

104  
2es



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**REGULACION DE VOLUMEN EN CELULAS QUE  
NO EXPRESAN LA GLICOPROTEINA P.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**B I O L O G A**

**P R E S E N T A :**

**DIANA CONCEPCION MIRANDA LOPEZ**



MEXICO, D.F. **FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR**

1995

**FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

**M. en C. Virginia Abrín Batule**  
**Jefe de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

**Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:**

"Regulación de volumen en células que no expresan la Glicoproteína P"

realizado por Diana Concepción Miranda López

con número de cuenta 9150678-0 --- , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

**Atentamente**

Director de Tesis Dra. Herminia Pasantes Ordoñez  
Propietario

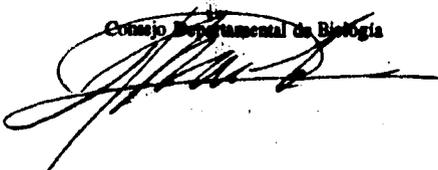
Propietario M. en I.B.B. Jorge Alberto Pérez León

Propietario M. en C. Silvestre de Jesús Alavez Espino

Suplente Dr. Julio E. R. Morán Andrade

Suplente Biol. Victor Coffe Ramirez

**Consejo Departamental de Biología**



La investigación que se presenta en esta tesis se realizó en el laboratorio 202 del Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, bajo la dirección de la Dra. Herminia Pasantes Ordoñez.

A la memoria de mi  
Abuelita Concepción  
Chávez M.

**AGRADECIMIENTOS:**

**A mis Padres Concepción López  
y Miguel Miranda. Por su  
apoyo y cariño.**

**A mis Hermanos.**

**A César Alfredo Chávez Lesama  
Por su gran amor y confianza.**

**Por su ayuda técnica:  
Claudia Peña S.  
Claudia Rodríguez**

**A Miguel A. Hernández P.  
por ser el mejor compañero de  
trabajo.**

**A mis compañeros de  
laboratorio: Edith González,  
Octavio García, Marcela  
Morales y Sandra Morales.**

INDICE.

INTRODUCCION	1
Regulación del Volumen	2
Mecanismos de Regulación del volumen celular (DRV)	6
Participación de compuestos orgánicos en el proceso de regulación de volumen	7
Participación de los iones en el proceso de regulación de volumen (DRV)	10
Canales de K	12
Características generales de los canales de Cl activados por hinchamiento	13
OBJETIVO	18
MATERIALES Y METODOS	19
Cultivos	19
Regulación de Volumen	19
Soluciones	20
Determinación de aminoácidos libres	22
RESULTADOS Y DISCUSIONES	24
Demostración de la falta de expresión de la GP en las células NIH3T3	24
Regulación de volumen en las células NIH3T3	24
Permeabilidad al sodio y cloro	26
Caracterización de la permeabilidad de los canales aniónico y catiónico activados durante el DRV	28
Efecto de los inhibidores de canales de cloro y potasio	30
Inhibición del DRV por ácidos grasos poliinsaturados	32
Dependencia del calcio del DRV	33
Participación de los aminoácidos libres en el DRV en células NIH3T3	34
CONCLUSIONES	37
BIBLIOGRAFIA	38

## INTRODUCCION

Los individuos pertenecientes a un gran número de especies animales son capaces de vivir en aguas con distinta concentración variable de sales. Los componentes celulares de los líquidos circulatorios de estos animales (sangre, linfa, hemolinfa) ajustan su volumen a los cambios en salinidad externa y en la mayoría de las especies, también las células que forman los tejidos tienen esta capacidad de adaptación. Durante mucho tiempo se pensó que la propiedad de regulación del volumen estaba restringida a las especies que efectivamente requieren de este control para su supervivencia. Sin embargo, se ha demostrado que las células de animales terrestres, que están siempre expuestas a fluidos de osmolaridad muy controlada, poseen también esta capacidad. La regulación de la osmolaridad de los líquidos corporales en estos animales se lleva a cabo a través de los órganos renales, los cuales se encargan de manejar los flujos de agua y solutos en la dirección necesaria para mantener las condiciones adecuadas para la supervivencia del organismo. Se puede cuestionar entonces cual es la necesidad de mantener esta capacidad de regulación del volumen aún en condiciones de osmolaridad controlada. Lo que se ha planteado es que pueden existir cambios en el volumen celular durante un

número considerable de funciones básicas que requieren ser ajustados. Entre estas funciones se encuentran los procesos de transporte de sustancias nutritivas (azúcares y aminoácidos), las funciones de secreción, los movimientos de organelos intracelulares, de manera particular el citoesqueleto, y por supuesto durante las fases de crecimiento y división celular. En todas estas situaciones se crean gradientes osmóticos microscópicos que dan lugar a cambios locales y transitorios en el volumen celular. Podría ser entonces ésta la justificación de que los procesos de regulación del volumen persistan en todos los tipos celulares, sin importar las características del medio externo en el que se desenvuelve el organismo.

#### REGULACIÓN DEL VOLUMEN.

La membrana plasmática tanto de origen animal como vegetal, es muy permeable al agua, por lo que siempre que exista una diferencia en la concentración de los componentes celulares con el exterior, es decir un gradiente osmótico entre el exterior y el interior de la célula, se observarán movimientos netos de agua. En presencia de un gradiente de presión osmótica, el agua se moviliza del compartimiento de menor al de mayor presión osmótica, y como consecuencia, el

volumen celular va presentar cambios. En un sistema biológico las soluciones isosmóticas son aquellas que poseen una misma presión osmótica que el compartimiento intracelular, mientras que las que presentan una presión osmótica diferente son anisosmóticas: éstas a su vez pueden ser hiposmóticas, si la presión osmótica es menor que la del interior de la célula, o hiperosmóticas cuando la presión osmótica externa es mayor que la de la célula. Las células animales y vegetales poseen membranas semipermeables, es decir que permiten el movimiento de agua pero impiden el flujo de solutos. Por ello, cada vez que la célula sea expuesta a un medio anisosmótico, estableciéndose un gradiente osmótico entre su interior y el medio extracelular, tendrá un cambio en su volumen al moverse agua de un compartimiento a otro para contrarrestar dicho gradiente. En el caso de un medio hiperosmótico, la célula perderá agua, tornando su interior más concentrado hasta disipar el gradiente. En el caso de un medio hiposmótico, la célula ganará agua hasta balancear su concentración de osmolitos con los del medio extracelular.

En condiciones isosmóticas, las células diferenciadas tienen un volumen característico, determinado por el linaje celular al que pertenecen, es decir su volumen está en estado estacionario. Cuando el medio extracelular se vuelve hiperosmótico, el volumen celular disminuye como consecuencia

de la salida de agua intracelular obedeciendo a los principios fisicoquímicos ya mencionados. Por el contrario, en un medio extracelular hiposmótico, la célula se hincha por la entrada de agua obligada osmóticamente. En cualquiera de las condiciones anteriores, el aumento o disminución del volumen celular es una consecuencia directa de los flujos de agua que sólo obedecen las leyes de la ósmosis. La mayoría de las células animales, sin embargo, poseen mecanismos por medio de los cuales tienden a recuperar su volumen estacionario aún cuando persisten las condiciones anisomóticas. Estos mecanismos son respuestas activas de las células que tienen lugar mediante modificaciones de la permeabilidad de la membrana a distintos solutos osmóticamente activos, como se explicará más adelante, (Osion y Col., 1986) y este proceso de recuperación del volumen es lo que se conoce como regulación del volumen celular.

La regulación del volumen celular puede ser de dos tipos :

- a) Un incremento regulador del volumen celular (IRV) que se presenta después de un encogimiento provocado por un medio hiperosmótico.
- b) Un decremento regulador del volumen celular (DRV), el cual se presenta después del aumento en volumen provocado por un medio hiposmótico.

La regulación del volumen celular es un proceso complejo que

implica varios eventos. La célula debe ser capaz de detectar los cambios en su volumen. Después debe reaccionar a los cambios ocurridos en su volumen, iniciando así el proceso regulador que cambie el contenido intracelular de solutos en la dirección necesaria para corregir el cambio en el volumen. Finalmente la célula debe "recuperar" su volumen inicial y terminar los mecanismos que se activaron durante el proceso regulador.

Los sensores del volumen celular aún no se han identificado; entre los factores o procesos que podrían desempeñar esta función se encuentran los siguientes:

- 1) Canales sensibles al estiramiento. Se han descrito un tipo de canales que se activan, o se desactivan, por el simple estiramiento de la membrana plasmática ( Chistensen 1987; Uhl y col., 1988; Morris, C.E. y col. 1989). El procedimiento experimental para el estudio de estos canales es la técnica de registro de canales unitarios en microáreas de membrana (patch clamp). Algunos de estos canales se activan cuando se produce el estiramiento de la membrana, ya sea provocado por la aplicación de una presión externa o bien, al disminuir la osmolaridad del medio y aumentar el volumen celular. Estos canales se han encontrado efectivamente en varios tipos celulares que tienen la capacidad de regular su volumen. El cambio en la permeabilidad de estos canales, al pasar de un

estado cerrado a uno abierto, puede permitir el paso de iones u otros factores del exterior al interior de la célula, los cuales a su vez, serían los causantes de dar inicio a los procesos de regulación del volumen. Una de las alternativas posibles es que estos canales sean vías directas de paso de los flujos iónicos correctores, en este caso del  $K^+$ .

2) Modificaciones en la concentración de algún componente intracelular, como el calcio, los iones hidrógeno, (Lauf, 1985; Wong y Chase, 1986) o los elementos de diversos sistemas de segundos mensajeros (Watson, 1990). El cambio en la concentración intracelular de estos compuestos podría suceder en forma pasiva por la modificación en su concentración, dada por la entrada o salida de agua de la célula.

