

Tesis Doctoral

Estudio del rol de la AQP2 en la regulación del volumen celular

Galizia, Luciano

2010

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

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

Cita tipo APA:

Galizia, Luciano. (2010). Estudio del rol de la AQP2 en la regulación del volumen celular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Galizia, Luciano. "Estudio del rol de la AQP2 en la regulación del volumen celular". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**ESTUDIO DEL ROL DE LA AQP2 EN LA REGULACIÓN DEL
VOLUMEN CELULAR**

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

Lic. Luciano Galizia

Director de la tesis: Dra. Paula Ford

Consejero de Estudios: Dr. Enrique Rodríguez

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

Buenos Aires, 2010

Estudio del rol de la AQP2 en la regulación del volumen celular

La capacidad de las células para regular su volumen es esencial para el mantenimiento de la homeostasis celular en condiciones de anisotonia. Nosotros previamente informamos, en una línea celular que deriva de túbulo colector cortical de rata (RCCD₁), que la presencia de la acuaporina 2 (AQP2) en la membrana celular es crítica para la activación rápida de mecanismos de regulación de volumen luego de un shock hipotónico (RVD). El objetivo de este trabajo de tesis fue investigar la vía de señalización que relaciona la AQP2 con esta activación rápida de RVD. Probamos la hipótesis de que AQP2 podría tener un papel en la activación de la entrada de calcio por hipotonía e investigamos su importancia en la regulación del volumen celular. Para ello estudiamos la $[Ca^{2+}]_i$ y el volumen celular en respuesta a un shock hipotónico en células WT-RCCD₁ (no expresan acuaporinas) y en células AQP2-RCCD₁ (transfectadas con AQP2). Encontramos, que luego de la exposición a un gradiente hipotónico, sólo en las células que expresan AQP2 se observa un sustancial aumento $[Ca^{2+}]_i$. Este aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ es fuertemente dependiente del calcio extracelular y de depósitos intracelulares. La exposición de las células AQP2-RCCD₁ a HgCl₂ (inhibidor de las acuaporinas), gadolinio y rojo de rutenio (inhibidores del TRPV4) redujeron el aumento $[Ca^{2+}]_i$. Además, la exposición de las células a estos inhibidores disminuyó el rápido RVD. Estudios de inmunofluorescencia mostraron que, en condiciones de isotonía el TRPV4 se distribuye principalmente en el compartimento intracelular en ambas líneas celulares. Sin embargo en condiciones de hipotonía el TRPV4 es translocado a la membrana celular sólo en las células que expresan AQP2. En esta tesis proponemos la existencia de una asociación funcional entre la AQP2 y el TRPV4, esencial para la generación de señales de calcio inducidas por *swelling* y necesarias para la activación rápida de los mecanismos de regulación de volumen celular.

Palabras Clave: AQP2; TRPV4; RVD; calcio intracelular; células renales

Study of AQP2 role in cell volume regulation

The ability of cells to regulate their volume is essential for maintenance of cellular homeostasis under anisotonic environmental conditions. We previously reported in a rat cortical collecting duct cell line (RCCD₁) that the presence of aquaporin 2 (AQP2) in the cell membrane is critical for the rapid activation of regulatory volume decrease mechanisms (RVD). The aim of our present work was to investigate the signalling pathway that links AQP2 to this rapid RVD activation. We tested the hypothesis that AQP2 could have a role in activation of calcium entry by hypotonicity and its implication in cell volume regulation. We studied $[Ca^{2+}]_i$ and cell volume changes in response to a hypotonic shock in WT-RCCD₁ (not expressing aquaporins) and in AQP2-RCCD₁ (transfected with AQP2) cells. We found that after a hypotonic shock only AQP2-RCCD₁ cells exhibit a substantial increase in $[Ca^{2+}]_i$. This $[Ca^{2+}]_i$ increase is strongly dependent on extracellular Ca^{2+} and on intracellular stores. Exposure of AQP2-RCCD₁ cells to $HgCl_2$ (aquaporin inhibitor), gadolinium and ruthenium red (TRPV4 inhibitors) reduced the increase in $[Ca^{2+}]_i$. Furthermore, exposure of cells to all of the above described conditions impaired rapid RVD. Immunofluorescence studies show that under isotonic conditions TRPV4 is distributed mainly in intracellular compartment in both cell lines. However under hypotonic conditions TRPV4 is translocated to the cell membrane only in AQP2-RCCD₁ cells. In this thesis we suggest the existence of a functional interaction between AQP2 and TRPV4, which is essential for the calcium signal generation induced by swelling and necessary for a rapid activation of the mechanisms of cell volume regulation.

Key Words: AQP2; TRPV4; RVD; intracellular calcium; renal cells

Agradecimientos

Quiero agradecer especialmente a la Universidad de Buenos Aires, en cuyas aulas, laboratorios y pasillos comencé este proceso infinito de aprendizaje, imposible de realizar sin los subsidios, las becas y los seres humanos.

Al CONICET y a la Agencia por los subsidios otorgados,

a todos los miembros del Laboratorio de Biomembranas del Departamento de Fisiología de la UBA, por hacer de ese lugar de trabajo un ámbito de trabajo inigualable,

a mi directora de tesis, la Dra. Paula Ford, por darme la oportunidad de participar de su proyecto de trabajo, por su confianza, dedicación y sobretodo por ser un excelente ser humano,

a la Dra. Claudia Capurro por sus consejos, recomendaciones e intercambios científicos,

a la Dra. Gabriela Amodeo, por las charlas, consejos y enseñanzas sobre aparatos equipos y cables,

a la Dra. Roxana Toriano, por las charlas de artes, ciencias y afines,

al Lic. Ricardo Dorr, por su incondicional predisposición a ayudar en el trabajo diario,

a la Dra. Valeria Rivarola, por su invaluable ayuda en las mesadas, por sus consejos y discusiones, y por compartir su experiencia durante estos años de aprendizaje,

a Rosalía y a Cristina por colaborar en el orden a nuestro alrededor,

a la Dra. Moira Sutka, por colaborar en el desorden del escritorio compartido,

a la Dra. Karina Alleva, por sus consejos casi diarios sobre como preparar un rico mate,

al Dr. Marcelo Ozu, por su calma y su espíritu oriental,

a la Lic. Pilar Flamenco, por el trabajo conjunto y las discusiones de experimentos durante estos años,

al Bioq. Jorge Bellati, por su energía y su empuje,

a la Lic. Mercedes Marquez, por su espíritu alegre,

a la Med. Luciana Melamud, por transmitir tranquilidad,

al Med. Juan Fernandez, por las eternas charlas,

a las jovenes Vicky, Cyn, Teresa, Julia y Majo, por la buena onda y por el espíritu estudiante,

al Dr. Osvaldo Chara, por transmitir esa increíble pasión por la enseñanza, y su amor por las matemáticas,

a la Dra. Paula Mut, por los años de mesadas compartidas,

a los compañeros de pasillo del 7^{mo}, los becarios del departamento de Fisiología de estos años, Mariano, Julián, Victoria, Elizabeth, Federico, Juliana, Carla por su predisposición y buena onda,

a la gente del 6^{to} donde siempre he sido bien recibido, en especial a Diego, Vicky, Cora y Nico.

a mis compañeros de docencia de Fisiología, por estos años de aprendizaje.

a los compañeros de la facu de mis años de estudiante, de Neurocenias, del Sótano y del taller con los que se han compartido innumerables charlas de ciencia.

a los amigos de siempre Martín, Lucas, Pato, Tulo y Guido y a los amigos de Sanpolara, a lucho, guido, al colo, al berry y al Ale, por bancarme como soy, siempre,

a mi viejo y mi vieja, Julia y Carlos, por darme la vida y apoyarme en mis proyectos,

a mis hermanas, Juli y Ceci por bancarme mis locuras y por traer al mundo a Ana, Mile, Pachi y a Nacho.

a Lisandro Tegli, porque tal vez, sin saberlo me impulsó a emprender este camino.

a Mari y a Guille, por el afecto,

a Vir, por compartir la vida.

Gracias.

*A mis padres, hermanas y
abuelos.*

A Vicente Manchado.

A Virginia

“El universo que nos rodea es el universo de los colores, sonidos y olores; todo eso desaparece frente a los aparatos del científico, con una formidable fantasmagoría”

Ernesto Sábato, Uno y el Universo, 1945.

Abreviaturas

- 4 α -PDD:** 4 α forbol 12-13 didodecanoato
- AA:** Acido Araquidónico
- ADP:** Adenosin difosfato
- AMP:** Adenosin Monofosfato
- AQP :** Acuaporina
- AQP2-RCCD₁:** AQP2 Rat Cortical Collectng Duct
- ATP:** Adenosin Trifosfato
- BCECF/AM :** bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein
- BKCa:** Large Conductance Calcium-activated Potassium Channel
- CCD:** Cortical Collecting duct
- CCE:** Entrada capacitativa de Calcio
- CFTR:** Cystic Fibrosis Transmembrane Receptor
- CICR:** Liberación de calcio inducida por calcio
- CYP 450:** Citocromo P450 epoxigenasa.
- DAG:** Diacilglicerol
- EAAT1:** Excitatory Amino Acid Transporter
- EET:** Acido Epoxieicosatrienoico
- EGTA:** Acido Etilendiaminotetracético
- ENaC:** Epithelial Sodium Channel.
- FI:** Filamentos intermedios
- GPCR:** Receptores acoplados a Proteína G
- IKCa :** Intermediate Conductance Calcium-activated Potassium Channel
- IP3:** Inositol trifosfato
- IP3R:** Receptor de Inositol trifosfato
- IsK:** Slow-voltage dependent potassium channel
- K2P:** Two pores potassium channel
- KCC:** K-Cl cotransport
- MAP:** Kinasas Mitogen-activated protein
- MSC:** Mechanosensitive channel
- MSCC:** Mechanosensitive calcium channel

NCX: Sodium Calcium Exchanger
NKCC: Na-K-Cl cotransporter
ORCC: Outwardly rectifying Cl- channel
OsM: Osmolaridad
PC: Fosfatidilcolina
P_{osm}: Coeficiente permeabilidad osmótica
PI-3 K: Fosfatidil Inositol Kinasa
PKA: Protein Kinasa A
PKC: Protein kinasa C
PLA2: Fosfolipasa A2
PLC: Fosfolipasa C
PMCA: Plasma membrana Calcium ATPase
ROC: Receptor-operated calcium
ROCE: Receptor activated Calcium Entry
RRy: Receptor de Rianodina
RT-PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa Transcriptasa Reversa
RRu: Rojo de rutenio
RVD: Regulatory Volume Decrease
RVD₂₀: Porcentaje de regulación de volumen a los 20 minutos
RVI: Regulatory Volume Increase
SAC: Stretch activated channels
SERCA: Sarcoplasmatic Reticulum Calcium ATPase
SGLT: Sodium-Glucose Transporter
SKCa: Small Conductance Calcium-activated Potassium Channel
SMOC: Second messenger operated channels
SOC: Store operated channels
TC: Túbulo colector
TK: Tirosin Kinasa
TRPC: Transient Receptor Portential Cannonical
TRPV: Transient Receptor Potential Vanilloid
VOC: Voltage-operated channel
VRAC: Volume regulated anion channels

VSOAC: Volume sensitive organic anion channel

VSOR: Volume-sensitive outwardly-rectifying

WT-RCCD₁: Wild Type Rat Cortical Collecting duct.

Índice General

Capítulo 1: Introducción general y objetivos	1
1.1. Principios de la regulación del volumen celular	2
1.1.1. Procesos reguladores del volumen celular: RVD y RVI	3
<i>i. ¿Qué es el RVD?</i>	3
<i>ii. ¿Qué es el RVI?</i>	4
1.2. Componentes moleculares que participan en el RVD	5
1.2.1. Los sistemas sensores del volumen celular	5
<i>i. Aglomeración macromolecular</i>	6
<i>ii. Citoesqueleto</i>	6
<i>iii. Estiramiento de membrana</i>	7
1.2.2. Vías de transducción de la señal	8
<i>i. Fosforilación de proteínas</i>	9
<i>ii. Metabolismo lipídico</i>	9
<i>iii. ATP y receptores purinérgicos</i>	10
<i>iv. pH</i>	10
<i>v. El calcio intracelular</i>	11
1.2.3. Mecanismos efectores	11
<i>i. Canales de Cl⁻</i>	12
<i>ii. Canales de K⁺</i>	13
1.3. Movimiento de agua a través de la membrana celular y los epitelios	14
1.3.1. Mecanismos y vías del transporte de agua	14
<i>i. La bicapa lipídica</i>	17
<i>ii. Las Acuaporinas (AQPs)</i>	17
<i>iii. Los cotransportadores agua-soluto</i>	20
1.4. El transporte de agua y los Epitelios Renales	20
1.4.1. La AQP2 y la reabsorción de agua en el túbulo colector	20
1.4.2 Las líneas celulares de túbulo colector	22
1.5. AQPs y regulación de volumen	24
1.5.1 ¿Por qué las AQPs pueden ser importantes para el RVD?	25
1.6. Objetivos generales	27
Capítulo 2: Participación de la AQP2 en el incremento de calcio intracelular inducido por hipotonía: Implicancias en la regulación de volumen celular	28
2.1. Introducción	29
2.1.1. Mecanismos celulares generales involucrados en la señalización de calcio	29
<i>i. Mecanismos de mantenimiento de la concentración de calcio libre citosólico</i>	30
<i>ii. Mecanismos de entrada de calcio</i>	31

<i>iii. Mecanismos de liberación de calcio desde los reservorios intracelulares</i>	33
<i>iv. Mecanismos de señalización que utilizan ambas fuentes</i>	33
<i>a- CICR</i>	33
<i>b- CCE</i>	34
2.1.2. Objetivos	36
2.2. Materiales y métodos	37
2.2.1. Cultivo celular	37
2.2.2. Medición de Volumen Celular	37
2.2.3. Medición del coeficiente de permeabilidad osmótica	41
2.2.4. Medición de calcio intracelular	42
2.2.5. Soluciones	44
2.2.6. Estadística	45
2.3. Resultados	45
2.3.1. La hipotonía induce incremento de calcio intracelular en células que expresan AQP2	45
2.3.2. El incremento de calcio inducido por hipotonía en células AQP2-RCCD ₁ depende de la fuente extracelular de calcio	48
2.3.3. La entrada de calcio dependiente de AQP2 es requerida para la rápida activación del RVD	50
2.3.4. El Gadolinio inhibe el incremento de calcio y el RVD dependiente de AQP2	52
2.3.5. La liberación de calcio de los compartimientos intracelulares también está involucrada en la respuesta de calcio a hipotonía mediada por AQP2	55
2.3.6. La liberación de calcio de reservorios ante estímulos hipotónicos dependiente de AQP2 es requerida para la rápida activación del RVD	57
2.3.7. El incremento de calcio en células AQP2-RCCD ₁ depende de la magnitud del estímulo osmótico: activación de la entrada capacitativa	58
2.4. Discusión	62
2.4.1. La presencia de la AQP2 funcional en las células del CCD es crucial para producir los incrementos de calcio necesarios para activar el RVD	62
2.4.2. El incremento de calcio inducido por <i>swelling</i> dependiente de AQP2 involucraría canales mecanosensibles	65
2.4.3. Posible participación de una vía CCE en el incremento de calcio inducido por <i>swelling</i> en AQP2-RCCD ₁	66
Capítulo 3: Participación del TRPV4 en el aumento de la concentración de calcio intracelular en respuesta a hipotonía en las células AQP2-RCCD₁	67
3.1. Introducción	68
3.1.1. La familia de los TRP	68
3.1.2. Los TRP mecanosensibles en riñón	69
3.1.3. El canal TRPV4	70
<i>i. Activación del canal TRPV4 por hipotonía</i>	73

ii. Activación por agonistas sintéticos: 4 α -PDD	74
iii. Interacción proteína-proteína en la activación del TRPV4	75
3.1.4. Objetivos	76
3.2. Materiales y métodos	76
3.2.1. Cultivo celular	76
3.2.2. Medición de Volumen Celular y calcio intracelular	77
3.2.3. RT-PCR	77
3.2.4. Western Blot	78
3.2.5. Inmunofluorescencia	79
3.2.6. Microscopía confocal	80
3.2.7. Soluciones	80
3.2.8. Estadística	81
3.3. Resultados	81
3.3.1. La inhibición de los canales TRPV disminuye el incremento de calcio en respuesta a estímulos hipotónicos y el RVD de las células AQP2-RCCD ₁	81
3.3.2. El canal osmosensible TRPV4 se expresa en las células RCCD ₁	85
3.3.3. El canal osmosensible TRPV4 es activable por 4 α -PDD en las células WT y AQP2- RCCD ₁	87
3.3.4. Los microfilamentos de actina y los microtúbulos son necesarios para la correcta osmoseñalización por TRPV4 ante estímulos hipotónicos en las células AQP2-RCCD ₁ .	91
3.3.5. El canal osmosensor TRPV4 aumenta su inserción en membrana plasmática en respuesta a un shock hipotónico en células AQP2-RCCD ₁	93
3.3.6. La hipotonía no provocaría una importante colocalización en membrana de TRPV4 y AQP2	96
3.3.7. La inserción del TRPV4 en la membrana inducida por <i>swelling</i> depende de la presencia de AQP2 funcional	98
3.3.8. La inserción del TRPV4 en la membrana de las células AQP2-RCCD ₁ depende de microtúbulos	99
3.3.9. La activación de TRPV4 por estímulos hipotónicos en las células RCCD ₁ involucraría a los EETs	101
3.4. Discusión	102
3.4.1. La presencia del canal TRPV4 en las células del CCD es esencial para producir los incrementos de calcio necesarios para el RVD: Rol de la AQP2	102
3.4.2. La activación del TRPV4 por hipotonía dependiente de AQP2 involucraría el tráfico a membrana	105
3.4.3. Evidencias de asociación funcional entre AQP2 y TRPV4 en las células del CCD.	107
Capítulo 4: Discusión general y perspectivas	110
4.1. Discusión general	111
4.1.1. Participación de la AQP2 en la activación de señales de calcio	111

durante el <i>swelling</i> .	
4.1.2. Participación de la AQP2 y el TRPV4 en la activación de una CCE.	112
4.1.3. Participación de la asociación funcional entre AQP2 y TRPV4 en la activación de mecanismos rápidos de RVD	113
4.1.4. Modelo hipotético propuesto para explicar el rol de la AQP2 en la activación del RVD	113
4.2 Perspectivas	115
Anexo Metodológico	117
Bibliografía	119
Trabajos publicados	135
Índice de Figuras	
Figura 1.1: Esquema de los mecanismos de regulación del volumen celular en respuesta a anisotonia del medio extracelular	4
Figura 1.2: Esquema de una célula epitelial hipotética mostrando los distintos sistemas de filamentos del citoesqueleto	7
Figura 1.3: Vías implicadas en el transporte de agua a través de un epitelio.	14
Figura 1.4: Esquema de las vías implicadas en el transporte transcelular de agua.	16
Figura 1.5: Ilustración esquemática de la topología de la AQP1.	19
Figura 1.6: Expresión y regulación de las acuaporinas en nefrón de mamíferos.	21
Figura 1.7: Micrografía electrónica de las células RCCD ₁ .	23
Figura 1.8: Mecanismos de regulación de volumen en las células RCCD ₁ .	25
Figura 1.9: Esquema de la evolución temporal del volumen relativo, luego de aplicar un shock hipotónico en células que expresan acuaporinas (+AQP) vs células que no expresan acuaporinas (-AQP).	26
Figura 2.1: Mecanismos generales de mantenimiento del calcio intracelular.	31
Figura 2.2: Modos de entrada de calcio a través de la membrana.	32
Figura 2.3: Esquema de la señalización de calcio por el mecanismo denominado CICR (Liberación de calcio inducida por calcio).	34
Figura 2.4: Esquema de la señalización de calcio por el mecanismo denominado CCE (Entrada de calcio capacitativa).	35
Figura 2.5: Modelos hipotéticos propuestos para la activación de canales SOC en la generación de la entrada de calcio CCE.	36
Figura 2.6: Esquema de mediciones utilizadas para la técnica de medición de cambios de volumen.	39
Figura 2.7: Espectro de excitación del Fluoróforo BCECF.	40
Figura 2.8: Espectro de excitación del fluoróforo Fura-2/AM	43
Figura 2.9: Efectos de la hipotonía en la $[Ca^{2+}]_i$ en células AQP2-RCCD ₁ y	46

WT en presencia y ausencia de HgCl ₂ .	
Figura 2.10: Efectos de la anfotericina en el Posm y en la [Ca ²⁺] _i en células WT-RCCD ₁ en respuesta a hipotonía.	48
Figura 2.11: Efecto de la remoción del calcio extracelular en la variación de la [Ca ²⁺] _i en células AQP2-RCCD ₁ y WT-RCCD ₁ luego de un tratamiento hipotónico	49
Figura 2.12: Efecto de la remoción de calcio sobre el RVD en las células AQP2 y WT-RCCD ₁ luego de un tratamiento hipotónico (Δ Osm = 100 mOsm).	51
Figura 2.13: Efecto de la remoción de calcio sobre la permeabilidad osmótica al agua (P _{osm}) en las células AQP2 y WT-RCCD ₁ .	52
Figura 2.14: Efecto del Gadolinio en la entrada de calcio estimulada por hipotonía en células AQP2-RCCD ₁ .	53
Figura 2.15: Efecto del Gadolinio en la regulación de volumen (RVD) en células AQP2-RCCD ₁ .	54
Figura 2.16: Efectos de la anfotericina en el RVD en células WT-RCCD ₁ .	55
Figura 2.17: Efectos de la Tapsigargina (Taps) y BAPTA-AM en el incremento de [Ca ²⁺] luego de un shock hipotónico en células AQP2-RCCD ₁ .	56
Figura 2.18: Efectos de la Tapsigargina (Taps) y BAPTA-AM en % RVD luego de un shock hipotónico en células AQP2-RCCD ₁ .	58
Figura 2.19: Efectos de la magnitud del gradiente osmótico en la [Ca ²⁺] _i en células WT y AQP2-RCCD ₁ .	59
Figura 2.20: Protocolo utilizado para inducir entrada de calcio por vaciamiento de depósitos intracelulares (CCE) en células AQP2-RCCD ₁ .	60
Figura 2.21: Presencia de entrada de calcio capacitativa en las células RCCD ₁ .	61
Figura 3.1: Características estructurales y funcionales del TRPV4.	71
Figura 3.2: Mecanismo propuesto de activación del canal TRPV4 por estímulos hipotónicos.	74
Figura 3.3: Sitio propuesto de unión de 4 α -PDD a TRPV4.	75
Figura 3.4: Efectos del Rojo de rutenio (RRu) sobre la entrada de calcio en respuesta a hipotonía en las células AQP2-RCCD ₁ y WT-RCCD ₁ .	82
Figura 3.5: Efectos del rojo de rutenio (RRu) sobre la regulación del volumen en las células AQP2-RCCD ₁ y WT-RCCD ₁ .	84
Figura 3.6: Caracterización de la presencia de mRNAs de TRPVs osmosensibles renales en las células WT-RCCD ₁ y AQP2-RCCD ₁ .	86
Figura 3.7: Estudio de la expresión del canal TRPV4 en las células WT-RCCD ₁ y AQP2-RCCD ₁ .	87
Figura 3.8: Efecto del 4 α -PDD en la [Ca ²⁺] _i de las células AQP2-RCCD ₁ y WT-RCCD ₁ .	89
Figura 3.9: Efecto del 4 α -PDD sobre la regulación de volumen y sobre la concentración de calcio intracelular en hipotonía en células WT y AQP2-RCCD ₁ .	90
Figura 3.10: Efectos de la disrupción del citoesqueleto de actina y tubulina sobre la activación del TRPV4 ante estímulos hipotónicos en las células	92

AQP2-RCCD ₁ .	
Figura 3.11: Localización del TRPV4 en las células AQP2-RCCD ₁ y WT-RCCD ₁ en respuesta hipotonía ($\Delta\text{Osm} = 100 \text{ mOsm}$).	94
Figura 3.12: Localización del TRPV4 en las células AQP2-RCCD ₁ y WT-RCCD ₁ en respuesta hipotonía ($\Delta\text{Osm} = 200 \text{ mOsm}$).	95
Figura 3.13: Localización del TRPV4 y de la AQP2 en las células AQP2-RCCD ₁ en respuesta a estímulo hipotónico.	97
Figura 3.14: Localización del TRPV4 en las células WT-RCCD ₁ en respuesta a estímulo hipotónico en la doble inmunomarcación con AQP2.	98
Figura 3.15: Efectos de la inhibición de la AQP2 con HgCl ₂ (0.3 mM) en la acumulación de TRPV4 en la membrana inducida por hipotonía en las células AQP2-RCCD ₁ .	99
Figura 3.16: Efectos de la disrupción de microtúbulos sobre la inserción en membrana de TRPV4 en respuesta a hipotonía en las células AQP2-RCCD ₁ .	100
Figura 3.17: Efecto de la preincubación con 5',6'-EET en el incremento de calcio por hipotonía de las células AQP2-RCCD ₁ y WT-RCCD.	102
Figura 4.1: Modelo hipotético propuesto de la participación de la asociación funcional entre la AQP2 y el TRPV4 en la entrada de calcio por hipotonía y en el RVD.	115
Figura 1: Parámetros geométricos involucrados en los cambios de volumen al utilizar técnicas de videomicroscopía de fluorescencia.	117
Índice de Tablas	
Tabla 3.1: Localización y función del TRPV4 en mamíferos.	73
Tabla 3.2: Primers utilizados para la RT-PCR de TRPV1, TRPV4 y β actina.	77

Capítulo 1: Introducción general y objetivos

1.1. Principios de la regulación del volumen celular

El mantenimiento del volumen celular es fundamental para la viabilidad de las células ya que no sólo define su forma y la osmolaridad intracelular sino que también gobierna otras funciones como por ejemplo el crecimiento, la migración, la diferenciación y muerte celular, el metabolismo intracelular, el transporte epitelial, la liberación de hormonas y la excitabilidad celular (Wehner y col, 2003; Lang y col, 1998). En general la membrana plasmática de las células animales es mucho mas permeable al agua que a otros solutos orgánicos e inorgánicos¹ que actúan como osmolitos celulares (Hoffmann y col, 2009). Los cambios de osmolaridad en el medio extracelular generan una diferencia de presión osmótica entre ambos lados de la membrana que se tenderá a disipar a través de rápidos movimientos de agua. Estos flujos llevan a la célula a un equilibrio osmótico con el medio y producen alteraciones en el volumen celular. Por ejemplo, cuando las células son expuestas a un gradiente hipotónico en general incrementan rápidamente su volumen, de manera inversamente proporcional a la relación de osmolaridades $OsM_{\text{externa}}/OsM_{\text{interna}}$.

Organismos como las bacterias, las levaduras y las plantas han desarrollado estructuras de membrana complejas como paredes extracelulares rígidas que ejercen una presión hidrostática adicional, permitiéndoles resistir diferencias de presión osmótica importantes sin la necesidad de modificar el volumen celular (Lang y col, 1998). En los organismos animales osmorreguladores, la mayoría de las células difícilmente se vean expuestas a cambios substanciales en la tonicidad del medio interno ya que la osmolaridad de los fluidos corporales está finamente regulada por órganos especializados (por ej. en mamíferos, el riñón) (Weiss, 1996; Lang y col, 1998). No obstante, existen algunas excepciones a esta generalización como, las células del túbulo colector, las células sanguíneas cuando circulan a través del riñón y las células

¹ Por ejemplo la permeabilidad al agua puede ser 10^5 veces mayor que la de iones como el Na^+ o el K^+

que se encuentran formando parte de algunos revestimientos epiteliales, como el epitelio intestinal y el epitelio respiratorio. Ante estas situaciones, las células han desarrollado mecanismos que les permiten responder a estas variaciones de volumen y recuperar su estado inicial.

1.1.1. Procesos reguladores del volumen celular: RVD y RVI

i. ¿Qué es el RVD?

Cuando una célula se expone a condiciones externas de hipotonía en general responde inicialmente con una primera fase rápida de hinchamiento o *swelling* provocado solamente por el ingreso de agua hasta alcanzar el volumen máximo. (Figura 1.1 A). El tiempo en el que las células alcanzan dicho volumen, dependerá básicamente de la permeabilidad al agua y a los solutos. La estrategia desarrollada por la célula para recuperar el volumen inicial, conocida como RVD (disminución regulatoria del volumen o del inglés *regulatory volume decrease*), se basa en incrementar la permeabilidad de la membrana celular a determinados osmolitos celulares, activando sistemas de transporte de salida de solutos, reduciendo transitoriamente la osmolaridad intracelular e induciendo la salida de agua (Figura 1.1 A) (Wehner y col, 2003; Hallows y col, 1995; Strange y col, 2004; Capurro y col, 2008). En la mayoría de las células animales el RVD acontece con la pérdida principalmente de KCl a través de la activación paralela de canales de K⁺ y canales de Cl⁻ independientes o bien, en algunos casos, de la activación de transportadores como el cotransportador K⁺-Cl⁻ o el intercambiador Cl⁻/HCO₃⁻. En algunas células también se activa la salida de osmolitos orgánicos.

