

154
20



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

LA ACTIVACIÓN DE LA PROTEÍNA-CINASA C (PKC) INHIBE AL
COTRANSPORTADOR ENDÓGENO DE $Na^+ : K^+ : 2Cl^-$ EN
OVOCITOS DE *Xenopus laevis*

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 :

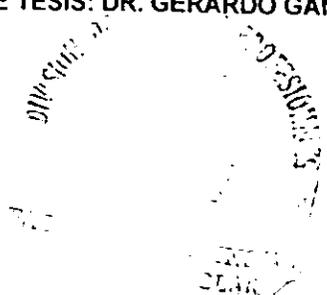
VERENA RUBIO GODOY

DIRECTOR DE TESIS: DR. GERARDO GAMBA AYALA

México, D.F.

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



25 8455



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 está 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
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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: La activación de la
proteín-kinasa C (PKC) inhibe al cotransportador endógeno de $Na^+K^+2Cl^-$
en ovocitos de Xenopus laevis."

realizado por la pasante RUBIO GODOY VERENA

con número de cuenta 9251680-3 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. GERARDO GAMBA AYALA

Propietario

Dra. NORMA ARACELI BOBADILLA SANDOVAL

Propietario

Dra. PATRICIA RAMOS MORALES

Suplente

Biol. ADRIANA PATRICIA MERCADO CABRERA

Suplente

Químico SILVESTRE DE JESUS ALABEZ ESPINO

FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Alejandro Martínez Mena
Coordinador de Licenciatura

*Este fluir de vino derramado
como sueño de lava que prospera;
este sentir el sueño transvasado,
y que el surco se vuele ola viajera.*

*Este ser, continente prolongado
en un mar para viajes sin ribera,
y palpase ya océano dilatado
por el área de un mundo sin frontera.*

*Este abrazo total, enamorado,
al planeta ya toda sementera,
es el sino del canto, río alado,*

*y su alegre incursión, mi primavera,
joven sueño de estío alucinado
que en la cuenca del gozo reverbera.*

Prof. Miguel Rubio Candelas

Agradecimientos.

**A mis padres Conchita, Miguel, Alvaro y Adriana
por todo su cariño, paciencia y apoyo.**

**A mis hermanos Miguel, Gabriela, Alvaro, Rogelio y Emilio
por compartir y apoyar todas mis aventuras.**

**A la memoria de mi queridísimo abuelo
Miguel Rubio Candelas.**

A mi asesor Gerardo Gamba,
por ser un ejemplo a seguir, por ser constante, por impulsar, por apoyar,
y por guiar los sueños de todos y cada uno de sus alumnos.

Por ser más que un tutor, un amigo.

¡GRACIAS!

A mis amigos,
Andor, Toy, Frank, Dennis, Ingrid,
Ale, Adri, Edith, Deyra, Melissa, Chela, Rodrigo, Galo,
Alejandro, Anabel, Toño, Rolex, Alf, Lety, Judith,
Margot, Kim, Therese, Pierrot,

A mis compañeros de laboratorio y amigos,
Paty, Gaby, Jorge, Niño Luis, Adri Monroy, Ale y Adri (nuevamente), Lety,
Y muy especialmente a Chelo, la "maistra", por su paciencia, dedicación y cariño.

...a todos ellos por dejarme entrar en sus vidas y formar parte de ellas.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
1) Transporte a través de la membrana	2
2) Regulación del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$	8
3) Transducción de señales	13
4) Existencia del cotransportador en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	20
HIPÓTESIS	22
OBJETIVO	23
MATERIALES Y MÉTODOS	23
Extracción y preparación de ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	24
Captación de $^{22}\text{Na}^+$ en ovocitos	27
Análisis estadístico	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
CONCLUSIÓN	41
REFERENCIAS	42

RESUMEN

Se determinó el efecto de la activación de la proteína-quinasa C (PKC) con ésteres de forbol sobre la actividad del cotransportador endógeno de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ en ovocitos de *Xenopus laevis*, que fueron incubados en distintos medios (con ésteres de forbol, inhibidores de la PKC y con bumetanida) y sometidos a la captación de $^{22}\text{Na}^+$. El cotransportador fue inhibido en un 90% (inhibición equiparable a la producida con bumetanida) cuando la PKC se activó con los ésteres de forbol como el forbol-12-mirato-13-acetato (TPA o PMA; 100 nM) y el forbol-12,13-dibutirato (PDBu; 100 nM) y se observó una parcial recuperación cuando se adicionó el inhibidor específico de la PKC bisindolilmaleimida (BSM; 100 nM). Para corroborar que el efecto observado se debe a la activación de la PKC, los ovocitos fueron incubados con un éster de forbol que no activa a la PKC conocido como 4α -forbol-12,13-didecanonato (4α PDD; 100 nM), y la captación de $^{22}\text{Na}^+$ fue la misma que la del grupo control. En base a esto, se postula que la PKC tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ sensible a bumetanida, siendo este efecto tiempo y dosis dependiente.

INTRODUCCIÓN

1) Transporte a través de la membrana

Los componentes más importantes de las membranas celulares (biológicas) son: a) los lípidos, de los que existen tres tipos principales; los fosfolípidos, los glicolípidos y el colesterol. Estos compuestos son de bajo peso molecular y anfífilos, por lo que forman bicapas de aproximadamente 6nm en las que las regiones polares están ordenadas hacia los medios acuosos (citosol y fluido extracelular) y las regiones no polares hacia el interior de la bicapa. En condiciones fisiológicas, la bicapa lipídica se mantiene en estado fluido, ya que esto es necesario para que no se interrumpa la función celular; b) las proteínas, que son los componentes más abundantes en las membranas celulares de mamíferos y son las responsables de sus funciones más especializadas. La mayoría de las proteínas membranales tienen estructura globular, y por su asociación con la membrana se dividen en periféricas e integrales que son las más estables en su unión con la membrana. Estas últimas tienen además la libertad de trasladarse en el plano de la membrana y de girar en torno a un eje perpendicular a dicho plano, sin embargo, mantienen su orientación y el grado de intercalación en la bicapa lipídica; y c) los carbohidratos, que rara vez representan más del 10% de la masa de las membranas en las células de mamíferos. Es probable que jueguen un papel importante en las funciones de la membrana, pero sólo se conoce su intervención en los procesos de reconocimiento celular ¹.

En 1972 S. J. Singer y G. L. Nicholson propusieron un modelo llamado de "mosaico fluido", según el cual las membranas son disoluciones bidimensionales de proteínas globulares y lípidos orientados. La disposición de los lípidos y las proteínas en la membrana son consecuencia de sus características moleculares, siendo la disposición energéticamente más estable, la más posible. Este modelo es congruente con las observaciones hechas al microscopio electrónico¹.

La bicapa lipídica es altamente impermeable a la mayoría de las moléculas polares por su interior hidrofóbico. Sin embargo, las células deben ingerir nutrientes esenciales y excretar desperdicios metabólicos, además de regular la concentración intracelular de iones¹, para lo cual se necesitan proteínas transportadoras de membrana que lleven al cabo la transferencia de tales solutos. Estas proteínas, que son transmembranales para evitar el contacto de los solutos polares con el interior hidrofóbico de la membrana, pueden ser de dos tipos principalmente: a) proteínas acarreadoras o transportadores, que sufren un cambio conformacional con la unión del soluto que será transportado y b) las proteínas canal, que forman poros acuosos a través de la membrana por los cuales entran los solutos².

La combinación de la permeabilidad selectiva y del transporte activo a través de la membrana es la responsable de que exista una diferencia en la composición iónica entre el citosol y el fluido extracelular. Esta diferencia permite a las membranas celulares almacenar energía potencial en forma de gradientes iónicos, que pueden ser utilizados para llevar al cabo varios procesos de transporte, para transmitir señales eléctricas y para producir energía química en forma de adenosina trifosfato (ATP)².

La tasa de difusión de las moléculas a través de la bicapa lipídica varía dependiendo principalmente de su tamaño y de su solubilidad relativa en los lípidos (disolventes no polares). La bicapa lipídica es altamente impermeable a cualquier molécula cargada sin importar su tamaño, pues la carga y el alto grado de hidratación de estas moléculas impiden su entrada en la fase hidrocarbónica de la bicapa lipídica².

Algunas proteínas acarreadoras y los canales permiten el paso de solutos a través de la membrana en forma pasiva (transporte pasivo o difusión facilitada) siguiendo un gradiente de concentración o un gradiente electroquímico (que es el gradiente de concentración actuando en forma conjunta con el potencial de membrana). Las membranas plasmáticas son negativas en el interior con relación al exterior, por lo que se facilita la entrada de iones positivos².

Las proteínas acarreadoras que bombean activamente solutos (transporte activo) están ligadas a fuentes de energía metabólica como la hidrólisis de ATP o gradientes iónicos y el transporte siempre es direccional. Cada proteína acarreadora tiene un lugar de unión específico para el soluto que transporta; esta unión puede ser bloqueada por inhibidores competitivos y no competitivos².

El transporte activo puede ser de dos tipos: a) primario, en el que la fuente de energía es la reacción de degradación de una sustancia a un estado de menor energía libre, como es el caso de la hidrólisis de ATP. Ejemplo de este tipo de transporte primario es la $\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa, que es la responsable de mantener el gradiente iónico de Na^+ y K^+ a través de la membrana; y b) secundario, cuya fuente de energía es una diferencia de potencial electroquímico generada por un

sistema primario de transporte activo¹, como son los intercambiadores de Cl^- : HCO_3^- y de $\text{Na}^+:\text{H}^+$ y los cotransportadores de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$.

Dentro del grupo de transporte activo secundario se encuentran los cotransportadores, que acarrean una molécula acoplada al ion que está siendo transportado a través de la membrana. Estos cotransportadores son

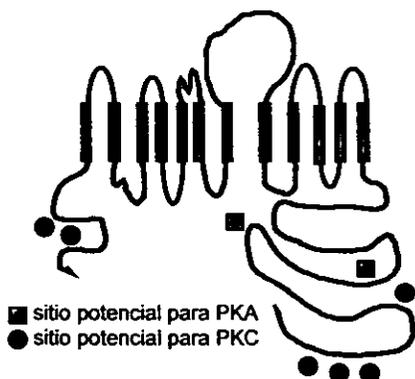


Figura 1. Estructura general de los cotransportadores electroneutros.

electroneutros cuando cada catión que es transportado va acompañado de un anión, por lo que no se producen cambios en el potencial transmembranal. Los cotransportadores Na-K-Cl son una clase de proteínas membranales que transportan iones Na^+ , K^+ y Cl^- hacia adentro y hacia afuera de las células en forma eléctricamente neutral, general-

mente con una estequiometría de 1Na^+ , 1K^+ y 2Cl^- . Recientemente se identificaron los mecanismos moleculares y funcionales de entrada electroneutra del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ (Figura 1) presentes en las membranas apicales de los segmentos distales de nefronas en riñones de mamíferos³, en las membranas basolaterales de muchas células no renales como los epitelios intestinales, de las vías aéreas, de las glándulas salinas⁴ y otros epitelios secretores, en algunos tejidos no epiteliales como el axón de calamar⁵, células de músculo liso, fibroblastos, osteoblastos, células T cultivadas, en células de Ehrlich⁶, en células sanguíneas de humanos y aves⁷, en la línea celular T84 del carcinoma humano de colon⁸ y en ovocitos de la rana *Xenopus laevis* ^(8,9). En los epitelios, los

cotransportadores de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ actúan en coordinación con otros mecanismos de transporte, incluyendo a los canales de Cl^- y K^+ y a la bomba $\text{Na}^+:\text{K}^+$ ($\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa), para producir el transporte transepitelial de NaCl^{10} . Además, en células epiteliales y no epiteliales intervienen en el mantenimiento y regulación del volumen celular y de gradientes iónicos^{6,7} actuando en conjunto con otros procesos, como los intercambiadores de $\text{Na}^+:\text{H}^+$ y de $\text{Cl}^-:\text{HCO}_3^-$ y flujos pasivos de iones¹¹. Altamirano *et al* (1987¹²) demostraron que en las células excitables como el axón de calamar y los miocitos cardiacos, estos cotransportadores pueden estar involucrados en la regulación del gradiente iónico que determina el potencial de membrana. Probablemente el cotransportador esté también involucrado en la regulación del contenido de agua de algunas células durante su crecimiento y diferenciación. Otras funciones potenciales de los cotransportadores se han reportado, incluyendo un posible papel en la proliferación celular⁵.