3) Participación del citoesqueleto. Las proteínas que forman parte del citoesqueleto en particular las del citoesqueleto de membrana, pueden estar conectadas directamente a las proteínas membranales que participan en la regulación del volumen celular (Ziyadeh y col. 1992). Al producirse un cambio en la tensión de la membrana por el cambio en el volumen, los elementos del citoesqueleto podrían transmitir esta señal a las proteínas reguladoras del transporte de osmolitos.

#### MECANISMOS DE REGULACION DEL VOLUMEN CELULAR (DRV)

Aunque, como se mencionó, la regulación del volumen celular se presenta tanto en respuesta a un aumento como

a un decremento en el volumen, en el presente trabajo se examinó únicamente el proceso regulador activado por el aumento en el volumen, es decir el DRV.

Cuando una célula es expuesta a soluciones hiposmóticas, se observa inicialmente un aumento rápido en su volumen debido a la entrada de agua, seguido de una fase de recuperación lenta, durante la cual las células alcanzan un volumen cercano al original. Este proceso se debe principalmente a la salida de solutos intracelulares osmóticamente activos (osmolitos), con lo cual disminuye la presión osmótica intracelular y el contenido de agua en las células. Los solutos osmóticamente activos son aquellos que se encuentran, en solución en el citoplasma. Los solutos que son empleados por las células como osmolitos se pueden dividir en dos grupos:

- a) Iones inorgánicos, principalmente potasio, sodio y cloruro.
- b) Compuestos orgánicos pequeños .

#### *PARTICIPACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS EN EL PROCESO DE REGULACIÓN DE VOLUMEN*

Algunos compuestos orgánicos utilizados por la células con fines de control osmótico incluyen la urea, los aminoácidos libres, compuestos cuaternarios de amonio, polialcoholes como

el sorbitol y el mio-inositol y metilaminas como la glicerofosforilcolina y la betaina. Los aminoácidos que participan en la regulación de volumen son la prolina, la alanina, el ácido aspártico, el ácido glutámico, la serina, el GABA, y la taurina. Entre los aminoácidos libres, la taurina es el más importante para una función osmoreguladora ya que se encuentra en concentraciones elevadas en la mayoría de las células animales, en las que representa una proporción considerable de la masa total de aminoácidos libres, contribuyendo de manera importante a la presión osmótica total. Además, siendo inerte desde un punto de vista metabólico, ya que no participa en la estructura primaria de proteínas, ni en ninguna reacción del metabolismo de la célula, permite que sus niveles celulares se puedan modificar con el fin de ajustar la presión osmótica interna, sin que las variaciones en su concentración intra o extracelular, alteren otras funciones celulares. Se ha demostrado en varios tipos celulares que el curso temporal de la liberación de taurina estimulada por soluciones hiposmóticas, es paralelo al proceso de regulación de volumen. La cantidad de taurina liberada es proporcional a la reducción osmolar del medio.

Los mecanismos de transporte de solutos orgánicos, activados por el cambio en volumen, podrían ser por una parte los transportadores dependientes de energía y por otra, mecanismos



de difusión del tipo de los canales a través de los cuales los solutos se mueven sólo siguiendo su gradiente de concentración. En relación con la taurina, que es el aminoácido cuya participación como osmolito se ha estudiado con más detalle, se favorece la posibilidad de que el mecanismo involucrado en su movilización en respuesta al cambio en volumen sea una vía difusional, más que el transportador. Existe evidencia experimental que sustenta esta propuesta. Por una parte está la independencia de sodio de la salida de taurina, al carecer de  $\text{Na}^+$  es una condición en la que el transportador está bloqueado. Por otra parte, están los experimentos que muestran que al aumentar el gradiente de concentración de la taurina, se modifica la dirección de su movilización. En condiciones similares a las fisiológicas, es decir cuando la concentración de taurina intracelular es mayor que la extracelular, al exponer a las células a condiciones hiposmóticas, el movimiento de taurina tiene lugar en favor de un gradiente de concentración, es decir, de dentro hacia afuera y los niveles de taurina endógena disminuyen en más de un 70%. Al ir aumentando la concentración extracelular de taurina a niveles cercanos a los endógenos, no se observa movimiento neto de taurina. Cuando el gradiente se invierte y las concentraciones extracelulares de taurina son mayores que las endógenas, al presentarse un aumento en el volumen celular

por las condiciones hiposmóticas, tiene lugar un movimiento de taurina en favor del gradiente de concentración con lo cual se observa una mayor concentración endógena de taurina. Estos resultados permiten afirmar que el mecanismo de movilización de taurina en respuesta al incremento en volumen celular causado por las condiciones hiposmóticas es un proceso difusional, controlado sólomente por la dirección del gradiente de concentración y no un mecanismo de transporte activo que trabaje en contra de un gradiente. En conjunto estas observaciones indican que puede tratarse de un poro, (canal o permeasa) sensible al aumento en el volumen celular. Estas características de la movilización de la taurina en respuesta al cambio en volumen son compartidas por la mayor parte de los aminoácidos y posiblemente también por otros osmolitos orgánicos como los polialcoholes.

*PARTICIPACION DE LOS IONES EN EL PROCESO DE REGULACION DE VOLUMEN (DRV)*

Los iones intracelulares K'y Cl- están activamente involucrados en el DRV, ya que la mayoría de las células que pueden regular su volumen responden al hinchamiento con una pérdida neta de K'y Cl', produciéndose así una salida obligada de agua dirigida por el gradiente osmótico. El mecanismo molecular responsable de esta pérdida de iones no es el mismo

en los distintos tipos celulares. En células epiteliales y en eritrocitos de aves, peces y mamíferos, el flujo iónico sensible a volumen es mediado por el cotransportador  $K^+/Cl^-$  eléctricamente neutro; en la mayoría de los otros tipos celulares que presentan DRV, el  $K^+$  y el  $Cl^-$  salen de la célula por medio de vías electrogénicas (canales). Los canales son poros proteicos incrustados en la membrana que permiten a los iones moverse en favor de un gradiente electroquímico. El mecanismo de salida de  $K^+$  y  $Cl^-$  intracelulares, determina el curso temporal de la recuperación de volumen en soluciones hiposmóticas. Cuando se encuentra involucrado el sistema de cotransporte, el proceso es lento, en el rango de horas; si se activan los sistemas de intercambio o canales, el proceso regulador de volumen se completa en general en una escala de minutos. La identificación de estos dos tipos de transporte de iones asociados a la regulación de volumen celular se ha llevado a cabo mediante el empleo de herramientas farmacológicas. Los cotransportadores se inhiben por compuestos como la furosemida y la bumetanida, que son bloqueadores con buena especificidad, en especial la bumetanida. En el caso de los canales, inicialmente se consideró que con el empleo de fármacos que inhiben a los canales iónicos ya conocidos tanto de potasio como de cloruro, y dependiendo de su eficacia para modificar el proceso de

regulación de volumen, se podría evaluar la contribución de estos canales a los procesos de regulación. Los fármacos más comunmente utilizados como inhibidores de canales de potasio son la quinidina, el bario, la 4-Amino piridina (4-AP) y el tetraetilamonio (TEA) y para el caso de los canales de cloro el 4,4'-diisothiocianostilben-2,2'-diasulfonato (DIDS), el dipiridamol, el 9-antraceno carboxilato (9-AC), el 5-nitro-2(3-fenilpropilamino)ácido benzoico (NPPB) y la 1,9-dideoxiforskolina (DDF). Sin embargo, se ha demostrado, primero que estos inhibidores no son completamente específicos y segundo que estos mismos fármacos inhiben significativamente el flujo de osmolitos orgánicos activados por el cambio en volumen ( Pasantes-Morales, y col.1990).

#### Canales de K<sup>+</sup>

La presencia de canales de potasio activados por volumen se ha detectado en numerosos tipos celulares incluyendo linfocitos, células epiteliales, astrocitos, células musculares y diversas líneas tumorales. Los canales de potasio activados por volumen son selectivos para el potasio ( y el Rb) por encima del sodio y otros cationes . En las células epiteliales los canales de potasio son dependientes de calcio mientras que en otros tipos celulares esta dependencia está controvertida. Los canales de potasio sensibles a volumen no se inhiben por compuestos que bloquean a los canales sensibles a voltaje ( bario, 4-AP y

TEA). Sin embargo sí se afectan por la quinidina .(Martin, y col. 1990).

Se han descrito canales de potasio sensibles a estiramiento también en células epiteliales, que se inhiben por el lantano y el gadolinio, que permiten el paso de calcio además de potasio, y que podrían corresponder a los canales involucrados en la regulación de volumen. Se ha propuesto que la función de estos canales de estiramiento es la de incrementar la concentración de calcio intracelular, lo que a su vez actuaría como señal de activación de las vías de transporte de los osmolitos. Sin embargo esta propuesta no sería válida como mecanismo para los varios tipos celulares en los que los canales de potasio y la regulación de volumen son independientes de calcio extracelular.

#### *CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS CANALES DE $Cl^-$ ACTIVADOS POR HINCHAMIENTO*

La caracterización electrofisiológica y farmacológica de los canales de cloro activados por cambios en el volumen celular se ha efectuado en diversas preparaciones. Las características de las corrientes de  $Cl^-$  activadas por hiposmolaridad en varios tipos celulares incluyen:

- a) Rectificación saliente.
- b) Una activación dependiente del tiempo a voltajes más positivos que 50-60mV

c) Una selectividad de estos canales con el siguiente orden de permeabilidad:  $I > NO_3 > Br > Cl$ .

d) Sensibilidad a bloqueadores de canales de cloro como el DIDS, el DPC, el dipiridamol, el NPPB y la DDF.