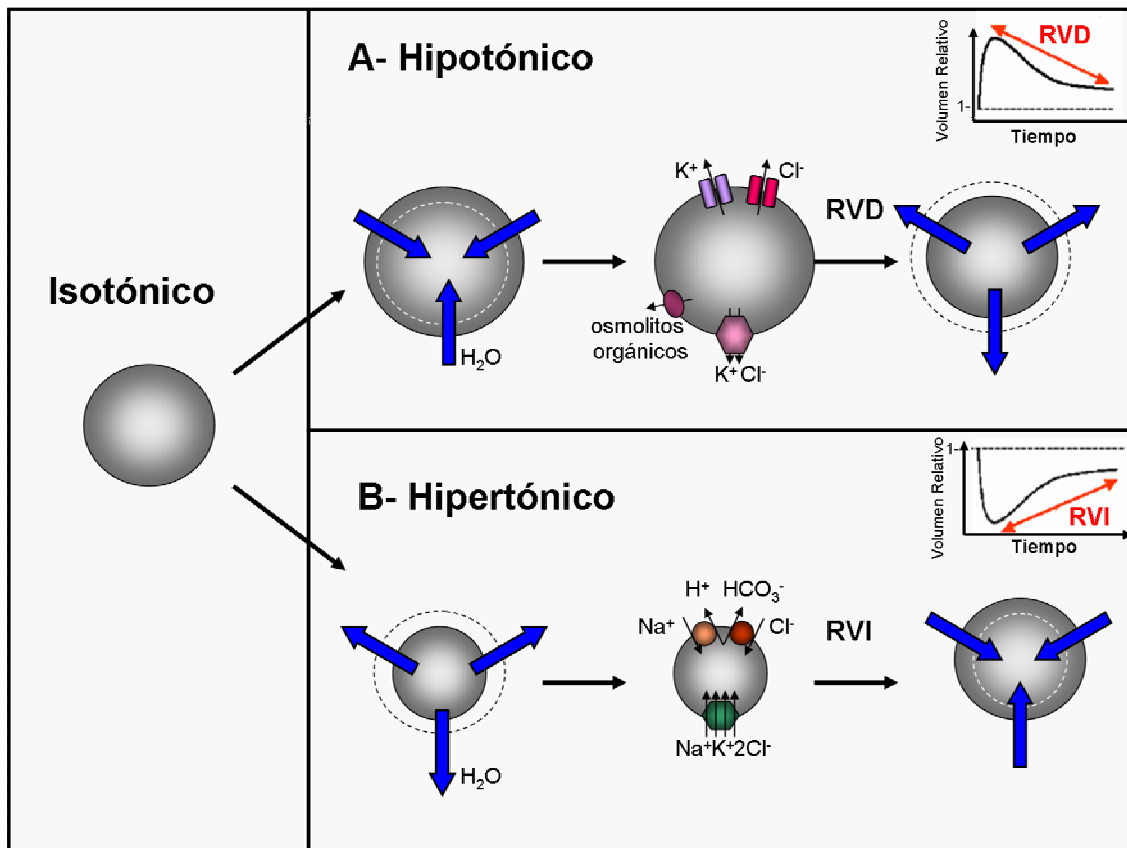


Figura 1.1: Esquema de los mecanismos de regulación del volumen celular en respuesta a anisotonia del medio extracelular. **A:** Mecanismo de disminución regulatoria del volumen en medio hipotónico (RVD). **B:** Mecanismo de aumento regulatorio del volumen en medio hipertónico (RVI). Las flechas azules indican el movimiento de agua.

ii. ¿Qué es el RVI?

Cuando una célula se expone a condiciones hiperosmóticas se produce una pérdida del contenido intracelular de agua llevando a un encogimiento celular (Figura 1.1 B) En este caso, el proceso básico que subyace a la recuperación del volumen inicial conocido como RVI (Incremento regulatorio de volumen, o bien del inglés *regulatory volume increase*) (Figura 1.1 B) consiste en la captación de osmolitos inorgánicos del medio externo (Wehner y col, 1995). El ingreso de iones (principalmente Na⁺ y Cl⁻) y la entrada obligada de agua se consigue mayoritariamente mediante dos procesos: 1) activando paralelamente los intercambiadores de Na⁺/H⁺ y de Cl⁻ /HCO₃⁻ o bien 2) activando el cotransportador Na⁺-K⁺-2Cl⁻ (Wehner y col, 2003; Hoffmann y

Dunham, 1995). También se han reportado canales iónicos activados por hipertonicidad como el canal epitelial de sodio ENaC (del inglés *epithelial sodium channel*) o el cotransportador Na⁺-Cl⁻ NCC (del inglés *sodium chloride channel*) (Wehner y col, 2003).

En este trabajo de tesis nos avocaremos solo a estudiar los mecanismos involucrados en el RVD.

1.2. Componentes moleculares que participan en el RVD

Este proceso de regulación de volumen conceptualmente simple *a priori* (RVD: salida de solutos y agua para recuperar el volumen), resulta ser muy complejo a nivel molecular ya que la diversidad y la variabilidad de los mecanismos moleculares implicados es enorme y característica de cada tipo celular (Lang y col, 1998; Hoffmann, 2000; Jakab y col, 2002; Hoffman y col, 2009). Esquemáticamente, se pueden definir tres componentes o mecanismos que participan en el proceso de regulación de volumen. Ordenadamente, encontramos un/a:

- *sistema sensor del volumen celular*
- *vía de transducción de la señal*
- *mecanismo efector*

1.2.1. Los sistemas sensores del volumen celular

Respecto de los sistemas que sensan el volumen celular existen varias preguntas todavía sin una respuesta definida como ser ¿Cómo detectan las células variaciones en su tamaño? ¿Qué parámetro mide la célula para poner en marcha su respuesta bioquímica?.

Las células son capaces de sensar y responder a variaciones de volumen

aproximadamente mayores a un 3% (Hoffman y col, 2009; Grunnet y col, 2003). Cambios bioquímicos (en las concentraciones de macromoléculas y en las concentraciones iónicas) o bien cambios mecánicos (en la arquitectura del citoesqueleto y en la tensión de la membrana) han sido propuestos como las señales detectadas por los sistemas sensores responsables de la detección del cambio de volumen celular (Lang y col, 1998; Hoffmann y Dunham, 1995). A continuación mostraremos algunos ejemplos.

i. Aglomeración macromolecular²

Se denomina aglomeración macromolecular al fenómeno por el cual la función de las proteínas citosólicas depende de su estado de agrupamiento y por lo tanto de su concentración (Jakab y col, 2002). Los cambios en la aglomeración macromolecular debidos al hinchamiento osmótico pueden funcionar como un sensor de volumen y gatillar mecanismos regulatorios (Burg, 2000; Hoffmann y Dunham, 1995; Minton y col, 1993). Por ejemplo en eritrocitos, el cotransportador K^+ / Cl^- puede ser activado a través de fosforilación por una kinasa sensible a la concentración de proteína que la rodea (Burg, 2000). La activación de estas enzimas por cambios en la dilución del citoplasma puede deberse además a cambios en la fuerza iónica, que modifican su actividad (Parker y col, 1995).

ii. Citoesqueleto

La arquitectura del citoesqueleto (Figura 1.2) también se ve afectada por el hinchamiento celular. Mientras que generalmente los filamentos de actina se despolimerizan en un proceso que es dependiente de Ca^{2+} , los microtúbulos aumentan su estabilidad (Wehner y col, 2003). Esta alteración del citoesqueleto que acompaña a la remodelación morfológica de la membrana (se pierden las invaginaciones de la membrana provocando una tensión mecánica o estiramiento (Hoffmann, 2000), se transduce en varios efectos. En algunos casos

² Del inglés *macromolecular crowding*, también puede ser traducida como hacinamiento macromolecular

se ha demostrado que facilita la fusión con la membrana de vesículas portadoras de canales, en otros modifica el estado de interacción de la actina con proteínas adaptadoras o estructurales (como la anquirina, la espectrina y la integrina) que interaccionan directamente con sistemas de transporte localizados en la membrana, modulando su actividad, y finalmente, puede alterar la actividad de diferentes moléculas señalizadoras cambiando su localización intracelular (Wehner y col, 2003; Hoffmann y Dunham, 1995; Jakab y col, 2002).

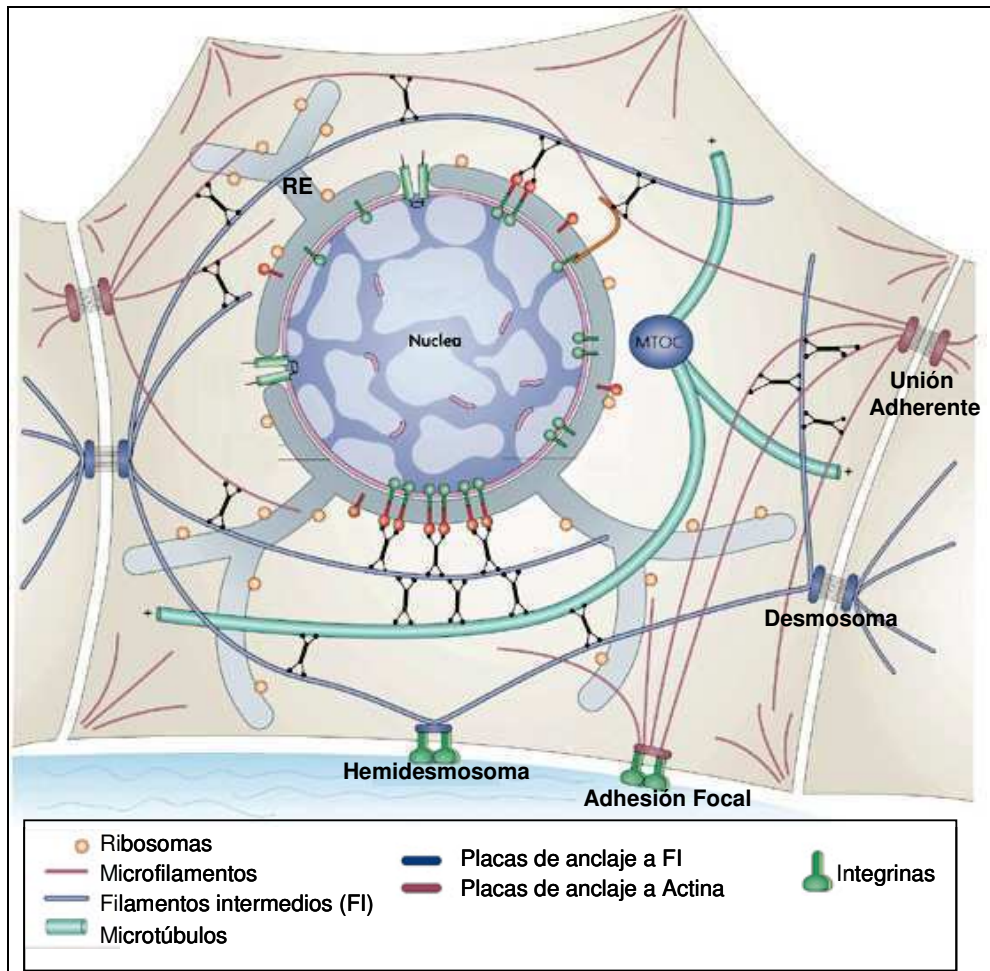


Figura 1.2: Esquema de una célula epitelial hipotética mostrando los distintos sistemas de filamentos del citoesqueleto. Los 3 sistemas de filamentos (microfilamentos, microtúbulos y filamentos intermedios) se conectan por complejos dimeros. También se muestran las proteínas asociadas a microtubulos y a actina que aumentan la complejidad de las interacciones (Modificado de Herrmann y col, 2007).

iii. Estiramiento de membrana

Los cambios de tensión en la membrana de las células que ocurren simultáneamente con la remodelación del citoesqueleto debido al hinchamiento osmótico, pueden provocar la modificación de la conductancia de los canales mecanosensibles (MSC, del inglés *mechanosensitive channel*) (Morris y col, 1990). Existen canales mecanosensibles activados directa o indirectamente por el estiramiento de la membrana. Una distensión de la membrana en el *swelling* provoca un aumento de la probabilidad de apertura de los canales mecanosensibles sin modificar la conductancia unitaria ni la selectividad. Se han identificado canales MSC catiónicos no selectivos (permiten mayoritariamente la entrada de Ca^{2+} y Na^+) y canales selectivos de Ca^{2+} , K^+ y Cl^- en varios tipos celulares (Lang y col, 1998; Wehner y col, 2003).

En resumen, existen muchos candidatos para detectar cambios en el volumen celular: desde canales mecanosensibles a otro tipo de proteínas de membrana, citosólicas o del citoesqueleto que se alteren frente a estos cambios inducidos por el hinchamiento (Hoffmann, 2000). No obstante, a pesar de los mecanismos mostrados, se desconoce con certeza la naturaleza del sistema sensor responsable de la detección de los cambios de volumen. Esto se debe, principalmente, al carácter integrador de las vías de señalización activadas durante el RVD cuya interrelación espacial y temporal dificulta la interpretación secuencial de todos los eventos, por lo que hace muy difícil identificar el evento inicial que pudiera ser el responsable de desencadenar la regulación del volumen. Se ha propuesto que no existiría un único sensor, sino que las células presentan un amplio abanico de sensores del volumen que responderían en función de la magnitud y la naturaleza de la perturbación del volumen (Wehner y col, 1995; McLeod y col, 1994).

1.2.2. Vías de transducción de la señal

En el RVD pueden estar participando en paralelo varias vías de señalización, por lo que la estrategia de bloquear una vía (con el uso de

inhibidores específicos) no necesariamente anula el RVD ya que las otras podrían estar contrarrestando el efecto. Por otro lado las vías de señalización empleadas en el RVD no pueden generalizarse ya que parecen ser específicas de cada tipo celular por lo que es necesario evaluarlas para cada tipo de célula (Lang y col, 1998). A pesar de todo ello, muchos han sido los mecanismos propuestos implicados en la señalización intracelular. Mencionaremos a continuación algunos de los mejor estudiados en diversos sistemas que participan en la señalización:

i. Fosforilación de proteínas

La fosforilación de proteínas se ha descrito en mecanismos de regulación de volumen a través de MAP Kinasas (*Mitogen-activated protein*) y en mecanismos vinculados a la salida de osmolitos inorgánicos (a través del resto de las kinasas PKC (**Protein kinase C**), PKA (**Protein kinase A**), TK (**tyrosine kinase**) (Jakab y col, 2002). Por ejemplo se ha demostrado que todos los miembros de la subfamilia de las Src TK son sensibles a cambios anisotónicos, participando en la activación de canales de Cl⁻ (VSOAC), canales de K⁺ y cotransportadores (KCC, del inglés *K-Cl cotransport*) (Jakab y col, 2002).

ii. Metabolismo lipídico

Los cambios en el metabolismo de lípidos como la fosfatidilcolina (PC), el ácido fosfatídico (AP), los fosfoinosítoles (PI(4,5)P₂, PI(3,4,5)P₂), el diacilglicerol (DAG), el ácido araquidónico (AA) y sus derivados (leucotrienos, prostaglandinas y tromboxanos) también participan en la respuesta celular a cambios osmóticos (Wehner y col, 1995 ; Jakab y col, 2002). Estos mensajeros pueden actuar en distintas etapas de la señalización como consecuencia de la activación de enzimas como la fosfolipasas PLA₂, la PLC o la kinasa PI-3 K por estímulos hipotónicos. Por ejemplo en el caso del AA, está bien descrito que un hinchamiento celular aumenta su concentración por activación de PLA₂

(Hoffmann, 2000). Se postula que la activación de esta enzima estaría dada por cambios en su estado de hacinamiento (con lo cual se ha sugerido un rol mecanosensor de dicha enzima) y cambios en la concentración intracelular de calcio (Lang y col, 1998). A partir del metabolismo del AA se derivan una serie de lípidos que han sido vinculados a la actuación de canales efectores del RVD (Hoffmann, 2000). La inhibición de la PLA2 mostró reducir el RVD en algunas células (Jakab y col, 2002). Sin embargo la complejidad de las cascadas lipídicas y la alta variabilidad de sus componentes enzimáticos en cada tipo celular hacen de su estudio en la señalización de cambios de volumen un tema impredecible a priori (Wehner y col, 1995).

iii. ATP y receptores purinérgicos

El ATP y los receptores purinérgicos han sido ampliamente vinculados a la señalización. El estiramiento de membranas celulares produce la liberación de ATP al medio extracelular en diversas células (Jakab y col, 2002; Leipziger, 2003; Novak, 2003; Pafundo y col, 2008). Este nucleótido (ATP) junto con los derivados resultantes de la acción de las ectonucleasas extracelulares (AMP, ADP), interaccionan con diferentes tipos de receptores purinérgicos presentes de forma ubicua en las membranas de las mismas células epiteliales, desencadenando la activación de vías de señalización que concluyen con la regulación de diferentes tipos de canales, entre ellos canales de Cl^- y K^+ (Bucheimer y Linden, 2004). Sin embargo aún no se conoce con certeza la vía por la cual el ATP es liberado en respuesta al estiramiento (Novak, 2003).

iv. pH

La mayoría de las células responde al *swelling* con una acidificación intracelular. Los mecanismos que pueden influenciar el pH extracelular e intracelular durante el RVD son: i) salida HCO_3^- mediante canales, ii) activación del transportador $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$, iii) liberación de H^+ desde los

reservorios intracelulares, iv) incremento en la formación de H^+ durante el metabolismo, v) extrusión de iones reducida por inhibición del intercambiador Na^+/H^+ , vi) estimulación de salida de protón vía intercambio Na^+/H^+ activado por acidosis intracelular y vii) estimulación de canales H^+ gatillados por voltaje.

Los cambios de pH en los procesos de regulación de volumen pueden tener distintos efectos celulares, por ejemplo muchos canales de K^+ son sensibles a pH, en general se activan a pH alcalinos y se inactivan a pHs ácidos. Esto está vinculado con el hecho de que muchas células presenten un mayor RVD en pH alcalino (Jakab y col, 2002). La mayor consecuencia del descenso en el pH citoplasmático sería la protonación de aminoácidos que determinan la función de canales iónicos y otras proteínas involucradas en la regulación de volumen.

v. El calcio intracelular

En muchos tipos celulares, principalmente epiteliales, el RVD requiere la participación del Ca^{2+} como molécula señalizadora (McCarty y O'Neil, 1992). Los aumentos intracelulares de Ca^{2+} , pueden deberse a una entrada de Ca^{2+} desde el exterior a través de diferentes tipos de canales permeables para este ión y/o bien a una liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares (Missiaen y col, 2000).

En la gran mayoría de las células epiteliales la entrada de calcio durante el swelling es necesaria para el RVD. Se ha descrito que las corrientes de calcio que se manifiestan en el hinchamiento corresponde en general a la activación de canales catiónicos no selectivos, sensibles a estímulos mecánicos de la membrana, y que son inhibibles por gadolinio. Estas corrientes entrantes de calcio activan en las cercanías conductancias salientes de potasio dependientes de calcio, cuya salida, será uno de los efectores mas establecidos del RVD (Lang y col, 1998).

1.2.3. Mecanismos efectores

En condiciones basales el gradiente electroquímico de las membranas celulares es favorable a un flujo de salida de los iones K^+ y Cl^- . Por ello, la activación de una vía de K^+ conduce a estos iones hacia el exterior produciendo una hiperpolarización de la membrana que a su vez favorece la salida de Cl^- y viceversa, la activación de una conductancia de Cl^- lleva a una despolarización de la membrana que en consecuencia facilita la salida de iones K^+ (Wehner y col, 1995). El mecanismo más efectivo y común para completar el RVD es la activación de ambas conductancias a la vez (Hoffmann, 2000; Wehner, 1998). La inhibición de cualquiera de ellas determina la inhibición del RVD. La activación de dichas conductancias desencadena un movimiento de agua que acompaña a los solutos. Si bien se han descrito una serie de canales y transportadores que participan de los mecanismos efectores del RVD en distintas células comentaremos los más relevantes para el desarrollo de esta tesis. Estos son los **canales de Cl^-** y los **canales de K^+** (Lang y col, 1998).

i. Canales de Cl^-

Se han caracterizado electrofisiológicamente muchos sistemas de los que se extrae que la conductancia de Cl^- mediada por los canales VSOAC llamados también VRAC (*volumen regulated anion channels*) o VSOR (del inglés *volume-sensitive outwardly-rectifying*), es el mecanismo más utilizado para mediar el RVD (Wehner y col, 2003; Okada y col, 2001). Tal y como su nombre indica estos canales aniónicos no son selectivos.

Otra vía involucrada en el transporte de Cl^- es el CFTR (del inglés *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*). Esta proteína funciona como canal permitiendo el flujo bidireccional de Cl^- y de otros aniones como el HCO_3^- (Park y col, 2002). Tan importante como su función primaria de canal de Cl^- o HCO_3^- activable por AMPc, es la función reguladora que el CFTR ejerce sobre un gran número de procesos celulares y de transporte iónico (Kunzelman, 2001; Kunzelman, 1999). Por ejemplo, se ha demostrado que regula canales de Na^+

(ENaC), (Schreiber y col 2004), canales de Cl⁻ ORCC (del inglés *outwardly rectifying Cl⁻ channel* (Schwiebert y col 1995)), canales de K⁺ (del tipo Maxi K⁺, hIK) (Vazquez y col, 2001; Fernandez-Fernandez y col, 2008)) y el intercambiador de Cl⁻ /HCO₃ (Wheat y col, 2000). Además de regular el volumen celular (Cho y col, 2004), participa en la regulación del tránsito vesicular (Bradbury y col, 1992; Bertrand y col, 2003), el pH (Coakley y col, 2003) y el transporte de ATP (Braunstein y col, 2001).

ii. Canales de K⁺

En estos últimos años ha habido un gran avance en la identificación molecular de canales de K⁺ que se activan en respuesta al hinchamiento celular. En diferentes tipos celulares se ha demostrado la participación de distintos miembros de varias familias de canales de K⁺: canales dependientes de Ca²⁺ del tipo BKCa (del inglés *Large Conductance Calcium-activated Potassium Channels*), IKCa (del inglés *Intermediate Conductance Calcium-activated Potassium Channels*) o SKCa (del inglés *Small Conductance Calcium-activated Potassium Channels*), canales dependientes de voltaje como el Kv1.3 y el Kv1.5, la proteína IsK (*Slow-voltage dependent potassium channel*) y más recientemente canales de K⁺ del tipo K2P (*two pores potassium channel*) como el TREK-1 y el TREK-2 ambos activados por estiramiento, difiriendo notablemente entre todos ellos respecto su conductancia unitaria, mecanismos de apertura y organización molecular (Wehner y col, 2003; Hoffmann y Dunham, 1995). El por qué cada tipo celular utiliza una proteína u otra se desconoce pero esta alta variabilidad pone de manifiesto la importancia de este mecanismo en el RVD (Wehner, 1998).

Como hemos visto se han descrito una serie de mecanismos sensores, transductores y efectores del RVD. Sin embargo no hemos hablado de los movimientos de agua durante estos procesos. En la siguiente parte de la introducción analizaremos el transporte de agua y su rol en la regulación de volumen celular.

1.3. Movimiento de agua a través de la membrana celular y los epitelios.

1.3.1. Mecanismos y vías del transporte de agua

El movimiento neto de agua a través de un epitelio es el resultado de los flujos impulsados por gradientes osmóticos e hidrostáticos y por aquellos acoplados a los transportes iónicos (Parisi e Ibarra, 1996; Capurro y Parisi, 1992; Escobar y col, 1990). Los movimientos de agua debidos a gradientes osmóticos tienen gran importancia en la fisiología de muchos epitelios de absorción y secreción, y revisten una particular relevancia, como ya vimos, en los procesos celulares vinculados a la regulación de volumen celular.

En un epitelio los movimientos de agua pueden efectuarse tanto a través de las células (vía transcelular), como entre las células (vía paracelular) (Figura 1.3). La importancia relativa de estas vías difiere según sean las uniones intercelulares del epitelio: abiertas (leaky) o cerradas (tight) (Naftalin y col, 1986; Whitttembury y col, 1985).

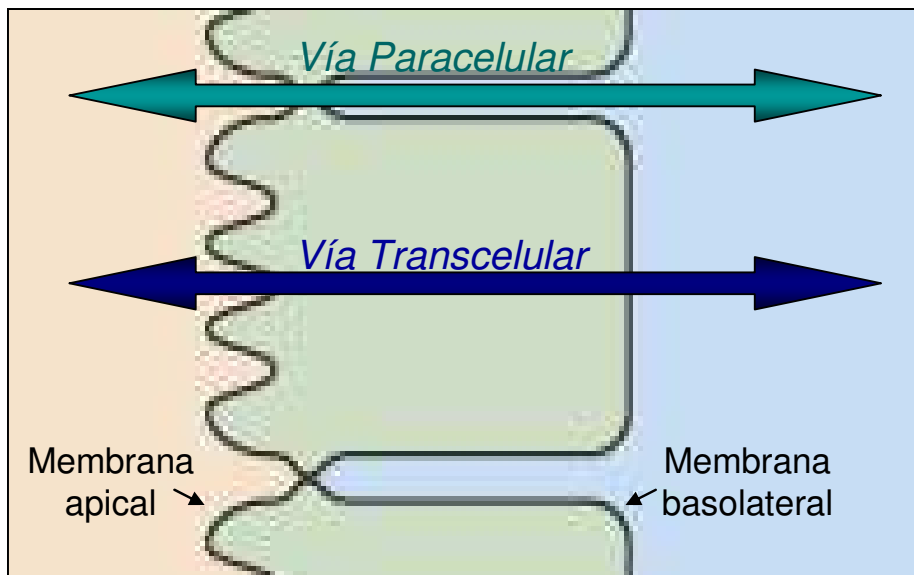


Figura 1.3: Vías implicadas en el transporte de agua a través de un epitelio. Las flechas indican el flujo neto de agua transepitelial cuya dirección dependerá del gradiente aplicado.

En el transcurso de esta tesis estudiaremos algunos componentes involucrados en la vía transcelular, concentrándonos fundamentalmente en el transporte apical. Los mecanismos de movimiento transcelular de agua fueron discutidos durante muchos años, proponiéndose varias hipótesis acerca de la identidad de las vías de transporte a través de la membrana celular. Por un lado se afirmaba que las moléculas de agua pasaban por la membrana por difusión como lo hace el dióxido de carbono o el oxígeno, sin requerir componente alguno para su transporte. Sin embargo el movimiento de agua por simple difusión a través de la bicapa lipídica no resultaba suficiente para explicar los grandes movimientos de agua que se observaban en ciertos tipos celulares. Por este motivo, se propuso la existencia de vías específicas en la membrana, bajo el nombre de **canales** o **poros**, que explicaban los rápidos cambios de volumen celular observados en epitelios. Los estudios biofísicos permitieron proponer canales hipotéticos donde 10 moléculas de agua se desplazan en fila india a través de la membrana (Parisi y Bourguet, 1983). A principios de los años 90, el grupo de Peter Agre identificó, por primera vez, a una proteína selectiva para el pasaje de agua (Preston y col, 1992). Esta familia de proteínas recibió el nombre de acuaporinas (AQPs). En la actualidad se ha postulado un mecanismo adicional de transporte, a través de cotransportadores agua-soluto (Zeuthen, 2002).

Por lo tanto, actualmente se acepta que el agua puede atravesar las membranas celulares a través de tres vías: la bicapa fosfolipídica, los canales específicos de agua (AQPs) y los co-transportadores agua-solutos recientemente descritos (Figura 1.4).

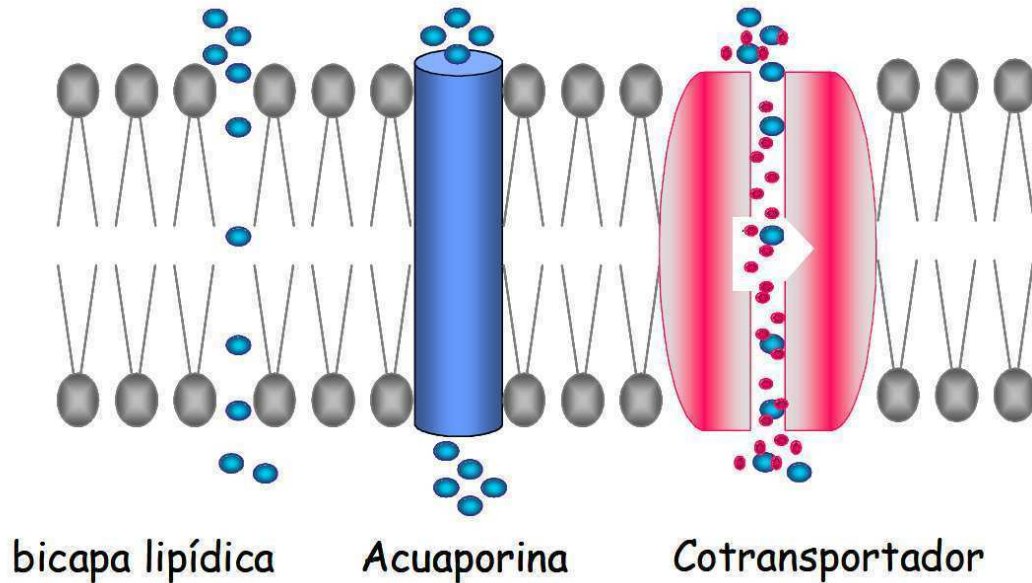


Figura 1.4: Esquema de las vías implicadas en el transporte transcelular de agua. El movimiento de agua a través de una membrana se puede dar por la bicapa lipídica, acuaporinas y por proteínas cotransportadoras.

El flujo de agua que se mueve hacia el interior de la célula a través de la membrana perturbada con un gradiente hiposmótico, resulta proporcional a:

$$J_{osm} = L_p \Delta \pi$$

dónde, el flujo osmótico de agua está representado por J_{osm} (en cm^3/s) y la diferencia de presión osmótica, por $\Delta \pi$. El coeficiente L_p se denomina *conductividad hidráulica* de la membrana, sin embargo en muchas ocasiones resulta mas conveniente utilizar el *coeficiente de permeabilidad osmótica*, P_{osm} (expresado en cm/s) como se muestra en la siguiente ecuación:

$$P_{osm} = \frac{L_p RT}{V_w A}$$

dónde R es la constante general de los gases, T la temperatura termodinámica, V_w el volumen molar parcial del agua y A el área de las células (Finkelstein, 1987). P_{osm} se puede entender como una medida de la velocidad promedio de desplazamiento que adquiere un volumen de agua a través una membrana.

Ejemplificando, al observar el hinchamiento osmótico de dos células hipotéticas con diferentes P_{osm} , la célula que posea un mayor P_{osm} , alcanzará el volumen máximo correspondiente en un menor tiempo. La velocidad con que el agua atraviesa una membrana dependerá de la vía utilizada.

i. La bicapa lipídica

El agua atraviesa la bicapa mediante un mecanismo mixto de partición-difusión (Finkelstein, 1987). De este modo, luego de impuesto un gradiente osmótico o hidrostático, el agua se mueve netamente por el compartimiento de mayor actividad de agua (mayor potencial químico) hacia el de menor actividad de agua. Al hacerlo difunde a través de la solución. En la frontera con la membrana efectúa una partición solución-membrana, difundiendo a través de la membrana. Luego genera una nueva partición membrana-solución. Finalmente difunde a través de la solución del otro compartimiento. Los fenómenos de partición como de difusión en la membrana estarían determinados por la compleja composición de esta. Los lípidos que componen las membranas biológicas varían el grupo de su cabeza polar, la longitud de su cadena de ácidos grasos, el grado de saturación y la concentración de colesterol. Ahora sabemos que la mayoría de las células poseen diferentes composiciones lipídicas en cada uno de los lados de sus membranas plasmáticas (Simons y van Meer, 1988).