En el riñón de mamífero, estos cotransportadores son la principal vía de reabsorción de Na^+ en el asa ascendente de Henle y en el túbulo distal y además representan los principales sitios de unión de diuréticos de asa (furosemida y bumetanida) y las tiazidas (clorotiazida, hidroclorotiazida y metolazona)^{3,13}, medicamentos ampliamente utilizados en la terapia de enfermedades como la hipertensión arterial o la retención de líquido relacionada con la insuficiencia cardíaca congestiva venosa, la cirrosis hepática o el síndrome nefrótico.

La figura 2 muestra un árbol filogenético que describe la similitud de los cotransportadores electroneutros a nivel génico en distintos subtipos de vertebrados e invertebrados. Con base en esa similitud, la familia de los cotransportadores puede ser dividida en cuatro grupos: 1) el grupo del

cotransportador apical de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ sensible a tiazidas (CST) que está presente en la vejiga urinaria de teleosteos y en el túbulo distal de rata y de humano; 2) el grupo del cotransportador apical de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ sensible a bumetanida (CSB) que está presente en el asa ascendente de Henle en riñón de rata, ratón, conejo y humano; 3) el grupo del cotransportador basolateral de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ sensible a bumetanida (CSB) que se localiza en la glándula rectal de tiburón, en las células T84 de colon humano⁸ y finalmente, 4) el grupo del cotransportador basolateral de $\text{K}^+:\text{Cl}^-$ en conejo, rata y humano. Estos cotransportadores, a pesar de tener diferencias funcionales y farmacológicas, evolucionaron a partir de un gen ancestral común³. La alta similitud entre los grupos, sin embargo, se conserva.

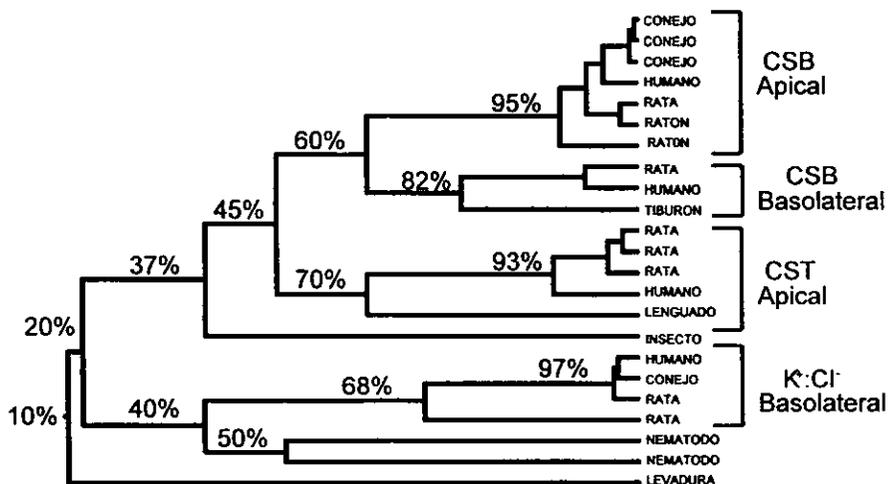


Figura 2. Árbol filogenético de la familia de cotransportadores electroneutros de Na-(K)-Cl

Los cotransportadores de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ fueron identificados y caracterizados funcionalmente usando varias técnicas como el marcaje radioactivo con $[\text{H}^3]$ bumetanida en eritrocitos de aves^{14,24} y de pato^{15,16,23} y en las vías aéreas de perro²², así como la expresión funcional en ovocitos de la rana *Xenopus laevis*^{17,18}, y en forma molecular por la comparación de secuencias de aminoácidos (figura 2)^{19,20}.

El análisis de secuencias muestra que los cotransportadores tienen una topología similar que consiste de 12 segmentos transmembrana y de dos dominios amino y carboxi-terminales largos (pero de longitud variable, ver figura 1) que se cree que son citosólicos. Las asas entre los segmentos transmembrana 7 y 8 contienen un número variable de sitios potenciales de N-glicosilación, lo que sugiere que los cotransportadores son glicosilados. Las regiones transmembrana y el extremo carboxi-terminal son muy similares entre varios miembros de la familia, mientras que las asas entre las regiones transmembrana y el extremo amino-terminal muestran poca identidad de aminoácidos. Se han identificado en estas proteínas un número variable de sitios potenciales de fosforilación (ver figura 1) por las proteína-quinasas A (PKA) y C (PKC)³, por lo que se postula que la regulación del cotransportador es mediada, por lo menos en algunos casos, por la fosforilación directa de la proteína⁵.

2) Regulación del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$

La regulación de este sistema de cotransporte es compleja y varía considerablemente entre los diferentes tejidos. La actividad del cotransporte de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ en muchos tipos celulares requiere de la presencia de ATP

intracelular, lo que sugiere que el cotransporte puede estar regulado, por lo menos en algunos tejidos, por la fosforilación de proteínas reguladoras o incluso del cotransportador mismo. Desde 1980, Palfrey *et al*²¹ hicieron estudios para investigar la relación existente entre la fosforilación de proteínas y el transporte efectuado por el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ que puede ser estimulado por la presencia de catecolaminas y AMPc a través de la membrana. Se ha postulado que existen factores que estimulan el cotransporte de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ ya sea al incrementar el número de transportadores en la membrana celular, por el recambio de los transportadores, o bien por ambos factores¹³.

La tabla 1 muestra los diferentes tipos de regulación que se conocen para los cotransportadores electroneutros de varios tipos celulares. Diversos estímulos, como el volumen celular^(21,22), ácidos grasos (prostaglandina E2), factores de crecimiento (factor de crecimiento epidérmico y nervioso), y hormonas (norepinefrina^{23,24}, calcitonina, hormona paratiroidea, angiotensina II, vasopresina, péptido natriurético atrial, péptidos intestinales) modulan la actividad de los cotransportadores por cambios en los mensajeros intracelulares mediados por receptores que alteran la actividad de varias cinasas que a su vez afectan el estado de fosforilación de la proteína cotransportadora²⁵.

En general, se ha demostrado que la activación de la PKA estimula a los cotransportadores de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$, mientras que la activación de la PKC los inhibe²⁵. También existe evidencia de que la concentración intracelular de Cl^- puede modular directamente la actividad de los cotransportadores de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$
(26).

Tabla 1. Mecanismos de regulación del cotransporte de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ (25).

Estímulo	Mensajero	Efecto	Tipo celular
Volumen	PKC	activación	Ehrlich
	?	activación	Células endoteliales cerebrales de rata
	?	activación	Células PC12
PGE ₂	AMPc-PKA	activación	Osteoblastos
?	AMPc-PKA	activación	Glándula rectal de tiburón
Norepinefrina	AMPc-PKA	activación	Eritrocitos de pato
Carbachol	AMPc-PKA	activación	Ácido de la glándula labial humana
?	AMPc-PKA	activación	Glándula de la sal de aves
?	AMPc-PKA	activación	Células mesangiales de rata
Calcitonina	AMPc-PKA	activación	Asa ascendente de Henle
	AMPc-PKA	activación	NPCE fetal humano
-	PKC	activación	Células mesangiales de rata
-	PKC	inhibición	Células endoteliales de bovino
-	PKC	inhibición	Osteoblastos
-	PKC	inhibición	NPEC ciliar ocular
-	PKC	inhibición	PCEC fetal humano
-	PKC	inhibición	Células T84
	GMPc	activación	Células mesangiales de rata
ANP	GMPc	inhibición	Miocitos ventriculares de conejo
NGF	?	activación	Células PC12
Endotelina	?	activación	Células endoteliales cerebrales de rata
Angiotensina	Ca	activación	Células mesangiales de rata
Vasopresina	Ca	activación	Células endoteliales de bovino
Bradicinina	PhoC/Ca	activación	Células endoteliales de bovino
Bradicinina	PhoC/Ca	activación	Ehrlich
-	PP1	activación	Eritrocitos de ave
-	PP1	activación	Células PC12
-	PP1	activación	Células endoteliales cerebrales de rata
-	PP1	activación	Colon de rata
VIP	-	activación	VEC pulmonares
Estrés oxidantes	-	inhibición	VEC pulmonares
?	F-actina	inhibición	T84

Lytle *et al*²⁷ reportaron que la fosforilación es la causa, y no la consecuencia, de la activación del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ de la glándula rectal de tiburón. Ellos activaron a la PKA con forskolin (que estimula a la adenilato ciclasa para producir AMPc) y expusieron a los cotransportadores a medios que provocaron el encogimiento celular y concluyeron que ambos estímulos promueven la fosforilación de los mismos residuos de serina y treonina en el cotransportador, ya que no produjeron efectos aditivos cuando se expuso al cotransportador a ambos estímulos. En otro estudio, Lytle²⁸ incluyó dos estímulos más (fluorida y caliculina-A), que al igual que los anteriores promueven la fosforilación del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ en sitios comunes de serina/treonina y demostró que la inhibición del cotransportador por bumetanida no se debe al bloqueo de la fosforilación de la proteína.

La regulación del cotransporte de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ por la PKC ha sido estudiada por Crook *et al*²⁹, quienes demostraron que el transporte de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ se reducía del 50 al 70% con dos ésteres de forbol (forbol 12-miristato, 13-acetato: PMA, forbol 12, 13 didecanonato: PDD) y con un análogo del diacilglicerol (dioctanilglicerol: DOG), los tres activadores efectivos de la vía de la PKC. Para establecer que en realidad la disminución en la actividad del cotransportador era debido a la activación de la PKC, utilizaron un éster de forbol que no activa a la PKC (el isómero $4\alpha\text{PDD}$), mismo que no tuvo efecto alguno sobre la función del cotransportador y un inhibidor específico de la PKC, como lo es la estaurosporina, que se une específicamente al sitio de unión para el ATP en la PKC e impide la hidrólisis del ATP y la subsecuente fosforilación de proteínas sustrato, por lo que hubo una recuperación en la función del cotransportador. Sin embargo, la

inhibición del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ por la PKC podría ser tejido específica ya que también se ha reportado un efecto estimulante por la PKC sobre la actividad del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ en fibroblastos de hámster.

En eritrocitos de aves se ha demostrado que el sistema de cotransporte $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ es fuertemente estimulado si los niveles de AMPc son elevados ya sea por la adición directa de AMPc o por la adición de catecolaminas. Sin embargo, este tipo de regulación dependiente de AMPc, y por lo tanto de la PKA, no se ha observado en células de Ehrlich³⁰. También Xu *et al*³¹ corroboraron que el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ de la glándula rectal de tiburón es fosforilado en residuos de serina y treonina al ser activado por estímulos dependientes de AMPc (forskolin) e independientes de AMPc (encogimiento celular). También los estudios de Torchia *et al*⁴ demostraron que el cotransportador en las glándulas salinas de aves es fosforilado por la PKA.