Varios tipos de canales de  $Cl^-$  se han identificado por su estructura molecular obtenida mediante clonación y expresión genética. Entre ellos se encuentran los siguientes:

#### *ClC-2.*

Se expresa como canal de  $Cl^-$  activado por osmolaridad extracelular. Los dominios necesarios para la activación tanto para voltaje como para volumen, se localizan en los grupos amino terminales. Este tipo de canal es ubicuo encontrándose en varios tejidos como el cerebro, el músculo, el pulmón y otros (Gründer, y col. 1992). Bajo condiciones isotónicas estos canales son activados por hiperpolarización con voltajes de  $-80mV$  a  $-90mV$ , por lo tanto su activación es muy pequeña; rectifica hacia fuera en estas condiciones.

#### *$I_{Cln}$*

Este es un canal de cloro clonado de la línea epitelial MDCK. Se ha localizado en varios tipos celulares como en tejido de pulmón, en la línea celular NIH3T3, en ovocitos y en células PC12. Se activa por voltajes positivos ( $>+40mV$ ) y su respuesta es idéntica a las corrientes que se presentan en el transporte

epitelial después del hinchamiento. Presentan corrientes pequeñas con características de rectificador externo. Este canal es sensible a fármacos inhibidores como el NPPB, la DDF y el DIDS. Su permeabilidad a los aniones con siguiente orden:  $SCN^- \gg I^- > Br^- > Cl^-$ , típica de los canales de cloro epiteliales y de los canales de cloro activados por hinchamiento. Una característica de este canal es que se inhibe por nucleótidos en el lado extracelular (GMPc, ITP, AMPc, GTP, ATP, ADP, AMP); también es sensible a la reducción del calcio intra o extracelular (Pusch, y Jentsch, 1994).

#### *Porina*

También conocido como canal de cloro dependiente de voltaje (VDAC), ha sido aislado primeramente de la membrana externa de la mitocondria de un gran número de organismos eucariontes. Se trata de un canal aniónico inespecífico que está involucrado en el movimiento de osmolitos hacia afuera de la membrana mitocondrial. Este canal no es exclusivo de las mitocodrias ya que ha sido detectado en la membrana plasmática de linfocitos humanos y en astrocitos donde se ha sugerido que participa activamente en los procesos de regulación de volumen. El canal se activa por despolarización en un rango de  $-30mV$ , pero permanece abierto sólo en un intervalo de voltaje muy estrecho que va de  $-30mV$  a  $+20mV$ .

### **Glicoproteína-P**

Recientemente se ha propuesto la posibilidad de que la glicoproteína- P (GP) podría funcionar como canal de Cl<sup>-</sup> activado por hinchamiento, participando así en el mecanismo de regulación del volumen celular. La GP es el producto del gen MDR1, el cual confiere resistencia a múltiples drogas anticancerosas que varían en su tamaño, estructura y sitio de acción, incluyendo las drogas usadas en quimioterapia como la adriamicina, la daunomicina, la actinomicina D, la vinblastina y la colchicina. La expresión y funcionamiento de la GP confiere a las células la resistencia a estas drogas. El mecanismo mediante el cual la GP expulsa los fármacos anticancerosos es la activación de su función como bomba hidrolizando ATP. La GP es una proteína de 170kda. Es un miembro de la superfamilia de transportadores ABC (ATP-binding cassette) y su estructura molecular muestra cuatro dominios, dos hidrofóbicos, los cuales atraviesan la membrana doce veces y dos dominios en los cuales se une el ATP. La GP se ha localizado en algunos tejidos normales como en las glándulas adrenales, pulmón, hígado, riñón, intestino y en tejidos tumorales como cáncer de colon, de riñón, de hígado y muchos otros.

Las evidencias que proponen a la GP como canal de cloro sensible a hiposmolaridad se basan en experimentos realizados

en una línea celular NIH3T3 de fibroblastos de ratón, los cuales no expresan dicha proteína. De acuerdo a los trabajos iniciales de Valverde y col. 1992 no se detectaban en estas células corrientes de cloro activadas por hiposmolaridad, y sólo al ser transfectadas con el gen MDR1 humano estos canales eran aparentes. Las características de estos canales expresados en las células transfectadas son semejantes a las de los canales de cloro activados por el volumen en otros tipos celulares, es decir con rectificación saliente, desactivación a voltajes positivos, impermeabilidad al gluconato y dependencia de ATP no hidrolizable. Estas corrientes son bloqueadas por agentes que inhiben la función de transporte de la bomba, con lo que se proporcionó evidencia de que son efectivamente un consecuencia de la expresión del MDR1. En trabajos subsecuentes de Valverde y col. y de otros grupos, la interpretación inicial de la ausencia del canal de cloro activado por volumen en células que no expresen la GP se modificó, señalando que el canal de cloro estaba presente aún en ausencia de la GP pero en menor proporción que en las células transfectadas y aparentemente con menor sensibilidad de respuesta al cambio del volumen celular. De acuerdo a esta hipótesis la GP podría estar actuando como una proteína bifuncional, es decir cuando hidroliza ATP funciona como bomba de expulsión de moléculas

hidrofobicas y cuando el ATP funciona como activador, sin ser hidrolizado, la proteina funciona como canal de cloro sensible a volumen (Gill y col.1992). Segun Valverde y col. estos dos mecanismos serian mutuamente excluyentes. Algunos trabajo publicados posteriormente sealan inconsistencias en la hipotesis de Valverde y col., ya que no se detecta un correlacion entre la expresion de la GP y la funcion del canal de cloro sensible a volumen. La investigacion crucial para resolver este problema controvertido, es decir, si las celulas que no expresan la GP como son las celulas NIH-3T3 nativas, sin ser transfectadas por el gen MDR1 presentan el proceso de regulacion de volumen no se ha realizado. Esta investigacion es el objetivo del presente trabajo.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **1. Cultivos**

Los cultivos se efectuaron a partir de la línea celular de fibroblastos de ratón NIH3T3, sembrados en cajas de Petri de 60 mm de diámetro. Estos cultivos se trataron con tripsina 0.01% para obtener una suspensión de células disociadas, la cuál se coloca en cajas de 60 mm de diámetro a una densidad de 1 millón de células por mililitro. Las células fueron crecidas en un medio de cultivo basal Eagle, el cual contiene 10% de suero de ternera y 1% de penicilina-estreptomicina. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub>/aire en una proporción de 5%:95%. Los cultivos se utilizaron después de dos días de haberse sembrado, ya que este es el tiempo óptimo para alcanzar una densidad alta y confluencia de las células.

### **2. Regulación de volumen**

Las medidas del volumen celular se realizaron en fibroblastos NIH3T3, sembrados en cajas de Petri de 60 mm de diámetro. Para dispersar las células de la monocapa se incubaron 1 min a 37°C en una solución salina de buffer de fosfatos (PBS) sin Ca<sup>++</sup> con EDTA 1mM y con tripsina 0.01%. Una vez separadas, se detuvo la acción enzimática de la tripsina al agregar a la suspensión el mismo volumen de medio de cultivo con suero. Esta nueva

suspensión se centrifugó 5 minutos a 1500rpm. Las células sedimentadas se resuspendieron en medio Krebs isosmótico. Se midió el volumen celular por medio de un contador Coulter (modelo 5f) acoplado a un analizador de partículas Coulter (modelo 256). Esta técnica consiste en el paso a través de un orificio de 100 $\mu$ M de diámetro de una suspensión de células junto con una corriente eléctrica. El paso de las células a través del orificio produce un cambio de impedancia determinado por el volumen de las células. Estos cambios son analizados por el aparato, lo que da información sobre el número de partículas y la distribución estadística del volumen de la población. El volumen promedio se calculó como la mediana de las curvas de distribución de cada muestra analizada (Grinstein et al, 1984). El volumen celular se registró en fentolitros, pero los resultados se expresaron como volumen relativo, es decir, el cambio de volumen en relación al registrado en un medio isosmótico.

### 3. Soluciones

La composición de medio Krebs isosmótico fue (en mM): NaCl, 135; KCl, 5; MgSO<sub>4</sub>, 0.6; CaCl<sub>2</sub>, 1; glucosa, 10; HEPES, 10, la osmolaridad calculada fue de 300mOsm/l de medio. El pH de la solución (7.4) se mantuvo sin variación en las diferentes soluciones y condiciones experimentales. La osmolaridad del medio se midió en un osmómetro de punto de congelación. Se

observó que el medio de cultivo es ligeramente hiperosmótico (310mOsm), y consecuentemente la composición del medio isomótico fue ajustada a la misma osmolaridad incrementando la concentración de NaCl (155mM).

Las soluciones hiposmóticas se prepararon reduciendo la concentración de NaCl de 10% a 50%. Para estudios sobre sustitución de cationes, el NaCl se sustituyó por cloruro de potasio, cloruro de rubidio, cloruro de litio, cloruro de colina, cloruro de glucosamina.

Para los estudios de la permeabilidad de aniones se sustituyeron 120mOsmolas de NaCl (60mM) por concentraciones equimolares de cloruro, nitrato, ioduro, tiocianato, acetato, benzoato o gluconato, todas como sales de potasio. Para estudiar la omisión de Cl, el KCl y el NaCl se sustituyeron por las correspondientes sales de gluconato.