Esta vía no es muy permeable al agua, por ejemplo, en presencia de gradientes osmóticos, el P_{osm} para esta vía es del orden de $1 \times 10^{-4} \text{ cm.s}^{-1}$ (Verkman y Mitra, 2000).

ii. Las Acuaporinas (AQPs)

Las AQPs son proteínas intrínsecas de membrana que funcionan como canales para el pasaje de agua (Preston y col, 1992). Se encuentran ampliamente difundidas en los reinos vegetal y animal. Hasta el momento han sido identificadas 13 acuaporinas en tejidos de mamíferos, denominadas AQP0-12. En mamíferos las acuaporinas están expresadas en muchos epitelios y

endotelios involucrados en transporte de fluido, así como en otra clase de epitelios, tales como la piel, tejido graso y vejiga urinaria.

Estructuralmente son proteínas hidrofóbicas de tamaño pequeño constituidas por cuatro monómeros (~30 kDa por monómero) (Agre y col, 2002; Agre y Kozono, 2003; Verkman, 2005) y compuestas por 6 dominios transmembrana (Figura 1.5 A). Las regiones amino y carboxiterminal contienen el motivo altamente conservado **NPA** (Asn-Pro-Ala), que está localizado entre los loops B y E respectivamente. Estos dos *loops* se pliegan hacia la membrana desde direcciones opuestas formando el poro que permite al agua pasar selectivamente. Este modelo estructural se denomina “reloj de arena” (Figura 1.5 B). Las AQP_s forman tetrámeros, sin embargo cada monómero forma un poro funcional (Figura 1.5 C). Esta estructura está bien descrita para la AQP₁, así el poro de esta acuaporina tiene un diámetro de aproximadamente 3 Å en su región mas estrecha y una molécula de agua mide aproximadamente 2.8 Å (Figura 1.5 (C)). Por lo tanto una molécula única de agua puede pasar a través del poro a una tasa de 3×10^9 moléculas de agua por monómero por segundo.

En el caso de la AQP₂, estudios de mutagénesis sugieren que estos loops no estarían vinculados en el transporte de agua, contradiciendo la hipótesis del reloj de arena (Fushimi, 1999). Estas diferencias desde el punto de vista estructural de las acuaporinas, son las que posiblemente le otorguen diferencias funcionales, es decir diferencias en su capacidad de transportar agua. Por ello es de suma importancia caracterizar biofísicamente los canales de agua.

Aunque AQP₁, AQP₂, AQP₄, AQP₅ y AQP₈ son fundamentalmente permeables al agua, AQP₃, AQP₇, AQP₉ y AQP₁₀ (llamadas Acuagliceroporinas) también transportan glicerol y otros solutos pequeños como en el caso de AQP₉ (Agre y col, 2002). Por otro lado, se ha publicado que AQP₁ es capaz de transportar cationes (Anthony y col, 2000), mientras que AQP₇ y AQP₉ transportarían pequeños solutos (Liu y col, 2002), y AQP₆ transportaría cloruros a bajo pH (Yasui y col, 1999). También se ha sugerido que la AQP₁ podría transportar gases como el dióxido de carbono (Cooper y Boron, 1998) y amoníaco (Nakhoul y col, 2001), aunque otros trabajos

(Verkman, 2002) llegaron a la conclusión de que el transporte de gas dependiente de AQP1, si ocurriese, no sería biológicamente significativo.

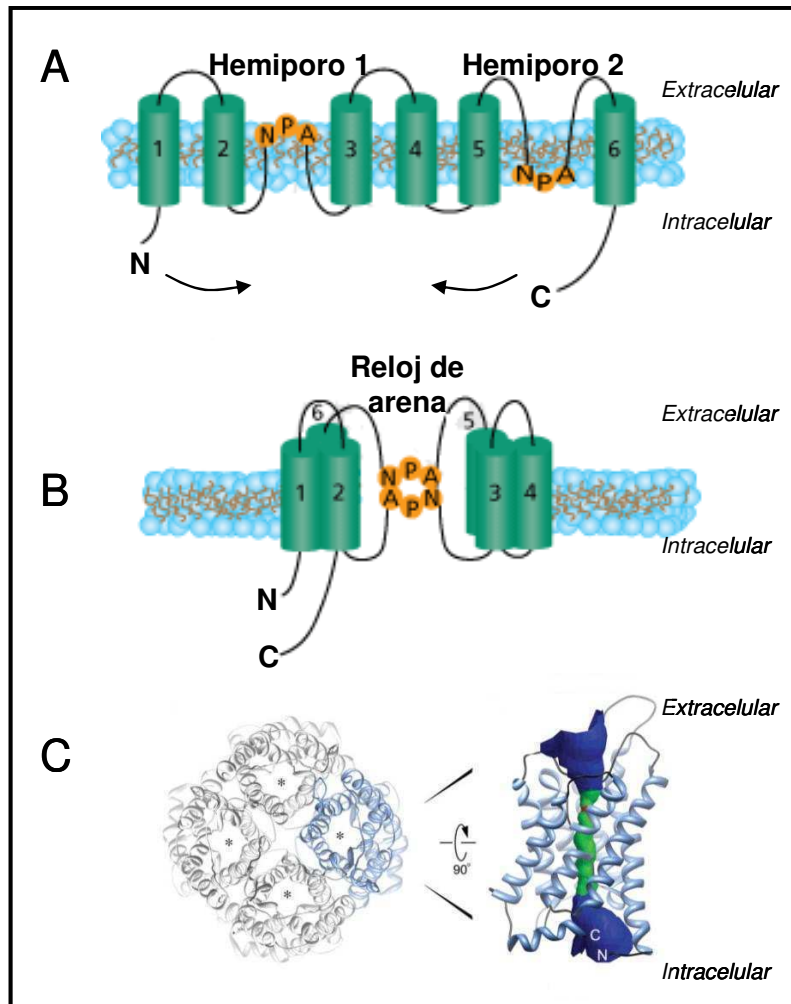


Figura 1.5: Ilustración esquemática de la topología de la AQP1. A: Cada canal de agua se compone de seis dominios transmembranales (1-6) conectada por cinco loops B: Al plegarse se forma un poro de agua hidrofílico en el centro de cada monómero. C: Las AQPs forman tetrameros sin embargo cada monómero forma un poro funcional (*). (Modificado de Andrews y col, 2008).

El transporte a través de casi todas las acuaporinas puede ser inhibido, aunque de manera no específica, por medio de compuestos mercuriales tales como el HgCl_2 .

La mayoría de las acuaporinas poseen secuencias consenso para N-glicosilación y se encuentran glicosiladas en los tejidos donde se expresan. Sin

embargo la glicosilación parecería no ser importante para cumplir su función como canales o para que la proteína alcance su destino subcelular correspondiente (Verkman y Mitra, 2000).

Las acuaporinas confieren a la membrana una vía extremadamente permeable al agua, de manera tal que, en presencia de gradientes osmóticos, el P_{osm} adquiere valores del orden de $100 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$ (Verkman y Mitra, 2000).

iii. Los cotransportadores agua-soluto

También ha sido propuesto que el transporte de agua puede ocurrir a través de ciertas proteínas transportadoras de membrana. El mecanismo hipotético propuesto para estas proteínas es que cotransportarían solutos y agua de forma activa (Zeuthen, 2002). El agua se transporta directamente acoplada al transporte de soluto (Loo y col, 1996). Por ejemplo el cotransportador Na^+ /glucosa (SGLT, del inglés *Sodium-Glucose Transporter*), de células intestinales, es capaz de mover 260 moléculas de agua acopladas a cada molécula de azúcar transportada. Otros ejemplos son los cotransportadores Na^+ -glutamato (EAAT1, del inglés *Excitatory Amino Acid Transporter*), el Na^+ - K^+ - 2Cl^- (NKCC, del inglés *Na-K-Cl cotransporter*) (King y col, 2004). Si bien el mecanismo de transporte de agua por esta vía es controversial, se ha descrito que el P_{osm} unitario de estos transportadores es un orden menor a la de la mayoría de las AQPs.

1.4. El transporte de agua y los Epitelios Renales

1.4.1. La AQP2 y la reabsorción de agua en el túbulo colector

El transporte transepitelial de agua tiene lugar en muchos órganos. Sin embargo, es en el riñón donde, quizás, este proceso es sorprendente por su magnitud. En efecto, el riñón, cuya unidad funcional es el nefrón, filtra diariamente 180 litros de plasma en un proceso de ultrafiltrado. Luego este

volumen es procesado, por varios segmentos del nefrón, hasta formar aproximadamente 1,5 litros de orina. Esto se logra gracias a la enorme capacidad que poseen los distintos segmentos del nefrón para reabsorber agua y, de este modo, concentrar la orina final. La regulación fina de estos procesos ocurre en un segmento del nefrón llamado túbulo colector (TC), el que está bajo el control de una hormona específica: la arginina-vasopresina (AVP). Para ello es fundamental, además, la presencia de gradientes osmóticos. En estado de antidiuresis la AVP estimula la incorporación de la acuaporina 2, presente en vesículas intracelulares, a la membrana celular, a través de un mecanismo dependiente de AMPc, estimulándose de esta manera la reabsorción de agua (Schafer y col, 1992). En éste caso el agua se mueve, siguiendo los gradientes osmóticos transepiteliales, vía la AQP2 apical y las AQP3 y AQP4 residentes en la membrana basolateral (Yamamoto y col, 1998; Parisi e Ibarra, 1996) (Figura 1.6).

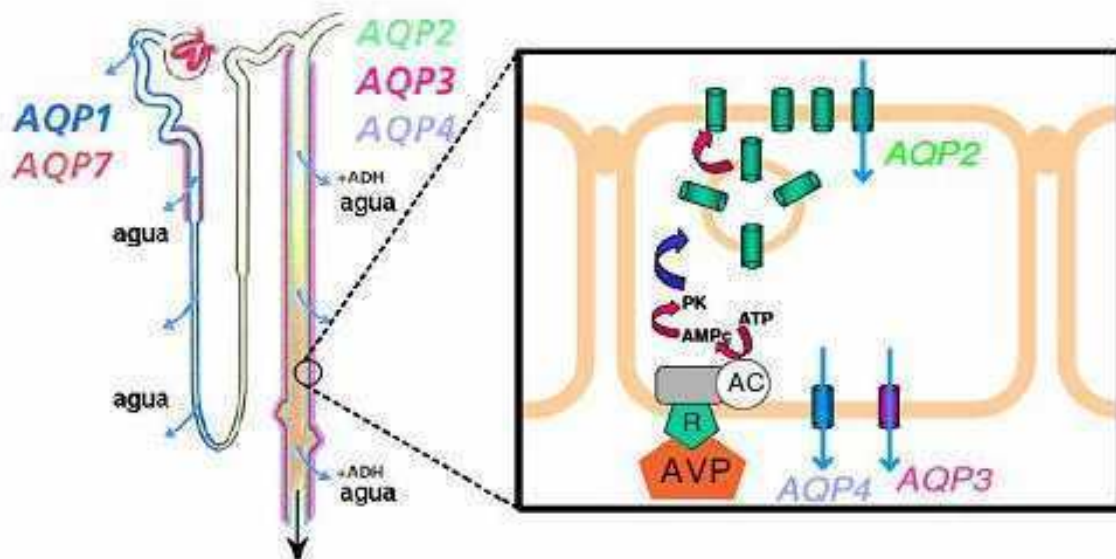


Figura 1.6: Expresión y regulación de las acuaporinas en el nefrón de mamíferos. Se detallan las distintas AQPs expresadas en los diferentes segmentos del nefrón. El detalle corresponde al segmento del TC en el cual se esquematiza el mecanismo de acción de la hormona AVP, conocida también como la hormona antidiurética (HAD), desencadenando la inserción de la acuaporina 2 (AQP2) en la membrana apical. El agua se transporta a través de ésta y a través de la AQP3 y AQP4 residentes en la membrana basolateral.

Cuando un individuo bebe mucha cantidad de agua o se inhibe la liberación de AVP -por ejemplo debido a la ingesta de cafeína o alcohol- se excretan mayores volúmenes de orina. Esto se debe a que la acuaporina 2 permanece en el interior de la célula y no se incorpora a la membrana, disminuyendo la reabsorción de agua. Existen individuos que poseen una mutación en el gen de la acuaporina 2 o en el receptor de AVP y desarrollan una enfermedad denominada diabetes nefrogénica insípida. Estos pacientes pierden la capacidad de reabsorber agua y llegan a eliminar hasta 20 litros de orina por día. También fue documentada una disminución en la expresión de la acuaporina 2 en pacientes que sufren incontinencia urinaria. Por el contrario, el aumento en la expresión de la acuaporina 2 conduce a una retención excesiva de líquido, característica durante el embarazo o en pacientes que sufren de insuficiencia cardiaca congestiva. Recientemente, se propuso que, además de la activación de la vía de señalización que involucra al AMPc, inducida por la AVP, la osmolaridad externa efectiva sería crucial para la expresión de AQP2 lo cual estaría mediado por elementos sensibles a la tonicidad (Storm y col, 2003).

La participación de la AQP2 en el proceso de reabsorción de agua debido a la exposición de la membrana apical a disminuciones en la osmolaridad luminal, implica elevados flujos de agua y rápidos cambios de volumen en estas células. Como vimos anteriormente, en respuesta al hinchamiento osmótico, se ponen en marcha en las células diversos mecanismos de regulación. Aunque se asume que durante la regulación del volumen celular los movimientos de iones conducen a movimientos de agua, el posible rol de las AQPs en estos procesos ha sido muy poco investigado. Estos estudios cobran importancia no sólo para entender los procesos fisiológicos, sino también en ciertas situaciones patológicas.

1.4.2. Las líneas celulares de túbulo colector

Debido a la complejidad del estudio de la regulación del transporte de agua e iones en los túbulos enteros, la posibilidad de contar con un sistema

celular en cultivo provee una herramienta muy importante para los estudios fisiológicos. Nuestro laboratorio ha contribuido al establecimiento de una nueva línea celular de origen renal derivada de túbulo colectores corticales de nefrón de rata: la línea celular WT-RCCD₁ (Rat Cortical Collecting Duct Wild-Type) (Blot-Chabaud y col, 1996). Esta es la primera línea de TC que mantiene muy elevadas resistencias transepiteliales (2400 $\Omega \cdot \text{cm}^2$) como ocurre en el túbulo nativo. Además, posee propiedades de transporte vectorial iónico próximas a aquellas observadas en los colectores nativos y conserva fenotipos característicos de las células principales e intercalares del epitelio renal del cual derivan. Los estudios morfológicos e inmunocitoquímicos indican que las células WT-RCCD₁ son polarizadas con uniones estrechas bien establecidas (Figura 1.7), expresan el canal de sodio-amiloride sensible en la membrana apical y la bomba Na⁺-K⁺-ATPasa en la membrana basolateral. Por otra parte, conservan el receptor V2 a la AVP, característico de las células principales de los CCD nativos (Blot-Chabaud y col, 1996) sin embargo no expresan acuaporinas (Capurro y col, 2001).

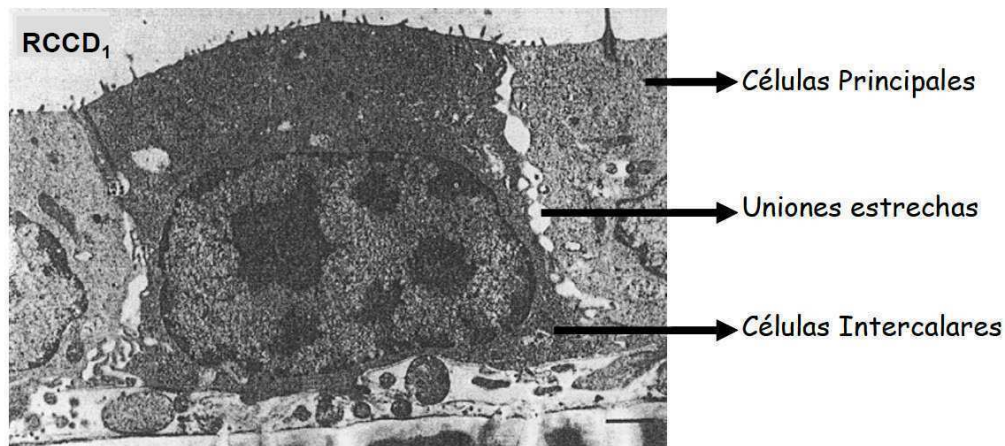


Figura 1.7: Micrografía electrónica de las células RCCD₁. La foto muestra las características morfológicas de las células cuando son crecidas en soporte permeable.

El establecimiento de esta línea celular permitió avanzar en el estudio de algunos de los eventos vinculados con el transporte de agua y solutos, antes mencionados (Djelidi y col, 1997; Djelidi y col, 1999; Capurro y col, 2001; Ford y col, 2002; Rivarola y col, 2005; Rivarola y col, 2007). En las células WT-RCCD₁ se

demonstró que los movimientos de agua son independientes de la expresión de las AQPs hasta el presente descritas en los túbulos colectores nativos (Capurro y col, 2001). Adicionalmente la transfección estable de esta línea celular con acuaporina 2 muestra un fenómeno de rectificación osmótica en hipotonía. Es decir que la permeabilidad osmótica de la membrana depende de la dirección del gradiente hipotónico impuesto. Esto sugiere que existirían mecanismos que modulan la permeabilidad osmótica de la AQP2 en la membrana en presencia de estímulos osmóticos (Chara y col, 2005).

1.5. AQPs y regulación de volumen.

Tal como ha sido descrito en la primera parte de esta introducción, una serie de canales y transportadores se han identificado como vías para los flujos de regulación de volumen (Lang y col, 2007; Okada y col, 2001), sin embargo la vía de pasaje de agua a través de la membrana plasmática en los procesos de regulación de volumen no ha sido metódicamente investigada (Kida y col, 2005). Las herramientas como transfección, knockdown y knockout de canales de agua específicos han provisto nueva información acerca de un posible rol de las acuaporinas en la regulación de volumen.

AQP5 fue el primer canal de agua descrito en tener un rol en la regulación de volumen en células acinares de glándulas parótidas y sublinguales (Krane y col, 2001). Los ratones deficientes en AQP5 presentan en esas células, una reducida permeabilidad osmótica e inhibida su RVD. Estos resultados están en concordancia con el reciente trabajo que muestra un rápido *swelling* y un completo RVD en células acinares submandibulares de rata (Hansen y col, 2007), en las cuales los niveles de expresión de AQP5 se encuentran incrementados. Otras acuaporinas han sido vinculadas a la regulación de volumen, por ejemplo, se ha demostrado que la delección de AQP1 en el endotelio de la córnea murina reduce la permeabilidad osmótica y produce un RVD incompleto (Kuang y col, 2004). Por otra parte la disminución de la expresión de AQP3 por tratamiento antisense suprime el RVD de las

células intestinales 407, indicando un rol importante de la AQP3 en este proceso (Kida y col, 2005). En algunos otros tipos de células no epiteliales se ha sugerido el rol de AQP4, AQP8, AQP9 y AQPs de protozoos en la regulación de volumen (Benfenati y col, 2007; Callies y col, 2008; Dibas y col, 2007; Figarella y col, 2007).

En cuanto a la participación de la AQP2 en la regulación de volumen, nuestro grupo reportó que las células de túbulo colector cortical transfectadas con AQP2 (AQP2-RCCD₁) presentan mecanismos rápidos de RVD (Ford y col, 2005). En este trabajo se postularon dos mecanismos paralelos de regulación de volumen, uno de activación rápida, que está gatillado por AQP2 e involucra los canales de potasio sensibles a bario y el canal CFTR (Figura 1.8) y otro de activación lenta, que sería independiente de la expresión de acuaporina 2.

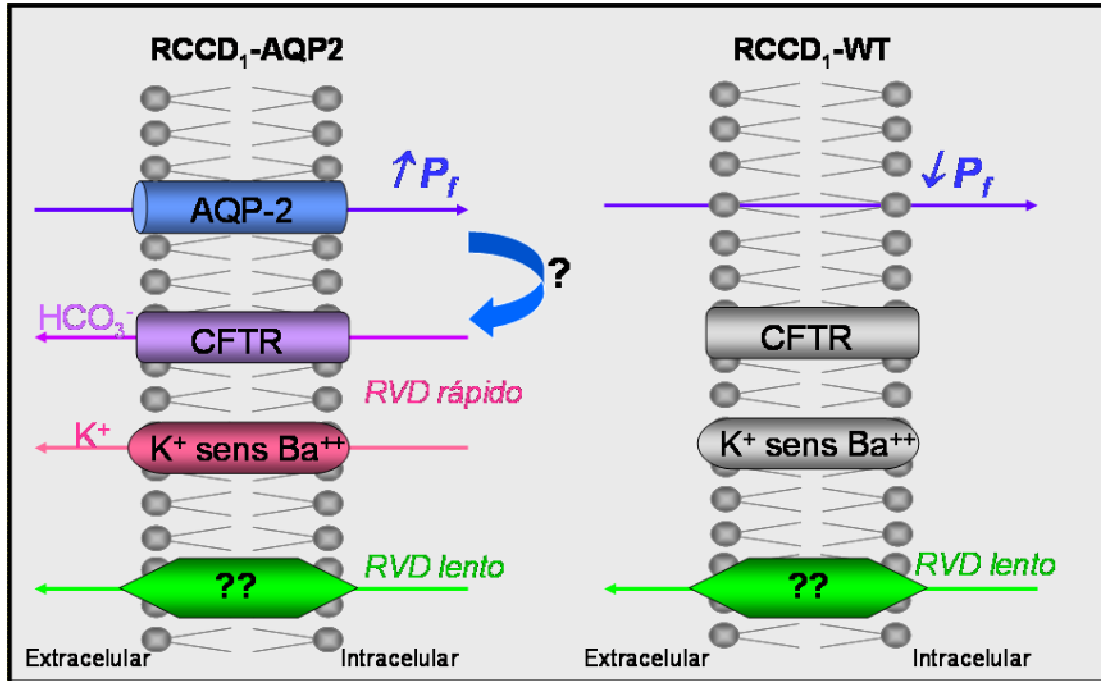


Figura 1.8: Mecanismos de regulación de volumen en las células RCCD₁. Las células AQP2-RCCD₁ son capaces de activar al CFTR y a canales de K⁺ sensibles a bario de tal manera que se logra activar un mecanismo rápido de RVD. En las células WT-RCCD₁ no se activan estos transportadores a pesar de que sí se expresan. Por otra parte los 2 tipos celulares presentan un mecanismo más lento de regulación de volumen que es independiente del CFTR y de los canales de K⁺.

1.5.1. ¿Por qué las AQPs pueden ser importantes para el RVD?

Cuando aplicamos un gradiente hiposmótico a una célula, podemos

dividir los cambios de volumen que observamos en dos fases (Figura 1.9) 1- un incremento debido al flujo de agua impulsado por el gradiente osmótico y 2- un decremento en el volumen debido a movimientos de agua cercanos a la isosmolaridad impulsados por el flujo de soluto hacia el exterior de la célula.

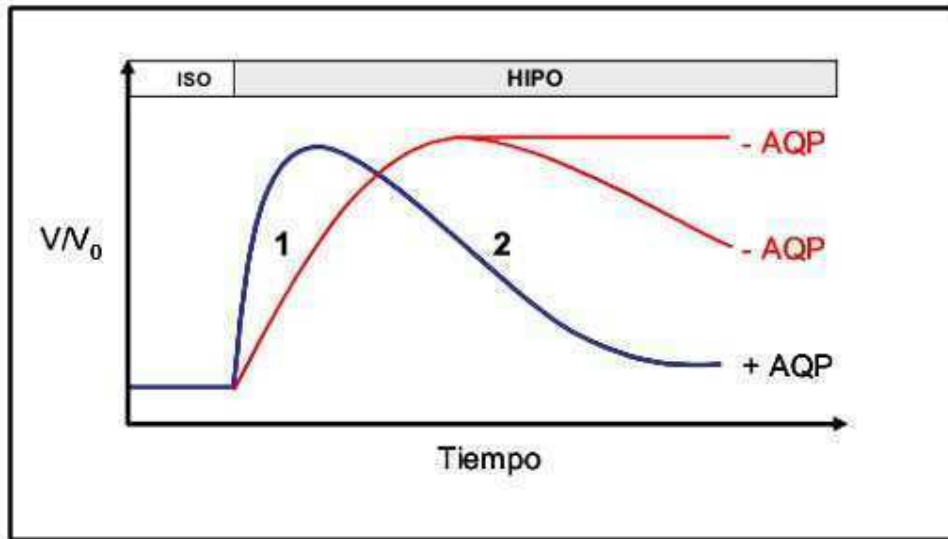


Figura 1.9: Esquema de la evolución temporal del volumen relativo, luego de aplicar un shock hipotónico en células que expresan acuaporinas (+AQP) vs células que no expresan acuaporinas (-AQP). Se observa una respuesta bifásica: 1 - Región donde el transporte pasivo de agua maneja los cambios de volumen. 2 - Región donde el volumen celular está impulsado por el RVD.

La presencia de una AQP, le otorga a la membrana de dicha célula una tasa rápida de hinchamiento (Fase 1). Si las acuaporinas no están presentes, este hinchamiento (Fase 1) igualmente ocurrirá, sin embargo la tasa de incremento de volumen se verá reducida. Por lo tanto, ambas alcanzan un volumen máximo similar, sin embargo las células que expresan AQP lo hacen en un menor tiempo. Luego del incremento en el volumen celular una rápida activación de mecanismos de RVD ocurriría sólo en presencia de las AQPs (Liu y col, 2006; Kida y col, 2005; Ford y col, 2005; Hansen y col, 2007; Benfenati y col, 2007). En ausencia de AQPs el RVD aparece a veces inhibido totalmente y otras veces activado tardíamente (Hansen y col, 2007; Kida y col, 2005; Kuang y col, 2004; Krane y col, 2001; Pasantes-Morales y col, 2006).

Aunque la expresión de acuaporinas claramente favorece el RVD, se

desconoce si esto se debe a la función que ejercen como vía de salida de fluido una vez generada la respuesta regulatoria y/o si son relevantes en los procesos de activación del mecanismo de RVD. Es probable que las acuaporinas participen en procesos celulares más allá de ser vías de pasaje de agua (Hill y col, 2004).

Siguiendo esta línea las acuaporinas se han propuesto como sensores de estrés mecánico o de diferencia de presión osmótica en la membrana plasmática (Ford y col, 2005; Hill y col, 2004; Kuang y col 2004). Además se ha sugerido que las acuaporinas pueden contribuir al ajuste del volumen celular de reposo (Stamer y col, 2001).

1.6. Objetivos generales

El proceso de sensado de cambios de volumen en células es un fenómeno de gran importancia para la regulación de la homeostasis. Para los epitelios que presentan una alta permeabilidad al agua como el caso del túbulo colector renal, resulta un fenómeno evidentemente crítico para que la rápida entrada de agua pueda desencadenar rápidos mecanismos de transducción que restablezcan el volumen. La naturaleza misma del sensado de volumen es una pregunta abierta y no hay hasta el momento una explicación general que pueda aplicarse a todas las células. Como vimos, la reabsorción de agua en los túbulos corticales del riñón de mamíferos está dada por la regulación de la expresión de acuaporina 2 en la membrana apical. Esta regulación se lleva a cabo fisiológicamente por AVP que aumenta la localización de AQP2 en la membrana apical. La expresión de AQP2 en la membrana favorece la pronta activación y gatillado de mecanismos de regulación de volumen. Sin embargo no se conoce cómo la acuaporina puede gatillar dichos eventos.

El objetivo general de este trabajo de tesis es estudiar los mecanismos celulares involucrados en la activación y señalización del RVD en células de túbulo colector cortical renal evaluando el rol de la AQP2 en este proceso.

Capítulo 2: Participación de la AQP2 en el incremento de calcio intracelular inducido por hipotonía: Implicancias en la regulación de volumen celular

2.1. Introducción

Trabajos previos de nuestro grupo demostraron que la presencia de AQP2 en la membrana de las células RCCD₁ es crucial para la activación de mecanismos rápidos de regulación de volumen. Estos mecanismos rápidos involucran la activación de un sistema efector del RVD compuesto por el canal de potasio sensible a Ba²⁺ y el CFTR, que sólo se activan cuando la AQP2 está expresada en membrana apical (Ford y col, 2005).

El paso siguiente fue estudiar en las células AQP2-RCCD₁ la existencia de señales citoplasmáticas que activen los mecanismos effectores del RVD. Hasta el momento, la existencia de esas señales es desconocida y se ignoran los eventos moleculares que vinculan la presencia de la AQP2 con la activación de los rápidos mecanismos effectores del RVD. Uno de los posibles candidatos para ser estudiados es la generación de señales de calcio intracelular ya que se ha descrito ampliamente al calcio intracelular como un mecanismo de señalización del RVD (Hoffman y col, 2009).

2.1.1. Mecanismos celulares generales involucrados en la señalización de calcio

El calcio citosólico es fundamental para regular una inmensa variedad de procesos celulares como la transcripción de genes, la activación de enzimas citoplasmáticas, el ciclo celular, la migración, o incluso para la comunicación célula-célula (Munaron y col, 2004). Su correcta participación en dichos procesos depende esencialmente del adecuado funcionamiento del mecanismo de señalización y del correcto mantenimiento de la concentración de calcio libre citosólico. De esta manera, la elevación de calcio citosólico producida en respuesta a un estímulo específico (por ejemplo una hormona), conforma en el citosol una señal determinada que, de acuerdo a su cinética, su amplitud, su duración y a su localización podrá desencadenar respuestas fisiológicas específicas.

