

**SIMPOSIO 17.
ACUAPORINAS Y CANALES IÓNICOS**

MEDICINA (Buenos Aires) 2004; 64 (Supl. II): 69-71

**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ACUAPORINAS POR HORMONAS OVÁRICAS
EN EL EPITELIO DEL TRACTO REPRODUCTIVO**

MARÍA C. BRAÑES

Departamento de Ciencias Fisiológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

El fluido del lumen del tracto reproductivo de la hembra proporciona el vehículo de transporte de los gametos y embriones y un ambiente óptimo para el éxito de la fecundación y el desarrollo embrionario. Este fluido, secretado por las células epiteliales que delimitan al tracto, varía en calidad y cantidad durante el ciclo estral, aumentando su volumen y fluidez en el período de la ovulación para volverse mínimo y muy viscoso en la fase lútea y la preñez. Esta variación se correlaciona con fluctuaciones en los niveles circulantes de estradiol y progesterona, lo que sugiere que estas hormonas regularían la disponibilidad de agua para la formación de este fluido por mecanismos aún no dilucidados. El transporte transcelular de agua está mediado principalmente por canales formados por acuaporinas (AQPs), una familia de proteínas de transmembrana. Algunos de sus miembros han sido identificados en el epitelio uterino, sugiriendo su participación en el aporte acuoso del fluido. Además, se ha descrito que la expresión de algunas de estas AQPs es regulada por hormonas sexuales. De manera semejante, hemos encontrado que el epitelio oviductal expresa AQPs reguladas por hormonas ováricas. Utilizando el sistema de expresión exógena de *X. laevis* como un ensayo funcional, hemos demostrado que el epitelio del oviducto de la rata expresa mensajeros que codifican para canales de agua e identificamos mediante RT-PCR a los ARNm de las AQPs 5, 8 y 9, pero no el de las AQPs 2 y 3, al menos

durante el proestro, la etapa previa a la ovulación. La inmunoreactividad para las AQPs 5, 8 and 9 se localizó solamente en las células epiteliales y en los dos segmentos, ampulla e istmo, más cercano al ovario y al útero, respectivamente. Las AQPs 5 y 8 se detectaron en el citoplasma, mientras que la AQP 9 se localizó en la membrana apical. La inmunoreactividad para las tres AQPs se perdió luego de ovariectomía de los animales y sólo se recuperó la expresión de la AQP9 luego de la administración de diferentes tratamientos de reemplazo hormonal con estradiol y/o progesterona. La recuperación de la reactividad de la AQP9 se correlacionó con un aumento en los niveles de su ARNm y proteína luego del tratamiento con sólo estradiol o con estradiol seguido de progesterona. Sin embargo, los niveles de proteína se recuperaron sin aumento en los niveles de ARNm luego de administrar dos dosis consecutivas de progesterona. Se detectó que los niveles de AQP9 son variables a lo largo del ciclo estral, siendo máximos durante las etapas periovulatorias del estro y proestro. Estos resultados indican que estradiol y progesterona regulan positivamente pero a distinto nivel la síntesis de AQP9, y que otras señales ováricas están involucradas en la expresión de las AQPs 5 y 8. Así, la regulación del tipo y cantidad de canales de agua en el epitelio del tracto reproductivo constituiría una estrategia para regular la disponibilidad de agua en el lumen del tracto. FONDECYT 3030066.

**CANALES DE AGUA (AQUAPORINAS) EN EL HEPATOCITO: EXPRESIÓN
Y TRÁFICO INTRACELULAR**

RAÚL A. MARINELLI

Instituto de Fisiología Experimental, IFISE (CONICET-UNR) Rosario, Santa Fe, Argentina.