Para examinar el efecto de la gramicidina (ionóforo de cationes), las células se expusieron a un medio 50% hiposmótico y un minuto después se les agregó gramicidina 10 $\mu$ M. Se continuó midiendo el volumen celular a los tiempos indicados. A las células control se les agregó el mismo vehículo (etanol) que a las experimentales. Para los experimentos con gramicidina el NaCl se reemplazó con cloruro de colina.

**Fármacos utilizados:**

**Inhibidores de canales de cloro:** el DIDS, la 1,9-dideoxiforskolina (100 y 50 $\mu$ M), el dipiridamol (100 y 150 $\mu$ M), el ácido niflúmico (300 y 600M), el DPC (1mM) y el 9-AC.

**Inhibidores de canales de potasio:** el bario (5mM), la 4-AP (1mM) y la quinidina (1mM).

**Ácidos grasos poliinsaturados:** el ácido araquidónico (5, 10 y 20 $\mu$ M), el ácido linolénico (10 y 20 $\mu$ M) y el ácido ricinoleico (20 $\mu$ M).

Para estudiar la dependencia de Ca<sup>++</sup>, el CaCl<sub>2</sub> se omitió y el medio fue suplementado con 0.5mM EGTA o BAPTA. También se examinó el efecto del verapamil (100, 250 y 500 $\mu$ M) y las dihidropiridinas como la nitrendipina (20 y 40 $\mu$ M), la nimodipina (50 $\mu$ M).

Las células control se trataron en paralelo con el mismo vehículo empleado para preparar las soluciones conteniendo las drogas examinadas.

Para estudiar la permeabilidad de los aminoácidos se sustituyó el NaCl del medio por concentraciones equimolares de estos compuestos.

**Determinación de aminoácidos libres.**

Los aminoácidos endógenos libres se determinaron en células NIH3T3 en cultivo por análisis de cromatografía líquida (HPLC).

Las células se homogeneizaron en 200 $\mu$ l de agua. Se tomaron

alícuotas del homogeneizado para la determinación de proteína y se adicionó un concentrado de ácido perclórico (calculado para tener una concentración final de 6% = 1.4N). La proteína se sedimentó por centrifugación en una microfuga, y el sobrenadante fue neutralizado con KOH, se centrifugó de nuevo y el botón se precipitó con perclorato de potasio. Los aminoácidos se midieron por medio de una reacción de derivación con O-phthaldialdehído y tres minutos después se inyectó 20 $\mu$ l de la mezcla en el equipo de cromatografía. Los aminoácidos se separaron en una columna ODS (25 cm x 4 mm de diámetro interno) de fase reversa y la detección fluorométrica en un fluorómetro acoplado al cromatógrafo. La fase móvil fue metanol:tetrahidrofurano (97:3)-buffer de acetato de sodio (pH 7.2, 0.1 M) y se corrieron las muestras a una velocidad de flujo de 1.5ml/min en un gradiente de 65 min, 10% a 90% metanol:tetrahidrofurano.

## *Resultados y Discusión*

### *Demostración de la falta de expresión de la GP en las células NIH-3T3.*

Cuando las células, ya sean normales o tumorales, no tienen la GP son incapaces de desarrollarse en medios que contienen fármacos tales como la colchicina, la vinblastina y otros utilizados en quimioterapia, mientras que sobreviven y se multiplican cuando sí expresan la GP. Las células NIH-3T3 utilizadas en este trabajo no crecieron en presencia de colchicina a una concentración de 10ng/ml, en la cual las células conteniendo la GP se desarrollan perfectamente. Otra prueba de la ausencia de la GP en las células con las que trabajamos es el resultado negativo de la reacción inmunohistoquímica con el anticuerpo monoclonal C219 que reconoce a la GP. (no se muestra)

### *Regulación de volumen en las células NIH-3T3.*

El volumen de las células NIH-3T3 en un medio isosmótico es de 1.88 fentolitros. Cuando las células NIH-3T3 son expuestas a medios de osmolaridad reducida entre un 10 y un 50 %, se observa inicialmente un rápido aumento en el volumen celular, proporcional al decremento en la osmolaridad, y que representa la entrada pasiva de agua en presencia del nuevo gradiente osmótico impuesto. En soluciones hiposmóticas al 50%, el

volumen de las células aumenta más del 70%; al reducir la osmolaridad un 30% el volumen aumenta 32%. Con decrementos en la osmolaridad del 10 y el 20% se detecta todavía un claro aumento en el volumen celular del 21% y el 22 % respectivamente (Fig. 1). Esta fase de incremento del volumen celular es muy rápida, lo que refleja la permeabilidad de la membrana al agua. El máximo incremento en el volumen se observa ya en el primer minuto en las células expuestas a la solución hiposmótica. Después de esta fase inicial de hinchamiento, se inicia el decremento regulador del volumen (DRV), durante el cual el volumen de las células va a decrecer hasta niveles cercanos al volumen original. Como se observa en la Fig. 1, las células NIH-3T3 tienen la capacidad de regular su volumen en forma eficiente, particularmente en respuesta a decrementos moderados en la osmolaridad. En las soluciones en las que se redujo la osmolaridad 10, 20 y 30%, la recuperación del volumen celular fue completa. La eficiencia del proceso regulador en soluciones con el 50% de osmolaridad fue del 76% (Fig. 1). Estos resultados indican que las células NIH-3T3 son capaces de regular su volumen en forma activa, aunque persistan las condiciones hiposmóticas, aún en ausencia de la GP. Estas observaciones contradicen la propuesta de Valverde y col. en el sentido que la GP es el canal de cloro responsable de la regulación del volumen. Otros resultados, con distintos enfoques experimentales

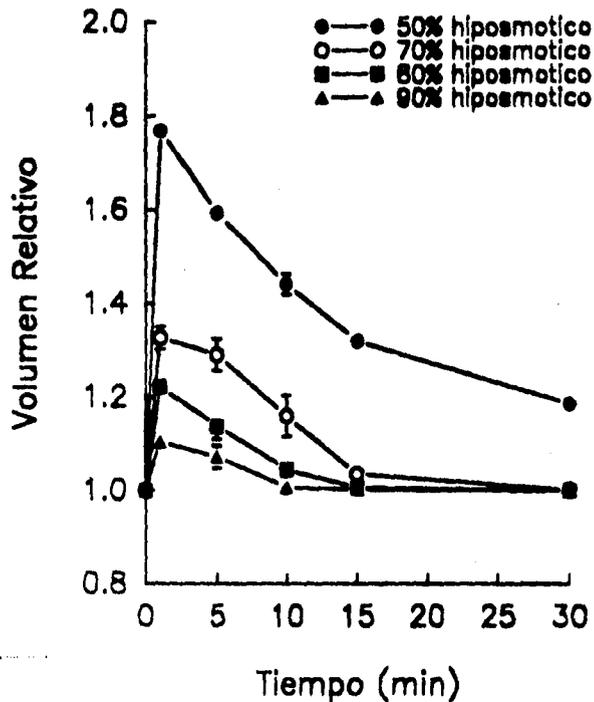


Fig.1  
 Decremento regulador del volumen en células NIH3T3 expuestas a medios con diferentes osmolaridades. Las medidas del volumen se realizaron como se describe en los métodos, utilizando un contador de células Coulter (modelo SF) acoplado a un analizador de partículas Coulter (modelo 256). Las células se expusieron a medios hiposmóticos en los que se les redujo el NaCl de manera que tuvieron 50%, 70%, 80% y 90% de la osmolaridad normal (310Osm). Los resultados se expresan como volumen relativo, es decir, el incremento en volumen sobre el valor del volumen en medio isosmótico. Los valores son medias ± ES de 4 - 20 experimentos.

conuerdan con el nuestro en el sentido de que no sustentan la propuesta del requerimiento de la GP para el DRV. Así, en las células de cáncer de colon T84 se ha encontrado que no existe una correlación entre la expresión de la GP y la función de los canales de cloro activados por volumen. En la misma dirección pero con un enfoque distinto Altenberg, y col. 1994 encontraron que las líneas de cáncer de mama MCF-7 y LZ-8 que expresan la GP, son incapaces de regular su volumen por la carencia de un canal de cloro activado por hinchamiento.

Puesto que las células NIH-3T3 pertenecientes a la línea nativa que no expresa la GP son capaces de regular su volumen de una forma muy eficiente, debe concluirse que dichas células tienen otros mecanismos de transporte de osmolitos que les permiten disipar el gradiente osmótico que se establece en soluciones de baja osmolaridad. Los experimentos y estudios que a continuación se describen fueron hechos con intención de caracterizar las vías de transporte de los osmolitos responsables del proceso regulador del volumen en las células NIH-3T3.