Las fuentes del calcio libre pueden ser extracelulares o de depósitos intracelulares de los cuales el retículo endoplasmático (RE) es el mayor reservorio. Sin embargo existen otros depósitos intracelulares de calcio vinculados a la señalización como el núcleo y las mitocondrias, el citoesqueleto de actina o las proteínas de unión a calcio (CBP). Dada la complejidad del sistema de señalización de calcio como segundo mensajero es importante comprender los componentes celulares vinculados a la generación de las señales citosólicas, que incluyen el mantenimiento del calcio intracelular, las vías de entrada desde el extracelular, la liberación desde los reservorios intracelulares y finalmente las vías de señalización conocidas en las que actúan conjuntamente ambos compartimentos. Los mecanismos generales involucrados en la señalización, descritos a continuación, nos servirán para comprender a lo largo del capítulo, los posibles fenómenos que ocurren durante la señalización de estímulos osmóticos.

i. Mecanismos de mantenimiento de la concentración de calcio libre citosólico

Las concentraciones de calcio libre en el citosol ($[Ca^{2+}]_i$) se mantienen muy bajas (aproximadamente 10^{-7} M) asegurando el correcto funcionamiento de los sistemas celulares. En mamíferos la concentración de calcio libre extracelular ($[Ca^{2+}]_e$) se encuentra en el rango milimolar y la concentración de calcio del RE ($[Ca^{2+}]_{RE}$) se estima en el orden micromolar. Por lo tanto la relación de concentración para el calcio entre el compartimento intracelular y cualquiera de los compartimentos que lo rodean es al menos 1000 veces menor. Este elevado gradiente hace que, aunque las permeabilidades al calcio de la membrana plasmática o del RE sean pequeñas, existan fugas a través de canales pasivos (Figura 2.1). Estas pequeñas fugas, de producirse de manera continua, podrían atentar contra la estabilidad de la $[Ca^{2+}]_i$. Las bombas Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática (PMCA) y de retículo endoplasmático (SERCA) son fundamentales en la extrusión constitutiva de calcio fuera del citosol, mientras que el intercambiador Na^+/Ca^{2+} (NCX), al funcionar acoplado a gradiente de

Na⁺ se utiliza específicamente durante algunos procesos (Figura 2.1). Ocasionalmente este transportador, también podría contribuir a la entrada de Ca²⁺ especialmente en situaciones de elevada concentración de Na⁺ intracelular o de importante despolarización.

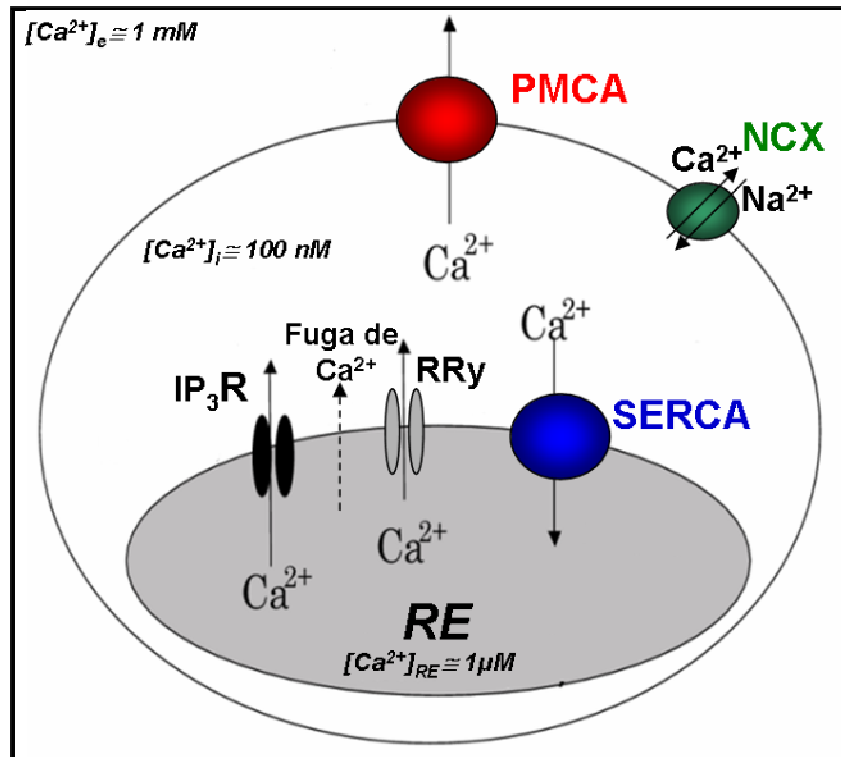


Figura 2.1: Mecanismos generales de mantenimiento del calcio intracelular. Las bombas PMCA, SERCA y el intercambiador NCX se encargan de mantener la concentración citosólica de calcio.

ii. Mecanismos de entrada de calcio

La entrada de calcio desde el extracelular está dada principalmente por canales que aumentan su probabilidad de apertura cuando la célula es estimulada. Los canales son clasificados de acuerdo al estímulo que los activa directa o indirectamente (Figura 2.2). De esta manera podemos describir canales activados por voltaje (VOC del inglés *voltage-operated channel*) dependientes de voltaje, activados por receptor (ROC, del inglés *receptor-operated calcium*) que se abren por unión directa a agonistas (por ej. neurotransmisores), activados por

segundos mensajeros (SMOC, *second messenger operated channels*) que responden a mensajeros intracelulares liberados en respuestas a agonistas (por ej ATP, hormonas esteroideas, factores de crecimiento y mitógenos). Los canales SMOC parecerían ser una vía importante en la entrada de calcio en respuesta a agonistas en células no excitables (Zitt y col 2002; Munaron y col, 2004). Los canales SOC (*Store operated channels*) se activan ante estímulos que vacían los reservorios intracelulares (descritos mas adelante).

Finalmente podemos mencionar a los canales MSCC (del ingles *mechanosensitive calcium channels*) que son sensibles a cualquier estímulo de tipo mecánico como el stress osmótico, el estiramiento de membrana o el *shear stress*³. Los MSCC incluyen a los canales activados directamente por estiramiento (por ejemplo por la aplicación de una presión hidrostática) (Morris y col, 1990) y otro tipo de canales mecanosensibles que se activan ante estímulos osmóticos, pero no en forma directa (Lietdke y Kim, 2005).

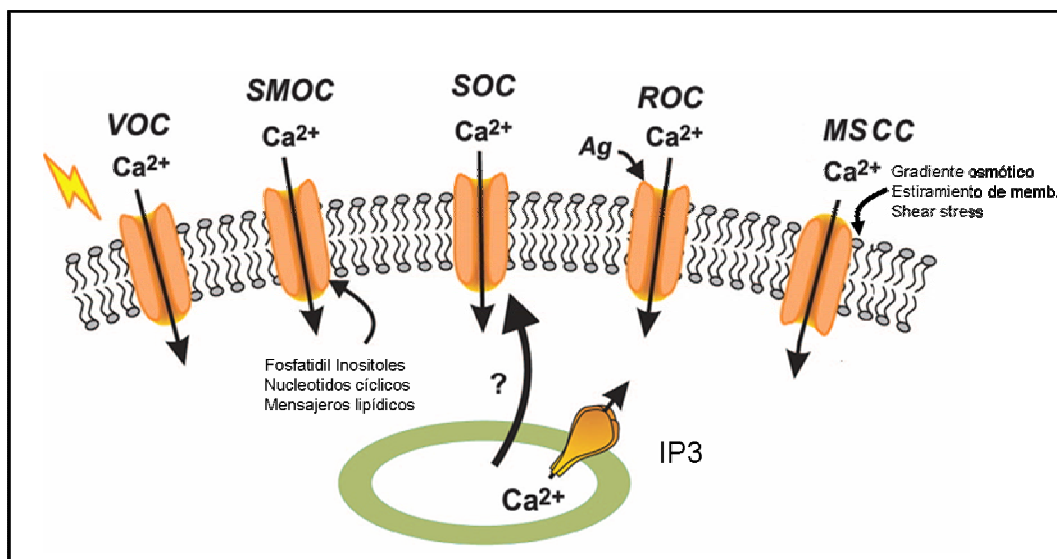


Figura 2.2: Modos de entrada de calcio a través de la membrana. El calcio puede entrar a la célula a través de varias clases generales de canales, incluyendo los VOC *Voltaje operated channels*), los SMOC (*Small molecule operated channels*), los SOC (*Store operated channels*), los ROC (*Receptor operated Channels*) y los MSCC (*mechanosensitive calcium channels*).

³ *Shear stress*, o cizallamiento, es el efecto que produce una fuerza mecánica aplicada de forma paralela a la superficie de las células, en contraste con el *normal stress*, en el que las fuerzas se aplica de forma perpendicular. Ocurre en algunos sistemas celulares por ejemplo en los túbulos, cuando el pasaje de fluido a lo largo de la luz, produce deformaciones en las células que forman el epitelio.

iii. Mecanismos de liberación de calcio desde los reservorios intracelulares

El retículo endoplasmático (RE) es uno de los reservorios intracelulares de calcio más importantes y es la fuente de liberación de calcio al citosol en respuesta a estímulos externos que más ha sido estudiada. Existen dos tipos de canales de calcio en el RE, los receptores IP3 (IP3R) y los receptores de Ryanodina (RRy Figura 2.1).

El IP3R es un canal de calcio multimérico que se abre luego de unirse a IP3, que puede estar estimulada ya sea por receptores acoplados a proteína G (GPCR) o por receptores acoplados a tirosin Kinasas (RTK) que activan una cascada de PLC (Putney y col, 2001). La liberación de calcio inducido por IP3 en general da lugar a una señal rápida y corta que es regulada por las bombas SERCA (en el retículo) y PMCA (en la membrana). El RRy es un canal multimérico que es modulado en si mismo por calcio y puede dar lugar a oscilaciones de la concentración intracelular de calcio.

iv. Mecanismos de señalización que utilizan ambas fuentes.

La señalización de estímulos extracelulares en la mayoría de los casos puede involucrar vías complejas que utilizan ambas fuentes. De acuerdo a los mensajeros que se activan y a los componentes moleculares que participan, estos mecanismos de señalización se han dividido principalmente en dos tipos: Liberación de calcio inducida por calcio (*CICR, calcium induced calcium release*) (Figura 2.3) y entrada de calcio capacitativa (*CCE, capacitative calcium entry*) (Figura 2.4).

a- CICR

En líneas generales la liberación de calcio inducida por calcio involucra un incremento inicial de calcio intracelular a través de un flujo de entrada desde el extracelular (por ej. canales VOC o MSCC) que es capaz de activar la apertura de receptores de RRy en el RE y de esa manera producir una rápida liberación

de calcio. En general este mecanismo requiere que los receptores de rianodina del RE estén acoplados funcionalmente a dichos canales de membrana de manera de que la cercanía física asegure una liberación rápida y específica. Se describió inicialmente en células musculares, en las cuales la entrada de calcio por canales voltaje dependientes gatilla la activación de RRY en el túbulo T. Posteriormente se encontraron evidencias que los estímulos osmóticos pueden desencadenar una CICR en células epiteliales. Existen adicionalmente algunos reportes que involucran a los IP₃R en la liberación (Figura 2.3).

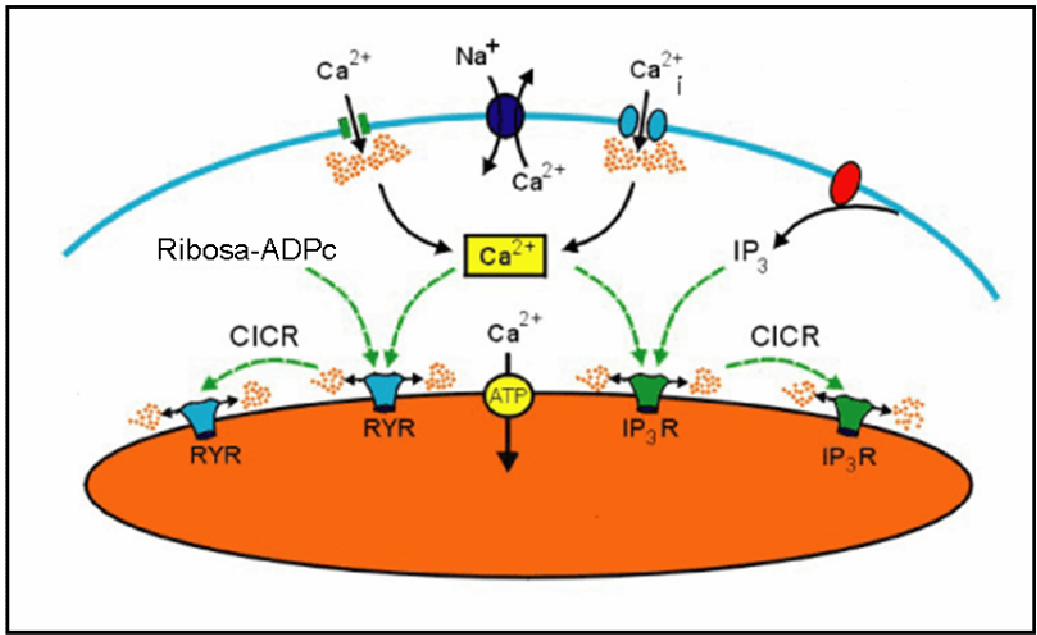


Figura 2.3: Esquema de la señalización de calcio por el mecanismo denominado CICR (Liberación de calcio inducida por calcio). La activación de una corriente entrante de calcio activa a los RRY o los IP₃R del RE, gatillando la liberación de los depósitos.

b- CCE

La CCE se activa cuando un estímulo externo (un ligando que se une a un receptor de membrana o un estímulo físico), es capaz de desencadenar el vaciamiento de calcio del RE. En general esta disminución en la $[Ca^{2+}]_{RE}$ se produce al activarse la liberación de calcio por la unión IP₃-IP₃R. Una vez que la $[Ca^{2+}]_{RE}$ disminuye por debajo de un determinado umbral de concentración, una serie de mecanismos son capaces de producir la activación de una vía de entrada específica en la membrana plasmática desde el compartimiento

extracelular (Figura 2.4). La CCE provocará una señal con dos componentes, primero una liberación rápida, transiente y luego una entrada lenta y sostenida (Putney y col, 2001). A los canales que pueden activarse por este mecanismo de entrada se los denomina, genericamente, canales SOC (del inglés *Store-operated Channel*).

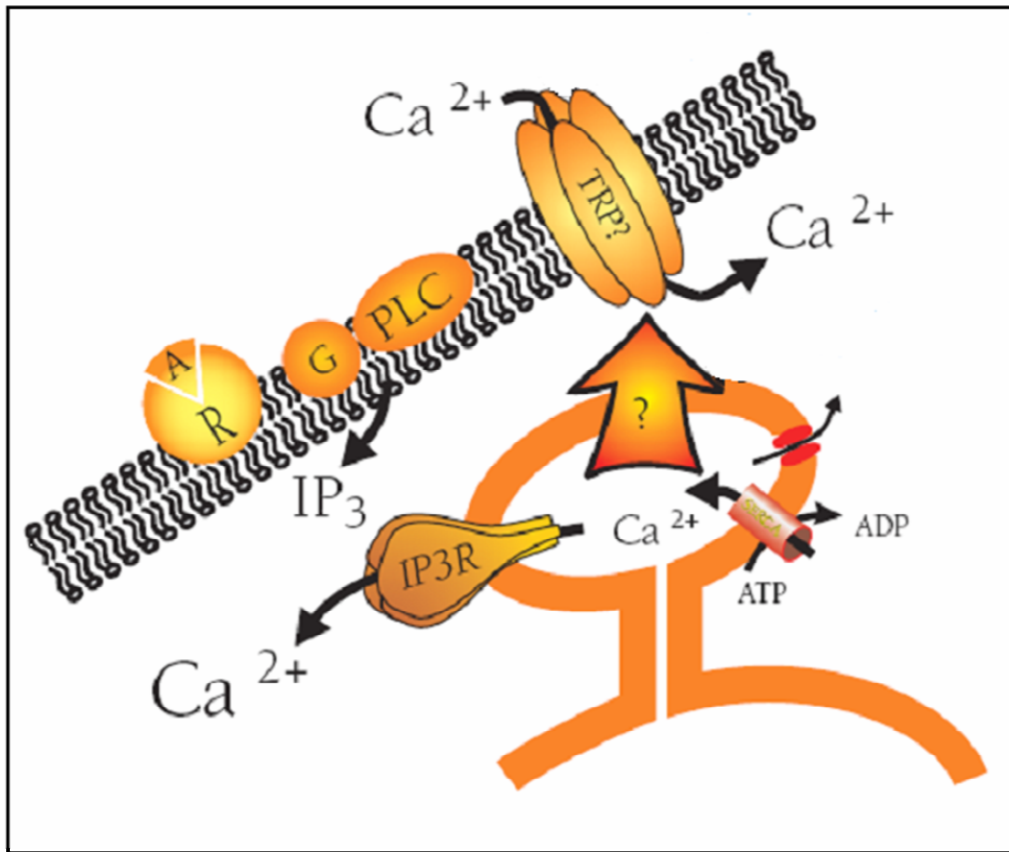


Figura 2.4: Esquema de la señalización de calcio por el mecanismo denominado CCE (**Entrada de calcio capacitativa**). Se esquematiza un ejemplo en el que la estimulación por un agonista que se une a su receptor GPCR, activa PLC y libera IP3. El IP3 se une al receptor de IP3 produciendo la primera fase de la liberación: el vaciamiento de los depósitos. Este provocará la activación de canales SOC en la membrana, que producirán una entrada sostenida.

Respecto de los mecanismos que activarían estos canales se han postulado tres hipótesis (Figura 2.5): la existencia de un *acoplamiento conformacional*, la *activación de inserción de vesículas* y la *presencia de mensajeros difusibles intracelulares* que estimulan la apertura del canal (Elliot y col, 2001).

El *acoplamiento conformacional* sugiere que los receptores de IP3 del

retículo endoplasmático, IP3R se hallan físicamente acoplados a los canales de calcio de la membrana plasmática. De esta manera, cuando los canales IP3R se abren, por acción del IP3, se gatilla la apertura de los canales de membrana por un cambio conformacional (Putney y col, 2001) (Figura 2.5 A).

El mecanismo de *inserción de vesículas o exocitosis* establece de manera similar al anterior que el vaciamiento de los depósitos por activación de receptores IP3 del retículo endoplasmático, gatilla la inserción en la membrana plasmática de vesículas que contienen canales de calcio (Figura 2.5 B).

El mecanismo de activación de la corriente capacitativa por *mensajeros intracelulares* postula la existencia de moléculas que se liberan luego del vaciamiento de los depósitos intracelulares y que activan canales de membrana plasmática. Entre estas moléculas se han postulado el IP4, los metabolitos del Citocromo P oxidasa 450 (CYP 450) y factores hipotéticos como el CIF (factor de flujo de calcio) (Figura 2.5 C).

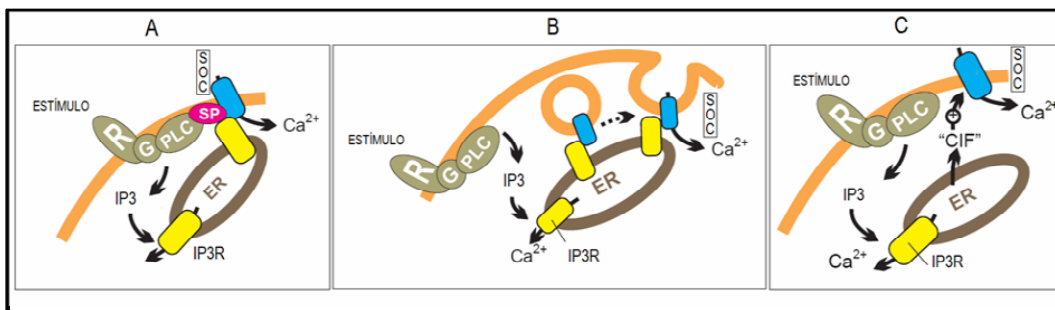


Figura 2.5: Modelos hipotéticos propuestos para la activación de canales SOC en la generación de la entrada de calcio CCE. A: Modelo de acoplamiento conformacional, B: modelo de la inserción vesicular, C: hipótesis del mensajero intracelular (Modificado de Putney y col, 2001).

2.1.2. Objetivos

El objetivo general de este capítulo es estudiar el rol del calcio intracelular en la activación y señalización del RVD en células del túbulo colector cortical renal, evaluando el rol de la AQP2 en este proceso. Para ello se utilizaron dos líneas celulares de túbulo colector cortical de rata, una que no expresa acuaporinas (WT-RCCD₁) y otra que expresa de manera constitutiva AQP2 en la membrana apical (AQP2-RCCD₁).

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Cultivo celular

La línea celular WT-RCCD₁ fue establecida a partir de túbulo colector cortical de rata (CCD). Esta línea presenta una elevada resistencia transepitelial y características de permeabilidad semejantes al túbulo nativo (Blot-Chabaud y col, 1996), sin embargo no expresa acuaporinas. Por lo tanto transfectamos esta línea con cDNA de AQP2 de rata. La transfección estable se realizó con el simian virus 40 (SV40). Por estudios de inmunolocalización y microscopía confocal comprobamos que AQP2 se localiza constitutivamente en la membrana apical y en el compartimento subapical (Ford y col, 2005).

Las células WT- RCCD₁ fueron cultivadas a 37°C, en una atmósfera de 5% CO₂, con un medio de cultivo definido (DM) de composición: 1:1 Ham's F-12/DMEM; 14 mM NaHCO₃; 3.2 mM glutamina; 5x10⁻⁸ M dexametasona; 3x10⁻⁸ M selenito de sodio; 5 µg/ml insulina; 10 µg/ml factor de crecimiento epidérmico; 5x10⁻⁸ M triodotironina; 10 unidades/ml penicilina/estreptomina; 20 mM HEPES, 10 mM Tris (pH 7,4), apotransferrina (5mg/ml) y 2% suero fetal bovino (Internegocios). El medio se les cambió cada 2 días y se repicó semanalmente utilizando Tripsina-EDTA (Gibco-BRL). Las células AQP2-RCCD₁ fueron cultivadas de la misma manera con el agregado de geneticina (G418).

2.2.2. Medición de Volumen Celular.

Para la medición de volumen celular se utilizaron técnicas de fluorescencia. Los experimentos fueron realizados con el fluoróforo derivado de la fluoresceína BCECF/AM. El hecho de que el fluoróforo esté modificado como un acetoximetil ester (AM) le permite ser permeable a la célula y evita la engorrosa técnica de inyección donde se daña la membrana de las células. La forma AM ingresa a la célula atravesando la membrana plasmática y es luego

clivado por estearasas intracelulares (presentes en casi todas las células). De esta forma el fluoróforo se transforma en una especie impermeable y queda en forma libre atrapado en el interior de la célula.

El fluoróforo BCECF/AM fue reportado por primera vez por Tsien (Tsien y col, 1981) y es el indicador intracelular más utilizado para la medición de pH intracelular. Adicionalmente este fluoróforo, así como la calceína (otro derivado de la fluoresceína) pueden actuar como marcadores de cambios de volumen de agua intracelular. A una determinada longitud de onda de excitación, denominada punto isobéptico, la fluorescencia del BCECF no se ve afectada por cambios en el pH. Esta técnica fue ampliamente utilizada para la medición de cambios de volumen celular, ya que los cambios de concentración de fluoróforo son proporcionales a los cambios de volumen en células aisladas (Alvarez-Leefmans y col, 1995; Alvarez Leefmans y col, 2006; Pafundo y col, 2004). Sin embargo se reportó que para algunas células crecidas en monocapas, el comportamiento es inverso al esperado ya que al diluirse el interior celular (luego de un shock osmótico) se producen aumentos de la intensidad fluorescencia, a este fenómeno se lo ha denominado extinción de fluorescencia (*Self quenching*) (Hamman y col, 2002; Wehner y col; 1995). Posteriormente se ha demostrado que dicho fenómeno de extinción puede deberse también a interacción entre el contenido citosólico y el fluoróforo (Solenov y col, 2004). En nuestro laboratorio se adaptó la técnica de videomicroscopía de fluorescencia para la medición de cambios de volumen de agua en células epiteliales de túbulo colector cortical (Ford y col, 2005). Dicha adaptación para células epiteliales se basa en que la medición de los cambios de fluorescencia en una pequeña región (pinhole) localizada en la periferia de las células, resulta directamente proporcional a los cambios de volumen (Figura 2.6). Este fenómeno, inverso al esperado por dilución de fluoróforo, no se debería a la auto-extinción de fluorescencia como fue reportado previamente (Hamman y col, 2002; Solenov y col, 2007) sino a los cambios de altura durante el incremento de volumen de las células registradas en la periferia (Ver Anexo metodológico).

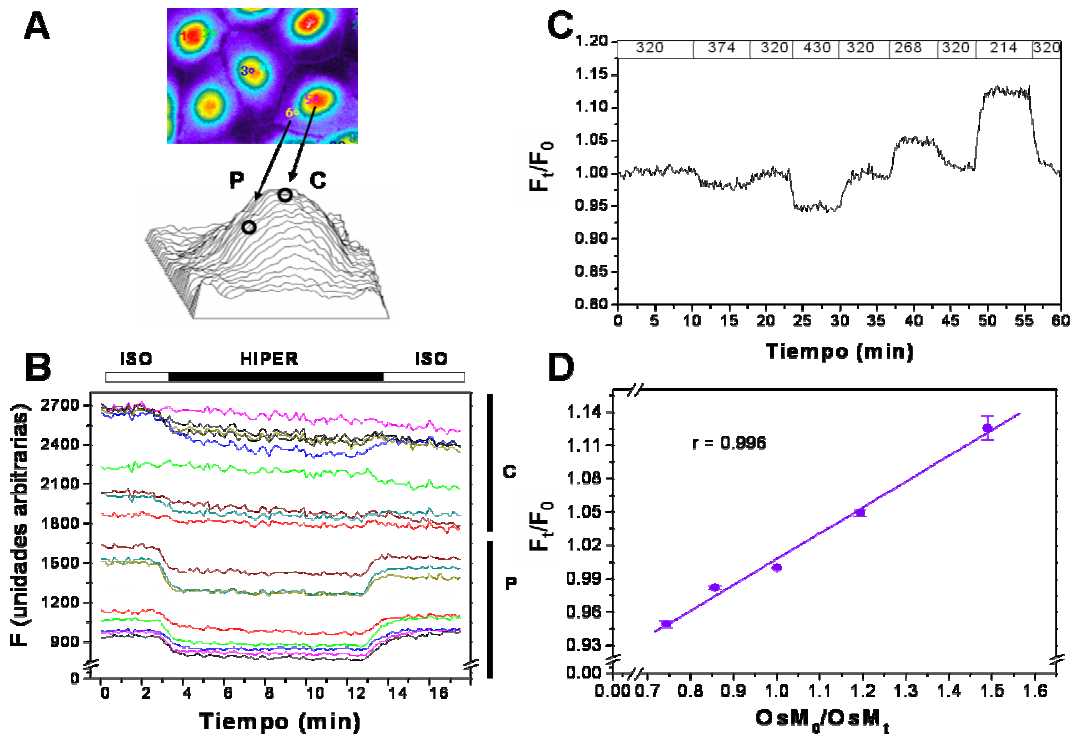


Figura 2.6: Esquema de mediciones utilizadas para la técnica de medición de cambios de volumen. A: Células RCCD₁ cargadas con fluoróforo BCECF y ubicación de las pinholes. B: Registro de intensidad de fluorescencia de las células cargadas con BCECF y registradas en el centro y en la periferia en medio hipertónico. C: Fluorescencia relativa en función del tiempo en células expuestas a distintos gradientes osmóticos D: Fluorescencia relativa en función del gradiente (Ford y col, 2005).

Las células crecidas en confluencia en cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro (Fisher), fueron montadas en una cámara de aluminio y se cargaron con 2 μ M del fluoróforo BCECF/AM (Molecular Probes) durante 30-45 minutos a 37°C, en oscuridad. Luego la cámara que contiene las células fue colocada en la platina de un Microscopio invertido de epifluorescencia Nikon TE-200 (objetivo Nikon Panfluor X40 apertura numérica 1.3 de aceite de inmersión). El setup de microscopía utilizado es similar al descrito en los trabajos del grupo de Alvarez-Leefmans (Alvarez-Leefmans y col, 1997). Las células son lavadas varias veces con solución Ringer isotónico libre de fluoróforo con el fin de remover el BCECF del sobrenadante y luego se mantienen en esa solución libre de fluoróforo al menos 15 min. antes de comenzar con los experimentos y se lava nuevamente. La temperatura del cuarto se mantiene a 20 ± 2 °C.

Durante el transcurso de los experimentos la solución de baño en la cámara se cambia aspirando por medio de pipetas pasteur y agregando rápidamente la solución deseada. Este intercambio de fluidos es completado en un lapso menor a 5s.

La intensidad de fluorescencia es registrada al excitar el BCECF en su punto isobéptico (440 nm), longitud de onda a la cual el fluoróforo es insensible a variaciones de pH (Figura 2.7).

Los datos de fluorescencia son adquiridos cada 10 s utilizando una cámara CCD (charge-coupled device camera: Hamamatsu C4742-95) conectada a una PC en la que se utiliza el software de adquisición Metafluor (Universal Imaging, West Chester, PA, USA). Este sistema permite tomar imágenes de la fluorescencia emitida por las células, con una frecuencia de adquisición elegida por el usuario y permite calcular la intensidad de fluorescencia de regiones específicas de las células (Figura 2.6 A). A estas regiones se las denomina pinhole digitales (Alvarez-Leefmans y col, 1997).

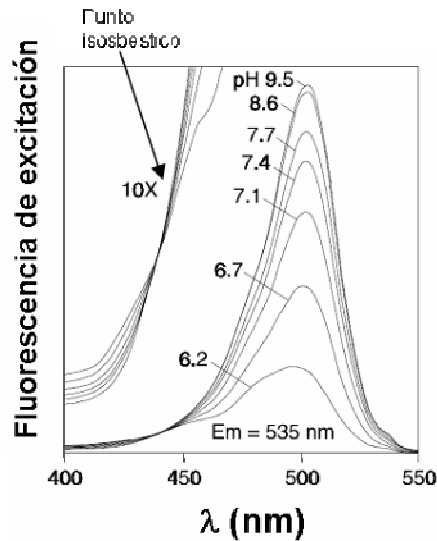


Figura 2.7: Espectro de excitación del Fluoróforo BCECF. En el detalle se muestra el punto isobéptico del fluoróforo aproximadamente en 440 nm el cual es insensible a pH.

