. (1992). Reconstitution of functional water channels in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein. *Biochemistry.* 31:7436-40.
184. Zeidel M.L., Nielsen S., Smith B.L., Ambudkar S.V., Maunsbach A.B., Agre P. (1994). Ultrastructure, pharmacologic inhibition, and transport selectivity of aquaporin channel-forming integral protein in proteoliposomes. *Biochemistry.* 33:1606-15.
185. Zeidel M.L. (1998). Recent advances in water transport. *Semin. Nephrol.* 18:167-177.
186. Zeuthen T., Meinild A.K., Klaerke D.A., Loo D.D., Wright E.M., Belhage B., Litman T. (1997). Water transport by the Na⁺/glucose cotransporter under isotonic conditions. *Biologie Cellulaire.* 89:307-312.
187. Zeuthen T., MacAulay N. (2002). Cotransporters as molecular water pumps. *Int. Rev. Cit.* 215:259-284.
188. Zhang R., Logee K., Verkman A.S. (1990). Expression of mRNA coding for kidney and red cell water channels in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 265:15375-15378.
189. Zhang R., Alper S., Thorens B., Verkman A. (1991). Evidence from oocyte expression that the erythrocyte water channel is distinct from band 3 and the glucose transporter. *J. Clin. Invest.* 88:1553-1558.
190. Zhang R., van Hoek A. N., Biwersi J., Verkman A. S. (1993). A point mutation at cysteine 189 blocks the water permeability of rat kidney water channel CHIP28k. *Biochemistry.* 32:2938-41.
191. Zhang Y., Hamill O.P. (2000). Calcium, voltage and osmotic stress-sensitive currents in *Xenopus* oocytes and their relationship to single mechanically gated channels. *Journal of Physiology.* 523(1):83-99.