#### *Permeabilidad al sodio y al cloro*

El DRV en las células NIH-3T3 tiene lugar prácticamente sin modificaciones aún cuando las células estén expuestas durante 10 minutos a un medio sin cloro en condiciones isosmóticas. Esta observación sugiere que la permeabilidad al cloro de la membrana

de las células NIH-3T3 es muy baja en condiciones isosmóticas ya que de lo contrario se esperaría que las células, al quedar depletadas de cloro intracelular no estarían capacitadas para regular su volumen, ya que el cloro es un osmolito que funciona de una manera preponderante en el DRV. Otra observación que sustenta es consideración es que las células no cambian su volumen notablemente en presencia de gramicidina en condiciones isosmóticas. La gramicidina es un ionóforo de cationes, que en ausencia de sodio, va a movilizar al potasio en favor de su gradiente de concentración. Si la permeabilidad de la membrana al cloro en estas condiciones es alta, se esperaría que la salida masiva de KCl de las células junto con el agua osmótica, produciría un decremento significativo en el volumen celular. La Fig. 2 muestra el resultado de un experimento como éste en las células NIH-3T3 en las que no se observó una disminución en el volumen celular en condiciones isosmóticas indicando que la salida de potasio a través de la vía de transporte abierta por la gramicidina está notablemente restringida por la impermeabilidad del anión acompañante (cloro) que debe movilizarse para mantener la electroneutralidad. Los resultados de estos dos experimentos indican que la permeabilidad al cloro en las células NIH-3T3 es muy baja en condiciones isosmóticas. Esta situación cambia en forma muy marcada al incrementar el volumen de las células como consecuencia del estímulo

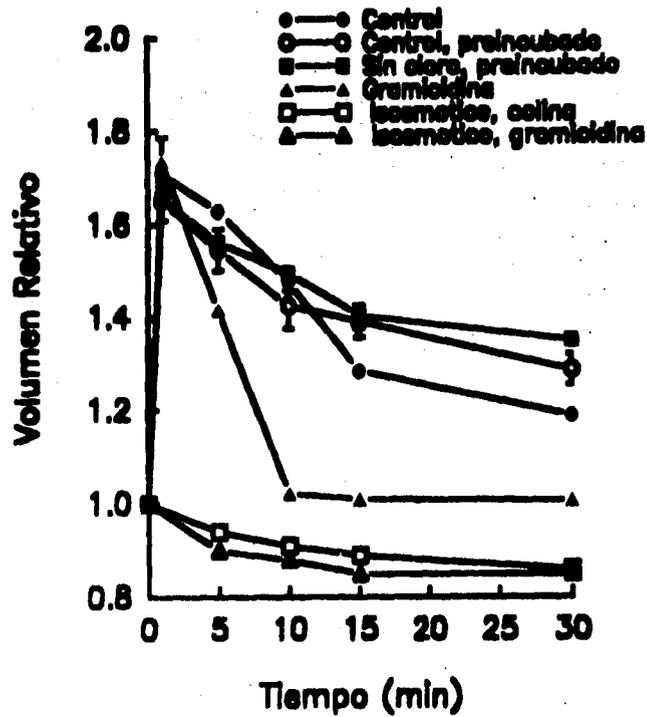


Fig.2  
 Efecto de la gramicidina sobre el DRV. El procedimiento para la medida del volumen es como se describe en la Fig.1, pero inmediatamente después del primer minuto, se adicionó gramicidina (10 $\mu$ M) en las células en suspensión y los experimentos siguieron el mismo proceso que los controles. Los resultados son expresados como volumen relativo y los valores son medias  $\pm$  ES de 4 a 6 experimentos.

hiposmótico. Al agregar la gramicidina al momento del máximo incremento en volumen, se observa una aceleración muy notable en el DRV. Esto indica que en condiciones hiposmóticas, la permeabilidad de la membrana al cloro de las células NIH-3T3 aumenta de tal manera que ahora es la permeabilidad al potasio el factor limitante para la velocidad del proceso de regulación del volumen. Por lo tanto, al abrir con la gramicidina una vía irrestricta a la salida del potasio, ante una permeabilidad muy alta de la membrana al cloro, se acelera la regulación del volumen como se muestra en la Fig. 2. Estos resultados hacen énfasis en la importancia del canal aniónico en el proceso regulador.

*Caracterización de la permeabilidad de los canales aniónico y catiónico activados durante el DRV.*

Para examinar la permeabilidad y la selectividad de los canales catiónico y aniónico que participan en la regulación del volumen, se tomó como base la observación de Grinstein y col. en el linfocito, que muestra que al incrementar las concentraciones del potasio extracelular por encima de su concentración intracelular, al abrirse la vía de permeabilidad como consecuencia del cambio en el volumen, el potasio se moviliza de acuerdo a su gradiente de concentración, y entra a las células, junto con cloro como anión acompañante y el agua osmóticamente

obligada. Con esto se contrarresta la salida de osmolitos intracelulares y se inhibe la regulación del volumen. De acuerdo a estas consideraciones, cuando el gradiente de un compuesto que puede o no funcionar como osmolito, si éste es permeable a través de la vía de transporte que se abre durante el hinchamiento, va a entrar a la células inhibiendo el DRV. Entre más rápida sea su entrada, lo que en cierto modo indica una mayor permeabilidad, mayor será el efecto sobre el DRV. Cuando una sustancia no es permeable a través de esta vía, aún cuando se invierta su gradiente de concentración en el sentido de favorecer su entrada a la células, no se observará ningún efecto de esta manipulación experimental sobre el DRV.

Siguiendo este paradigma, en las células NIH-3T3 examinamos el efecto sobre del DRV de incrementar las concentraciones extracelulares de diferentes aniones y cationes, para medir de esta forma la selectividad de las vías de transporte sensibles a hiposmolaridad. La Fig. 3 muestra que, en forma semejante a la observada por Grinstein en los linfocitos, al reemplazar el NaCl por KCl o RbCl se inhibió por completo el DRV, observándose que el volumen de las células se incrementó aún por encima del máximo volumen observado durante la exposición al medio hiposmótico. Cuando el sodio se reemplazó por otros cationes como el litio y la N-metil-D-glucamina, se pudo observar que el DRV ocurrió en forma muy similar a la normal, es decir en

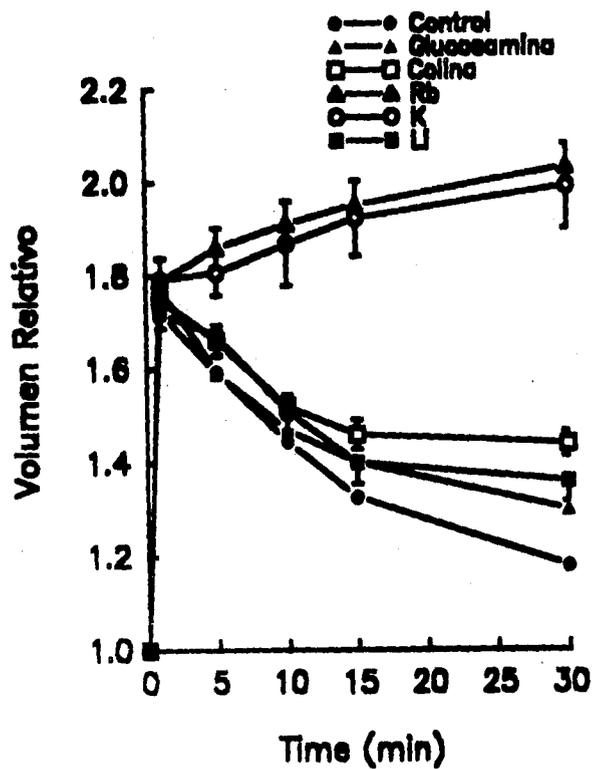


Fig.3  
 Efecto del remplazamiento de cationes sobre el DRV en células NIH3T3. El DRV se midió en medios hiposmóticos con 60mM de NaCl (control) el cual fue reemplazado por concentraciones equimolares de Li, colina, glucosamina, potasio o Rb todos como sales de potasio. Los resultados son expresados como volumen relativo. Los valores son medias  $\pm$  ES de 4 a 6 experimentos. Todos los resultados fueron significativamente diferentes del control por  $P < 0.001$ .

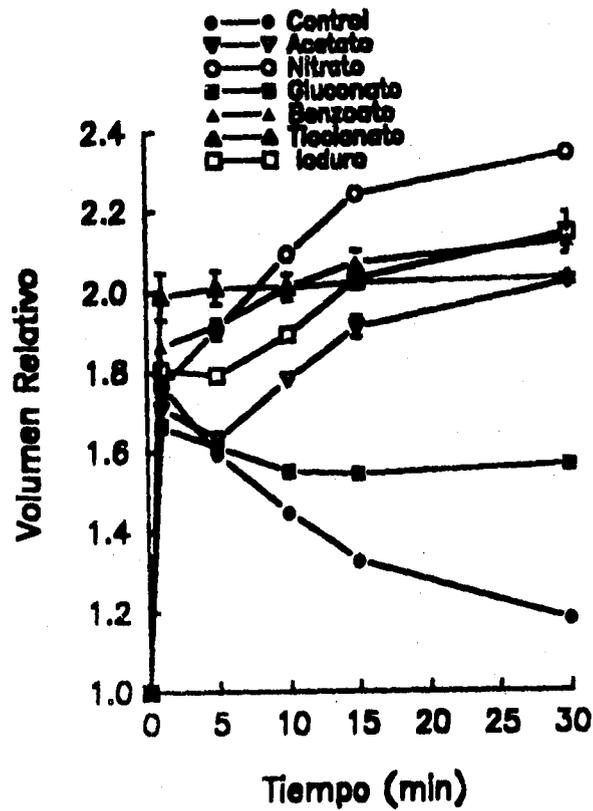


Fig.4  
 Efecto del reemplazamiento de aniones sobre el DRV en células NIH3T3. El DRV se midió en medios hiposmóticos con 60mM de NaCl (control) el cual fue reemplazado por concentraciones equimolares de las siguientes sales de potasio: como tiocianato, yoduro, benzoato, nitrato y gluconato. Los resultados son expresados como volumen relativo. Los valores son medias  $\pm$  ES de 4 a 8 experimentos.

presencia de sodio. Cuando el cation reemplazante fue la colina, se observó un decremento moderado en la eficiencia del DRV. Estos resultados indican que el canal catiónico es moderadamente permeable a la colina mientras que es impermeable al sodio, muy poco permeable al litio y a la N-metil-D-glucamina y libremente permeable al potasio y al rubidio (Fig. 3).