El procedimiento para estimar el cambio en el volumen celular de agua es similar al descrito para células epiteliales de retina (Hamman y col, 2002).

$$\frac{V}{V_0} = \frac{\left(\frac{F_t}{F_0}\right) - f_b}{1 - f_b}$$

Dónde:

V es el volumen celular a tiempo t

V₀ es V cuando t = 0

F₀ representa la señal de fluorescencia medida en una región pequeña (pinhole) en presencia de un medio de osmolaridad OsM₀

F_t es la intensidad de fluorescencia de la misma región a tiempo t en una solución de una osmolaridad OsM_t

f_b es la fluorescencia de fondo (background)

El parámetro f_b corresponde a la intersección en las ordenadas de un gráfico F_t/F₀ en función de OsM₀/OsM_t (Figura 2.6 D)

El RVD asociado con la respuesta volumétrica de las células expuestas a un medio hipotónico fue evaluado con el parámetro %RVD_t que evalúa el porcentaje de recuperación del volumen celular en el tiempo t, y se calcula por medio de la siguiente ecuación:

$$\%RVD_t = \left[\frac{\left(\frac{V}{V_0}\right)_{max} - \left(\frac{V}{V_0}\right)_t}{\left(\frac{V}{V_0}\right)_{max} - 1} \right] \times 100$$

Donde (V/V₀)_{máx} corresponde al máximo valor de V/V₀ alcanzado durante el shock hipotónico (Pico máximo) y V_t/V₀ representa el valor de V/V₀ en el tiempo evaluado.

2.2.3. Medición del coeficiente de permeabilidad osmótica

La permeabilidad osmótica al agua de las células RCCD₁ fue estimada utilizando los dos primeros minutos de los registros del curso temporal del volumen relativo obtenido con células cargadas con BCECF según se describió en el punto 2.2.2. Las curvas fueron ajustadas a exponenciales simples con el

software Prism 3.0 y se obtuvo el parámetro correspondiente a la constante de tiempo (τ). El P_{osm} (en cm^2/s) se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación,

$$P_{osm} = \frac{V_0}{\tau \cdot A \cdot \Delta Osm \cdot V_w}$$

Donde A es el área correspondiente a la superficie de la célula (en cm^2), V_0 es el volumen relativo inicial, ΔOsm es el gradiente osmótico y V_w representa el volumen molar parcial del agua ($18 \text{ cm}^3/\text{mol}$).

2.2.4. Medición de calcio intracelular

Para la medición de cambios en la concentración de calcio intracelular a partir de estímulos en los que se modifica la concentración de las especies en el citosol por cambios de volumen (como es el caso de de estímulos hipotónicos o hipertónicos) es necesario utilizar fluoróforos que permitan visualizar señales de fluorescencia independientemente de los cambios de dilución. Por esto se utilizaron fluoróforos que permiten mediciones ratiométricas. Esto significa que para la estimación de la concentración intracelular de calcio se toman en cuenta la relación de fluorescencia de dos longitudes de onda de excitación.

El fluoróforo Fura-2 es el más ampliamente utilizado desde su desarrollo por Grynkiewicz en 1985. Un espectro de excitación del Fura-2 se muestra en la figura 2.8. Según el espectro, este fluoróforo tiene tres longitudes de onda de excitación relevantes para la medición de calcio: una a 340 nm, la cual aumenta su intensidad al aumentar el calcio libre, otra a 380 nm que disminuye su intensidad al aumentar la concentración de calcio y finalmente la de 360 nm, en la que la intensidad no varía en estos cambios, o sea el punto isosbético (Muallem y col, 1992; Alvarez-Leefmans y col, 2006).

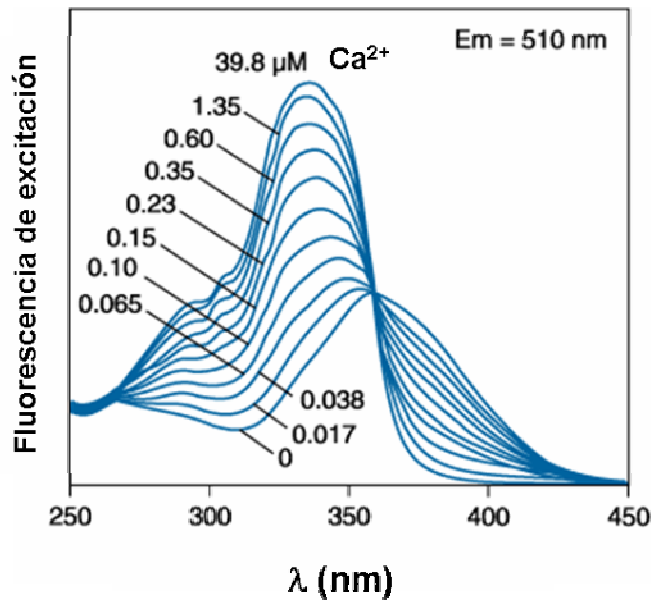


Figura 2.8: Espectro de excitación del fluoróforo Fura-2/AM. El máximo de excitación de este fluoróforo se encuentra aproximadamente en 340 nm (correspondiente al fluoróforo unido a calcio) mientras que el mínimo de excitación está en 380 nm (correspondiente al fluoróforo 0- Ca^{2+}).

La concentración de calcio intracelular se evalúa mediante la relación de intensidades a partir del registro de fluorescencia de 340 nm y 380 nm en un pinhole central en cada célula. Para los experimentos las células crecidas en confluencia se cargaron con Fura-2/AM (10 μM) durante 1 hora a temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ \text{C}$).

Las concentraciones de Ca^{2+} intracelular fueron calibradas a partir de las señales máximas y mínimas de Fura-2 al finalizar cada experimento. La solución del baño utilizada fue de 3.5 μM del ionóforo de Ca^{2+} ionomicina con una concentración 1 mM de Ca^{2+} para establecer máximas señales de Fura-2 y luego una solución libre de Ca^{2+} y 100 μM EGTA utilizando la misma concentración de ionomicina para alcanzar señales mínimas de Fura-2.

La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fue calculada como se reportó previamente (Grynkiewicz y col, 1985):

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \cdot (R - R_{\text{min}}) / (R_{\text{max}} - R) \cdot F$$

Donde:

K_d es la constante de disociación de Fura-2 (224 nM)

R es la relación de intensidades de fluorescencia en las longitudes de onda de

excitación 340 y 380 nm

R_{max} y R_{min} son las relaciones máximas y mínimas de Fura-2 alcanzadas en presencia y ausencia de Ca^{2+} ,

y F es la relación de intensidades de Fura-2 a 380 nm en presencia y ausencia de Ca^{2+} .

Para cuantificar los efectos del estímulo sobre la concentración intracelular de calcio se calculó la diferencia de la $[Ca^{2+}]_i$ ($\Delta[Ca^{2+}]_i$) respecto de la condición basal. El setup experimental utilizado para estos experimentos es el mismo que describimos en el punto anterior, utilizando los filtros de excitación 340 nm y 380 nm y el filtro de emisión para Fura-2 de 510 nm.

2.2.5. Soluciones

Las soluciones isosmóticas contienen (en mM): 90 NaCl, 10 $NaHCO_3$, 5 KCl, 1 $CaCl_2$, 0.8 $MgSO_4$, 1 $MgCl_2$, 100 manitol, 20 Hepes, 5 glucosa. Las soluciones hiposmóticas se prepararon removiendo manitol hasta lograr el $\Delta OsM = 100$ mOsM, manteniendo la fuerza iónica. Las soluciones de gradiente osmótico mayor ($\Delta OsM = 200$ mOsM), se prepararon por dilución hasta alcanzar la osmolaridad final de 120 ± 3 mOsM. Las soluciones 0- Ca^{2+}_e se realizaron sustituyendo $CaCl_2$ por $MgCl_2$ y agregando EGTA (1mM) para quelar el calcio libre.

Las osmolaridades fueron sistemáticamente medidas por medio de un osmómetro de presión de vapor (Werked). Todas las soluciones fueron llevadas a un pH de 7.4 con Tris (Sigma). En algunos experimentos se usó 100 μM Cloruro de Gadolinio (Sigma), 100 μM BAPTA/AM (Molecular Probes), 1 μM Tapsigargina (Molecular Probes), 300 μM $HgCl_2$ (Sigma), 100 $\mu g/ml$ Anfotericina (Sigma).

2.2.6. Estadística

Todos los valores reportados corresponden a media \pm el error standard de la media (SEM), y n es el número de células evaluadas utilizando entre tres a seis experimentos diferentes. Para todas las comparaciones se realizaron pruebas de *t de Student* para datos no pareados y $p < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo

2.3. Resultados

2.3.1. La hipotonía induce un incremento de calcio intracelular en células que expresan AQP2

Para estudiar las variaciones de calcio intracelular ante estímulos osmóticos en las células de túbulo colector renal y evaluar el rol de la AQP2 en este proceso realizamos experimentos donde se expuso a las células AQP2-RCCD₁ y WT-RCCD₁ a gradientes hipotónicos, y se midieron los cambios de calcio citosólico.

En la figura 2.9 A se muestra el curso temporal de la fluorescencia relativa de células AQP2-RCCD₁ y WT-RCCD₁ cargadas con Fura-2/AM en presencia de un shock hipotónico. La reducción de la osmolaridad produce un importante aumento transiente del calcio citosólico sólo en las células AQP2-RCCD₁. En cambio en las células WT se produce un pequeño aumento seguido de un decremento por debajo de los niveles basales.

Para estudiar si la inhibición de la permeabilidad osmótica al agua de las células AQP2-RCCD₁ tiene efectos sobre el incremento de la señal de calcio en respuesta a hipotonía, realizamos experimentos de inhibición de la AQP2 por medio de una preincubación con cloruro de mercurio (0.3 mM) el cual ha sido ampliamente utilizado como inhibidor de AQPs. Trabajos anteriores en el laboratorio mostraron que este tratamiento inhibe un 80 % el P_{osm} de las células

AQP2-RCCD₁ (Ford y col 2005).

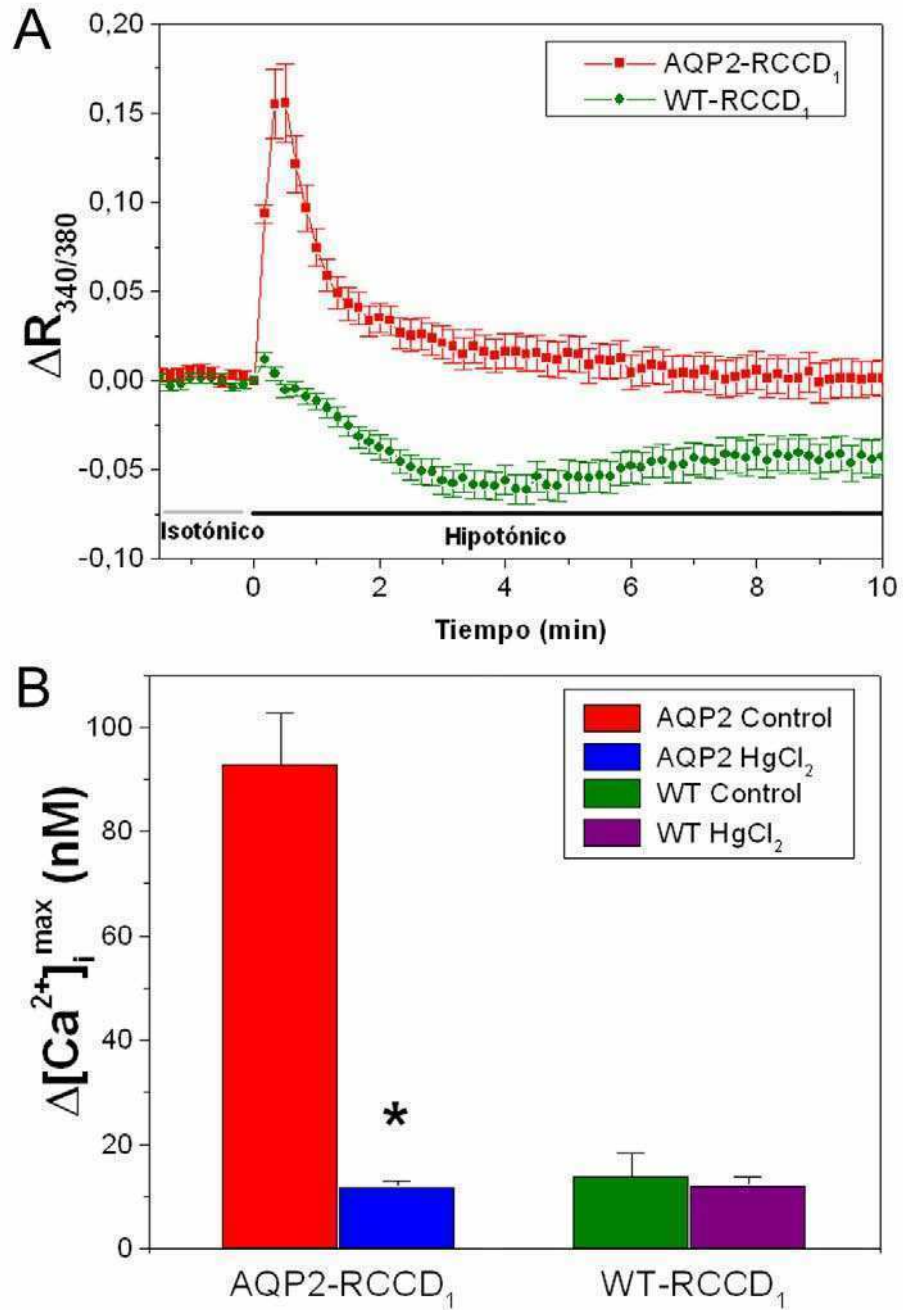


Figura 2.9: Efectos de la hipotonía en la $[Ca^{2+}]_i$ en células AQP2-RCCD₁ y WT en presencia y ausencia de HgCl₂. A: Dinámica de la relación 340/380 luego del shock hipotónico ($\Delta OsM = 100$ mOsM) de células cargadas con Fura-2/AM. B: $\Delta[Ca^{2+}]_i^{max}$ representa el máximo incremento de $[Ca^{2+}]_i$ luego del shock hipotónico. Los valores son medias \pm SEM de 80 a 100 células de 5-6 experimentos * $p < 0.001$, comparando HgCl₂ vs Control.

La figura 2.9 B muestra que el valor máximo de incremento de la concentración $[Ca^{2+}]_i$ luego del shock hipotónico ($\Delta[Ca^{2+}]_i^{max}$) en las células AQP2-RCCD₁ se redujo significativamente al incubarlas con HgCl₂, obteniéndose valores similares a los de WT. En contraste en las células WT-RCCD₁ la inhibición con HgCl₂ no mostró efectos en el $\Delta[Ca^{2+}]_i^{max}$ (Figura 2.9 B).

Con el objetivo de evaluar si los efectos de la hipotonía sobre el incremento de calcio son debidos a la presencia de AQP2 *per se* o si solamente son debidos a los rápidos cambios de volumen que se dan cuando el P_{osm} aumenta, incubamos las células WT-RCCD₁ con el poro artificial anfotericina B (Holz y col, 1970). Esta droga se ha utilizado por distintos autores para simular un incremento en la permeabilidad similar a la producida por las acuaporinas (Capurro y col, 1994; Zelenina y Brismar, 2000; Zhang y Verkman, 1991; Yano y col, 1996).

La figura 2.10 A muestra el coeficiente de permeabilidad osmótica estimado luego de la exposición a un medio hipotónico de las células WT-RCCD₁ tratadas con anfotericina o vehículo. La preincubación de las células WT con anfotericina produjo un incremento de 6 veces en el P_{osm} , sin embargo no hubo cambios significativos en el aumento de calcio intracelular (Figura 2.10 B). Este resultado refuerza la idea de que el sólo incremento de el P_{osm} a través de un poro no es suficiente para producir incrementos en $[Ca^{2+}]_i$.

Todos estos resultados en conjunto muestran que la presencia de la AQP2 funcional en la membrana de las células RCCD₁ es condición necesaria para la activación del incremento de calcio citosólico en respuesta a estímulos hipotónicos.

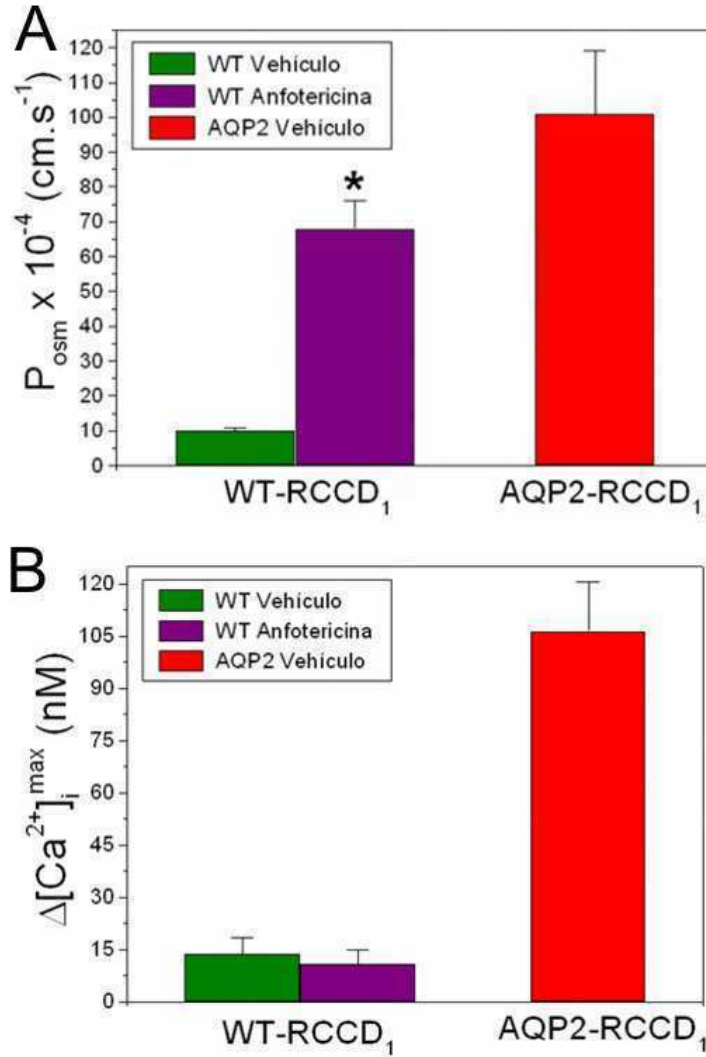


Figura 2.10: Efectos de la anfotericina en el P_{osm} y en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en células WT-RCCD₁ en respuesta a hipotonía. **A:** El coeficiente de permeabilidad osmótica fue estimado a partir de los cambios de volumen relativo en respuesta a un shock hipotónico ($\Delta\text{OsM} = 100 \text{ mOsM}$) en células WT-RCCD₁ pre incubadas con anfotericina B (100 $\mu\text{g/ml}$) o vehículo (DMSO). Para comparar estos valores con los valores de permeabilidad osmótica de las células AQP2-RCCD₁, éstas fueron preincubadas con vehículo. **B:** $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i^{\text{max}}$ representa el máximo incremento de concentración de calcio intracelular luego de un shock hipotónico en las condiciones ya descritas. Los valores representan la media \pm SEM de 50 a 100 células de 4-5 experimentos, * $p < 0.001$, comparando con células WT-RCCD₁ preincubadas con vehículo.

2.3.2. El incremento de calcio inducido por hipotonía en células AQP2-RCCD₁ depende de la fuente extracelular de calcio.

Para evaluar si el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta a hipotonía depende de fuentes extracelulares, expusimos las células a un medio libre de Ca^{2+}_e .

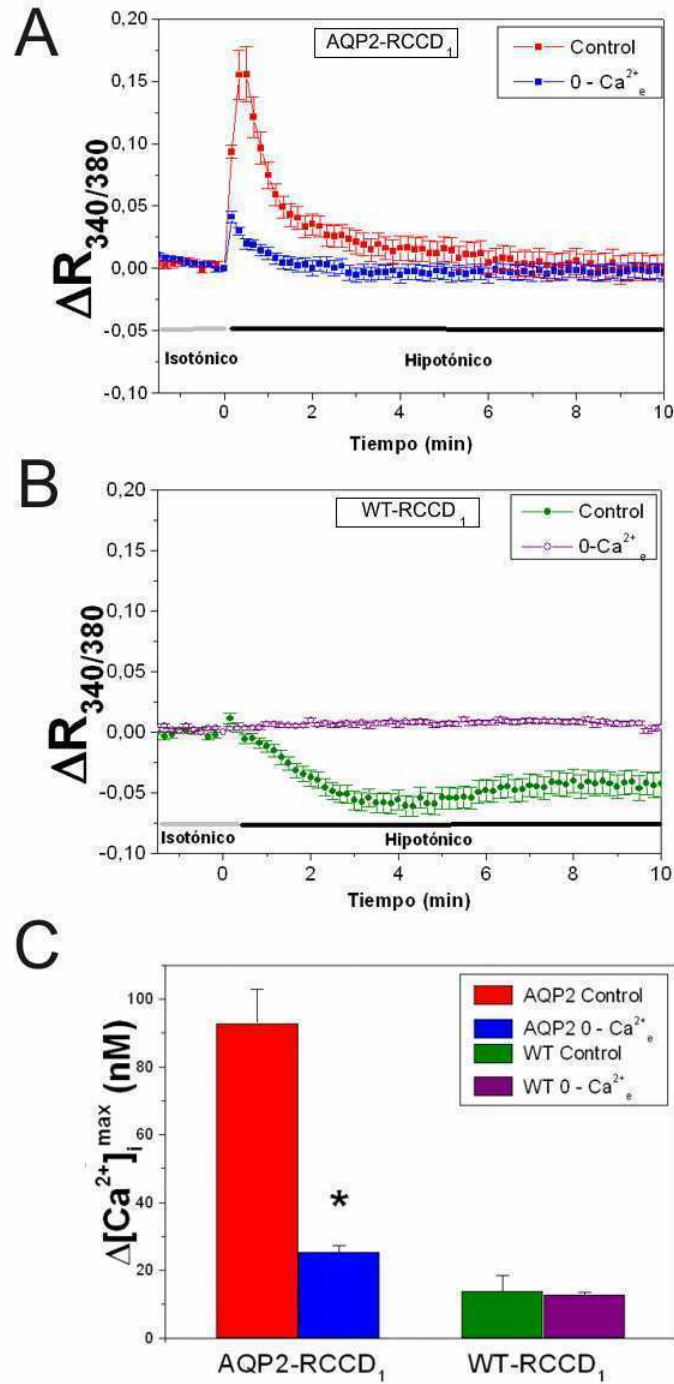


Figura 2.11: Efecto de la remoción del calcio extracelular en la variación de la $[Ca^{2+}]_i$ en células AQP2-RCCD₁ y WT-RCCD₁ luego de un tratamiento hipotónico. Dinámica de la relación 340/380 luego del shock hipotónico ($\Delta OsM = 100$ mOsM) en células AQP2-RCCD₁ (A) y WT-RCCD₁ (B) cargadas con Fura-2/AM en ausencia y presencia de calcio extracelular (C) $\Delta[Ca^{2+}]_i^{max}$ representa el máximo incremento de $[Ca^{2+}]_i$ luego del shock hipotónico. Los valores son medias \pm SEM de 80 a 100 células de 5 a 6 experimentos, * $p < 0.001$.

La figura 2.11 A muestra que la ausencia de calcio extracelular en las células AQP2-RCCD₁ reduce significativamente la capacidad de aumentar el calcio intracelular. Al cuantificar estos experimentos, se evidencia que el promedio máximo de concentración de calcio intracelular $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i^{\text{max}}$ se reduce a un 27 % en ausencia de calcio extracelular (Figura 2.11 C). Por el contrario, la ausencia de calcio extracelular en las células WT-RCCD₁ no modificó la respuesta máxima observada (Figura 2.11 B y C).

Estos resultados muestran que en la osmoseñalización de células RCCD₁, la presencia de AQP2 en la membrana plasmática participa en la activación de mecanismos de entrada de calcio desde el compartimento extracelular.

2.3.3. La entrada de calcio dependiente de AQP2 es requerida para la rápida activación del RVD

Dado que previamente reportamos que la AQP2 es crucial para la activación de los mecanismos rápidos de RVD (Ford y col, 2005) evaluamos si la entrada de calcio desde el extracelular es requerida para dicha respuesta. La figura 2.12 A muestra los cursos temporales de cambio relativo de volumen de células AQP2-RCCD₁ en soluciones control y libres de calcio. Al someter a las células al shock hiposmótico, las cinéticas de ambas condiciones resultan diferentes mostrando una inhibición en la respuesta de recuperación de volumen en los experimentos realizados con soluciones libres de calcio. El porcentaje de RVD a los 20 minutos (%RVD₂₀) fue significativamente menor en las células expuestas a 0-Ca²⁺_e (Figura. 2.12 C). Por el contrario las células que no expresan AQP2, en las cuales reportamos la ausencia de mecanismos rápidos de RVD, el %RVD₂₀ no se ve alterado en medio 0-Ca²⁺_e (Figura 2.12, B y C).

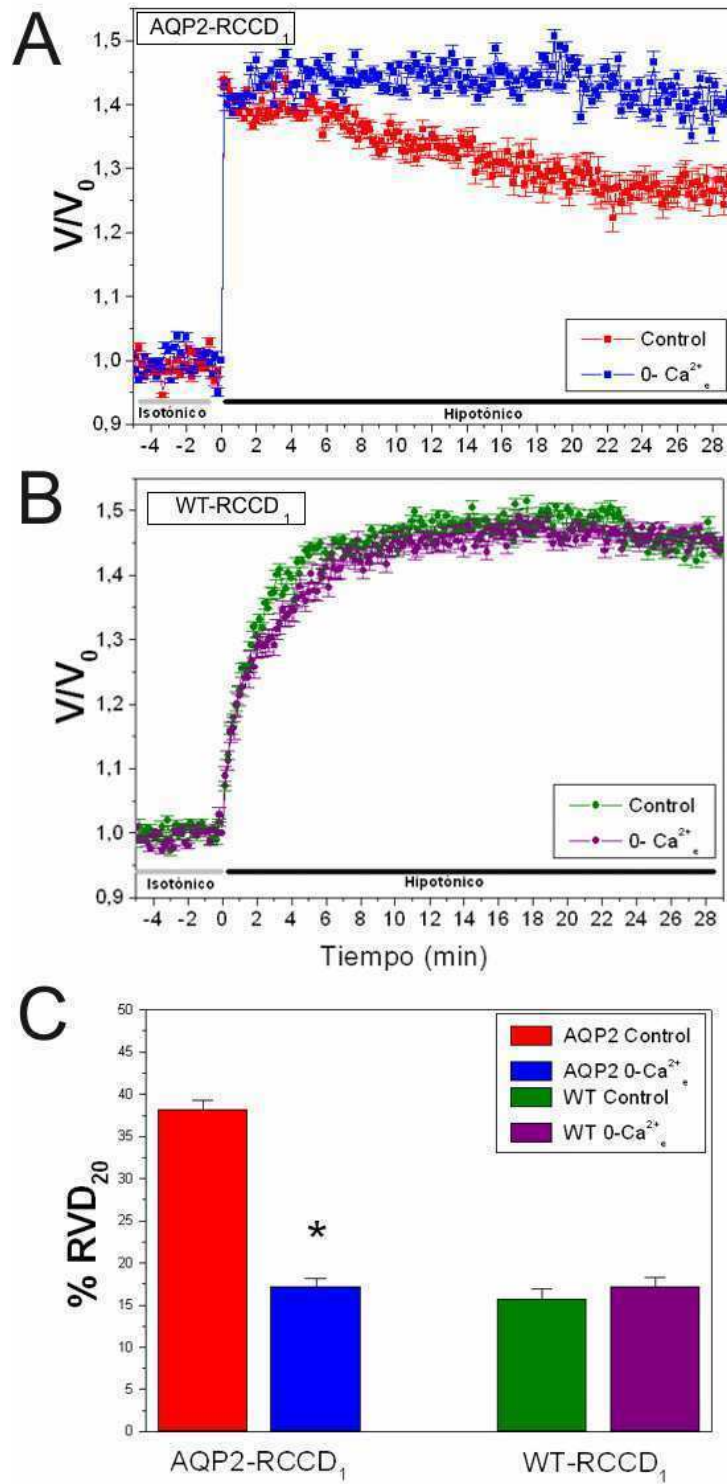


Figura 2.12: Efecto de la remoción de calcio sobre el RVD en las células AQP2 y WT -RCCD₁ ($\Delta\text{Osm} = 100 \text{ mOsm}$). Los cambios de volumen fueron medidos en células AQP2(A) y WT (B) cargadas con BCECF en condiciones control y en ausencia de calcio extracelular. C: Porcentaje de recuperación de volumen a los 20 minutos (% RVD₂₀). Los valores son medias \pm SEM de 80 a 100 células de 5-6 experimentos, * $p < 0.001$.

Dado que ha sido reportado que el Ca^{2+} puede modular la permeabilidad osmótica de algunas acuaporinas (Nemeth-Cahalan y col, 2000) evaluamos que el P_{osm} no se estuviera modificando con el Ca^{2+} y que esta fuese la causa de la inhibición del RVD. En la figura 2.13 mostramos que la permeabilidad osmótica de las células AQP2-RCCD₁ no se modifica por una disminución de la concentración extracelular de calcio.

Estos resultados sugieren fuertemente que en las células AQP2-RCCD₁ la rápida activación del RVD requiere una entrada de calcio desde el espacio extracelular.