Por otra parte, varios autores^{8-11,30-33} observaron que las células responden al cambio de osmolaridad del medio en forma similar. Al ser expuestas a un medio hipertónico se encogen, mientras que en los medios hipotónicos se hinchan. Sin embargo, al poco tiempo de ser sometidas al estrés, las células se hinchan en respuesta al encogimiento, o se encogen como respuesta al aumento de volumen, lo que sugiere que son capaces de activar algún sistema de transporte que facilite la entrada o salida de iones a la célula según las necesidades. En muchos tipos celulares el proceso de cotransporte está involucrado en cambios de volumen que no producen un cambio drástico en el medio intracelular, por lo que puede operar como parte de un sistema de control por retroalimentación del volumen celular. La activación del cotransporte de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ lleva a un aumento en el volumen

celular por la ingesta de los iones Na^+ , K^+ y Cl^- ; a este proceso se le conoce como aumento regulatorio de volumen (ARV) y se activa cuando las células son expuestas a un medio hipertónico. Durante el encogimiento producido por el decremento regulatorio del volumen (DRV), la permeabilidad de la célula para K^+ y Cl^- aumenta por la activación de canales específicos de K^+ y Cl^- ⁽³⁰⁾ que facilitan la salida de estos iones en respuesta al aumento en el volumen celular. Geck *et al*³² demostraron que ni el nivel de AMPc ni el de Ca^{2+} intracelulares juegan un papel como señales o como parte del mecanismo sensorial del volumen. Hebert³³ concluyó que los procesos de ARV y de DRV involucran reajustes en las vías de escape de Na^+ , K^+ y Cl^- y que estas vías regulatorias de transporte de iones representan procesos de transporte activo secundario que utilizan gradientes eléctricos y químicos establecidos por la $\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa para realizar el flujo de iones. Se conocen dos mecanismos que median la entrada de Na^+ a las células durante el ARV: uno mediado por el intercambiador de $\text{Na}^+:\text{H}^+$ y otro regulado por el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ sensible a bumetanida. Este segundo es el responsable del ajuste en el volumen celular en los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*^{8,9}.

3) Transducción de señales

Puesto que en esta tesis se estudió el efecto de la activación de la PKC sobre la actividad del cotransportador endógeno de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ en ovocitos de *Xenopus laevis*, es necesario hacer una revisión de los mecanismos por los que operan los segundos mensajeros, grupo al que pertenece la PKC.

La coordinación de actividades metabólicas entre células, tejidos y órganos es mediada por la acción de señales extracelulares. La transducción de señales es el proceso por el cual una señal química externa provoca un cambio metabólico intracelular³⁴. La comunicación en células animales se realiza por medio de una gran variedad de moléculas señal (proteínas, péptidos pequeños, aminoácidos, nucleótidos, esteroides, retinoides derivados de ácidos grasos y gases disueltos como el óxido nítrico y el monóxido de carbono). La mayoría de estas moléculas señal son secretadas por exocitosis, otras son liberadas por difusión a través de la membrana y algunas permanecen unidas a la superficie celular e influyen únicamente a las células adyacentes².

Sea cual fuere la naturaleza de la señal, las células responden por medio de las proteínas receptoras, que se unen específicamente a las moléculas señal y desencadenan la respuesta en las células blanco. Muchas de las moléculas señal extracelulares actúan a bajas concentraciones y se unen con una alta afinidad a sus receptores. Los receptores, una vez activados, generan una cascada de señales intracelulares que alteran el comportamiento de las células².

Todas las moléculas señal solubles en agua (incluyendo a los neurotransmisores y a las hormonas y los factores de crecimiento proteicos) y algunas solubles en lípidos, se unen a los receptores de las células blanco donde actúan como transductores de señal y pueden ser de tres tipos: 1) receptores asociados a canales iónicos, que están involucrados en el rápido señalamiento sináptico entre células eléctricamente excitables; 2) receptores asociados a proteínas G, que regulan indirectamente la actividad de una proteína blanco membranar, que puede ser una enzima o un canal iónico; y 3) receptores

asociados a enzimas, que al ser activados funcionan directamente como enzimas, o bien están asociados a enzimas cuya mayoría son proteín-cinasas o están asociados a éstas y fosforilan a un conjunto específico de proteínas en la célula².

Existen cuatro tipos principales de señalamiento:

- a) El señalamiento parácrino es llevado a cabo por mediadores locales que afectan únicamente a las células localizadas en las inmediaciones de la célula señaladora.
- b) El señalamiento sináptico utiliza a los neurotransmisores como moléculas señal.
- c) Las células endócrinas secretan hormonas hacia el torrente sanguíneo para que éstas lleguen a las células distribuidas en todo el cuerpo que cuenten con receptores para hormonas.
- d) En el señalamiento autócrino las células secretan moléculas señal que pueden unirse a sus propios receptores².

A pesar de que algunas moléculas señal, como esteroides y hormonas, difunden a través de la membrana y se unen a receptores citosólicos específicos, la mayoría de las moléculas señal extracelulares interactúan con las células blanco por medio de los receptores. La unión del ligando al receptor produce en este segundo un cambio conformacional que inicia una serie de eventos que llevan a la formación o liberación de una señal intracelular (segundos mensajeros) que altera el metabolismo de la célula blanco³⁴. La insulina y muchos factores de crecimiento actúan estimulando la actividad de la tirosina-cinasa de sus receptores. También los productos de muchos oncogenes tienen actividad de tirosina-cinasa o activan esta cascada. Los esteroides y hormonas tiroideas entran

en la célula y se unen a receptores que son transportados al núcleo, donde se unen a sitios específicos del ácido desoxirribonucleico (DNA)³⁵.

Segundos mensajeros

a) Las proteínas G

En estado de reposo, las proteínas G son heterotrimeros que contienen subunidades α , β y γ . La subunidad α tiene un guanina difosfato (GDP) unido, además posee un sitio de unión para guanina y actividad de GTPasa. La activación de la proteína G provoca la liberación del GDP unido a la subunidad α y en su lugar se une el guanina trifosfato (GTP), el trímero se disocia en un dímero $G\beta\gamma$ y un complejo $G\alpha$ -GTP activo. La acción del complejo es de corta duración debido a la actividad GTPasa de la subunidad α , que hidroliza GTP en GDP, inactiva a la subunidad α y ésta se une al dímero $G\beta\gamma$ ³⁴. La fosfolipasa C, que hidroliza al fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) para formar inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG) que activa a la proteína-cinasa C, es activada por una proteína G.

b) AMPc

La cascada de la adenilato ciclasa es una de las vías de transducción de señales más importante. La actividad de la adenilato ciclasa, que es una proteína integral de la membrana, cataliza la formación de AMPc a partir de adenosina trifosfato (ATP). La actividad de esta ciclasa se lleva a cabo en el lado interno de la membrana plasmática y es regulada por complejos ligando-receptor que son regulados indirectamente por dos proteínas G: La G_s (estimuladora) y la G_i (inhibidora). Además de mediar muchas otras respuestas, el aumento en la

concentración intracelular de AMPc produce una respuesta por la vía de la proteína-
cinasa A (PKA), que está compuesta por dos subunidades reguladoras y dos
catalíticas. En su forma tetramérica, la enzima está inactiva; cuando el AMPc se
une a las subunidades reguladoras, ésta se disocia en dos subunidades catalíticas
activas y en un dímero formado por las subunidades reguladoras. La PKA cataliza
la transferencia de un grupo fosfato del ATP a la proteína blanco. La acción de
esta cinasa es revertida por la acción de la proteínafosfatasa (existen cuatro tipos
de proteínafosfatasa; PP-1, PP-2A, PP-2B y PP-2C)³⁴.

c) GMPc

En muchos sistemas los niveles de AMPc y guanina monofosfato cíclico (GMPc)
se mueven en direcciones opuestas como respuesta a las interacciones ligando-
receptor, y con frecuencia tienen efectos también opuestos³⁴.

d) Ca²⁺

Las concentraciones intracelulares de Ca²⁺ pueden ser aumentadas rápidamente
ya sea por la apertura transitoria de los canales membranales de Ca²⁺ o por la
liberación de Ca²⁺ de los retículos endoplásmico y sarcoplásmico (en células
musculares). Ambos mecanismos son activados por la unión de señales
extracelulares a los receptores membranales. La mayoría de los efectos del Ca²⁺
se deben a la acción de la calmodulina, que se encuentra en las células como un
péptido libre y como un componente de complejos enzimáticos de múltiples
subunidades. La calmodulina tiene cuatro sitios de unión de alta afinidad para el
Ca²⁺. La unión del Ca²⁺ a la calmodulina libre provoca que ésta se una a la
proteína blanco y que la active o desactive. Las actividades celulares del calcio y
el AMPc a veces están asociadas, ya que una proteína puede ser regulada tanto

por Ca^{2+} como por AMPc; incluso en algunas células los niveles de Ca^{2+} libre y de AMPc son interdependientes³⁴.

e) Segundos mensajeros generados por la hidrólisis de lípidos

Existen tres lípidos principales que contienen un grupo inositol: el fosfatidilinositol (PI), el fosfatidilinositol 4-fosfato (PIP) y el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2). Como respuesta a señales externas, las células pueden hidrolizar el PIP_2 para formar tres distintos segundos mensajeros; inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), que se une a un canal de Ca^{2+} específico en retículo endoplásmico o sarcoplásmico y

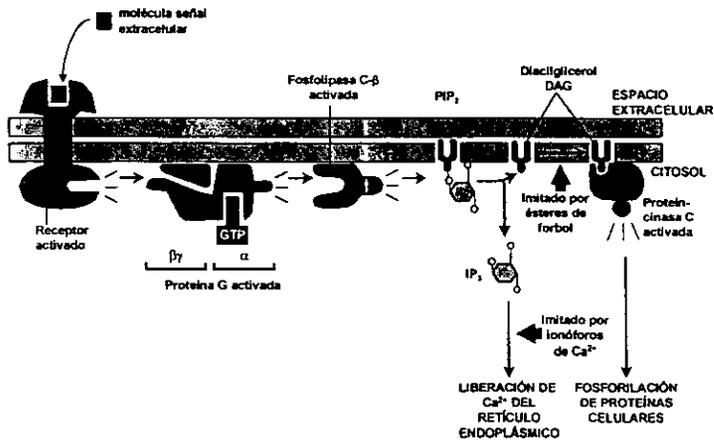


Figura 3. Esquema que muestra la activación de la PKC por la hidrólisis de PIP_2 (2)

genera la liberación de calcio al citoplasma; diacilglicerol (DAG), que activa a la PKC; y el ácido araquidónico, que puede producir una gran variedad de hormonas locales (eicosanoides) de vida corta; estas hormonas alteran la actividad de las células en las que son sintetizadas y de las células adyacentes. La enzima que

hidroliza al PIP_2 para formar DAG e IP_3 (ver figura 3) es la fosfatidilinositol fosfolipasa C (PLC), de la cual existen por lo menos nueve isoformas, mismas que están clasificadas de acuerdo a su estructura en cuatro grupos (α , β , γ y δ). La PLC puede ser activada por dos mecanismos; en algunos casos la unión de una molécula señal extracelular al receptor membranal activa a una proteína G, que activa a la fosfolipasa C- β 1 al unirse con GTP. En otras ocasiones, la PLC es activada por fosforilación; la fosfolipasa C- γ es activada directamente por la actividad de una cinasa de tirosina presente en el complejo receptor-ligando. La unión de DAG a la PKC resulta en la activación de esta cinasa, que posee un dominio catalítico y uno regulatorio. La forma inactiva de la PKC se encuentra en el citosol, mientras que la forma activa está unida a la membrana³⁵ (ver figura 4). Para la activación de la PKC el DAG (o los ésteres de forbol) se une a un dominio