Cuando se llevó a cabo un experimento, similar pero reemplazando al cloro por una serie de aniones, se observó que el canal aniónico a diferencia del catiónico, es muy poco selectivo. La Fig. 4 muestra que al reemplazar al cloro por una serie de aniones, todos como sales de potasio, el decremento del DRV se inhibió en todos los casos excepto cuando el ion reemplazante fue el gluconato. De acuerdo a los resultados de la Fig. 4 el rango de permeabilidad de los aniones a través de la vía de transporte que se abre por hiposmolaridad es el siguiente:  $\text{NO}_3^- > \text{I}^- = \text{Benzoato} > \text{Acetato} > \text{Tiocianato} > \text{Cl}^- > \text{Gluconato}$ .

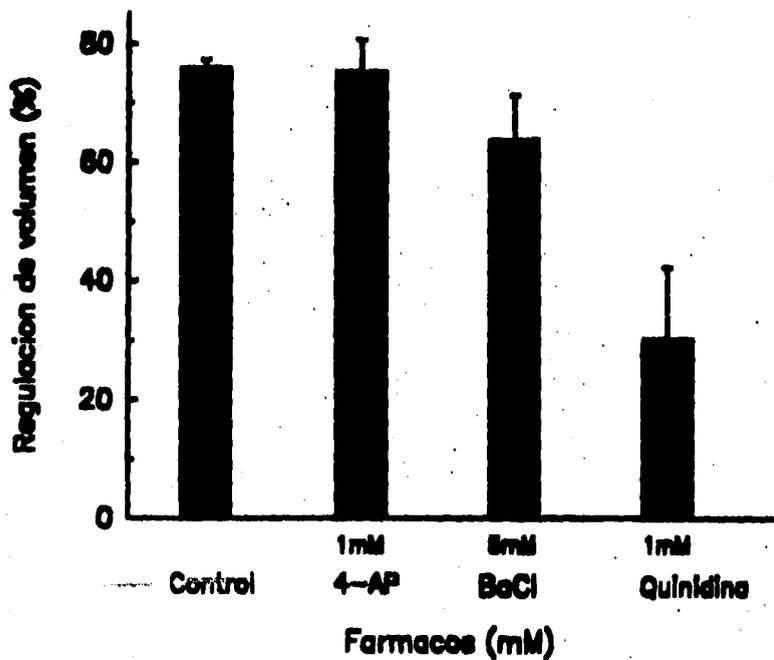
#### *Efecto de inhibidores de canales de cloro y potasio*

Con el objeto de caracterizar los canales de potasio y cloro involucrados en la regulación del volumen en las células NIH-3T3, investigamos el efecto de fármacos con un efecto inhibitor conocido sobre canales de potasio y canales de cloro.

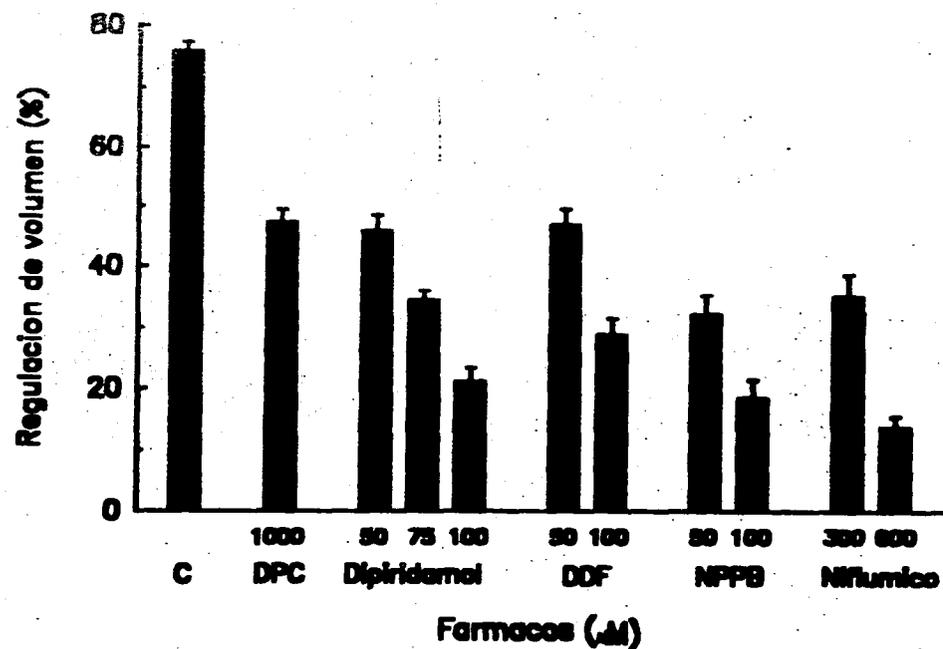
Los inhibidores de canales de potasio, bario, 4-AP y TEA, no modificaron el DRV, a concentraciones a las que funcionan

efectivamente como bloqueadores del transporte de potasio a través de otros canales (Fig. 5). El único inhibidor de canales de potasio que tuvo un efecto claro disminuyendo la eficiencia del DRV fue la quinidina. Este compuesto, a una concentración de 1mM redujo el DRV en 30.4% (Fig. 5). Estos resultados indican que la conductancia al potasio que se activa por hiposmolaridad no tiene las características farmacológicas de los canales de potasio conocidos, que son sensibles a los inhibidores que no tuvieron efecto sobre el DRV. Es posible, entonces que el canal de potasio involucrado en la regulación sea una canal distinto, aún por caracterizar.

En relación con los canales de cloro, examinamos el efecto de compuestos con una acción inhibidora general sobre la mayor parte de los canales de cloro descritos hasta ahora. Dos de estos fármacos, el ácido niflúmico y el dipiridamol son también inhibidores del intercambiador aniónico mientras que el DPC, el NPPB y la DDF, no parecen tener efectos distintos de los inhibidores de canales de cloro. El DDF y el NPPB a concentraciones de 100 $\mu$ M tuvieron un efecto inhibitor de la eficiencia del DRV de aproximadamente 62% y 75% respectivamente. Esta inhibición no se incrementó al aumentar la concentración de los fármacos. En este sentido el ácido niflúmico fue el inhibidor más potente, ya que a concentraciones relativamente elevadas (300 y 600 $\mu$ M) disminuyó la eficiencia del DRV hasta un



**Fig. 5**  
 Efecto de los inhibidores de canales de  $K^+$  sobre el DRV en células NIH3T3. Las células se preincubaron durante 5 min. en medio isosmótico con las concentraciones de los fármacos indicadas y el DRV se midió en medio hiposmótico 50% conteniendo la misma concentración de los fármacos. Las células control se trataron en paralelo con el mismo vehículo que las experimentales. Los resultados son expresados como el porcentaje de DRV que en los controles es de 76%. Los valores son medias  $\pm$  ES de 4 a 8 experimentos.



**Fig.6**  
**Efecto de los inhibidores de canales de Cl<sup>-</sup> sobre el DRV en células NIH3T3. Las células se preincubaron durante 5 min. en medio isosmótico con las concentraciones de los fármacos indicadas y el DRV se midió en medio hiposmótico 50% conteniendo la misma concentración de los fármacos. Las células control se trataron en paralelo usando el mismo vehículo que en los experimentales. Los resultados son expresados como porcentajes del DRV. Los valores son medias ± ES de 4 a 8 experimentos. Todos los resultados fueron significativamente diferentes del control por P < 0.001.**

80%. El dipiridamol 72%, el DPC fue el inhibidor más débil, reduciendo la eficiencia del DRV aproximadamente en 38%. (Fig. 6) El efecto inhibitor de estos fármacos no se revirtió en presencia de granicidina lo que indica que se está ejerciendo efectivamente sobre la conductancia al cloro y no sobre la del potasio.

La inhibición observada en presencia de todos estos fármacos coincide con la reportada para otros canales de cloro activados por hiposmolaridad a los que se hizo referencia en la introducción como el ClC-2, el Igen, el CFTR. Estos inhibidores también bloquean la función de canal activado por hiposmolaridad en las células MIN-3T3 transfectadas con el gen MDR1 cuando se mide con técnicas electrofisiológicas.

#### *Inhibición del DRV por ácidos grasos poliinsaturados.*

Se ha considerado que el ácido araquidónico podría ser un mensajero en la transducción de la señal del cambio en volumen y la activación de los canales iónicos responsables del proceso regulador. Esta hipótesis fue considerada en un trabajo previo de nuestro laboratorio en el que estudiamos el efecto del ácido araquidónico y otros ácidos grasos poliinsaturados sobre el DRV en astrocitos en cultivo (Sanchez, y col. 1995). En este trabajo encontramos, que efectivamente estos compuestos tienen un efecto inhibitor muy potente sobre el DRV. Este efecto está restringido a los ácidos poliinsaturados ya que el ácido oleico

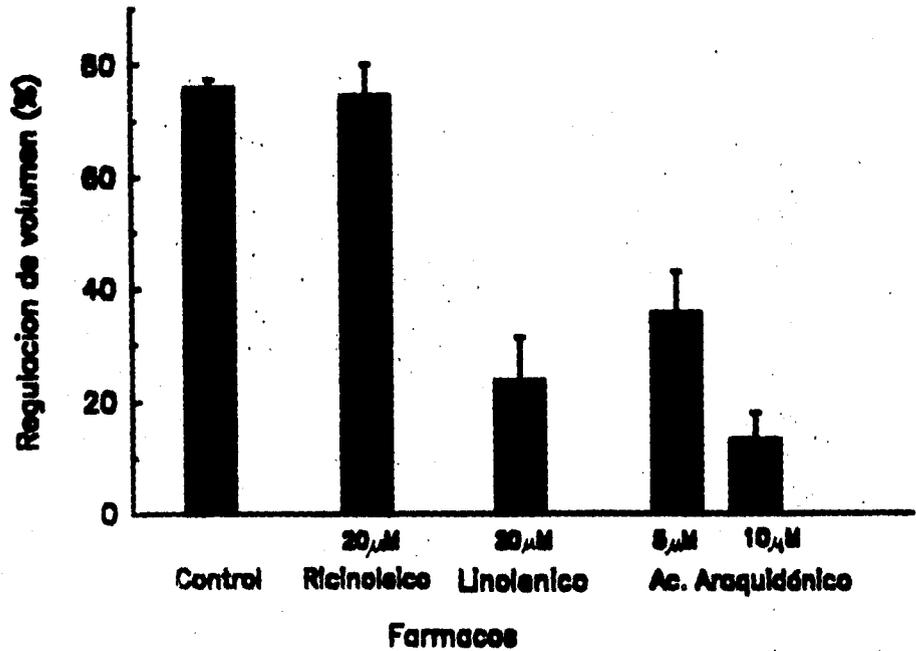


Fig.7 Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados sobre el DRV en células NIH3T3. Las células se preincubaron durante 5 min. en medio isosmótico con las concentraciones de los fármacos indicadas y el DRV se midió en medio hiposmótico 50% conteniendo la misma concentración de los fármacos. Los resultados son expresados como porcentaje de DRV. Todos los resultados fueron significativamente diferentes del control por  $P < 0.001$ .