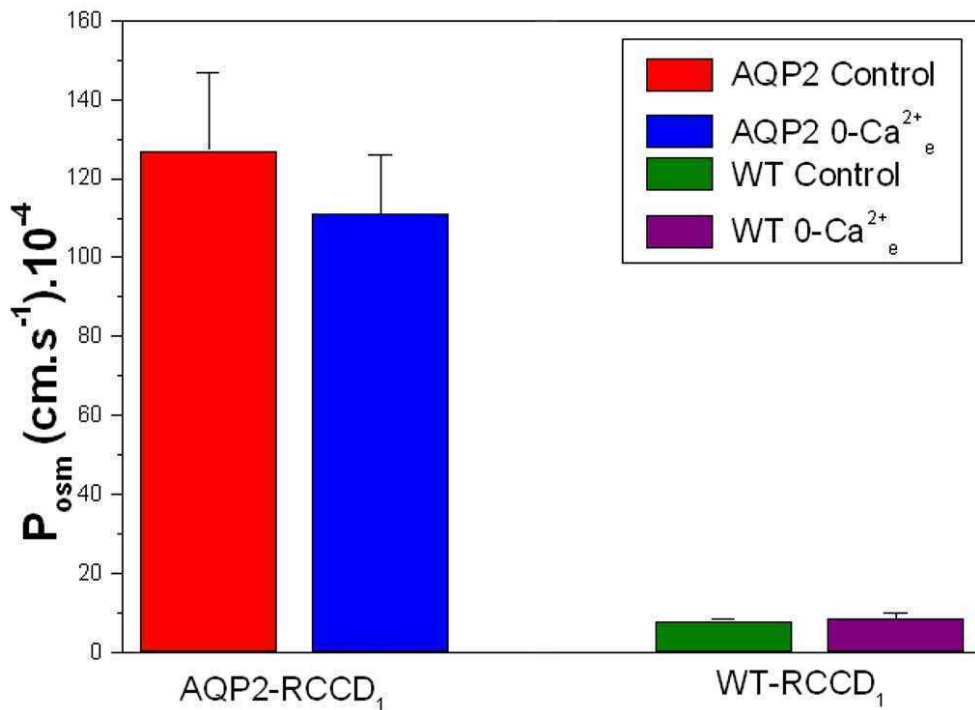


Figura 2.13: Efecto de la remoción de calcio sobre la permeabilidad osmótica al agua (P_{osm}) en las células AQP2 y WT-RCCD₁. El P_{osm} se estimó a partir de los cambios de volumen registrados en células AQP2 y WT sometidas a un medio hipotónico ($\Delta\text{Osm} = 100 \text{ mOsm}$) en condiciones control y en ausencia de calcio extracelular. Los valores representan medias \pm SEM de 80 a 100 células de 5-6 experimentos.

2.3.4. El Gadolinio inhibe el incremento de calcio y el RVD dependiente de AQP2

El siguiente paso fue investigar la posible vía de ingreso de Ca^{2+} desde el compartimento extracelular. Evaluamos la posible participación de canales inhibidos por GdCl_3 . El gadolinio ha sido reportado como un inhibidor del ingreso de calcio extracelular a través de canales mecanosensibles durante el hinchamiento osmótico (Urbach y col, 1999).

La figura 2.14 A muestra que la incubación de las células AQP2-RCCD_1 con $100 \mu\text{M Gd}^{3+}$ inhibe sustancialmente el pico del incremento transiente de calcio intracelular producido por el hinchamiento, y se reduce a un 34 % respecto del control (Figura 2.14 B).

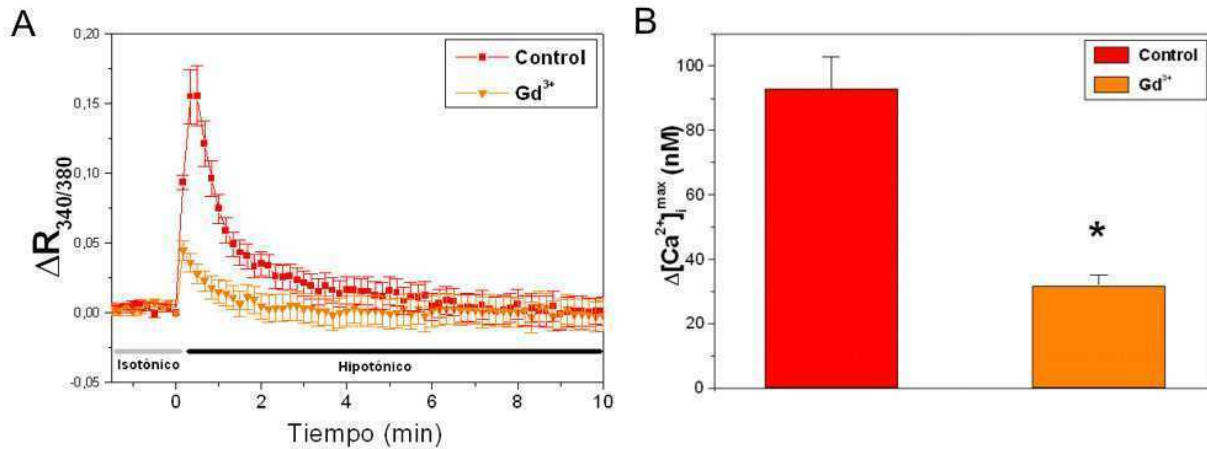


Figura 2.14: Efecto del Gadolinio en la entrada de calcio estimulada por hipotonía en células AQP2-RCCD_1 . Se utilizó una concentración $100 \mu\text{M Gd}^{3+}$ que fue agregada 10 minutos antes del shock hipotónico y mantenida durante todo el experimento. **A:** Curso temporal de relación 340/380 en células control y en células tratadas con GdCl_3 **B:** Concentración intracelular de calcio máxima luego de un shock hipotónico $[\text{Ca}^{2+}]_i^{\text{max}}$. Los valores representan la media \pm SEM de 70 a 90 células a partir de 5-6 experimentos, * $p < 0.001$.

Posteriormente evaluamos si la señalización por estímulos osmóticos sensible a gadolinio observada en AQP2-RCCD_1 es relevante en la activación de mecanismos rápidos de RVD. Para ello realizamos mediciones de cambios de volumen en presencia de un gradiente osmótico en células AQP2-RCCD_1 incubadas con gadolinio.

La presencia de gadolinio produce una cinética de volumen diferente al control con un retardo en alcanzar el máximo y una reducción de la

recuperación de volumen (Figura 2.15 A). De esta forma el % RVD₂₀ fue reducido significativamente (Figura. 2.15 B).

Para evaluar si el rápido estiramiento provocado por un gradiente osmótico en células RCCD₁ es capaz de activar mecanismos de RVD independientemente de la presencia de AQP2 realizamos experimentos de medición de volumen en células WT-RCCD₁ incubadas con anfotericina (100 µg/ml). La figura 2.16 muestra que el %RVD de las células WT-RCCD₁ tratadas con anfotericina ante un gradiente osmótico (Δ OsM = 100 mOsM) no difiere significativamente de las células tratadas con vehículo. Por lo tanto, el rápido swelling no puede activar la respuesta de RVD, reforzando la participación de la AQP2 en una vía específica sensible a estímulos osmóticos.

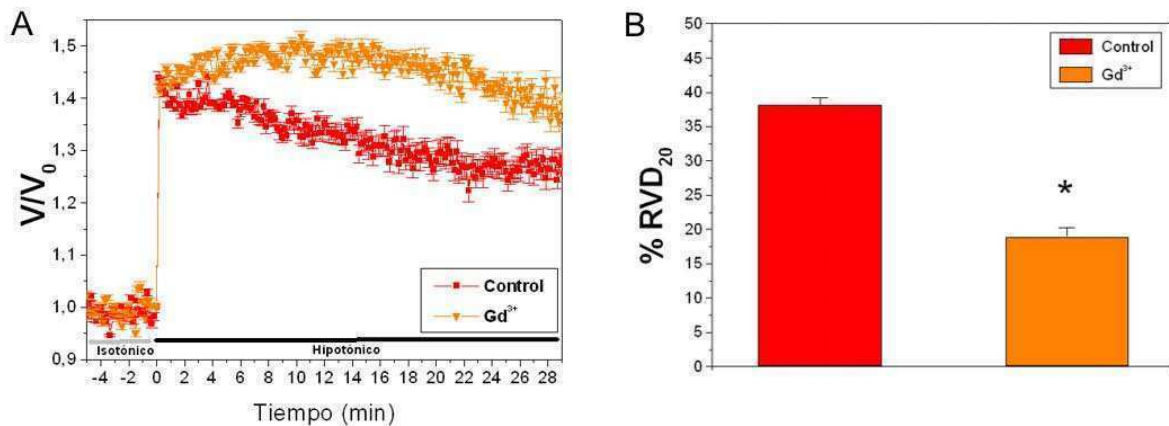


Figura 2.15: Efecto del Gadolinio en la regulación de volumen (RVD) en células AQP2-RCCD₁ A: Curso temporal del volumen celular en células control y tratadas con Gd³⁺ B: porcentaje de recuperación de volumen a los 20 minutos (%RVD₂₀). Los valores representan media \pm SEM de 70 a 90 células a partir de 5-6 experimentos, * p < 0.001.

Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que una vía específica activada por cambios de volumen y sensible a gadolinio media la entrada de calcio durante el swelling de las células AQP2-RCCD₁ y que esto cumple un rol clave en la respuesta rápida de regulación de volumen.

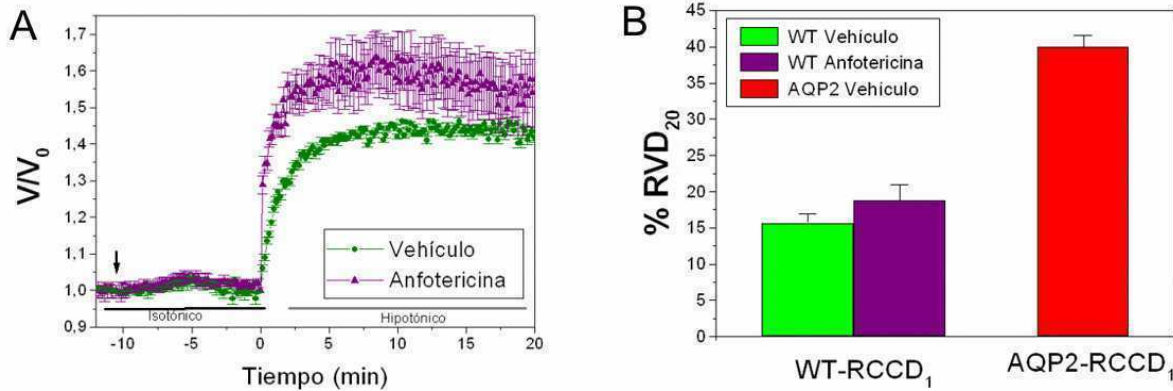


Figura 2.16: Efectos de la anfotericina en el RVD en células WT-RCCD₁. **A:** Curso temporal de cambio de volumen relativo en respuesta a un shock hipotónico ($\Delta\text{OsM} = 100 \text{ mOsM}$) en células WT-RCCD₁. La flecha indica el tiempo en el cual se agregó anfotericina B (100 $\mu\text{g/ml}$) o vehículo (DMSO) al medio. **B:** porcentaje de regulación de volumen a los 20 minutos (%RVD₂₀) en las condiciones descritas previamente. Para comparar estos valores con los de las células AQP2-RCCD₁, éstas fueron preincubadas con vehículo. Los valores representan la media \pm SEM de 60 a 100 células de 4-5 experimentos, * $p < 0.001$ comparado con células WT-RCCD₁ preincubadas con vehículo.

2.3.5. La liberación de calcio de los compartimientos intracelulares también está involucrada en la respuesta de calcio a hipotonía mediada por AQP2

Dado que la incubación de las células AQP2-RCCD₁ con solución 0-Ca²⁺_e no inhibe completamente la respuesta de calcio a hipotonía observada en las células AQP2-RCCD₁ (Figura 2.11 A) nos preguntamos si no estarían también implicados los depósitos intracelulares en la respuesta. Para estudiar si los reservorios de calcio están involucrados en la generación de la señal sensible a volumen investigamos el efecto de la hipotonía sobre los niveles de calcio intracelular y luego de un tratamiento con tapsigargina, un inhibidor de la bomba Ca²⁺/ATPasa (SERCA) que evita el llenado de los reservorios (Thastrup y col, 1990).

La figura 2.17 A muestra el curso temporal de la fluorescencia relativa en células AQP2-RCCD₁ incubadas con tapsigargina 1 μM o con vehículo (DMSO) durante 10 minutos previos a la adición de la solución hipotónica.

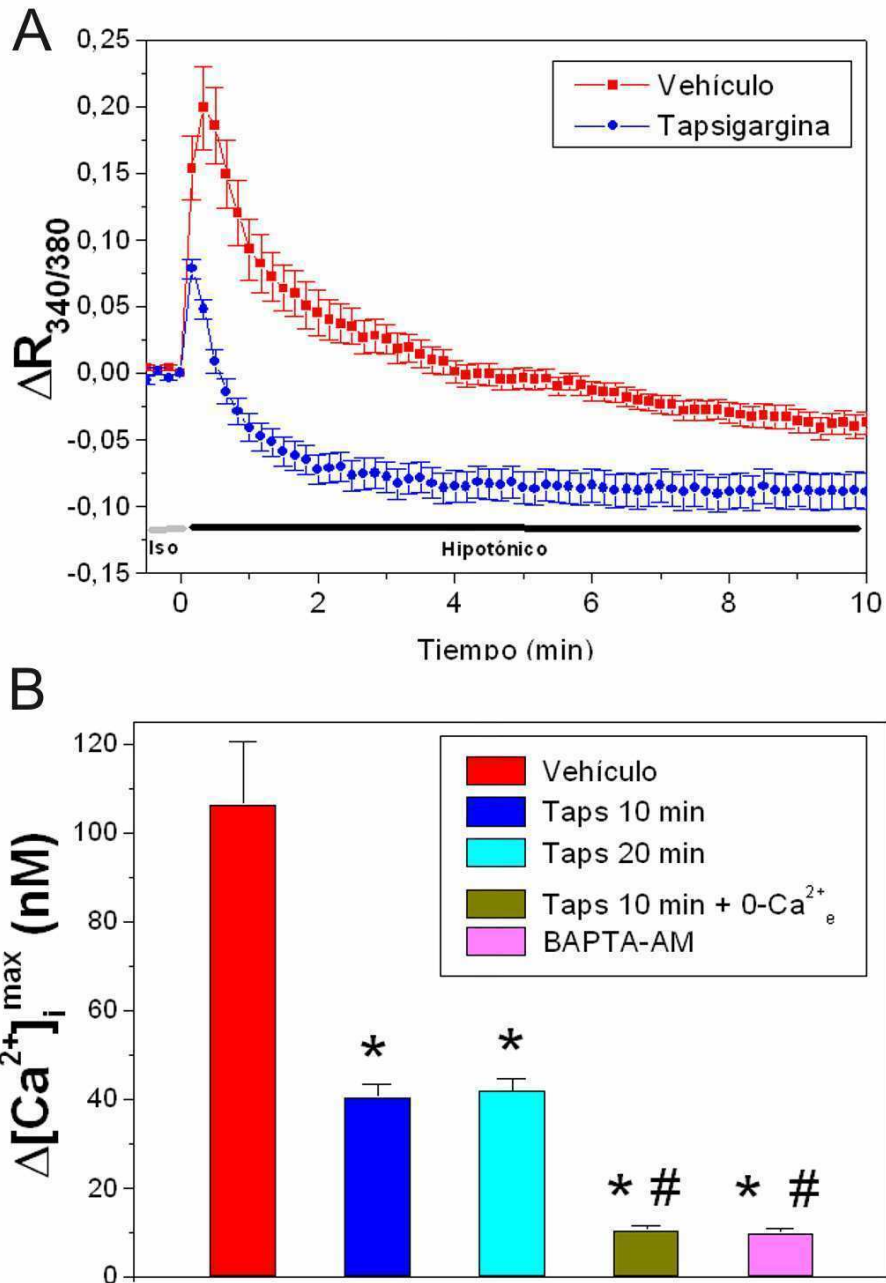


Figura 2.17: Efectos de la Tapsigargina (Taps) y BAPTA-AM en el incremento de $[Ca^{2+}]$ luego de un shock hipotónico en células AQP2-RCCD₁. **A:** Dinámica de la relación 340/380 luego del shock hipotónico ($\Delta OsM = 100$ mOsM) en células cargadas con Fura-2/AM tratadas con tapsigargina $1 \mu M$ o vehículo (DMSO). Las drogas se agregaron 10 minutos antes del shock hipotónico y fueron mantenidas durante todo el experimento. **B:** $\Delta [Ca^{2+}]_i^{max}$ (nM) luego del shock hipotónico en células tratadas previamente con Taps durante 10 o 20 minutos, con o sin calcio extracelular o incubadas 60 minutos con BAPTA/AM. Los valores representan promedios \pm SEM de 50 a 100 células de 4-5 experimentos. * $p < 0.01$ comparado con vehículo # $p < 0.01$ comparada con Taps 10 min.

Se puede observar que ocurre una inhibición parcial pero significativa del pico que sigue al shock hipotónico en células donde los reservorios fueron previamente depletados. No se observaron diferencias cuando se incubó durante 20 minutos. Al incubar con tapsigargina en ausencia de calcio extracelular, se observó una inhibición total. Resultados similares se observaron al tratarse las células con el quelante de iones divalentes BAPTA/AM (Figura 2.17 B).

Todos estos resultados sugieren que en células AQP2-RCCD₁ el incremento de [Ca²⁺]_i provocado por hipotonía, además de activar una vía de entrada desde el extracelular, produce una movilización de reservorios intracelulares sensibles a tapsigargina.

Con el fin de establecer si el pequeño incremento en la [Ca²⁺]_i observado en las células WT-RCCD₁ (Figura 2.9) ante un shock hipotónico involucra también una liberación desde los reservorios, examinamos cambios de [Ca²⁺]_i en células WT previamente tratadas con tapsigargina. No observamos cambios en $\Delta[Ca^{2+}]_i^{max}$ entre los controles y las células tratadas con tapsigargina (vehículo: 14 ± 4 nM; $n = 60$ vs. tapsigargina: 12.5 ± 2 nM; $n = 60$, no significativo).

2.3.6. La liberación de calcio de reservorios ante estímulos hipotónicos dependiente de AQP2 es requerida para la rápida activación del RVD.

Para estudiar si la liberación desde los reservorios intracelulares de calcio en respuesta a estímulos hipotónicos existente en las células AQP2-RCCD₁ es un evento fundamental en la osmoseñalización de mecanismos rápidos de RVD, evaluamos la regulación de volumen en ausencia de una fuente intracelular de calcio. Para esto indujimos con tapsigargina una depleción de los reservorios intracelulares previo al estímulo osmótico. Este tratamiento con tapsigargina produjo una reducción significativa del %RVD₂₀ (Figura 2.18). La

reducción de los mecanismos rápidos de RVD (a aproximadamente un 50% del control) también se observó cuando la regulación de volumen se evaluó simultáneamente en presencia de tapsigargina y ausencia de calcio extracelular o cuando se utilizó el quelante de calcio intracelular BAPTA/AM (Figura 2.18).

Estos resultados indican que además de la entrada de calcio desde el extracelular, la liberación de calcio de los reservorios intracelulares frente a estímulo hipotónico en células AQP2-RCCD₁ es fundamental para la activación de mecanismos rápidos de RVD.

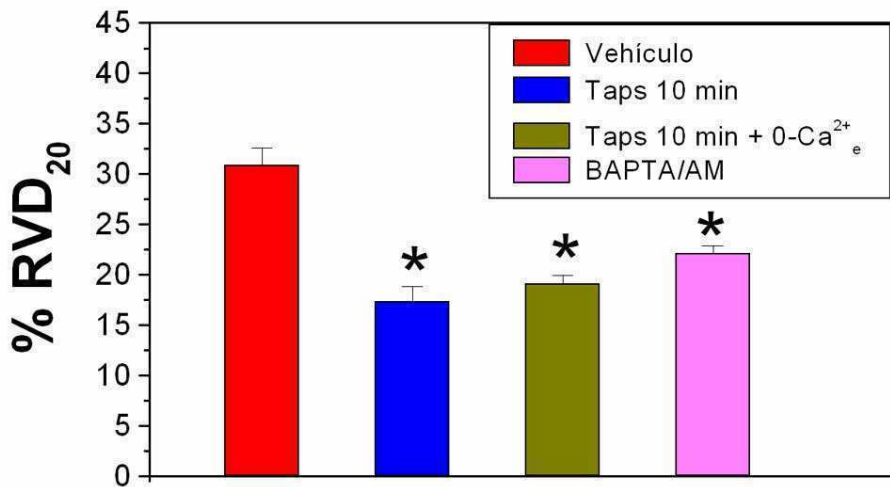


Figura 2.18: Efectos de la Tapsigargina (Taps) y BAPTA-AM en el %RVD₂₀ luego de un shock hipotónico en células AQP2-RCCD₁. Porcentaje de recuperación de volumen celular a los 20 minutos (%RVD₂₀). Todos los valores representan medias ± SEM de 60 a 100 células de 4 a 6 experimentos, * p < 0.001 comparado con vehículo.

2.3.7. El incremento de calcio en las células AQP2-RCCD₁ depende de la magnitud del estímulo osmótico: posible activación de la entrada capacitativa.

Para estudiar si el incremento en la magnitud del gradiente osmótico afecta las características de la respuesta, las células fueron expuestas a una

solución más diluida ($\Delta\text{OsM} = 200 \text{ mOsM}$, un gradiente similar al gradiente existente entre la luz del TC y el intersticio). Los efectos en las respuestas de calcio a gradientes osmóticos mayores en las células AQP2-RCCD₁ y WT se muestran en la figura 2.19. Se observa que las cinéticas de $\Delta\text{OsM} = 100$ y 200 mOsM son similares en las células WT-RCCD₁ pero resultan muy diferentes en las células AQP2-RCCD₁ (Figura. 2.19 A). En células AQP2 estas diferencias desaparecen cuando las células son incubadas con tapsigargina (Figura. 2.19 B).

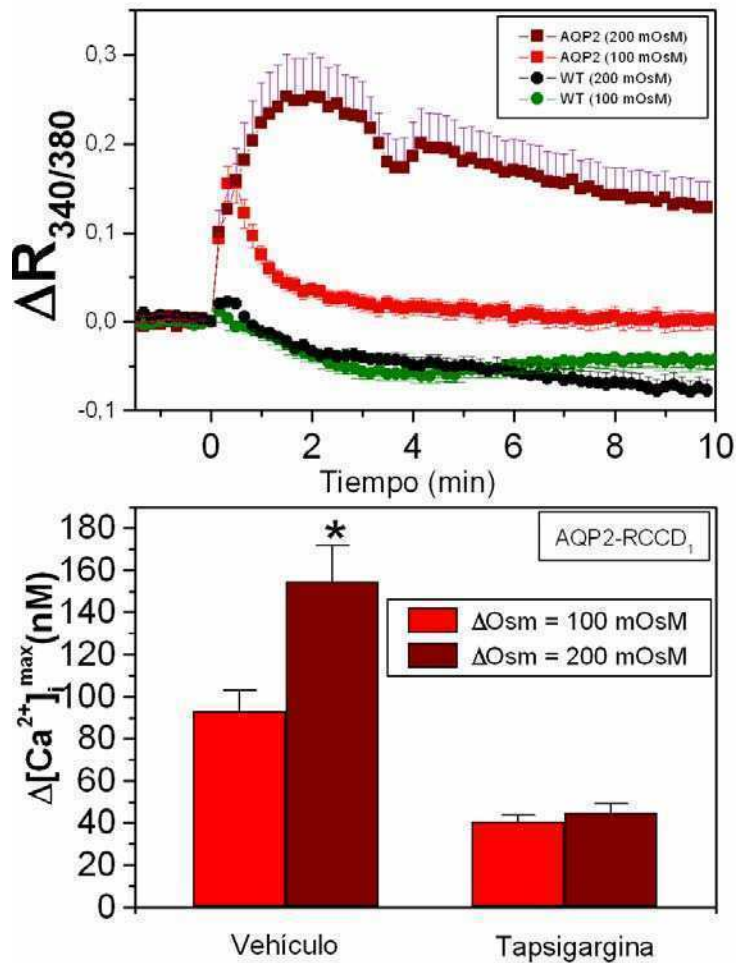


Figura 2.19: Efectos de la magnitud del gradiente osmótico en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en células WT y AQP2-RCCD₁. A: Curso temporal de la relación de fluorescencia 340/380 luego de un shock hipotónico ($\Delta\text{OsM} = 100 \text{ mOsM}$, $\Delta\text{OsM} = 200 \text{ mOsM}$) en células WT y AQP2-RCCD₁ cargadas con Fura-2/AM B: $[\text{Ca}^{2+}]_i^{\text{max}}$ (nM) luego del shock hipotónico en células AQP2-RCCD₁ en condiciones control o pretratadas con tapsigargina por 10 minutos. Los valores representan medias \pm SEM de 60-80 células a partir de 4-5 experimentos, * $p < 0.001$.

Dado que la cinética de $\Delta\text{OsM} = 200 \text{ mOsM}$ en AQP2 muestra un incremento sostenido similar al que generalmente se describe en la entrada capacitativa (Putney, 2001), testeamos si la depleción de los reservorios por tapsigargina promueve la activación de la vía CCE.

Un protocolo típico utilizado para distinguir la corriente de calcio capacitativa se muestra en la figura 2.20.

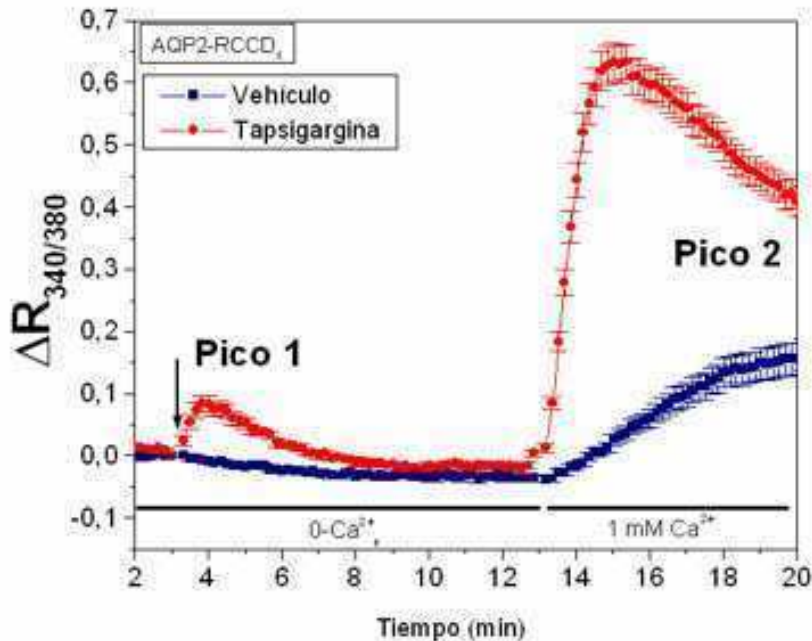


Figura 2.20: Protocolo utilizado para inducir entrada de calcio por vaciamiento de depósitos intracelulares (CCE) en células AQP2-RCCD₁. Curso temporal de relación de fluorescencia 340/380 en células tratadas con tapsigargina o con vehículo. La tapsigargina o vehículo fueron agregados en el tiempo indicado por la flecha. En ausencia de calcio extracelular la tapsigargina induce un incremento de calcio transiente en células AQP2-RCCD₁ (Pico1). El restablecimiento del calcio extracelular en el tratamiento con tapsigargina estimula un incremento de calcio mayor que en los experimentos control (Pico2) indicando la presencia de CCE. . Los valores representan la medias \pm SEM de 40 a 60 células de 4 a 5 experimentos, * $p < 0.001$

El vaciamiento de los reservorios se induce en primer lugar por la adición de tapsigargina ($1\mu\text{M}$) en medio 0-Ca^{2+}_e seguido por la reintroducción de $\text{Ca}^{2+} 1 \text{ mM}$. La preincubación de las células AQP2-RCCD₁ con tapsigargina en medio 0-Ca^{2+}_e induce un transiente de calcio intracelular (pico 1: que corresponde al vaciamiento de los depósitos). Un incremento mayor se da cuando se reestablece el calcio extracelular (pico 2: correspondiente a una

entrada de calcio del medio extracelular). Cuando el mismo protocolo es realizado con el vehículo (DMSO) no aparece ningún incremento durante la exposición a un medio 0-Ca^{2+}_e y un pequeño aumento puede observarse cuando se agrega calcio extracelular. Este incremento independiente de tapsigargina podría explicarse por una depleción parcial de los reservorios durante la exposición a la solución 0-Ca^{2+}_e o a un posible daño de las células. Por lo tanto el restablecimiento de calcio extracelular en el tratamiento con tapsigargina estimula un incremento de calcio mayor que en los experimentos control (Pico 2) indicando la presencia de CCE. Resultados similares fueron obtenidos en células WT-RCCD₁ cuando se aplica el mismo protocolo.

La figura 2.21 muestra la $[\text{Ca}^{2+}]_i^{\text{max}}$ cuando se reestablece la concentración extracelular de calcio (pico 2 de la figura 2.9) en ambas líneas celulares. La diferencia entre tapsigargina y vehículo representa la entrada capacitativa de calcio.

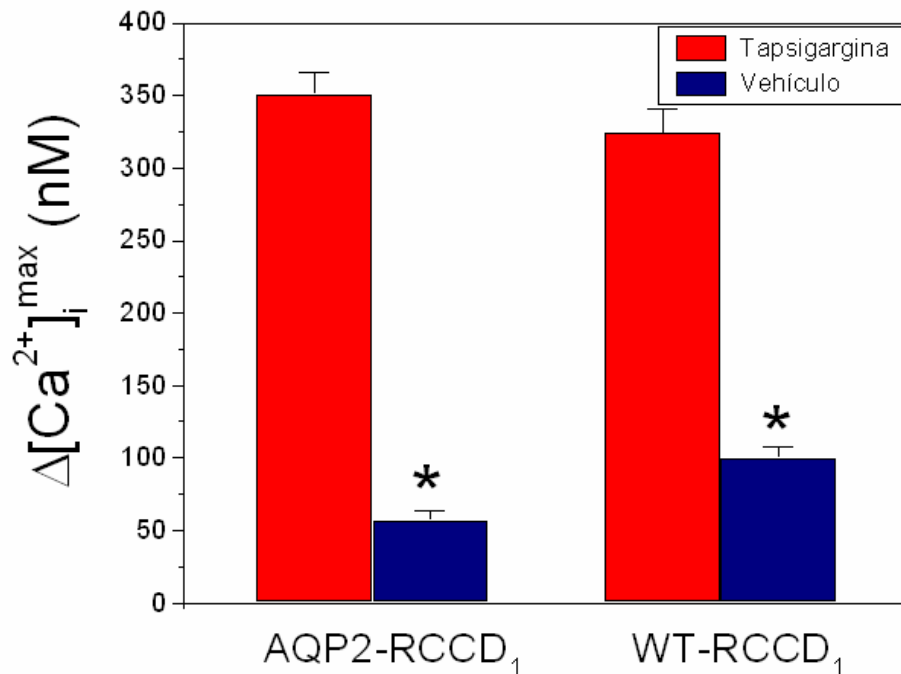


Figura 2.21: Presencia de entrada de calcio capacitativa en las células RCCD₁. $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i^{\text{max}}$ calculado cuando el calcio se reestablece (pico 2) en células AQP2 y WT-RCCD₁. Los valores son medias \pm SEM de 40 a 60 células de 4 a 5 experimentos, * $p < 0.001$.