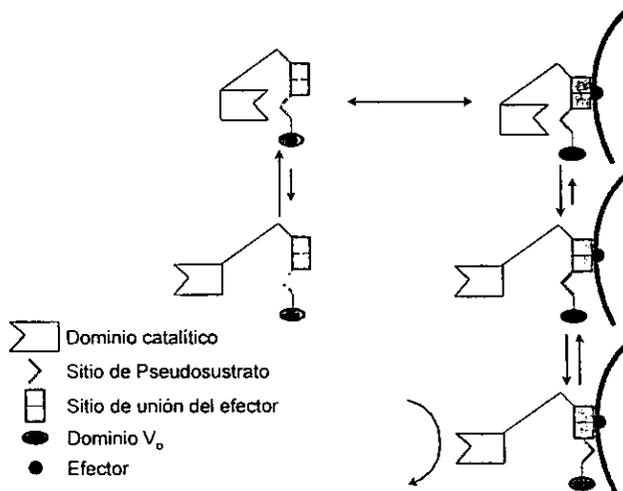


Figura 4. Activación y unión de la PKC a la membrana³⁶.

proximal rico en cisteína llamado C1, este dominio es característico por poseer un motivo C_6H_2 que se repite y al que se unen dos iones de Zn^{2+} ⁽³⁶⁾; la forma activa utiliza al ATP para fosforilar residuos de serina o treonina en las proteínas blanco. Al parecer, esta fosforilación afecta la actividad de estas proteínas y lleva a una respuesta biológica³⁴. Por lo menos 4 de las 8 isoformas de PKC en mamíferos son activadas por el diacilglicerol². Los ésteres de forbol son derivados de alcoholes policíclicos de aceites vegetales. Son muy semejantes al DAG y por ello activan a la PKC directamente. Su acción es persistente porque, a diferencia del DAG, no son degradados rápidamente³⁵.

f) Señalamiento por la fosforilación del receptor²

Existe una familia de receptores que se activan con la fosforilación directa de las proteínas blanco. La unión de ligandos de alta afinidad a estos receptores produce un cambio conformacional que activa a una cinasa de tirosina localizada dentro del dominio citoplásmico. La actividad de esta cinasa puede provocar la autofosforilación del receptor y/o la fosforilación de proteínas blanco intracelulares. Las cinasas de tirosina del receptor activadas transmiten las señales por dos vías, la fosforilación de proteínas y la unión proteína-proteína³⁴.

4) Existencia del cotransportador en ovocitos de *Xenopus laevis*

El cotransportador de $Na^+ : K^+ : 2Cl^-$ del ovocito es una proteína de membrana de 140 kilodaltones (kDa) que es regulada por cambios en el volumen celular como se ha reportado previamente en numerosos tipos celulares. Su actividad también es alterada por la fosforilación pero no por cambios intracelulares en AMPc, Ca^{2+} o GMPc. El cotransportador endógeno fue estudiado por Suvitayavat

*et al*⁸ a raíz de que en un estudio de expresión funcional del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ de la línea celular T84 del carcinoma humano en ovocitos de *Xenopus laevis*, los ovocitos controles inyectados con agua mostraban la misma actividad que los inyectados con el RNA del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$. Para demostrar que la entrada de K^+ que observaron en los ovocitos era mediada por un sistema de transporte de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$, estudiaron la dependencia de Na^+ , K^+ y Cl^- para este transporte y la inhibición dosis dependiente producida por diuréticos de tipo ácido 5-sulfamoilbenzioco (bumetanida y furosemide). Además estudiaron la sensibilidad del cotransportador a la osmolaridad del medio, determinando que se activa en condiciones isotónicas y por último examinaron varios sistemas regulatorios al evaluar el efecto de sustancias como el PDBu, el 8-bromoguanosina 3',5'-monofosfato cíclico, el 8-(4-clorofeniltio)adenosina 3',5'-monofosfato cíclico, la ionomicina, el ácido ocadaico y la caliculina A (inhibidor de la fosfatasa) sobre la actividad del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$. De todos estos agentes, sólo el inhibidor de la fosfatasa, caliculina A, aumentó la captación de K^+ sensible a bumetanida y el activador de la PKC, PDBu, tuvo un leve efecto inhibitorio.

Shetlar *et al*⁹ demostraron la dependencia de los iones Na^+ , K^+ y Cl^- al reemplazar al Na^+ con n-metilglucamina y al Cl^- con nitrato, en ambos casos observaron una reducción en la actividad equivalente a la producida por la adición de bumetanida. El cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ en ovocitos de *Xenopus laevis* es similar a los sistemas investigados en otras células ya que: 1) las afinidades aparentes para los iones cotransportados concuerdan con los rangos reportados para otros sistemas; 2) la aparente estequiometría $1\text{Na}^+:1\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ sugiere un

cotransporte electroneutro como el reportado para otras células y 3) la bumetanida inhibe la captación de $^{86}\text{Rb}^+$ (que sustituye al K^+) en forma dosis dependiente.

Por otro lado, Sahara *et al*³⁷ reportaron la presencia de dos isoformas de la PKC a las que denominaron xPKC I y xPKC II en los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*. Ambas isoformas fueron reconocidas por un antisuero dirigido a la región C1 (que es esencial para la unión del DAG y de los ésteres de forbol a la PKC) de la γ PKC (subespecie γ de la PKC de rata), lo que demuestra que las isoformas están estrechamente relacionadas con las PKC de mamíferos en sus regiones conservadas. Al comparar las propiedades cinéticas entre las dos isoformas y con las de la α PKC cerebral de rata, descubrieron que eran muy similares, y que respondían de igual forma al éster de forbol TPA, a concentraciones variables de Ca^{2+} y al diacilglicerol. Sin embargo, determinaron que existe una ligera diferencia entre las propiedades cinéticas de ambas isoformas puesto que la actividad de la xPKC II disminuyó rápidamente cuando los ovocitos fueron incubados con el éster de forbol TPA, mientras que la actividad de la xPKC I permaneció sin cambio aparente por dos horas.

HIPÓTESIS

Se ha reportado la existencia de dos isoformas de la proteína-quinasa C en los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*. Cuando los ovocitos son incubados en un medio que contiene ésteres de forbol, que son activadores de la PKC, se observa una inhibición en la actividad del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$. Por lo tanto

cotransporte electroneutro como el reportado para otras células y 3) la bumetanida inhibe la captación de $^{86}\text{Rb}^+$ (que sustituye al K^+) en forma dosis dependiente.

Por otro lado, Sahara *et al* ³⁷ reportaron la presencia de dos isoformas de la PKC a las que denominaron xPKC I y xPKC II en los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*. Ambas isoformas fueron reconocidas por un antisuero dirigido a la región C1 (que es esencial para la unión del DAG y de los ésteres de forbol a la PKC) de la γ PKC (subespecie γ de la PKC de rata), lo que demuestra que las isoformas están estrechamente relacionadas con las PKC de mamíferos en sus regiones conservadas. Al comparar las propiedades cinéticas entre las dos isoformas y con las de la α PKC cerebral de rata, descubrieron que eran muy similares, y que respondían de igual forma al éster de forbol TPA, a concentraciones variables de Ca^{2+} y al diacilglicerol. Sin embargo, determinaron que existe una ligera diferencia entre las propiedades cinéticas de ambas isoformas puesto que la actividad de la xPKC II disminuyó rápidamente cuando los ovocitos fueron incubados con el éster de forbol TPA, mientras que la actividad de la xPKC I permaneció sin cambio aparente por dos horas.

HIPÓTESIS

Se ha reportado la existencia de dos isoformas de la proteína-quinasa C en los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*. Cuando los ovocitos son incubados en un medio que contiene ésteres de forbol, que son activadores de la PKC, se observa una inhibición en la actividad del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$. Por lo tanto

mencionado, se postula que la PKC regula negativamente al cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$.

OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar el efecto de la activación de la PKC sobre la función del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ sensible a bumetanida en ovocitos de *Xenopus laevis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con las ranas africanas *Xenopus laevis* (Figura 5), que son anuros de la Familia Pipidae, aeróbicas pero completamente acuáticas. Estos organismos comenzaron a usarse en estudios de biología del desarrollo, pero hoy en día son más utilizados sus ovocitos por varias razones; 1) son prácticos para expresar RNAs exógenos de canales, transportadores y cotransportadores ya que tienen la habilidad de traducir los RNAs fielmente; 2) los DNAs y RNAs pueden ser introducidos fácilmente dentro de las células; 3) es fácil realizar análisis funcionales de este sistema con una gran variedad de técnicas electrofisiológicas y 4) la producción de ovocitos es asincrónica y continua³⁸. Los ovocitos pueden ser clasificados en seis estados de desarrollo en base a su anatomía: estado I, miden de 50 a 100 μm de diámetro y son de apariencia transparente; estado II, miden de 300 a 450 μm y su apariencia es translúcida o blanca; estado III, miden

mencionado, se postula que la PKC regula negativamente al cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$.

OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar el efecto de la activación de la PKC sobre la función del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ sensible a bumetanida en ovocitos de *Xenopus laevis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con las ranas africanas *Xenopus laevis* (Figura 5), que son anuros de la Familia Pipidae, aeróbicas pero completamente acuáticas. Estos organismos comenzaron a usarse en estudios de biología del desarrollo, pero hoy en día son más utilizados sus ovocitos por varias razones; 1) son prácticos para expresar RNAs exógenos de canales, transportadores y cotransportadores ya que tienen la habilidad de traducir los RNAs fielmente; 2) los DNAs y RNAs pueden ser introducidos fácilmente dentro de las células; 3) es fácil realizar análisis funcionales de este sistema con una gran variedad de técnicas electrofisiológicas y 4) la producción de ovocitos es asincrónica y continua³⁸. Los ovocitos pueden ser clasificados en seis estados de desarrollo en base a su anatomía: estado I, miden de 50 a 100 μm de diámetro y son de apariencia transparente; estado II, miden de 300 a 450 μm y su apariencia es translúcida o blanca; estado III, miden

mencionado, se postula que la PKC regula negativamente al cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$.

OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar el efecto de la activación de la PKC sobre la función del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ sensible a bumetanida en ovocitos de *Xenopus laevis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con las ranas africanas *Xenopus laevis* (Figura 5), que son anuros de la Familia Pipidae, aeróbicas pero completamente acuáticas. Estos organismos comenzaron a usarse en estudios de biología del desarrollo, pero hoy en día son más utilizados sus ovocitos por varias razones; 1) son prácticos para expresar RNAs exógenos de canales, transportadores y cotransportadores ya que tienen la habilidad de traducir los RNAs fielmente; 2) los DNAs y RNAs pueden ser introducidos fácilmente dentro de las células; 3) es fácil realizar análisis funcionales de este sistema con una gran variedad de técnicas electrofisiológicas y 4) la producción de ovocitos es asincrónica y continua³⁸. Los ovocitos pueden ser clasificados en seis estados de desarrollo en base a su anatomía: estado I, miden de 50 a 100 μm de diámetro y son de apariencia transparente; estado II, miden de 300 a 450 μm y su apariencia es translúcida o blanca; estado III, miden

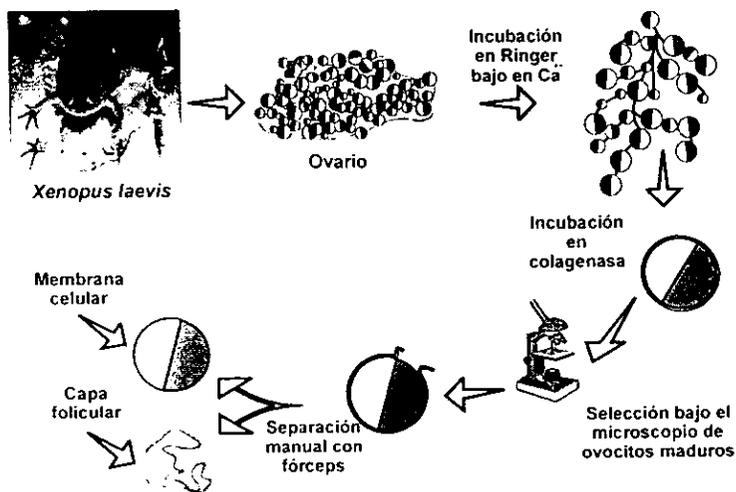
de 350 a 600 μm y presentan una pigmentación uniforme en toda la superficie; estado IV miden de 600 a 1000 μm y los hemisferios (polo animal y polo vegetal, ver figuras 9 y 10) están ya diferenciados, siendo el polo animal de un color café oscuro; estado V, miden de 1000 a 1200 μm y los hemisferios están claramente delineados, el color café del hemisferio animal es más claro; estado VI, miden de 1200 a 1300 μm y presentan una banda ecuatorial no pigmentada entre los hemisferios. Para el presente estudio se utilizaron ovocitos en los estados V y VI³⁹. Las ranas se mantienen en el bioterio con un periodo luz/oscuridad de 12:12 horas a una temperatura aproximada de 16°C.