(monoinsaturado), el ácido ricinoleico y el ácido araquídico (saturados) no tienen este efecto inhibitor. En ese trabajo demostramos que el efecto del ácido araquídónico no está relacionado a través de alguna de las vías metabólicas descritas para este compuesto ya que la inhibición de las tres principales vías de degradación del ácido araquídónico no revirtió el efecto inhibitor. Por ello se postuló que estos ácidos grasos están actuando directamente sobre los canales. De forma semejante a como observamos en los astrocitos, los ácidos grasos poliinsaturados tuvieron también un notable efecto inhibitor sobre el DRV en las células NIH3T3 ( Fig. 7). Al igual que en el caso de los astrocitos sólo los ácidos grasos poliinsaturados son los inhibidores eficaces del proceso de regulación de volumen. El mecanismo a través del cual estos compuestos actúan esta aún sin aclarar.

#### *Dependencia del calcio del DRV*

El DRV en las células NIH3T3 es independiente de la presencia de calcio extracelular como se muestra en la Tabla 1. Cuando la regulación del volumen se mide en un medio que no contiene calcio, en presencia de los quelantes EGTA y BAPTA, la eficiencia del DRV no se modificó. Para evaluar la posible participación del calcio intracelular se utilizó el BAPTA-AM, derivado esterificado del BAPTA, que es permeable a través de la membrana, y que una vez en el espacio extracelular es convertido

**Tabla 1. Efecto de la omisión del calcio y los inhibidores de canales de calcio sobre el DRV en células NIH3T3.**

	DRV %
Control	68.3 ± 5.2
Sin calcio, EGTA 0.5mM	64.9 ± 3.4
Sin calcio, BAPTA 0.5mM	67.8 ± 5.3
Nimodipina 50µM	18.4 ± 3.7
Nimodipina 50µM sin calcio	17.7 ± 1.9
Verapamil 100µM	61.8 ± 2.3
Verapamil 250µM	54.2 ± 4.0
Verapamil 500µM	53.6 ± 3.4

**Tabla 2. Concentración de aminoácidos libres en las células NIH3T3 en condiciones normales.**

Glicina	17.2mM
β-Alanina	2.1mM
GABA	1.4mM
Glutamina	2.8mM
Taurina	5.1mM
Valina	1.9mM
Alanina	4.2mM

por las esterases en BAPTA, con la misma acción quelante. Los trabajos de Valverde y de otros reportan que el verapamil, un inhibidor general de canales de calcio sensibles a voltaje es un potente inhibidor de los canales de cloro expresados en las células NIH-3T3 trasfectadas. Esta afirmación fue puesta en duda en otros trabajos en los que este supuesto efecto inhibidor del verapamil no fue observado. En nuestro sistema, el verapamil en las concentraciones reportadas por Valverde (100 $\mu$ M) y aún en concentraciones más altas, sólo tuvo un efecto inhibidor débil reduciendo la eficiencia del DRV en 61.8%. Las dihidropiridinas, compuestos con un efecto bloqueador sobre los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L, tienen también un efecto inhibidor sobre el DRV pero este efecto es independiente de su acción nivel de los canales de calcio y del calcio extracelular ya que el mismo efecto inhibidor se observa en presencia o ausencia de calcio (Tabla 1).

*Participación de los aminoácidos libres en el DRV en células NIH-3T3*

Los aminoácidos libres actúan como osmolitos y participan en esa forma en el proceso de regulación de volumen en casi todas las células animales. En este trabajo se midió la concentración de aminoácidos libres en las células NIH-3T3 y se examinó la permeabilidad de las vías de transporte que se abren

como respuesta en el cambio en volumen a los aminoácidos con mayor concentración en los fibroblastos. La Tabla 2 muestra las concentraciones de los aminoácidos libres en las células NIH-3T3. Los aminoácidos más abundantes fueron la alanina, la  $\beta$ -alanina, la glicina, la glutamina y la taurina. En conjunto la concentración de estos aminoácidos es de 37mM, y representan el 4% de la masa total de aminoácidos libres de las células. En investigaciones aún no publicadas de nuestro laboratorio, hemos demostrado que estos aminoácidos se liberan de las células NIH-3T3 en respuesta a la estimulación osmótica, y en cantidades que están en función de la magnitud del decremento en la osmolaridad. Con el objetivo de conocer la permeabilidad relativa de estos aminoácidos, utilizamos el mismo paradigma experimental empleado para investigar la selectividad de los canales aniónicos y catiónicos, es decir, incrementar la concentración extracelular de los aminoácidos y observar el efecto de esta maniobra sobre el DRV. De acuerdo a este procedimiento, como ya se mencionó, cuando los aminoácidos sean libremente permables a través de la vía de permeabilidad abierta por el cambio en volumen, el gradiente de concentración impuesto va hacer que se acumulen en las células y contrarresten la salida de los omolitos celulares, inhibiendo así la regulación de volumen. La Fig. 8 ilustra los experimentos que muestran que los aminoácidos más abundantes en las células NIH-3T3 son

también los más permeables a través de la vía abierta por el cambio en volumen. El rango de permeabilidad fue Gly> Ala> Tau> GABA> Glutamina. Estos resultados indican que los aminoácidos libres pueden contribuir moderadamente al procesos regulador en las células NIH-3T3, junto con el potasio y cloro.

Los resultados de este trabajo no sustentan la hipótesis de que la GP tenga en sí misma la función de canal de cloro sensible a volumen. Tampoco fundamentan la sugerencia de Valverde y col. de que este canal de cloro era más sensible en las células que contienen la GP. En este trabajo demostramos las características del canal de cloro que participa en la regulación del volumen en las células NIH3T3, son similares desde el punto de vista farmacológico y de su selectividad aniónica, a las que se han encontrado en todos los otros tipos celulares que regulan su volumen movilizándolo el cloro a través de una vía conductiva. Es posible que algunos de los canales clonados hasta la fecha sea el que participe de manera predominante en la regulación de volumen, ya que se han descrito que varios tipos de estos canales de cloro sensibles a hiposmolaridad. No se puede excluir tampoco la posibilidad de que haya un tipo de canal de cloro en algunas células y otro diferente en otras o aún que en un mismo tipo celular se expresen y sean funcionales distintos tipos de canales de cloro, todos vinculados con la regulación del volumen.

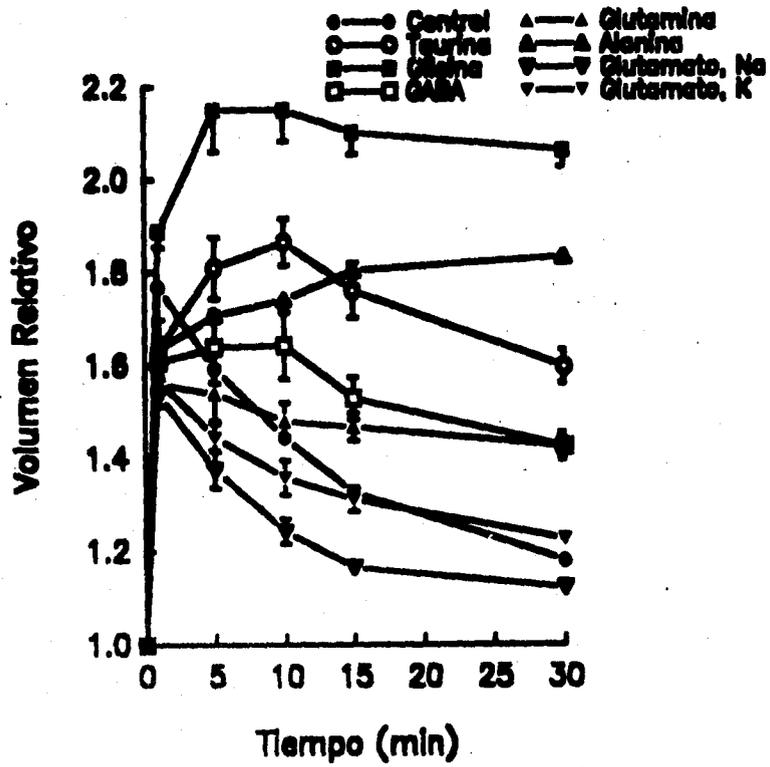


Fig.8 Efecto del incremento de la concentración extracelular de los aminoácidos sobre el DRV en células MIN3T3. El DRV se midió en medio hiposmótico 50%, en el cual se reemplazó el NaCl (45mM) control por una concentración de 90mM los aminoácidos neutros y 45mM para Glutamato de K o de Na. Los resultados son expresados como volumen relativo. Los valores son medias  $\pm$  ES de 4 a 8 experimentos.