Nuestros resultados indican que ambas líneas celulares tienen reservorios sensibles a tapsigargina y que en ambas se puede inducir una vía CCE. Sin embargo la activación de esta vía por estímulos osmóticos sólo se evidencia en las células que expresan AQP2.

2.4. Discusión

2.4.1. La presencia de la AQP2 funcional en las células del CCD es crucial para producir los incrementos de calcio necesarios para activar el RVD

Previamente se ha reportado en una gran diversidad de tipos de células que luego del swelling osmótico existen incrementos en la concentración de Ca^{2+}_i , mientras que en otras permanece constante (Lang y col, 1998; McCarty y O'Neil, 1992). En algunas células estos incrementos de calcio son necesarios para el RVD, sin embargo en otros tipos de células estos aumentos por swelling se observan pero no resultan necesarios para el control de volumen (Beck y col, 1991; Best y col, 1996; Hansen y col, 2007). Estas diferencias pueden deberse a la variación en los canales que participan del RVD en los distintos tipos de células. Previamente a este trabajo de tesis, nuestro grupo demostró que la expresión de la AQP2 en las células RCCD₁ es crucial para la rápida activación del RVD a través de la activación del CFTR y canales de K^+ (Ford y col, 2005). En este capítulo investigamos si el calcio intracelular es parte de la vía de señalización que vincula la AQP2 con la rápida activación de la regulación de volumen.

En las células AQP2-RCCD₁ el swelling osmótico produce un incremento transiente en el calcio intracelular que resulta insignificante en las células que no expresan AQP2. El incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ puede ser debido a la activación de canales permeables a calcio en la membrana de la célula y/o a la liberación de calcio desde los reservorios. Nuestro hallazgo de que la exposición a una

solución libre de calcio extracelular o a una solución 100 μM Gd^{3+} no bloquea completamente la respuesta, indica que el calcio extracelular no es la única fuente para el incremento de calcio luego del swelling. En este sentido mostramos que el tratamiento con tapsigargina, reduce el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ producida por un shock hipotónico y el tratamiento con tapsigargina en una solución libre de calcio inhibe casi completamente la respuesta. Todos estos resultados indican que, el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se debe tanto a una entrada de calcio desde el compartimiento extracelular como a una liberación de los depósitos.

Por otro lado, el descenso en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ intracelular provocado por el swelling osmótico puede deberse a una recaptación de calcio de los reservorios y/o a una extrusión hacia el extracelular. También podría estar involucrada alguna proteína de unión a calcio, como por ejemplo la calciclina. En riñón, la calciclina se localiza a lo largo del túbulo colector cortical y en las células RCCD_1 , se ha informado su presencia en el citoplasma (Courtois-Coutry y col, 2002). Nuestra observación de que en las células WT existe un descenso en el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por debajo de los niveles basales, sin observarse un incremento sustancial, sugiere que el hinchamiento osmótico probablemente induzca la estimulación de mecanismos de disminución del calcio citosólico libre, independientemente de la activación de los mecanismos de incremento de calcio. Adicionalmente nuestros experimentos muestran que esta disminución del calcio citosólico es dependiente de calcio extracelular (Figura 2.11 B)

El incremento en la concentración de calcio intracelular en las células AQP2-RCCD_1 provocado por un shock hiposmótico es consistente con lo que ha sido reportado para muchos tipos de células renales (Ankorina-Stark y col, 2007; Hirsch y col, 1993; McCarty y O'Neil, 1992; Tamma y col, 2007; Tinel y col, 2000; Tinel y col, 2002; Urbach y col, 1999). En el CCD de rata se ha descrito que una entrada de calcio es estimulada por swelling hiposmótico y es fuertemente dependiente de calcio extracelular, pero que no involucraría la liberación de calcio de los depósitos (Hirsch y col, 1993). Sin embargo un trabajo

posterior reportó que en CCD profundos, el incremento de calcio debido a estiramiento involucra una liberación desde los reservorios además de una entrada desde el extracelular (Woda y col, 2002). En células de túbulo colector CD8 y en células de túbulo colector medular, el shock hipotónico es acompañado por una liberación de calcio desde los reservorios, y por una entrada proveniente de fuentes extracelulares (Tamma y col, 2007; Tinel y col, 2002). Sin embargo, ninguno de estos trabajos evalúa si estas respuestas de calcio, se encuentran afectadas por la expresión de AQP2.

Nuestro hallazgo mas importante es que la expresión de AQP2 en la membrana celular es crítica para producir el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ necesario para activar los mecanismos rápidos de RVD. Nosotros previamente demostramos que en las células RCCD₁ un canal de K⁺ está implicado en la respuesta de volumen. En las células del CCD se expresan en la membrana apical los canales de potasio activados por calcio de baja conductancia (SK) y de alta conductancia BK (Liu y col, 2007). Por lo tanto proponemos que el incremento de calcio es necesario para gatillar la apertura de canales de potasio activados por calcio, requeridos para el rápido RVD.

Previamente al desarrollo de esta tesis en el laboratorio se reportó la disminución del P_{osm} de las células AQP2-RCCD₁ a un 80% con un compuesto mercurial (Ford y col, 2005). En este trabajo de tesis mostramos que esta inhibición produce un bloqueo en la respuesta de calcio ante estímulos osmóticos impidiendo la activación de los mecanismos de RVD. Adicionalmente mostramos que en las células WT, la anfotericina B aumenta la permeabilidad osmótica pero no es capaz de producir un aumento del calcio intracelular. Estos resultados refuerzan la idea de que se requiere una AQP2 funcional y que una alta permeabilidad osmótica sólo no es suficiente para activar los mecanismos de señalización de calcio intracelular.

Dado que se ha descrito que las variaciones en la concentración extracelular de calcio pueden modificar el P_{osm} de AQP0 (Németh-Cahalan y

col, 2004), resulta importante descartar la posibilidad de que las diferencias observadas en el incremento de calcio intracelular y el RVD en ausencia de calcio extracelular no se deba a una disminución en el P_{osm} mediada por AQP2. Una cantidad de estudios documentan el papel que desarrolla la señalización de calcio intracelular en el tráfico de AQP2 mediado por arginina vasopresina (Noda y col, 2006). Sin embargo hasta el momento, no existen estudios que evalúen el efecto directo del calcio extracelular en la permeabilidad de las células que ya posean AQP2, es decir de manera independiente del tráfico. Nosotros demostramos por primera vez que la permeabilidad osmótica a través de AQP2 no se afecta por la remoción de calcio extracelular.

2.4.2. El incremento de calcio inducido por *swelling* dependiente de AQP2 involucraría canales mecanosensibles

El efecto inhibitorio de Gd^{3+} en el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por *swelling* y en el RVD sugiere la participación de canales mecanosensibles en esta respuesta. Como el *swelling* osmótico es un tipo de estiramiento mecánico, sugerimos que la apertura de canales de calcio activados por estiramiento (directo o indirecto) contribuye a la entrada de Ca^{2+} inducida por hipotonía que es necesaria para la activación de los transportadores implicados en el RVD en células AQP2 pero no en WT.

Podemos plantear la hipótesis de que la presencia de AQP2 facilita la activación de un vía de entrada de calcio, aunque la identidad molecular de este canal permanece indefinida. Los miembros de la superfamilia TRP (*Transient receptor potential*), como el TRPV4, el TRPC6, el TRPP1 y el TRPP2 resultan candidatos atractivos (Pedersen, 2005) ya que todos estos canales se propusieron como implicados en el incremento de calcio inducido por flujo en el CCD (Liu y col, 2007; Wu y col 2007). En el capítulo próximo investigaremos si los TRPs son las proteínas implicadas en el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en las células AQP2- RCCD₁.

2.4.3. Posible participación de una vía CCE en el incremento de calcio inducido por swelling en AQP2-RCCD₁

Adicionalmente nuestros resultados nos indican que en las células AQP2 expuestas a gradientes osmóticos de $\Delta\text{OsM} = 200 \text{ mOsM}$ producen un incremento de calcio citosólico de magnitud incrementada y con una respuesta sostenida, que presenta una importante contribución de los reservorios intracelulares. Esta evidencia sugeriría un mecanismo de entrada de calcio CCE. Como hemos descrito, las células AQP2-RCCD₁ y WT son capaces de producir este tipo de entrada de calcio de tipo capacitativa cuando la depleción es inducida por tapsigargina. Sin embargo su activación en las células RCCD₁ por estímulos osmóticos sólo se manifestaría en la presencia de la AQP2 en la membrana y se haría más evidente a mayores gradientes osmóticos.

En conjunto los resultados nos permiten proponer de forma general que independientemente de la identidad molecular de los canales involucrados en estos mecanismos de entrada y de liberación de calcio, en respuesta a hipotonía, estas dos fuentes de calcio parecen actuar de forma sinérgica para producir el nivel de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ requerida para activar el canal de potasio necesaria para el RVD. Las células que no expresen AQP2, muestran un pequeño incremento no pudiendo en consecuencia activar mecanismos rápidos de RVD.

Capítulo 3: Participación del TRPV4 en el aumento de la concentración de calcio intracelular en respuesta a hipotonía en las células AQP2- RCCD₁

3.1. Introducción

En el capítulo anterior mostramos que un aumento en la concentración de calcio intracelular en respuesta a hipotonía sólo se manifiesta en la línea RCCD₁ cuando expresa AQP2 funcional en la membrana. Esta osmoseñalización de calcio resultó ser fundamental para la activación rápida de los mecanismos de RVD. Una de las hipótesis que explicaría estos resultados es que la hipotonía activa canales iónicos permeables a calcio modulados directa o indirectamente por la AQP2.

Las diversas entradas de Ca²⁺ en respuesta al hinchamiento osmótico en general se las asocia a canales mecanosensibles que presentan corrientes catiónicas de baja selectividad activadas por deformaciones mecánicas. La identidad molecular de estos canales que responden a estímulos osmóticos se ha descrito recientemente y serían algunos de los integrantes de la familia de canales TRP (Pedersen y Nilius, 2007).

3.1.1. La familia de los TRP

Los canales de la superfamilia de los TRP han sido propuestos como sensores celulares dado que son capaces de detectar fuerzas mecánicas, cambios en el volumen celular y/o modificaciones en la osmolaridad extra e intracelular. De acuerdo a la homología de la secuencia, los TRP de mamíferos se dividen en siete subfamilias: TRPC (canónico), TRPV (vanilloid), TRPM (melastatin), TRPP (polycystin), TRPML (mucolipin), TRPA (ankyrin) y TRPN (“NOMP-C”) (Evearerts y col 2009). La mayoría de los TRPs son canales polimodales activados por múltiples estímulos físicos y químicos a través de distintos mecanismos moleculares (Voets y col, 2002; Liedtke y Kim, 2005; Liedtke, 2006; Voets y col, 2005; Nilius y col, 2007; Pedersen y Nilius, 2007; Everaerts y col, 2009). Estos canales funcionan como integradores de múltiples señales externas e internas por lo cual sus respuestas deben ser transitorias, altamente

específicas, espacialmente confinadas, amplificadoras y en algunos casos su activación debe ocurrir extremadamente rápido.

Los canales TRP presentan una estructura de 6 dominios transmembrana. Se considera que al igual que el canal Shaker de K^+ estas subunidades se asocian como tetrámeros (Shigematsu y col, 2009) formando una unidad funcional con posible heterotetramerización, con un poro formado por los segmentos transmembrana TM5 y TM6. Las secuencias transmembrana son las más conservadas entre todos los integrantes de esta superfamilia. Las diferencias estructurales más distintivas entre los diversos TRPs se encuentran en los dominios citoplasmáticos amino y carboxi-terminal, que contienen los sitios putativos de interacción con proteínas. De hecho, recientes estudios estructurales muestran que las regiones citoplasmáticas regulatorias conformarían un dominio mucho más grande que la región transmembrana (Shigematsu y col, 2009). Esta variabilidad en las regiones regulatorias brindaría las diferencias funcionales que los TRPs muestran, ya que presentan una sorprendente diversidad en las características de permeabilidad desde ser canales catiónicos no selectivos hasta ser canales altamente selectivos para Ca^{2+} (Pedersen y Nilius, 2007). Existen evidencias emergentes, en distintos tipos celulares, de que varios miembros diferentes de la familia de los TRPs están involucrados en las respuestas de regulación de volumen dependientes de un influjo de Ca^{2+} (Pan y col, 2008; Arniges y col, 2004; Becker y col, 2009; Becker y col, 2005; Liu y col, 2006; Numata y col, 2007; Pedersen y Nilius, 2007).

3.1.2. Los TRP mecanosensibles en riñón

Hasta el momento, los canales TRP que se activan por estímulos mecánicos u osmóticos son el TRPC1, -C6, -M3, -M7, -A1, -V1, -V2, -V4, P1 y P2 (Maroto y col, 2005; Spassova y col, 2006; Grimm y col, 2003; Numata y col, 2007; Zhang y col, 2008; Birder y col, 2002; Muraki y col, 2003; Vriens y col, 2004; Montalbetti y col, 2005). De los canales osmosensibles en el CCD de mamífero únicamente se expresan el TRPC6 y el TRPV4 (Goel y col, 2007;

Cohen, 2005), ambos canales producen en hipotonía corrientes inhibidas por Gd^{3+} . Adicionalmente el canal TRPV1 se ha descrito en células de túbulo colector de rata (Feng y col, 2008). Si bien estos canales responden a estímulos osmóticos, sólo el TRPV4 ha sido ampliamente caracterizado como osmosensible en distintos tipos de células (Plant y Strotmann, 2007; Strotman y col, 2000; Becker y col, 2005; Pan y col, 2008; Vriens y col, 2004; Vriens y col, 2007; Watanabe y col, 2003; Arniges y col, 2004; Liu y col, 2006). En el CCD existe un trabajo que muestra que el TRPV4 se activa por hipotonía (Wu y col, 2007). En cambio para el TRPC6 existen sólo 2 reportes donde se evidencia ésta función los cuales hasta el momento, no incluyen al CCD (Spasova y col, 2006; Mederos y Schnitzler, 2008). En el caso del TRPV1 si bien se ha propuesto su rol como osmosensor, sólo existen evidencias indirectas de su activación (Birder y col, 2002) y no existe al momento ningún trabajo que muestre en sistemas de expresión heteróloga que el TRPV1 se activa ante estímulos osmóticos. Complementariamente, sólo para el TRPV4 se ha descrito ampliamente un rol en la regulación de volumen (Fernández-Fernández y col, 2008; Arniges y col, 2004; Becker y col, 2005, Liu y col, 2006; Pan y col, 2008; Becker y col, 2009) sin haberse documentado hasta el momento una participación concreta en el CCD.

3.1.3. El canal TRPV4

El canal TRPV4 fue clonado en paralelo por distintos grupos de investigación en el año 2000 recibiendo diferentes nombres: OTRPC4 (*osmosensitive transient receptor potential channel*) (Strotman y col, 2000), VR-OAC (*vanilloid receptor-related osmotically activated channel*) (Lietdke y col, 2000), TRP-12 (Wissenbach y col, 2000) y VRL-2 (*vanilloid receptor-like 2*) (Delany y col, 2001). Inicialmente fue descrito como el primer canal catiónico no selectivo sensible a cambios osmóticos identificado en mamíferos y propuesto como un canal mecanosensible y osmosensor (Strotman y col, 2000; Lietdke y col, 2000; Wissenbach y col, 2000). No obstante, pronto se observó que esta proteína podía activarse frente a un amplio rango de estímulos físicos y químicos, pasándose a

considerar un canal integrador de estímulos capaz de participar en una gran variedad de respuestas fisiológicas y celulares (O'neil y col, 2003; Nilius y col, 2007).

Hasta la fecha, se ha demostrado que este canal responde a cambios en la osmolaridad extracelular (Strotman y col 2000), al *shear stress* (Gao y col, 2003), a variaciones de temperatura (Güler y col, 2002; Chung y col, 2003; Watanabe y col, 2002) y a variaciones del pH (Suzuki y col, 2003a). Además se ha descrito que el TRPV4 puede ser estimulado por activadores naturales como citrato (Suzuki y col, 2003a), ácido araquidónico (AA) y derivados (Watanabe y col, 2003), endocannabinoides (anandamida) (Watanabe y col, 2003), y por ligandos sintéticos como el 4 α -PDD (4 α -forbol 12,13 didecanoato) (Watanabe y col, 2002).

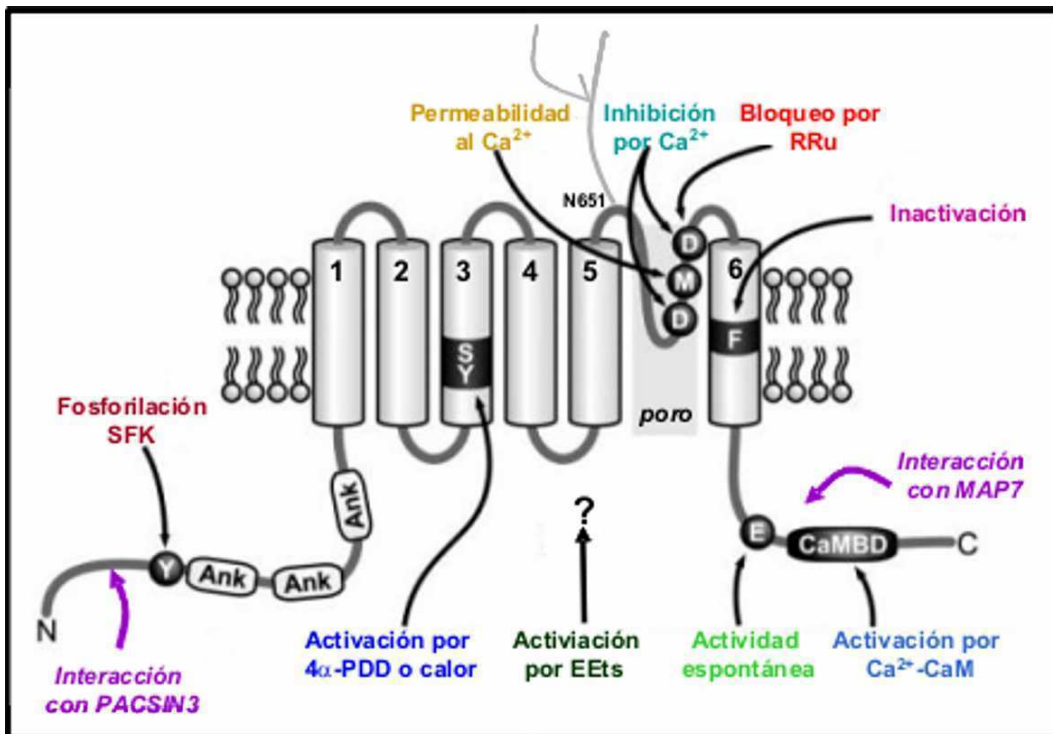


Figura 3.1: Características estructurales y funcionales del TRPV4. Se muestra la topología de las regiones transmembrana de un monómero de TRPV4 indicando las regiones características de la proteína y de los residuos aminoacídicos involucrados en la regulación del canal, o determinantes de las propiedades de activación. El poro se forma entre los segmentos TM5 y 6, conteniendo este loop los sitios de bloqueo por RRu y de inhibición por calcio extracelular D⁶⁸² y D⁶⁷², además contiene el sitio que le confiere la permeabilidad al calcio M⁶⁸⁰. Otra región relevante es la conformada entre los segmentos TM3 y 4, que media la activación por 4 α -PDD o por temperatura. El sitio de inactivación se encuentra en el segmento TM6 en la F⁷⁰⁷. Se muestran además los sitios de modificaciones postraduccionales de fosforilación en Y²⁵³, en el N-terminal y de glicosilación N⁶⁵¹ cerca del TM5, necesarios respectivamente, para la activación

por hipotonía y para la regulación de la expresión en superficie. Finalmente esquematizamos los sitios de interacción, en el N-terminal, con Pacsina 3, necesaria para la inserción en membrana y en el C-terminal con MAP7, fundamental para su asociación a citoesqueleto y con calmodulina, crucial en la activación por calcio desde el intracelular. La región N-terminal donde se encuentran los motivos ankrina es fundamental para el correcto tráfico.

Esta diversidad de estímulos que modifican la actividad del canal a través de mecanismos diversos, pone de manifiesto que el TRPV4 es actualmente un importante ejemplo del comportamiento de activación polimodal característico de esta familia de canales TRP (O'Neil y col, 2003). Esta capacidad de responder a estímulos tan variados en conjunto con su amplia distribución en tejidos de mamíferos (Tabla 3.1), le confiere una diversidad de funciones fisiológicas entre las que se encuentran la osmotransducción, la mecanotransducción, la percepción de la temperatura local y periférica, y el mantenimiento de la homeostasis de calcio.

Sistema	Función Propuesta y localización
Sistema Urinario	Sensado de flujo luminal y osmolaridad <i>en túbulos corticales y medulares</i> . Mecanosensado del llenado vesical y sensado del flujo de orina <i>en células uroteliales y vesicales</i> .
Sistema Respiratorio	Regulación la función de barrera <i>de células del epitelio pulmonar</i> . Regulación el transporte de fluidos y regulación del volumen de <i>células de los epitelios traqueal y bronquial</i> .
Sistema Digestivo	Secreción de bicarbonato en colangiocitos. Formación de bilis <i>en células ciliadas del ducto biliar</i> . Muerte celular por apoptosis <i>en células β del páncreas</i> . Regulación de volumen celular y formación de saliva <i>en células de las glándulas salivales</i> .
Sistema Reproductor	Movimiento de los cilios, sensado de cambios de viscosidad del fluido, transporte de ovocitos <i>en células ciliadas oviductales</i> .
Piel	Regulación del volumen celular <i>en queratinocitos</i> . Mecano y termosensación cutánea <i>por células de Merkel</i> .
Sistema Cardiovascular	Vasodilatación por shear stress <i>en endotelio vascular de aorta y carótida</i> . Neovascularización, proliferación y crecimiento celular <i>de arterias pequeñas y capilares</i> . Contractibilidad de <i>células de músculo liso pulmonar</i> .

Sistema Nervioso Central	Regulación de la homeostasis cerebral, osmosensado en <i>células de la astrogliá</i> . Osmoregulación y termorregulación sistémica a través de <i>neuronas de órganos centroventriculares y del órgano vascular lamina terminalis del hipotálamo</i> . Nocicepción en <i>neuronas sensitivas primarias</i> .
Oído	Osmosensado de endolinfa en células del saco endolinfático. Audición en células ciliadas cocleares del oído interno .
Ojo	Regulación de volumen celular y formación de lágrimas hipotónicas en <i>células epiteliales de la córnea</i> .
Sistema óseo	Crecimiento del cartílago. Remodelación del hueso y regulación de volumen en <i>condrocitos</i> .

Tabla 3.1: Localización y función del TRPV4 en mamíferos. La tabla muestra los tejidos y las funciones en las que se ha involucrado a este canal.

i. Activación del canal TRPV4 por hipotonía

El mecanismo por el cual el canal TRPV4 se activa ante estímulos osmóticos no está del todo claro. Los efectos de los estímulos osmóticos sobre TRPV4 provocarían una activación indirecta ya que la estimulación por *swelling* es más lenta que la de los canales activados por estiramiento directo. Se ha propuesto que la acción de tirosin kinasas de la familia Src participa en la activación de este canal por hipotonía en la que es fundamental la tirosina²⁵³ (Xu y col, 2003). Sin embargo, en paralelo, otros grupos mostraron que los estímulos osmóticos activan al canal por medio de metabolitos del ácido araquidónico (Watanabe, 2003; Vriens y col, 2004). El mecanismo de activación de este canal por esta vía no está del todo claro, pero dado que la inhibición de fosfolipasa A2 (PLA2) inhibe la activación de TRPV4 por *swelling* (Watanabe y col, 2003) se ha propuesto el siguiente modelo (Figura 3.2): el aumento de volumen celular activa la (PLA2) la cual produce a partir de fosfolípidos de membrana un aumento del ácido araquidónico (Hoffmann, 2000) que por la enzima citocromo P450 (CYP450) (Watanabe y col, 2003) será metabolizado a ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs).

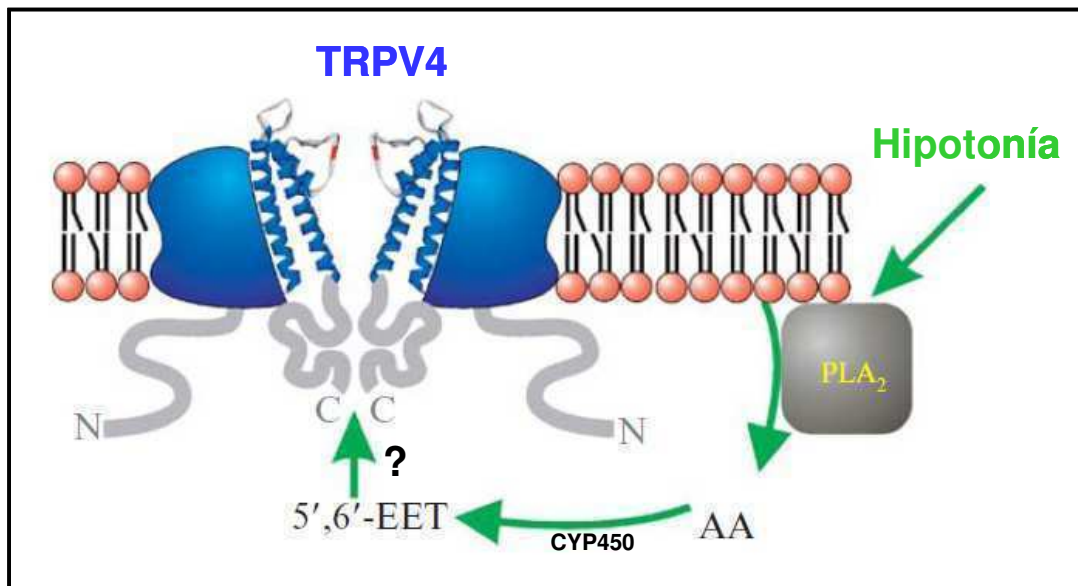


Figura 3.2: Mecanismo propuesto de activación del canal TRPV4 por estímulos hipotónicos. Según el modelo, la PLA₂ se activaría mediante un estímulo osmótico, favoreciendo la liberación de AA al citosol, el AA es metabolizado a 5',6'-EET por la CYP 450, provocando la apertura del TRPV4 y la entrada de calcio a las células por un mecanismo desconocido.

Sin embargo, si bien se asume que este mecanismo es el que utilizaría la mayoría de las células para activar al TRPV4 frente a estímulos osmóticos no está claro de qué manera los EET se unen al canal. Tampoco está claro de que manera el *swelling* activa la PLA₂, aunque se sugiere que puede estar mediado por quinasas activadas por *swelling* (Strotmann y col, 2000).

ii. Activación por agonistas sintéticos: 4 α -PDD

El activador sintético específico del canal TRPV4, 4 α forbol 12-13 didodecanoato (4 α -PDD) interactúa directamente con el TRPV4 a través de un bolsillo de unión formado por residuos entre los segmentos TM3 y TM4 (Vriens y col 2004) (Figura 3.3).

Curiosamente, la mutación del residuo fundamental para la activación por 4 α -PDD, la Tyr⁵⁵⁶ no impide la activación por *swelling*, por AA o por EETs, demostrando que los mecanismos que gatillan la apertura del canal ante estos dos estímulos, responden a vías distintas (Vriens y col, 2004).

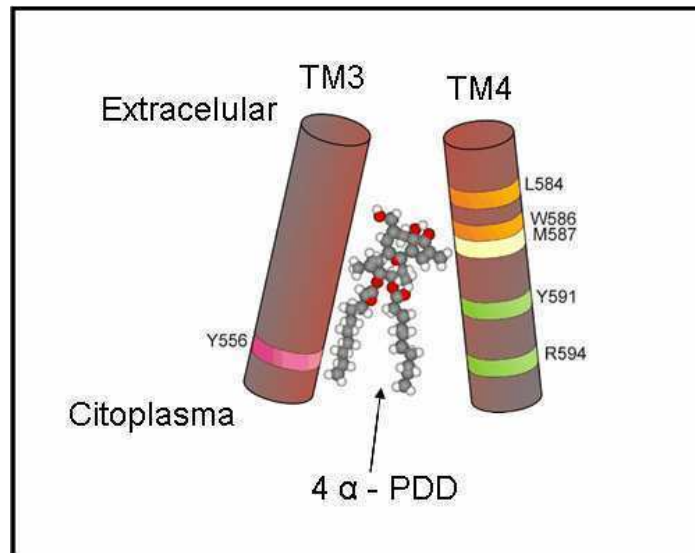


Figura 3.3: Sitio propuesto de unión de 4 α -PDD a TRPV4. El bolsillo de interacción está conformado por los segmentos TM3 y TM4 y el residuo Y⁵⁵⁶ sería crucial para el anclaje del forbol a la molécula, esta interacción provocaría un cambio conformacional favoreciendo la apertura del poro. Se muestran los 2 segmentos transmembrana y el esquema de la molécula de 4 α -PDD en su interior, junto con los principales residuos descriptos que participarían en esta activación y en la permeabilidad basal.

iii. Interacción proteína-proteína en la activación del TRPV4

Existen algunas evidencias que muestran que las interacciones proteína-proteína son fundamentales en el complejo mecanismo de activación del TRPV4. Se ha sugerido de acuerdo a un cúmulo de evidencias que el TRPV4 formaría parte de un complejo sensorial en conjunto con otros canales presentes en las células, en algunos de estos casos la interacción demostrada es sólo funcional, y en otros además física.

La deficiente activación del TRPV4 en células que expresan una mutante del CFTR, evidencia la vinculación funcional de ambos canales (Arniges y col, 2004). Adicionalmente se ha reportado la participación conjunta de TRPC1 y del TRPC6 con TRPV4 en la mecanotransducción en neuronas sensoriales primarias (Alessandri-Haber y col, 2009). La colocalización del TRPV4 con el TRPP2 en cilios primarios de células renales y su interacción física y funcional, ha sugerido la formación conjunta de un complejo mecanosensible (Giamarchi y col, 2006). También ha sido reportado que la asociación funcional entre TRPV4 y AQP5 en células de glándulas salivales (Liu y col, 2006) es fundamental para

la activación de TRPV4 por hipotonía. La interacción del TRPV4 con componentes del citoplasma como proteínas de unión a vesículas o asociadas a citoesqueleto sugieren un rol de la exocitosis en la respuesta a estímulos osmóticos (Cuajungco y col, 2006; D'hoedt y col, 2008).