Extracción y preparación de ovocitos de *Xenopus laevis*

Para la obtención de ovocitos (ver esquema 1) las ranas se anestesiaron por inmersión en una solución de tricaina al 0.17% (ácido etil éster 3-aminobenzoico, SIGMA). Una vez anestesiadas, se colocaron con el vientre hacia arriba en una cama de hielo para disminuir su metabolismo y para asegurar que el efecto de la anestesia sea suficientemente largo. Se les hizo una pequeña incisión en la parte inferior del abdomen a través de la cual fueron expuestos los ovarios, y se cortaron suficientes lóbulos para obtener así los ovocitos necesarios (Figura 6).

Los lóbulos extraídos fueron colocados en una caja de Petri con una solución ND96 que no contenía calcio (ND96 sin Ca^{2+}) (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 5 mM HEPES). Se suturó a la rana con seda del número 5 (Figura 7) y fue colocada en una pecera para su recuperación. Los lóbulos fueron cortados en pequeños racimos e incubados en la solución ND96 sin Ca^{2+} a la que se le

agregaron 2 mg/ml de colagenasa (BOEHRINGER MANNHEIM) durante una hora con agitación moderada y a temperatura ambiente (Figura 8). Transcurrido este tiempo, se hicieron tres lavados con la solución ND96 sin calcio, agitando ligeramente para eliminar los residuos de colagenasa. Los ovocitos, que con este tratamiento se separaron de los racimos, se colocaron en una caja de Petri con solución ND96 (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES) y se examinaron bajo un microscopio estereoscópico para seleccionar a los maduros. Por lo general, los ovocitos conservan una capa folicular la cual se removi6 manualmente con unas pinzas finas bajo el microscopio (Figura 9). Una vez defoliculados (Figura 10), los ovocitos se incubaron un día a 18°C en una solución ND96 con 2.5 mM de piruvato de sodio (SIGMA) y 5 mg/ml de



Esquema 1. Metodología para la obtención de ovocitos de *Xenopus laevis*.



Figura 5. Rana hembra
Xenopus laevis.

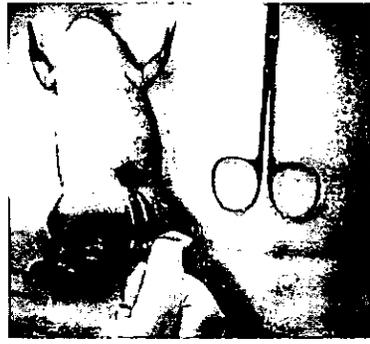


Figura 6. Ovarios expuestos.



Figura 7. Herida suturada.



Figura 8. Incubación en colagenasa.

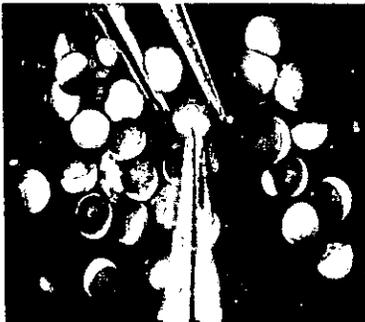


Figura 9. Desfoliculación manual de
Ovocitos bajo el microscopio.

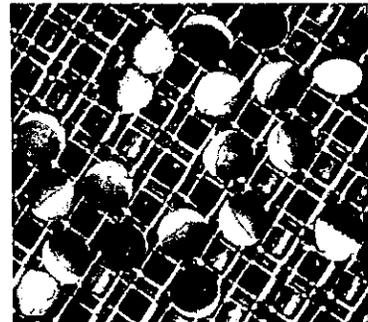
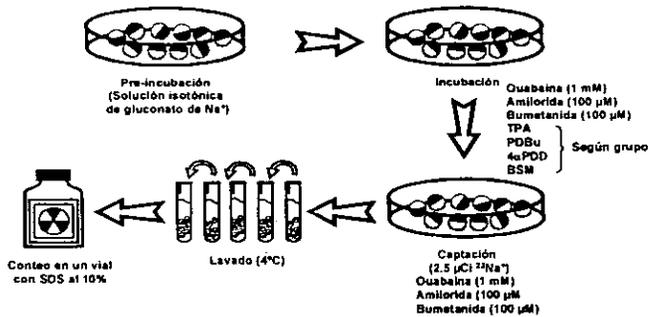


Figura 10. Ovocitos desfoliculados.

gentamicina (SIGMA) y otro día en una solución libre de cloro (isetionato de sodio (98 mM isetonato de Na⁺, 2 mM gluconato de K⁺, 1.8 mM gluconato de Ca²⁺, 1 mM gluconato de Mg²⁺, 5 mM HEPES) con 2.5 mM de piruvato de sodio y 5 mg/ml de gentamicina) con el fin de inhibir todo el transporte de sodio dependiente de cloro en los ovocitos.

Captación de ²²Na⁺ en ovocitos



Esquema 2. Ensayo de captación de material radioactivo para la determinación de la función del cotransportador de Na⁺:K⁺:2Cl⁻ en ovocitos de *Xenopus laevis*.

Los ovocitos fueron incubados en grupos de 20 a 30 en tres diferentes soluciones (ver esquema 2):

1. Primera incubación: todos los grupos se incubaron durante 15 minutos en 1ml de solución isotónica sin K⁺ ni Cl⁻ (98 mM gluconato de Na⁺, 6 mM gluconato de Ca²⁺, 1 mM gluconato de Mg²⁺, 5 mM HEPES) que contenía 1 mM de ouabaína (SIGMA) para inhibir a la Na⁺:K⁺-ATPasa y 100 µM de amilorida (SIGMA) para inhibir a los canales de Na⁺ (ver tabla 2). Variaciones:

- i) Grupo control, no se adicionó nada más.
- ii) Grupo control negativo, se le adicionó 100 μM de bumetanida.
- iii) Grupos experimentales con ésteres de forbol, se incubaron por más o menos de 15 minutos.
- iv) Grupos control hipotónicos, fueron incubados en una solución hipotónica sin K^+ ni Cl^- (75 mM gluconato de Na^+ , 4.6 mM gluconato de Ca^{2+} , 1 mM gluconato de Mg^{2+} , 5 mM HEPES) con 1 mM de ouabaína y 100 μM de amilorida. A uno de los grupos (dos grupos hipotónicos control) se le adicionó de 100 μM bumetanida.

Previamente se hicieron curvas cinéticas para determinar la dosis y el tiempo adecuados de incubación.

2. Segunda incubación: los grupos se incubaron otros 15 minutos en 1 ml de la misma solución isotónica sin K^+ ni Cl^- con 1 mM de ouabaína y 100 μM de amilorida de la siguiente manera:

- i) Grupo control, no se le adicionó nada más.
- ii) Grupo control negativo, se le adicionó 100 μM de bumetanida.
- iii) Grupos experimentales con ésteres de forbol y el inhibidor de la PKC, se adicionó 100 nM (10^{-7} M) de estas sustancias.
- iv) Grupos control hipotónicos, se incubaron en la misma solución hipotónica, adicionando nuevamente a uno de ellos 100 μM de bumetanida.

3. Captación: todos los grupos fueron incubados durante 30 minutos en 1 ml de solución de captación isotónica (34 mM Cloruro de N-metil D-glucamina [NMDG-Cl], 62 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.8 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 5 mM

HEPES) con 1 mM de ouabaina , 100 μ M de amilorida y 2.5 μ Ci de $^{22}\text{Na}^+$ (DUPONT). A los grupos control negativo se adicionó 100 μ M de bumetanida. Los grupos control hipotónico se incubaron en una solución de captación hipotónica (62 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.8 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 5 mM HEPES) con 1 mM de ouabaina , 100 μ M de amilorida y 2.5 μ Ci de $^{22}\text{Na}^+$.

Todos los grupos fueron lavados cinco veces en la solución de captación isotónica fria (a 4°C aproximadamente) para detener la captación de $^{22}\text{Na}^+$. Cada ovocito fue transferido con una pipeta Pasteur a un tubo de centelleo que contenía 350 μ l de dodecil sulfato de sodio (SDS; FISHER SCIENTIFIC) que es un detergente que lisa las células y se agitaron los tubos para asegurar que los ovocitos fueran lisados.

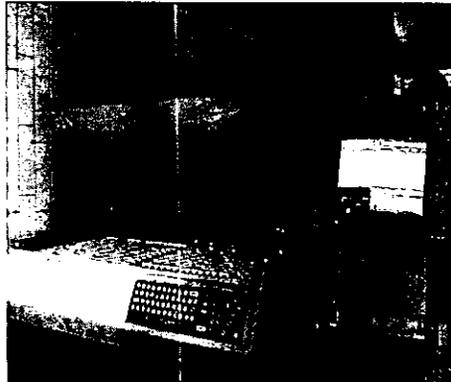


Figura 11. Contador de centello

Se agregaron 2 ml de líquido de centelleo (SIGMA) a cada vial y se contaron las emisiones de cada tubo en un contador de centelleo β (BECKMAN, LS 6500; ver figura 11). Para conocer la actividad específica de cada grupo se

prepararon tres alícuotas con 10 μ l de la solución de captación con $^{22}\text{Na}^+$ tomados del medio de incubación de cada grupo, además se adicionaron 350 μ l de SDS y 2 ml de líquido de centelleo.

Las drogas que fueron utilizadas se muestran en la tabla 2. Para la determinación de la dependencia de dosis (de los distintos ésteres de forbol) se hicieron diluciones a partir de un stock procurando agregar siempre la misma cantidad de dimetilsulfóxido en los grupos experimentales [DMSO (FISHER BIOTECH), se utilizó este disolvente porque algunas de las drogas, como los ésteres de forbol, no son solubles en agua]. También se agregó la misma cantidad de DMSO para la determinación de la dependencia de tiempo.

Tabla 2. Resumen de las drogas utilizadas en los experimentos y descripción de su función.