Los canales de agua o aquaporinas conforman una familia de proteínas homólogas ampliamente distribuidas en los seres vivos que facilitan el transporte osmótico

de agua a través de las membranas biológicas. Los hepatocitos, células formadoras de la secreción biliar canalicular, expresan tres canales de agua, las

aquaporinas 0, 8 y 9 (1,2). La aquaporina-0 se localiza en el interior celular y su función en hepatocitos es desconocida (2). La aquaporina-9 se localiza exclusivamente sobre la membrana plasmática sinusoidal (basolateral) y contribuiría al pasaje de agua y de algunos solutos pequeños (2). Por su parte, la aquaporina-8 se localiza predominantemente en vesículas intracelulares. La hormona glucagón, vía AMP cíclico y activación de la proteína quinasa A, estimula su tráfico vesicular dependiente de microtúbulos hasta la membrana plasmática canalicular (apical) del hepatocito (1-3). La redistribución de aquaporina-8 induce un aumento significativo de la permeabilidad de membrana al agua facilitando su transporte osmótico (4). Nuestros estudios indican que el hepatocito puede regular la permeabilidad al agua de la

membrana canalicular alterando el número de moléculas de aquaporina-8, un mecanismo que participaría en la formación y regulación de la secreción biliar canalicular. Nuestros resultados también indican que la expresión canalicular de aquaporina-8 está marcadamente disminuida en colestasis extra e intrahepática, sugiriendo un rol de las aquaporinas en los mecanismos de disfunción secretora biliar (5).

Referencias

1. García et al. *J Biol Chem* 276:12147-52, 2001.
2. Huebert et al. *J Biol Chem* 277:22710-17, 2002.
3. Gradilone et al. *Hepatology* 37:1435-41, 2003.
4. Marinelli et al. *J Biol Chem* 31:43157-62, 2003.
5. Carreras et al. *Hepatology* 37:1026-33, 2003.

GENES CUYA EXPRESIÓN ES REGULADA POR LA ACTIVIDAD DEL CFTR, CANAL DE CLORURO AFECTADO EN FIBROSIS QUÍSTICA

TOMÁS A. SANTA COLOMA, G. BEATRIZ REYES, GUILLERMO TAMINELLI Y A. GABRIEL VALDIVIESO

Instituto de Investigaciones Bioquímicas (UBA, CONICET) y Fundación Instituto Leloir, Buenos Aires, Argentina

En 1994 hacía cinco años que John Riordan había clonado el gen *CFTR*, canal de cloruro afectado en fibrosis quística (FQ). Sin embargo, el mecanismo por el cual existía una sobreproducción de mucinas en los pacientes FQ seguía siendo una incógnita. Nos propusimos entonces estudiar la posible existencia de genes regulados por la actividad del CFTR, que deberían ser finalmente los responsables del fenotipo FQ (redes de genes dependientes de otros genes). Utilizando display diferencial identificamos varios genes CFTR-dependientes. La mayoría correspondían a proteínas de función desconocida, pero uno resultó ser la quinasa c-Src. Se sabía que c-Src modulaba la expresión de diversas mucinas componentes del mucus (MUC2, MUC5, etc.), pero faltaba estudiar MUC1, el componente principal en las vías respiratorias, afectadas en FQ. Utilizando mutantes de c-Src y microscopía confocal, demostramos que efectivamente MUC1 se encontraba sobreexpresada en células CFDE, derivadas de un paciente FQ. En células CFDE transfectadas con un plásmido CFTR wt, la sobreexpresión de MUC1 se corregía y aumentaba nuevamente con oligonucleótidos antisense del CFTR, o con glibenclamida (inhibidor de CFTR). Estos resultados sugieren que el c-Src es el puente entre la sobreexpresión de mucinas y la falla del CFTR en FQ (Gonzalez Guerrico et al., *J Biol Chem*.

277:17239-47, 2002) y que inhibidores de c-Src, como genisteína, podrían ser beneficiosos.

Recientemente caracterizamos otros genes CFTR-dependientes (ver posters de A. Valdivieso y G. Taminelli). Contrariamente a c-Src, éstos se encuentran modulados negativamente en FQ. Uno corresponde a una subunidad del Complejo I mitocondrial fundamental para su actividad (ND4), de modo que su modulación por CFTR podría ser responsable de la falla mitocondrial observada en pacientes FQ. El otro gen, KLPx, corresponde a una proteína homóloga a la región N-terminal de ciertas proteínas semejantes a kinesinas. PSORT II predice su localización mitocondrial, que hemos verificado mediante el uso de una quimera KLPx-GFP. Como KLPx se encuentra también disminuida en FQ, los resultados sugieren que podría modular positivamente la actividad mitocondrial, al igual que ND4.