La conclusiones de este trabajo son:

1- En esta investigación se demostró por primera vez que las células NIH-3T3 pertenecientes a la línea nativa que no expresan la GP, son capaces de regular su volumen en forma muy eficiente. Esto indica que dichas células tienen otros mecanismo de transporte de osmolitos que les permiten disipar el gradiente osmótico que se establece en soluciones de baja osmolaridad

2- Durante el proceso de regulación de volumen en las células NIH-3T3 el  $K^+$  y el  $Cl^-$  se movilizan a través de canales iónicos separados pero interdependientes.

3- Las características de estos canales estudiadas en este trabajo con un enfoque farmacológico, indican que son semejantes a los de otras células animales independientemente de la presencia o ausencia de la GP.

4- El DRV en las células NIH-3T3 es un proceso independiente del calcio extracelular como ocurre en otros tipos celulares.

5- Los aminoácidos libres presentes en concentraciones del orden de 40mM en las células NIH-3T3 probablemente participan en el DRV, de nuevo en forma similar a como ocurre en células que pueden o no expresar la GP.

**REFERENCIAS.**

1.- Olson, J.B. Goldfinger, M.D. 1990. Amino acid content of rat cerebral astrocytes adapted to hyperosmotic medium in vitro. *J. Neurosci. Res.* 27:241-246.

2.- Christensen, O. 1987. Mediation of cell volume regulation by Ca influx through stretch-activated channels. *Nature* 330:66-68.

3.- Uhl, J., Murer, H. Kolb, H.A. 1988. Ion channels activated by osmotic and mechanical stress in membranes of opossum kidney cells. *J. Membr. Biol.* 104:223-232.

4.- Morris, C.E., Sigurson, W.J. 1989. Stretch-inactivated ion channels coexist. *Science* 243:807-809.

5.- Lauf, P.K. 1982. Evidence for chloride dependent potassium and water transport induced by hyposmotic stress in erythrocytes of the marine teleost, *Opsanus tau*. *J. Comp. Physiol.* 146:9-16.

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

7.- Hoffman, E.K. 1987. Volume regulation in cultured cells. *Curr. Top. Membr. Transp.* 30:125-180.

8.- Hoffman, E.K., Simonsen, L.O. 1989. Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells. *Physiol. Rev.* 69:315-382.

9.- Awapara, J. 1955. Taurine content of some animal organs. *Fed. Pro.* 14:175.

10.- Ballatory, N., Boyer, J.L. 1992. Taurine transport in skate hepatocytes II. Volume activation, energy, and sulfhydryl dependence. *Am. J. Physiol.* 262:G451-460.

11.- Bandereli, U., Roy, G. 1992. Anion channels for amino acids in MDCK cells. *Am. J. Physiol.* 263:C1200-C1207.

12.- Cala, P.M. 1990. Principles of cell volume regulation. Ion flux pathways and the role of anions chloride channels and Carriers in Nerve, Muscle and Glial Cells (ed). F.J. Alvarez-Leafmans y John M. Russell. Plenum Press. 67-83.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

13.-Deutsch, S.C. Lee, 1988. Cell volume regulation in lymphocytes. Renal Physiol. Biochem.3-5:260-276.

14.-Krouse, M.E., Haws, M.C., Xia, Y., Fang, H.H. and Wine, J.J. 1994. Dissociation of Depolarization-activated and swelling-activated Cl channels. Am.J.Physiol.267:C642-C649.

15.-Carroll, P.T., Schwiebert, M.E. and Guggino, B.W. 1993. CFTR: Structure and Fuction. Cell Physiol.Biochem.3:388-399.

16.-Valverde, M.A., Díaz, F.V. Sepúlveda, D.R. Gill, S.C. Hyde, and C.F.Higgins. Volume-regulated chloride channels associated with the human multidrug-resistance P-glycoprotein. Nature Lond.355:830-833,1992.

17.-Gill, D.R., S.C.Hyde, C.F.Higgins, M.A. Valverde, G.M. Mintenig, F.V. Sepúlveda. Separation of drug transport and chloride channel functions of the human multidrug resistance P-glycoprotein.Cell 71:23-32,1992.

18.-Dias, M., M.A. Valverde, C.F. Higgins, C. Rucareanu, and F.V. Sepúlveda. Volume-activated chloride channels in HeLa cells are blocked by verapamil and diacetylforskolin. *Pflugers Arch.* 422:347-353, 1993.

19.-Bear, C.E. Drugs transported by P-glycoprotein inhibit a 40pS outwardly rectifying chloride channels. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 200:513-521, 1994.

20.-Luckie, D.D., Krouse, M.E., Harper, K.L., Law, T.C., and Wine, J.J. Selection for MDR1/P-glycoprotein enhances swelling-activated  $K^+$  and  $Cl^-$  currents in MDR1/3T3 cells. *Am. J. Physiol.* 267:C650-C658, 1994.

21.-Rasola, A., J.V. Galletta, D.C. Gruenert, and G. Romeo. Volume-sensitive chloride currents in four epithelial cell lines are not directly correlated to the expression of the MDR-1 gene. *J. Biol. Chem.* 269:1432-1436, 1994.

22.-McEwan, G.T.A., J. Hunter, B.H. Hirst and N.L. Simmons. Volume-activated  $Cl^-$  secretion and transepithelial vinblastine secretion mediated by P-glycoprotein are not correlated in cultured human  $T_8$  intestinal epithelial layers. *FEBS Lett.* 304:233-236, 1992.

23.-Viana, F., K. Vanacker, C. DeGreef, J. Eggermont, L. Raeymaekers, G. Droogmans, B. Nilius. Drug-transport and Volume-activated Chloride Channel Functions in Human Erythroleukemia Cells: Relation to Expression Level of P-Glycoprotein. *J. Membr. Biol.* 145:87-98, 1995.

24.-Altenberg, G.A., J.W. Deitner, D.C. Glass and L. Reuss. P-Glycoprotein-associated Cl<sup>-</sup> Currents are activated by cell swelling but do not contribute to cell volume regulation. *Cancer Res.* 54:618-622, 1994.

25.-DeGreef, C., J. Sehrer, F. Viana, K. Vanacker, J. Eggermont, L. Mertens, L. Raeymaekers, G. Droogmans and B. Nilius. Volume-activated chloride currents are not correlated with P-glycoprotein expression. *Biochem. J.* 307:713-718, 1995.

26.-Mintenić, G. M. , M. A. Valverde, F. V. Sepúlveda, D. R. Gill, S. C. Hyde, J. Kirk and C.F. Higgins. Specific inhibitors distinguish the chloride channel and drug transporter functions associated with the human multidrug resistance P-glycoprotein. *Receptors and Channels* 1:305-313, 1993.

- 27.-Altenberg, G.A., C.G. Vancoye, E.S. Han, J.W. Deitmer, and L. Reuss. Relationships between rhodamine 123 transport, cell volume, and ion channel function of P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 269:7145-7149, 1994.
- 28.-Juliano, R.L. and Ling, V. 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. et Biophys. Acta.* 455:152-162.
- 29.-Gründer, S., Thiemann, A., Fusch, M. and Jentsch, T. 1992. Regions involved in the opening of ClC-2 chloride channel by voltage and cell volume. *Nature.* 360:759-762.
- 30.-Ruetz, S. and Gros, P. 1994. A mechanism for P-glycoprotein action in multidrug resistance: are we there yet?. *TIPS.* 15:260-263.
- 31.-Juranka, P.F., Roman, L. Zastawny, and Ling V. 1989. P-glycoprotein: multidrug-resistance and a superfamily of membrane-associated transport proteins. *FASEB J.* 3:2583-2592.
- 32.-Rasola, A. Galletta, L.J., Gruenert, D.C. and Romeo, G. 1992. Ionic selectivity of volume-sensitive currents in human epithelial cells. *Biochim. et Biophys. Acta.* 1139:319-323.

33.-Endicott, J.A. and Ling, V. 1989. The Biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu. Rev. Biochem.* 58:137-171.

34.-Sarkadi, B. and Parker, J.C. 1991. Activation of ion transport pathways by changes in cell volume. *Biochim. et Biophys. Acta.* 1071:407-427.

35.-Valverde, M.A., Hardy, S.M. and Sepúlveda, F.V. 1995. Chloride channels: a state of flux. *FASEB J.* 9:509-515.

36.-Fusch, M. and Jentsch, T.J. 1994. Molecular physiology of voltage-gated chloride channels. *Physiol. Rev.* 74(4):813-827.

37.-Kirk, J. and Kirk, K. 1994. Inhibition of volume-activated  $I^+$  and Taurine efflux from HeLa cells by P-glycoprotein blockers correlates with calmodulin inhibition. *J. Biol. Chem.* 269(47):29389-29394.

38.-Gottesman, M.M. and Pastan I. 1988. Resistance to multiple chemotherapeutic agents in human cancer cells. *TIPS.* 8(2):54-58.

39.-Sardini, A., Mintening, G. M., Valverde, H.A.,  
Sepúlveda, F. V., Gill, S. C. Hyde, S.C., Higgins, C.F. and  
McNaughton, P.A. 1994. Drug efflux mediated by human multidrug  
resistance P-glycoprotein is inhibited by cell swelling.  
J.Cell.Sci. 107:3281-3290.