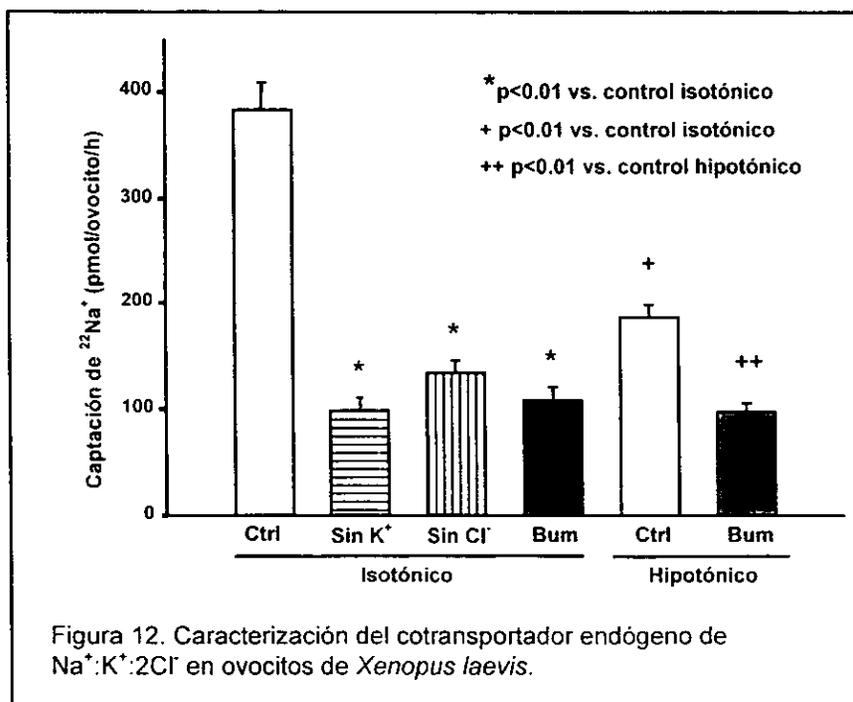
DROGA	FUNCIÓN
Ouabaina	Inhibidor de la $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{ATPasa}$, soluble en H_2O y DMSO
Amilorida	Inhibidor de canales de Na^+ , soluble en DMSO
Bumetanida	Diurético de asa. Inhibidor específico del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$, soluble en DMSO
TPA	Ester de forbol; activador de la PKC, soluble en DMSO
PDBu	Ester de forbol; activador de la PKC, soluble en H_2O y DMSO
4 α PDD	Ester de forbol que NO activa a la PKC, soluble en DMSO
BSM	Inhibidor específico de la PKC, soluble en DMSO

Análisis estadístico

Los valores obtenidos se expresan como picomoles por ovocito por hora (media \pm EE). Para determinar la significancia de los valores obtenidos se les aplicó una prueba t de Student. Se consideró estadísticamente significativo cuando la $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 12 muestra la caracterización del cotransportador endógeno de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ en ovocitos de *Xenopus laevis*. En el eje de las ordenadas se expresa la captación de $^{22}\text{Na}^+$ como picomoles por ovocito por hora (pmol/ovocito/h). En el eje de las abscisas están representados los grupos experimentales. Cada barra



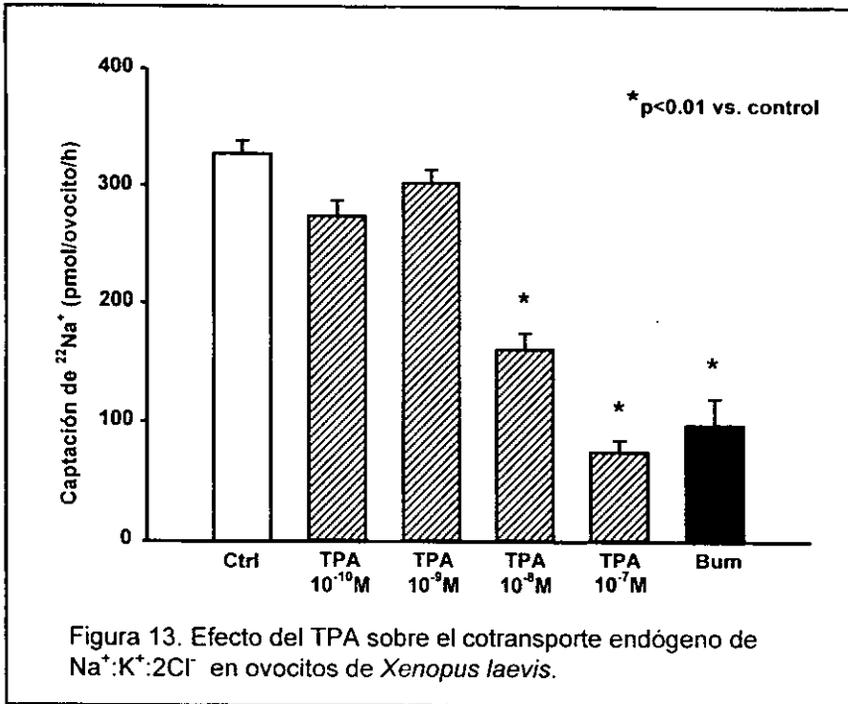
representa la media de 20 a 30 ovocitos \pm el error estándar.

En este experimento observamos que la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en el grupo control fue de 383 ± 21 pmol/ovocito/h; en ausencia de K^+ se redujo a 98 ± 11 pmol/ovocito/h; en ausencia de Cl^- a 134 ± 11 pmol/ovocito/h y en presencia del diurético de asa bumetanida [$100 \mu\text{M}$] fue de 108 ± 13 pmol/ovocito/h. El grupo

control que fue incubado en un medio hipotónico tuvo una captación de 186 ± 11 pmol/ovocito/h y cuando se le adicionó la bumetanida [$100 \mu\text{M}$] se redujo a 90 ± 10 pmol/ovocito/h. En base a lo antes mencionado, concluimos que bajo estas condiciones experimentales el transporte de Na^+ es dependiente de Cl^- y de K^+ , es sensible a bumetanida y a la tonicidad del medio. Por lo tanto, en ovocitos se trata del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$.

Los cotransportadores electroneutros de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ han sido descritos en varios tejidos epiteliales y no epiteliales y se caracterizan por ser dependientes de la presencia simultánea de los tres iones cotransportados, ser sensibles a diuréticos de asa como el furosemide y la bumetanida, y por su sensibilidad a la osmolaridad del medio³⁻³⁵. La gráfica de la figura 12 muestra que el cotransportador endógeno de los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* pertenece a la familia de cotransportadores de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ descrita por Hebert *et al*³ puesto que hubo una inhibición en la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en ausencia de los iones K^+ y Cl^- equivalente a la inhibición causada por la bumetanida, observación hecha anteriormente por Suvitayavat *et al*⁹. Esta gráfica también demuestra que el cotransportador en los ovocitos es activado en condiciones isotónicas, lo que sugiere que en estas células, el cotransportador juega un papel importante en la regulación del volumen celular, función que ha sido descrita por varios autores para otros tipos celulares^{8,9,11,13,28,40}.

La figura 13 muestra la curva de dosis que se realizó para determinar cuál era la dosis de éster de forbol que se utilizaría en todos los experimentos donde se incluyera el TPA.

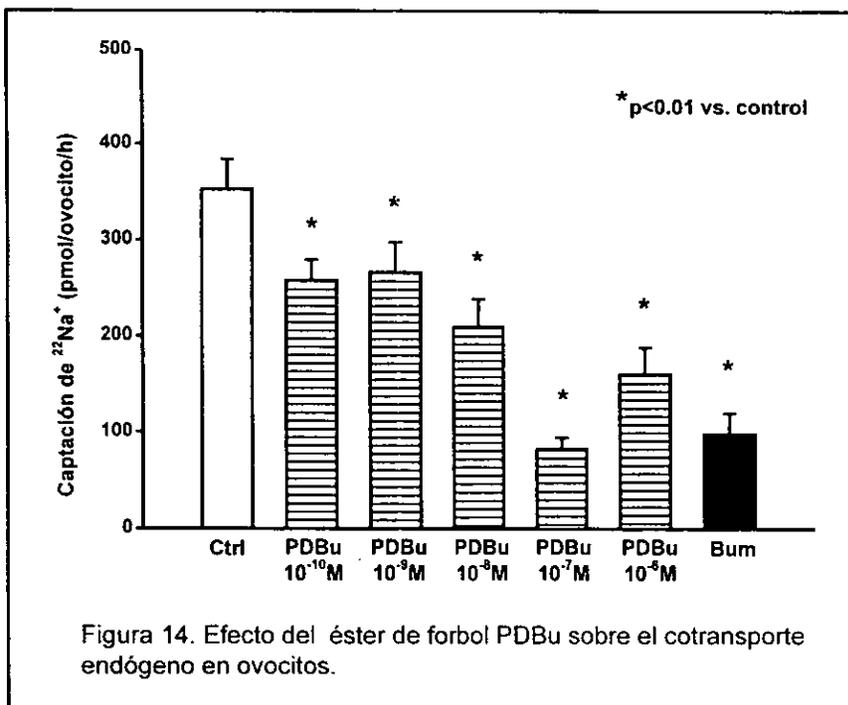


Para estudiar la respuesta del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ a la activación de la PKC (figura 13), se utilizó en primer lugar al éster de forbol TPA como activador de la PKC. El grupo control tuvo una captación de 328 ± 10 pmol/ovocito/h y el grupo con bumetanida [100 mM] tuvo una captación de 99 ± 20 pmol/ovocito/h. Los grupos experimentales con éster de forbol tuvieron captaciones que iban disminuyendo al aumentar la concentración de TPA. Con una concentración de 0.1 nM tuvimos una captación de 274 ± 12 pmol/ovocito/h, con 1 nM 302 ± 10 pmol/ovocito/h, con 10 nM 161 ± 13 pmol/ovocito/h y con 100 nM obtuvimos la menor captación que fue de 75 ± 9 pmol/ovocito/h. Observamos un efecto dosis dependiente sobre la actividad del cotransportador con el éster de forbol. A mayor

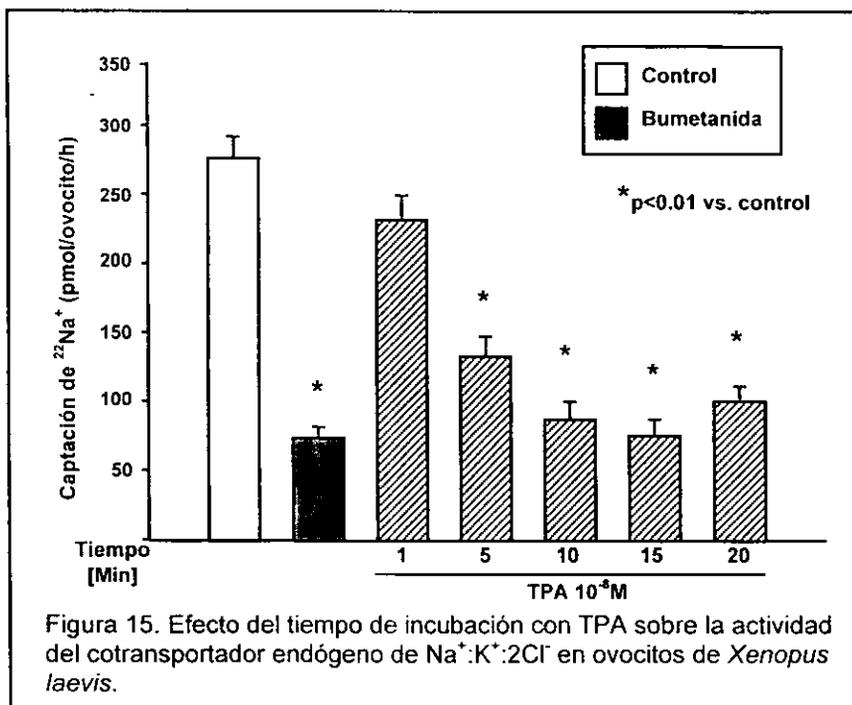
concentración de TPA en el medio de incubación de los ovocitos se observa una menor captación de $^{22}\text{Na}^+$, alcanzándose un valor equivalente al de la inhibición producida por el diurético de asa bumetanida con una concentración de TPA de 100 nM. Suvitayavat *et al*⁹ reportaron una leve disminución en la función del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ cuando incubaron a los ovocitos en un medio que contenía el éster de forbol PDBu y al incubarlos con el inhibidor de la fosfatasa calcicolina A observaron que la captación de K^+ aumentaba cuatro veces.