Demostramos así nuestra hipótesis sobre la existencia de genes dependientes del CFTR y se abre el camino hacia la identificación de nuevos posibles blancos de terapia en FQ.

Agradecimientos: A mis alumnos, profesores, colaboradores y sponsors; UBA, CONICET y ANPCyT; Fundaciones Rockefeller, Roemmers, Antorchas, AAPC, TWAS y Asociación FIPAN; Joan Brudger, Harvard Medical School, por las mutantes de c-Src; John Riordan, Mayo Clinic, por los anticuerpos anti-CFTR.

EFFECTOS DE NUCLEÓTIDOS EXTRACELULARES Y SUS PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS SOBRE LA REGULACIÓN DEL VOLUMEN CELULAR EN HEPATOCITOS DE TRUCHA (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)

DIEGO PAFUNDO Y PABLO J. SCHWARZBAUM

IQUIFIB. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Junín 956. (1113). Buenos Aires, Argentina.

En hepatocitos de trucha, el aumento de volumen inducido por medios hipotónicos es seguido de una disminución compensatoria conocida como RVD (*regulatory volume decrease*). Se ha postulado que el ATP liberado al medio extracelular luego del shock hipotónico podrían interactuar con receptores P de tipo 2 (P2) para modular esta respuesta regulatoria de volumen. Por otro lado, ectoenzimas ubicadas en la superficie de la membrana celular podrían defosforilar totalmente el ATP, y la adenosina resultante podría unirse a receptores P de tipo 1 (P1) y modular el RVD por mecanismos aun desconocidos.

En el presente trabajo se caracterizó en hepatocitos de trucha el efecto del ATP y del UTP y de sus productos de hidrólisis sobre el RVD.

El volumen celular fue estimado por microscopia de fluorescencia utilizando BCECF. El RVD fue evaluado a partir de su velocidad inicial (v_{RVD}) y a los 40 min de iniciada la regulación de volumen (RVD₄₀).

Resultados: en presencia de medio hipotónico (60% de isotónico), los hepatocitos aumentaron su volumen 1.6 veces, seguido de un v_{RVD} de 1.7 min^{-1} y RVD₄₀ 60.2%. En presencia de $5 \mu\text{M}$ de ATP, UTP, UDP o ATPgS (agonistas P2) el v_{RVD} se incrementó 1.5-2 veces, mien-

tras que no se detectaron cambios en el valor de RVD₄₀. El agregado de $100 \mu\text{M}$ de suramina o cibacron blue (antagonistas P2) al medio hipotónico no produjo efecto en el v_{RVD} pero redujo el RVD₄₀ 53-58%.

La incubación de hepatocitos en presencia de $5 \mu\text{M}$ de [^{32}P]ATP o [^{32}P]ATP causó la liberación extracelular de [^{32}P]Pi ($0.21 \text{ nmol } 10^{-6} \text{ cels } \text{min}^{-1}$) y de [^{32}P]Pi (aprox. $8 \cdot 10^{-3} \text{ nmol } 10^{-6} \text{ cels } \text{min}^{-1}$), sugiriendo la presencia de ectoenzimas capaces de hidrolizar totalmente el ATP.

Con respecto al efecto de la activación de P1 sobre el RVD, $5 \mu\text{M}$ adenosina en presencia y en ausencia de $100 \mu\text{M}$ NBTI (un bloqueante de la captación de adenosina) provocaron una disminución del RVD₄₀ de 37-44% mientras que $100 \mu\text{M}$ 8-fenilteofilina, un antagonista P1, aumentaron el RVD₄₀ en 15%.

En conclusión, los resultados arriba descriptos indican que el ATP, UTP y UDP, actuando vía P2, son importantes factor que promueven el RVD de hepatocitos de trucha, mientras que la adenosina proveniente del ATP liberado por las células actuaría vía P1 inhibiendo la respuesta regulatoria de volumen.

Con subsidios de F. Antorchas, UBA, CONICET, ANPCyT (11017).