La figura 14 muestra la curva de dosis que se realizó con el éster de forbol PDBu. Como se muestra en este experimento, la captación de $^{22}\text{Na}^+$ disminuye al aumentar la concentración de PDBu. La captación del grupo control fue de 353 ± 25 pmol/ovocito/h y con la adición de bumetanida [100 nM] disminuyó a 99 ± 20 pmol/ovocito/h. Los grupos experimentales tuvieron las siguientes captaciones; con 0.1 nM la captación fue de 259 ± 19 pmol/ovocito/h, con 1 nM fue de 267 ± 29 pmol/ovocito/h, con 10 nM de 210 ± 27 pmol/ovocito/h, con 100 nM de 83 ± 10 pmol/ovocito/h y con 1 mM fue de 161 ± 27 pmol/ovocito/h. Se puede observar que el PDBu tuvo el mismo efecto inhibitorio dosis dependiente sobre la actividad del cotransportador, y la inhibición máxima se alcanzó de igual forma con una dosis de 100 nM.

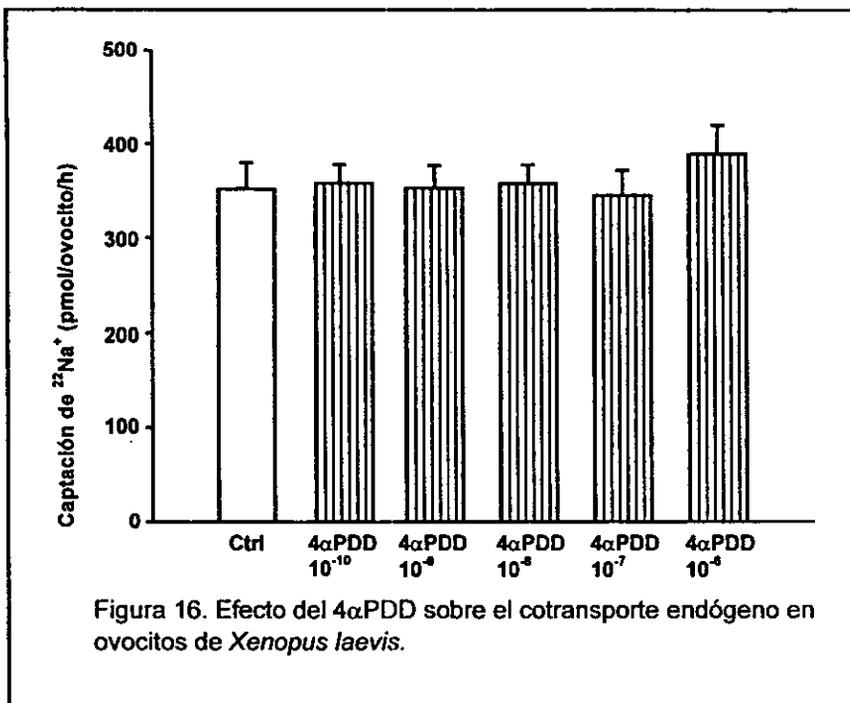
Dong *et al*⁴⁰ demostraron que ambos ésteres de forbol también produjeron un efecto inhibitorio dosis dependiente en el epitelio ciliar de conejo, y lograron una inhibición máxima tanto para TPA como para PDBu con la misma concentración que nosotros, 100 nM.



La figura 15 muestra la inhibición del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ a diferentes tiempos de incubación con el éster de forbol TPA 100 nM. El grupo control tuvo una captación de 278 ± 14 pmol/ovocito/h y ésta disminuyó a 74 ± 7 pmol/ovocito/h en presencia de bumetanida [100 mM]. Con un minuto de incubación en un medio con TPA 100 nM la captación disminuyó a 233 ± 15 pmol/ovocito/h, a los cinco minutos la captación fue de 134 ± 14 pmol/ovocito/h, a los diez minutos fue mayor alcanzando un valor de 88 ± 12 pmol/ovocito/h, después de quince minutos se alcanzó la máxima disminución en la captación con 76 ± 10 pmol/ovocito/h y, finalmente, a los veinte minutos la captación fue de 102 ± 8 pmol/ovocito/h.



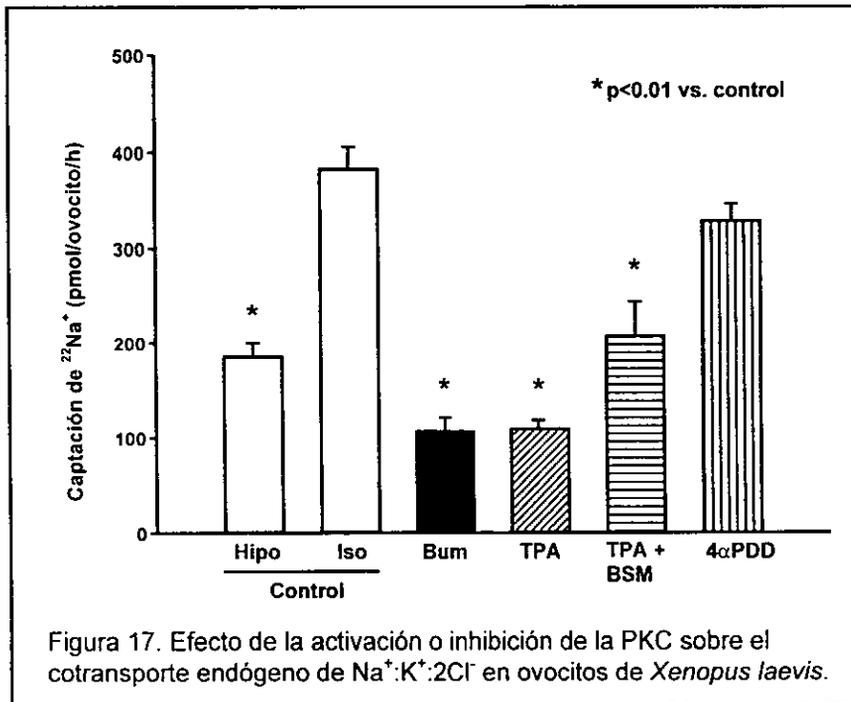
La gráfica de la figura 15 muestra claramente que el efecto de los ésteres de forbol es también tiempo dependiente, puesto que a mayor tiempo de incubación se logró una menor captación de $^{22}\text{Na}^+$, alcanzándose la mayor inhibición a los 15 minutos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Dong *et al* ⁴⁰, quienes establecieron la relación que existe entre el tiempo de incubación con PDBu y la actividad del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ de las células epiteliales ciliares de conejo.



Finalmente, como se observa en la figura 16, estudiamos la dependencia de dosis con el éster de forbol 4αPDD, que es incapaz de activar a la PKC, para corroborar que el efecto observado anteriormente se debiera en realidad a la activación de la PKC. La captación del grupo control de 353±25 pmol/ovocito/h fue muy similar a la de los grupos experimentales; con una concentración 0.1 nM de 4αPDD la captación fue de 360±17 pmol/ovocito/h, con 1 nM de 354±21 pmol/ovocito/h, con 10 nM fue de 361±23 pmol/ovocito/h, con 100 nM de 346±25 pmol/ovocito/h y con 1 μM la captación fue de 390±29 pmol/ovocito/h. A pesar del incremento en la dosis de 4αPDD, no se observó un efecto inhibitorio significativo

con respecto al control. Esto mismo observaron Dong *et al*⁴⁰ en el epitelio ciliar de conejo.

La figura 17 muestra el efecto de la activación de la PKC sobre la función del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$.

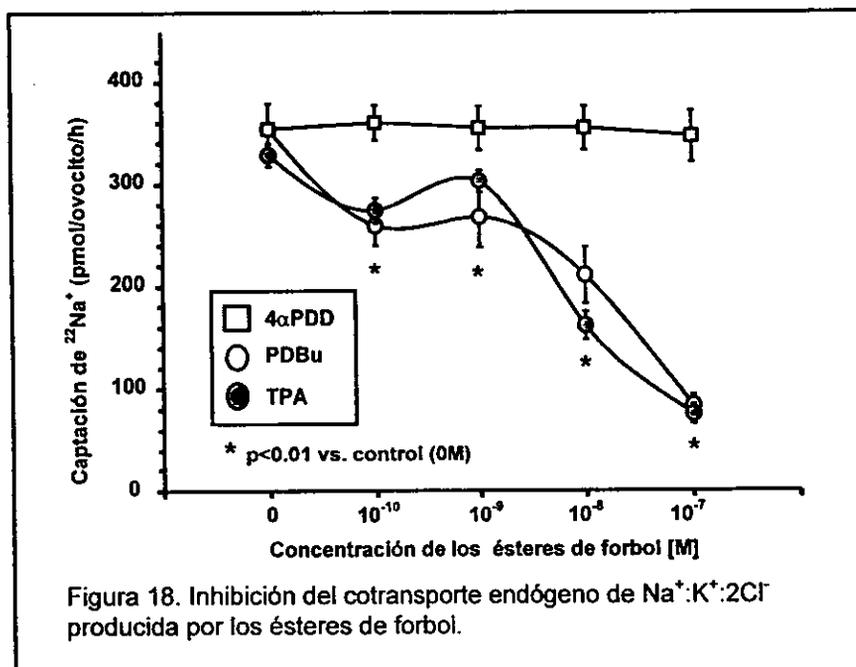


La máxima captación de 383 ± 21 pmol/ovocito/h se observó en el grupo control bajo condiciones isotónicas. En el grupo control hipotónico la captación fue de 186 ± 11 pmol/ovocito/h. La adición de bumetanida [$100 \mu\text{M}$] redujo la captación a 108 ± 13 pmol/ovocito/h y se logró una reducción semejante con la adición del éster de forbol TPA [100nM] que activa a la PKC de 110 ± 10 pmol/ovocito/h. La coincubación de los ovocitos en un medio que contenía el éster de forbol [100nM]

y un inhibidor de la PKC conocido como bisindolilmaleimida (BSM) [100 nM] produjo una parcial recuperación en la captación de 208 ± 35 pmol/ovocito/h. La captación obtenida tras la adición al medio del éster de forbol 4α PDD (que no activa a la PKC) no fue significativamente diferente del control isotónico (329 ± 18 vs. 383 ± 21 pmol/ovocito/h).

Este experimento muestra que la activación de la PKC con el éster de forbol TPA [100 nM] tiene un efecto inhibitorio sobre el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ comparable al producido por la bumetanida. Se comprobó que este efecto es producido por la PKC y no por algún otro mecanismo que pudiera ser activado por la presencia del TPA en el medio de incubación, puesto que su análogo 4α PDD, que posee las características generales de un éster de forbol pero que no es capaz de activar a la PKC, no inhibió al cotransportador en forma significativa con respecto al control. Además, el inhibidor específico de la PKC, la BSM, provocó una recuperación parcial en la actividad del cotransportador cuando los ovocitos fueron incubados tanto con el activador (TPA) como con el inhibidor (BSM) de la PKC. Dong *et al*⁴⁰ describieron un efecto inhibitorio de la PKC semejante en el epitelio ciliar no pigmentado de conejo. Estos experimentos sugieren que el efecto inhibitorio de los ésteres de forbol TPA y PDBu sobre la captación de $^{22}\text{Na}^+$ mediado por el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ está relacionado con la activación de la PKC.

En la figura 18 se resumen los tres experimentos donde se establece la dependencia de dosis de los ésteres de forbol TPA y PDBu, así como la



inhabilidad del $4\alpha\text{PDD}$ de activar a la PKC. Tanto TPA como PDBu se comportan en forma similar, TPA [100 nM] redujo la captación de $^{22}\text{Na}^+$ mediada por el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ de un valor control de 328 ± 10 a 75 ± 9 pmol/ovocito/h. PDBu [100 nM] redujo la captación de un valor control de 353 ± 25 a 83 ± 47 pmol/ovocito/h.

En resumen:

1. El transporte de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ en ovocitos se inhibió en presencia del diurético de asa bumetanida, lo que indica que los ovocitos expresan el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ sensible a bumetanida.

2. La estimulación de la PKC con dos ésteres de forbol (TPA y PDBu) redujeron la captación de $^{22}\text{Na}^+$ a valores semejantes a los obtenidos con la adición de bumetanida. A mayor concentración de los ésteres de forbol se observó una mayor disminución en la captación de $^{22}\text{Na}^+$, o sea una mayor inhibición del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$.
3. Cuando los ovocitos fueron expuestos a un medio que contenía tanto el inhibidor de la PKC como el activador de la misma, TPA, el inhibidor específico de la PKC, BSM produjo una parcial recuperación en la captación de $^{22}\text{Na}^+$.
4. Cuando fue incluido en el medio de incubación de los ovocitos el éster de forbol $4\alpha\text{PDD}$, que a pesar de compartir las características típicas de los ésteres de forbol fue incapaz de activar a la PKC, no hubo efecto alguno sobre la actividad del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ aún cuando la dosis fue aumentada hasta $1\ \mu\text{M}$.
5. El efecto del éster de forbol TPA sobre el cotransporte de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ en ovocitos de *Xenopus laevis* fue tiempo y dosis dependiente.
6. El efecto del éster de forbol PDBu fue también dosis dependiente.

CONCLUSIÓN

La función del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ del ovocito de *Xenopus laevis* se regula negativamente por la activación de la PKC con ésteres de forbol.

2. La estimulación de la PKC con dos ésteres de forbol (TPA y PDBu) redujeron la captación de $^{22}\text{Na}^+$ a valores semejantes a los obtenidos con la adición de bumetanida. A mayor concentración de los ésteres de forbol se observó una mayor disminución en la captación de $^{22}\text{Na}^+$, o sea una mayor inhibición del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$.
3. Cuando los ovocitos fueron expuestos a un medio que contenía tanto el inhibidor de la PKC como el activador de la misma, TPA, el inhibidor específico de la PKC, BSM produjo una parcial recuperación en la captación de $^{22}\text{Na}^+$.
4. Cuando fue incluido en el medio de incubación de los ovocitos el éster de forbol $4\alpha\text{PDD}$, que a pesar de compartir las características típicas de los ésteres de forbol fue incapaz de activar a la PKC, no hubo efecto alguno sobre la actividad del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ aún cuando la dosis fue aumentada hasta $1\ \mu\text{M}$.
5. El efecto del éster de forbol TPA sobre el cotransporte de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ en ovocitos de *Xenopus laevis* fue tiempo y dosis dependiente.
6. El efecto del éster de forbol PDBu fue también dosis dependiente.

CONCLUSIÓN

La función del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ del ovocito de *Xenopus laevis* se regula negativamente por la activación de la PKC con ésteres de forbol.

- ¹ Garrahan, P.J. y Rega, A. F. 1997. Transporte a través de la membrana celular. Secretaría General de la Organización de los Estados Unidos. Washington. D.C.
- ² Ablerts, B. Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. D. 1994. Molecular biology of the cell. 3rd. ed. Garland Publishing Inc. Nueva York. 1294 pp.
- ³ Hebert, S. C., Gamba, G. y Kaplan, M. 1996. The electroneutral Na⁺-(K⁺)-Cl⁻ cotransport family. *Kidney Int.* 49:1638-1641.
- ⁴ Torchia, J., Lytle, C., Pon, D. J., Forbush III, B. y Sen, A. K. 1992. The Na-K-Cl cotransporter of avian salt gland. Phosphorylation in response to cAMP-dependent and calcium-dependent secretagogues. *J. Biol. Chem.* 267. 35:25444-25450.
- ⁵ Russel, J. M. 1981. K⁺-dependent Na⁺Cl uptake by squid giant axon. (Abstract). *Biophys. J.* 33:40a.
- ⁶ Geck, P., Pietrzyk, C., Burckhardt, B. C., Pfeiffer, B. y Heinz, E. 1980. Electrically silent cotransport of Na⁺, K⁺ and Cl⁻ in Ehrlich cells. *Bioch. Biophys. Acta.* 600:432-447.
- ⁷ Haas, M. 1994. The Na-K-Cl cotransporters. *Am. J. Physiol.* 267 (Cell Physiol. 36):C869-885.
- ⁸ Suvitayavat, W., Palfrey, H. C., Haas, M., Dunham, P. B., Kalmar, F. y Rao, M. C. 1994. Characterization of the endogenous Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter in *Xenopus* oocytes. *Am. J. Physiol.* 266 (Cell Physiol. 35): C284-C292.
- ⁹ Shetlar, R. E., Schölermann, B., Morrison, A. I. y Kinne, R. K. H. 1990. Characterization of a Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport system in oocytes from *Xenopus laevis*. *Bioch. Biophys. Acta.* 1023:184-190.
- ¹⁰ Benjamin, B. A. y Johnson, E. A. 1997. A quantitative description of the Na-K-2Cl cotransporter and its conformity to experimental data. *Am. J. Physiol.* 273 (Renal Physiol. 42): F472-F482.
- ¹¹ Drewnowska, K. y Baumgarten, C. M. 1991. Regulation of cell volume in rabbit ventricular myocytes: bumetanide, chlorothiazide, and ouabain. *Am. J. Physiol.* 260 (Cell Physiol. 29): C122-C131.
- ¹² Altamirano, A. A., Russell, J.M. 1987. Coupled Na/K/Cl efflux. "Reverse" unidirectional fluxes in squid giant axons. *J. Gen. Physiol.* 89:669-686.
- ¹³ Haas, M. 1989. Properties and diversity of (Na-K-Cl) cotransporters. *Annu. Rev. Physiol.* 51:443-457.

-
- ¹⁴ Haas, M. y Forbush III, B. 1987. Photolabeling of a 150-kDa (Na + K + Cl) cotransport protein from dog kidney with a bumetanide analogue. *Am. J. physiol.* 253 (Cell Physiol. 22): C243-C250.
- ¹⁵ Haas, M. y Forbush III, B. 1988. Photoaffinity labelling of a 150 kDa (Na + K + Cl)-cotransport protein from duck red cells with an analogue of bumetanide. *Bioch. Biophys. Acta.* 939: 131-144.
- ¹⁶ Haas, M. y Forbush III, B. 1987. Na, K, Cl-cotransport system: characterization by bumetanide binding and photolabelling. *Kidney Int.* 32. 23: S134-S140.
- ¹⁷ Gamba, G., Miyanoshita, A., Lombardi, M., Lytton, J., Lee, W. S., Hediger, M. A. y Hebert, S. 1994. Molecular cloning, primary structure, and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney. *J. Biol. Chem.* 269. 26:17715-17722.
- ¹⁸ Gamba, G. 1995. Estructura molecular de los receptores de diuréticos luminales. *Rev. Invest. Clin.* 47: 231-249.
- ¹⁹ Payne, J. A. y Forbush III, B. 1994. Alternatively spliced isoforms of the putative renal Na-K-Cl cotransporter are differentially distributed within the rabbit kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:4544-4548.
- ²⁰ Igarashi, P., Van den Heuvel, G. B., Payne, A. y Forbush III, B. 1995. Cloning, embryonic expression, and alternative splicing of a murine kidney-specific Na-K-Cl cotransporter. *Am. J. Physiol.* 269. (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 38): F405-F418.
- ²¹ Palfrey, H. C., Alper, S. L. y Greengard, P. 1980. Protein phosphorylation and the regulation of cation cotransport. *J. Exp. Biol.* 89: 103-115.
- ²² Hass, M., Johnson, L. G. y Boucher, R. C. 1990. Regulation of Na-K-Cl cotransport in cultured canine airway epithelia: a [³H]bumetanide binding study. *Am. J. Physiol.* 259 (Cell Physiol. 28):C557-C569.
- ²³ Haas, M. y Forbush III, B. 1986. [³H]bumetanide binding to duck red cells. Correlation with inhibition of (Na + K + 2Cl) co-transport. *J. Biol. Chem.* 261. 18:8434-8441.
- ²⁴ Pewitt, E. B., Hegde, R. S. y Palfrey, H. C. 1990. [³H]bumetanide binding to avian erythrocyte membranes. Correlation with activation and deactivation of Na/K/2Cl cotransport. *J. Biol. Chem.* 265. 24:14364-14370.
- ²⁵ Kaplan, M. R., Mount, D. B., Delpire, E., Gamba, G. y Hebert, S. 1996. Molecular mechanisms of NaCl cotransport. *Annu. Rev. Physiol.* 58:649-668.

-
- ²⁶ Haas, M. y McBrayer, D. G. 1994. Na-K-Cl cotransport in nystatin-treated tracheal cells: regulation by isoproterenol, apical UTP, and [Cl]_i. *Am. J. Physiol.* 266 (Cell Physiol.):C1440-C1542.
- ²⁷ Lytle, C. y Forbush III, B. 1992. The Na-K-Cl cotransport protein of shark rectal gland. II. Regulation by direct phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 267. 35:25438-25443.
- ²⁸ Lytle, C. 1997. Activation of the avian erythrocyte Na-K-Cl cotransport protein by cell shrinkage, cAMP, fluoride, and caliculin-A involves phosphorylation at common sites. *J. Biol. Chem.* 272. 24:15069-15077.
- ²⁹ Crook, R. B., Von Brauchitsch, D. K. y Polansky, J. R. 1992. Potassium transport in nonpigmented epithelial cells of ocular ciliary body: inhibition of Na⁺, K⁺, Cl⁻ cotransporter by protein kinase C. *J. Cell. Physiol.* 153:214-220.
- ³⁰ Geck, P. y Heinz, E. 1986. The Na-K-Cl cotransport system. *J. Membrane Biol.* 91: 97-105.
- ³¹ Xu, J. C., Lytle, C., Zhu, T. T., Payne, J. A., Benz Jr., E., Forbush III, B. 1994. Molecular cloning and functional expression of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:2201-2205.
- ³² Geck, P. y Pfeiffer, B. 1985. Na⁺ + K⁺ + 2Cl⁻ cotransport in animal cells- its role in volume regulation. *Ann. New York Acad. Sci.* 456:166-182.
- ³³ Hebert, S. 1987. Volume regulation in renal epithelial cells. *Seminars in Nephrology.* 7. 1:48-60.
- ³⁴ Sleight, R. G. y M. A. Lieberman. 1995. Signal Transduction. Cell Physiology Source Book. Academic Press.
- ³⁵ Stryer, L. 1988. Biochemistry. W. H. Freeman & Co. Nueva York. 1089pp.
- ³⁶ Parker, P. J. 1996. The protein kinase C gene family. Signal Transduction. Chapman & Hall. Londres. Cap. 16. pp. 241-252
- ³⁷ Sahara, S., Sato, K., Aoto, M., Ohnishi, T., Kaise, H., Koide, H., Ogita, K. y Fukami, Y. 1992. Characterization of protein kinase C in *Xenopus laevis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 182. 1:105-114.
- ³⁸ Swanson, R. y Follander, K. 1992. In vitro synthesis of RNA for expression of ion channels in Xenopus oocytes. Methods in Enzymology. Academic Press Inc. Cap.18. pp. 310-318.

³⁹ Goldin, A. L. 1992. Maintenance of *Xenopus laevis* and oocyte injection. Methods in Enzymology. Academic Press Inc. Cap.15 pp. 266-278.

⁴⁰ Dong, J. y Delamere N. A. 1994. Protein kinase C inhibits Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter activity in cultured rabbit nonpigmented ciliary epithelium. *Am. J. Physiol.* 267 (Cell Physiol. 36): C1553-C1560.