Por lo tanto, si bien se ha mostrado que en el CCD el TRPV4 responde a hipotonía y se ha sugerido que esta activación depende de su interacción con otros canales, no se han reportado hasta el momento evidencias de que en el CCD, el TRPV4 sea necesario para el RVD ni que requiera de AQP2 para poder ser activado.

3.1.4. Objetivos

El hecho de que la presencia de la AQP2 en la membrana de las células RCCD₁ sea fundamental para que se produzca un incremento de calcio ante estímulos hipotónicos sugiere la idea de que la AQP2 forma parte de un mecanismo complejo de señalización de calcio. Las evidencias bibliográficas mostradas nos indican que los canales TRPs son candidatos a formar parte de este complejo. Dadas las ya mencionadas evidencias de la participación del TRPV4 en la regulación de volumen en distintos sistemas, este canal resulta un fuerte candidato a participar en la osmoseñalización mediada por AQP2.

Como objetivo del presente capítulo nos proponemos indagar la posible participación del canal TRPV4 en el incremento de calcio intracelular mediado por AQP2, intentando establecer si existe una interacción física o funcional entre ambos.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Cultivo celular

La técnica utilizada fue la descrita en el capítulo 2.

3.2.2. Medición de Volumen Celular y calcio intracelular

Las técnicas utilizadas fueron las descritas en el capítulo 2.

3.2.3. RT-PCR

El ARN total de riñón (control positivo) o de las células RCCD₁ fue aislado utilizando el kit comercial SV total ARN Isolation System (Promega). Se realizó luego una transcripción reversa utilizando como molde 2 µg de ARN total. Los ARNs fueron colocados en la mezcla de reacción I (50 µl de volumen final) conteniendo: 1x tampón de enzima MMLV; 0,5 µg primer oligo-dt; y 10 U. µl⁻¹ ARNsina. La reacción fue calentada durante 3 minutos a 80 °C y luego enfriada a 45° C. Luego se tomaron 25 µl de la mezcla de reacción I y se agregaron a la mezcla de reacción II (25 µl) que contenía: 1x tampón de enzima MMLV; 400 µM dNTPs y 200 unidades de enzima MMLV. Con los 25 µl restantes de la mezcla de reacción I se realizaron experimentos control en ausencia de enzima MMLV. La reacción de transcripción reversa fue llevada a cabo durante 1 hora a 45 °C y luego frenada calentando la reacción a 95° C durante 2 minutos.

<i>Primers</i>	
TRPV1	<i>Up: 5'- -3' GAAGATCGGGGTCTTGGCCTA</i> <i>Dw: 5'- -3' CTCACTGTAGCTGTCCACCCCAAA</i>
TRPV4	<i>Up: 5'- -3' CCAACCTGTTTGAGGGAGAG</i> <i>Dw: 5'- 3' TGGCTGCTTCTCTACGACCT</i>
β ACTINA	<i>Up: 5'- -3' CGG AAC CGC TCA TTG CC</i> <i>Dw: 5'- -3' ACC CAC ACT GTG CCC ATC TA</i>

Tabla 3.2. Primers utilizados para la RT-PCR de TRPV1, TRPV4 y β actina. Se muestran las secuencias 5' - 3' de los primers up y down utilizados para obtener productos de PCR de secuencias de TRPV1- V4 y de β- actina como control. Para el TRPV1 se esperan amplificaciones de 506 pb, para el TRPV4 de 287 pb y para la β- actina, de 289 pb.

Los experimentos de PCR fueron llevados a cabo sobre 5 μ l de mezcla de la transcripción reversa utilizando 5 pmol de los primers específicos para las TRP de rata identificadas en riñón (Tabla 3.2). La enzima utilizada fue la Taq polimerasa (Promega). Controles positivos internos fueron incluidos utilizando primers específicos de β -actina. Para realizar los PCR del TRPV1 inicialmente se calentó la reacción durante 10 min a 94°C, luego se realizaron 35 ciclos de 94 °C 60 s, 60 °C 1 min 30 s, 72 °C 60 s, y se finalizó a 72°C 10 min. Para realizar los PCR del TRPV4 inicialmente se calentó la reacción durante 5 min a 94°C, luego se realizaron 35 ciclos de 94 °C 30 s, 56 °C 45 s, 72 °C 1 min 30 s, y se finalizó a 72°C 10 min. Una alícuota (10 μ l) de cada reacción de PCR fue sometida luego a una electroforesis en gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio. Como marcador de peso molecular se utilizó el Ladder 100 PB (PB-L).

3.2.4. Western Blot

Las células confluentes WT-RCCD₁ y AQP2-RCCD₁ se lavaron 3 veces en PBS frío y se incubaron durante 30 minutos en una solución de lisis fría que contenía (en mM): 150 NaCl; 20 Tris; 5 EDTA; 1% Tritón X100; 1 fenilmetilsulfonil fluoruro; 10 μ g.ml⁻¹ antipaina; 10 μ g/ml leupeptina y 10 μ g.ml⁻¹ pepstatina.

Se determinó la concentración de proteínas de las muestras por el método de Bradford, utilizando albúmina bovina como estándar. Luego cantidades adecuadas de muestras se sembraron en minigeles de acrilamida 10 % p/v para someterlos a un SDS-PAGE. Para ello los mini-geles se prepararon y corrieron utilizando un equipo comercial (Mini-Protean II Cell, Bio-Rad). Posteriormente a la electroforesis los minigeles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. La transferencia se realizó en otra cuba del mismo fabricante (Mini-Trans Blot Cell, Bio Rad). Como marcador de peso molecular se utilizó el Rainbow-high molecular weight range (Amersham).

El siguiente paso fue bloquear las membranas de nitrocelulosa con una

solución de PBS-Tween BSA (en mM: 80 Na₂PO₄, 20 NaH₂PO₄, 100 NaCl y 0,1% Tween 20, pH=7,5) durante 1 hora. Luego se incubaron con un anticuerpo específico anti-TRPV4 de rata purificado (dilución 1: 1500) (Alomone). Después de varios lavados en PBS-Tween se incubaron con un anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo conjugado con la peroxidasa de rabanito, dilución 1:25.000, NEN). Se hicieron nuevamente varios lavados en PBS-Tween y luego en PBS. La proteína inmovilizada fue entonces detectada por quimioluminiscencia utilizando un kit comercial (Renaissance, NEN). Seguidamente a la reacción de quimioluminiscencia las membranas se expusieron a films radiográficos (Kodak XAR) para revelar las bandas positivas.

3.2.5. Inmunofluorescencia

Las células confluentes crecidas en cubreobjetos circulares en cajas de 24 pocillos se lavaron 3 veces con solución PBS. Luego se fijaron con paraformaldehído (PFA 3 %) durante 30 minutos. Se lavó con PBS y se neutralizó con NH₄Cl durante 30 minutos. Finalmente se lavó con PBS. La permeabilización se realizó con Triton X 100 0,2 % por 30 minutos y luego se enjuagó con PBS. El anticuerpo anti TRPV4 (anti rata hecho en conejo, Alomone) diluido 1:1500 en PBS-BSA 1 % fue incubado *overnight* a 4 ° C. Luego se lavó con PBS y se incubó con el anticuerpo secundario (IgG Cy3 anti conejo), durante 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad.

También se realizaron experimentos de doble inmunomarcación donde la incubación con los anticuerpos se efectuó de manera secuencial:

1º- El anticuerpo primario anti TRPV4 hecho en conejo, se incubó *overnight* a 4°C (dilución 1:1500) y se marcó con un secundario anti conejo IgG-Cy5 (hecho en burro), incubando 2 hs a T° ambiente (dilución 1: 800).

2º- el anticuerpo anti-AQP2 hecho en cabra, se incubó *overnight* a 4°C (dilución 1:50) y se marcó con un anticuerpo secundario anti cabra IgG FITC (hecho en bovino), incubando por 2 hs a T° amb (dilución 1: 100).

Finalmente se lavo con PBS y se confeccionó cada preparado con una

gota de líquido de montaje (Vectashield).

3.2.6. Microscopía confocal

Los preparados de inmunofluorescencia fueron visualizadas por microscopía laser confocal de barrido, utilizando un microscopio Olympus FV1000. En los experimentos de dobleinmunomarcación se utilizaron los lasers de excitación de 473 ± 50 nm con un filtro de emisión de 510 nm para detectar AQP2 marcada con FITC (en verde) y al mismo tiempo se utilizó un laser de excitación en 633 ± 50 nm utilizando un filtro de emisión de 700 nm para detectar el TRPV4 marcado con Cy5 (mostrado en azul).

Se utilizó un objetivo de 60 X de inmersión en aceite y se capturaron imágenes al azar de cada preparado haciendo barridos en fetas en el eje z. El espesor de cada feta barrida corresponde a 1 μ m, sumando una altura total de 10 μ m. Las imágenes fueron analizadas con el software del microscopio (Olympus Fluoview versión 1.7b) y se eligieron para mostrar fetas representativas de cada preparadado. Se muestran además los cortes correspondientes al plano *xz*, es decir la vista del perfil de las células. La colocalización entre ambos fluoróforos fue observada de manera comparativa, a partir de la superposición de los colores azul y verde en los planos escogidos.

3.2.7. Soluciones

Las soluciones utilizadas para los experimentos funcionales fueron descritas en el capítulo 2. Adicionalmente se utilizó en algunos experimentos rojo de rutenio 10 μ M (Sigma), 4 α -PDD 1 y 10 μ M (Sigma), capsaicina 100 μ M (Sigma), HgCl₂ 0.3 mM (Sigma), colchicina 2.5 μ M (Sigma), citocalasina-D 4 μ M (Sigma) y 5',6'-EET 1 μ M (Cayman). Los experimentos realizados con rojo de rutenio se efectuaron preincubando las células RCCD₁ con este inhibidor en

medio isotónico 5 minutos antes y durante el cambio a medio hipotónico. En los experimentos de activación del TRPV4 en condiciones isoosmóticas, el 4 α -PDD 1 o 10 μ M fue aplicado durante 30 minutos. En algunos de estos experimentos se utilizó RRu 10 μ M o 0-Ca²⁺ con EGTA. En los experimentos de activación del RVD con 4 α -PDD 1 μ M, el activador se aplicó durante el gradiente hipotónico. La colchicina fue incubada durante 30 minutos previos al gradiente y se mantuvo durante el mismo. La citocalasina-D se aplicó durante la incubación con el fluoróforo FURA 2/AM.

3.2.8. Estadística

Todos los valores reportados corresponden a media \pm el error standard de la media (SEM), y n es el número de células evaluadas utilizado entre tres a seis experimentos diferentes. Para todas las comparaciones se realizaron pruebas de *t de Student* para datos no pareados y p <0.05 fue considerado como estadísticamente significativo.

3.3. Resultados

3.3.1. La inhibición de los canales TRPV disminuye el incremento de calcio en respuesta a estímulos hipotónicos y el RVD de las células AQP2-RCCD₁

Para evaluar la hipótesis de que la respuesta de calcio a hipotonía observada en las células AQP2-RCCD₁ se debe a la activación de canales de la familia TRPV, utilizamos el inhibidor rojo de rutenio (RRu). Este inhibidor ha mostrado bloquear a los canales TRPV. Se preincubaron las células con 10 μ M RRu durante 5 minutos previos a la exposición al medio hipoosmótico y se mantuvo durante el estímulo. Se midieron los cambios en [Ca²⁺]_i en presencia

del inhibidor (Figura 3.4 A).

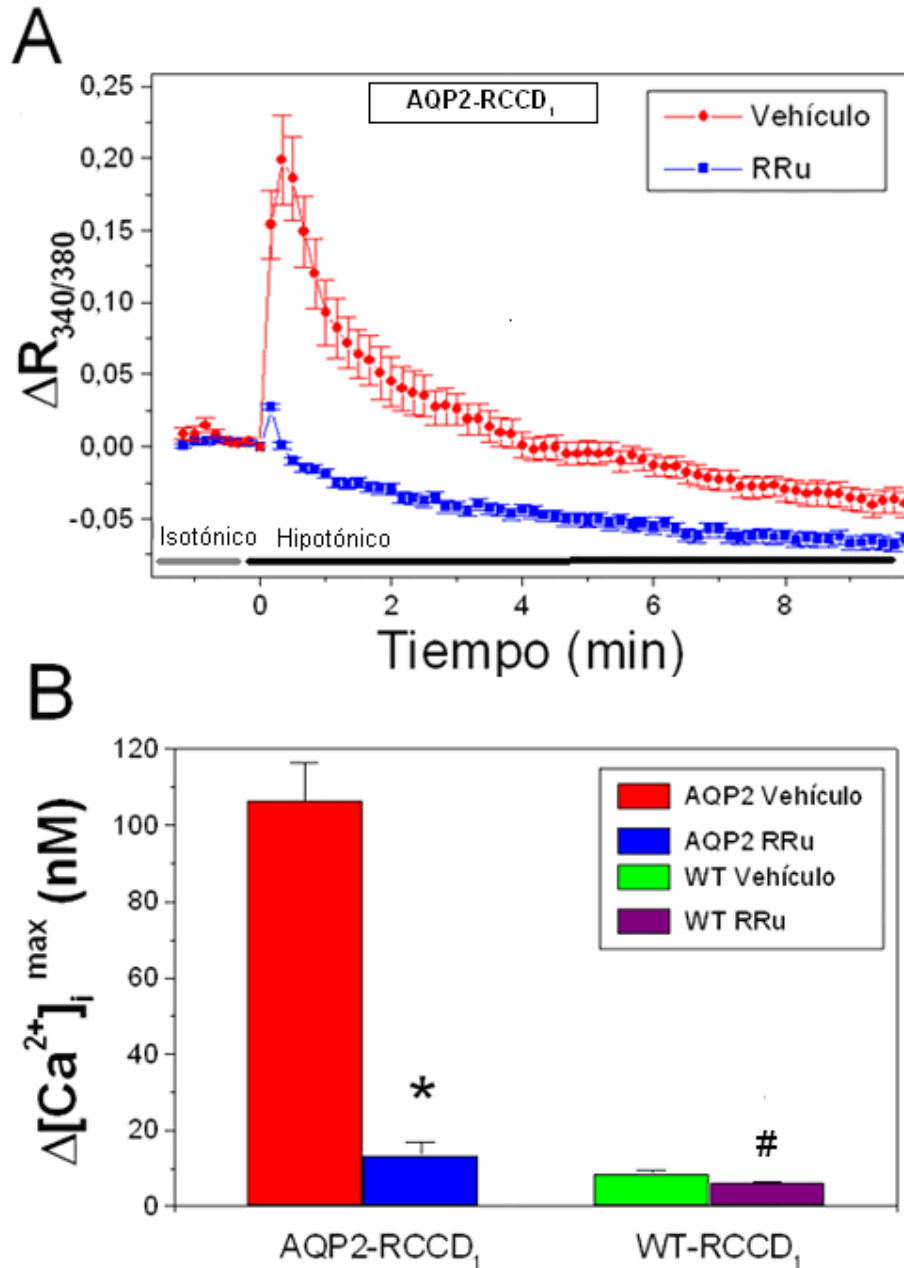


Figura 3.4: Efectos del Rojo de rutenio (RRu) sobre la entrada de calcio en respuesta a hipotonía en las células AQP2-RCCD₁ y WT-RCCD₁. Las células fueron tratadas con RRu 10 μ M o vehículo (DMSO) durante 5 minutos en isotonía y luego se mantuvo durante el gradiente osmótico. **A:** Curvas de $\Delta R_{340/380}$ en función del tiempo en las células AQP2-RCCD₁ en hipotonía en presencia y ausencia de RRu. **B:** $\Delta [Ca^{2+}]_i^{max}$ en células AQP2-RCCD₁ y WT-RCCD₁ en presencia y ausencia de rojo de rutenio. Los valores representan la media \pm SEM de 40 a 100 células de 3 a 5 experimentos, * $p < 0.001$, # $p < 0.01$.

Observamos que el RRu inhibió significativamente el aumento de calcio intracelular en respuesta a hipotonía en las células AQP2-RCCD₁ reduciéndose un 84% respecto del control. En cambio en las células WT-RCCD₁ el pequeño incremento de calcio provocado por la hipotonía se redujo solo un 26 % al bloquear con RRu (Figura 3.4 B).

Posteriormente analizamos si la activación rápida de los mecanismos de regulación de volumen mediada por AQP2 en las células RCCD₁ se ve influida por el RRu. En la figura 3.5 se observa que la respuesta regulatoria de volumen de las células AQP2-RCCD₁ se ve significativamente disminuida al utilizar este inhibidor de los TRPVs. Por el contrario en las células WT no se observaron diferencias significativas entre el control y las células tratadas con rojo de rutenio (Figura 3.5 B). El porcentaje de recuperación de volumen que alcanzan las células AQP2-RCCD₁ tratadas con RRu, resulta similar al de las WT-RCCD₁.

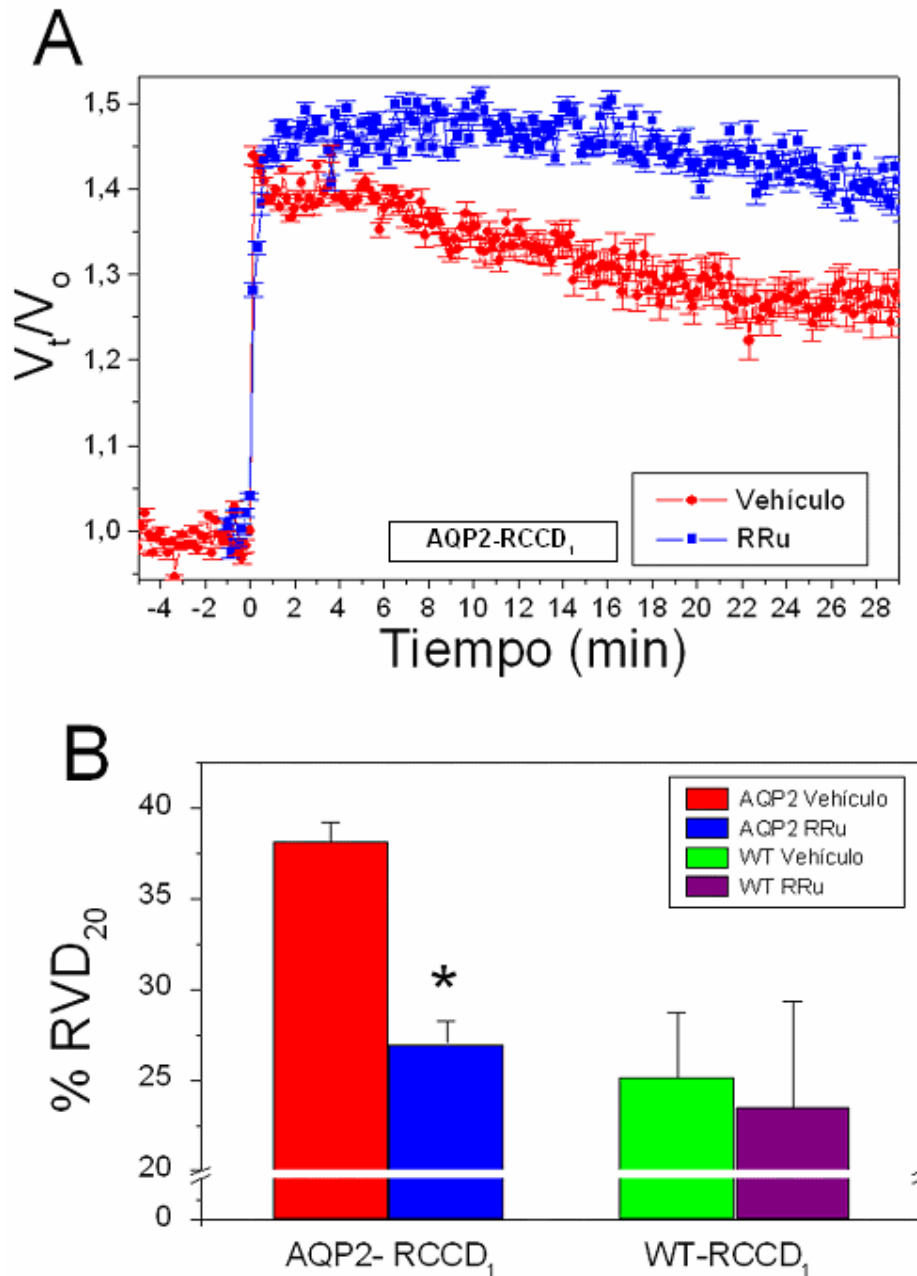


Figura 3.5: Efectos del rojo de rutenio (RRu) sobre la regulación del volumen en las células AQP2-RCCD₁ y WT-RCCD₁. Las células fueron tratadas con RRu 10 μ M o vehículo (DMSO) por cinco minutos en isotonía y mantenido durante la hipotonía. **A:** Curvas promedio de volumen relativo (V_t/V_o) en función del tiempo de AQP2-RCCD₁ en presencia y ausencia de rojo de rutenio. **B:** Porcentaje de regulación de volumen a los 20 minutos (%RVD₂₀) de las células AQP2-RCCD₁ y WT-RCCD₁. Los valores representan la media \pm SEM de 30 a 100 células de 3 a 5 experimentos, * $p < 0.05$

A partir de estos resultados concluimos que existen canales de la familia TRPV que estarían participando en la respuesta de calcio activada por swelling y en la rápida

activación de mecanismos de RVD dependientes de AQP2.

De los seis canales TRPV de mamíferos, el TRPV1, el V2 y el V4 ha sido demostrado que tienen una función en la transducción de estímulos osmóticos y mecánicos (Lietdke y col, 2006). De estos, sólo el TRPV1 y el TRPV4 fueron descritos en células renales. Por lo tanto el siguiente paso fue investigar la expresión de estos canales en las células RCCD₁.

3.3.2. El canal osmosensible TRPV4 se expresa en las células RCCD₁

Con el fin de estudiar la expresión del ARNm de TRPV1 y TRPV4 en las células WT-RCCD₁ y AQP2-RCCD₁ realizamos experimentos de RT-PCR. Como control positivo de los primers se utilizó ARNm de riñón de rata y también se utilizó como control de la extracción del ARNm primers de actina (Figura 3.6). En la figura 3.6 A se muestra que mientras el riñón expresa el ARNm de TRPV1, las células AQP2-RCCD₁ y WT no muestran la presencia de mensajero. En los experimentos de RT-PCR realizados utilizando primers para TRPV4 se obtuvo una banda del tamaño esperado (287 bp) en la muestra de riñón y en ambos tipos celulares (Figura 3.6. B).

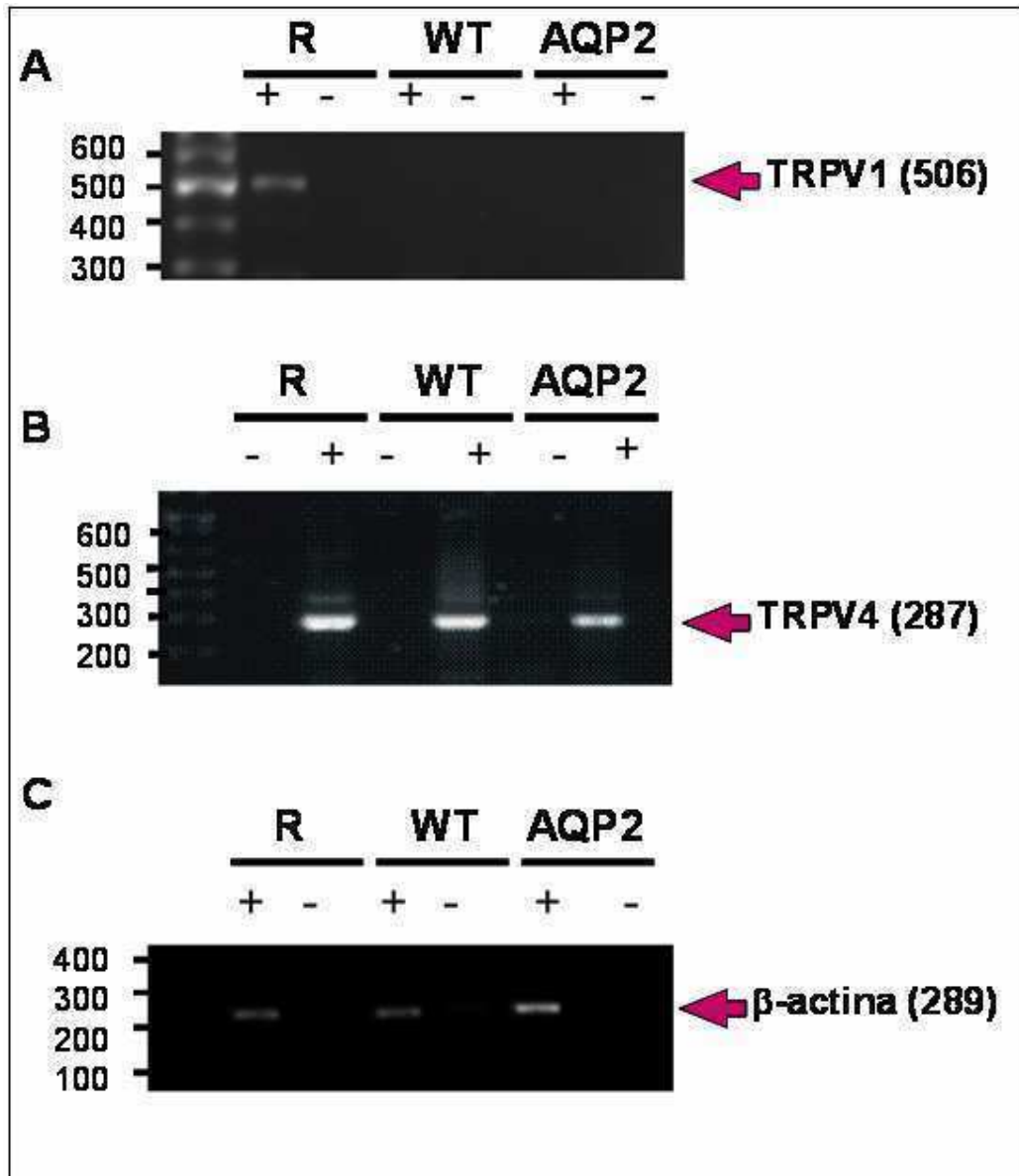


Figura 3.6: Caracterización de la presencia de mRNAs de TRPVs osmosensibles renales en las células WT-RCCD₁ y AQP2-RCCD₁. Experimentos representativos de RT-PCR realizados utilizando primers de (A) TRPV1, (B) TRPV4 y (C) actina en riñón (R), células WT-RCCD₁ (WT) y células AQP2-RCCD₁ (AQP2). Los experimentos de PCR se realizaron sobre muestras de RT que habían sido obtenidas en presencia (+) o ausencia (-) de la enzima MMLV.

Luego evaluamos la expresión proteica del canal TRPV4 en las células RCCD₁ mediante la técnica de Western Blot (Figura 3.7). El inmunoblotting de TRPV4 nos muestra bandas del peso molecular esperado en riñón y en ambas líneas celulares. La presencia de tres bandas evidencia distintos estados de glicosilación como se ha detectado en otros tipos celulares y en riñón (Wu y col, 2007).

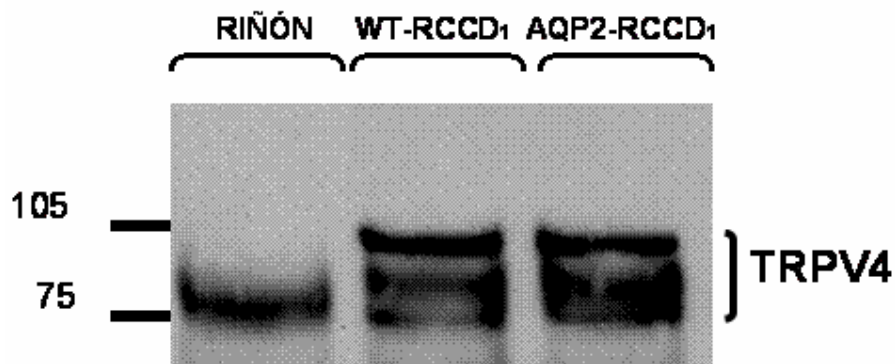


Figura 3.7: Estudio de la expresión del canal TRPV4 en las células WT-RCCD₁ y AQP2-RCCD₁. Experimento representativo de Western blot realizado a partir de homogenato total de riñón de rata, y de células RCCD₁ en medio isotónico. La marcación se realizó con el anticuerpo anti TRPV4 de rata, hecho en cabra (Alomone) en una concentración 1:1500, over night a 4° C. Las bandas más livianas corresponderían a la forma nativa de la proteína. Las bandas restantes aprox. 95 y 105 Kd, corresponderían a dos estados de glicosilación. Se muestra una corrida representativa de los tripletes encontrados en las células RCCD₁, y un ejemplo de una muestra de homogenato de riñón de rata, otras muestras de riñón realizadas, sí evidenciaron el triplete.

Con los resultados expuestos podemos concluir que el canal TRPV4 está presente en las células WT-RCCD₁ y AQP2-RCCD₁. Esta evidencia sumada a los resultados ya mostrados en los experimentos de inhibición de TRPVs por rojo de rutenio, permiten proponer que el TRPV4 sería el canal que está participando en la entrada de calcio por hipotonía en las células AQP2-RCCD₁. Ya que las células WT-RCCD₁ también expresan la proteína, pero ésta no parece activarse en respuesta a hipotonía, estudiamos si esta diferencia se debe a defectos en la funcionalidad del TRPV4. Para ello evaluamos la función utilizando otra estrategia de activación del canal, que es independiente de gradiente osmótico.

3.3.3. El canal osmosensible TRPV4 es activable por 4 α -PDD en las células WT y AQP2-RCCD₁

Para evaluar la funcionalidad del TRPV4 presente en las células, utilizamos el activador específico del canal 4 α -PDD, y estimamos la modificación de la concentración intracelular de calcio utilizando la relación R_{340/380} durante los 30 minutos en que las células fueron incubadas con el

activador. La figura 3.8 nos muestra los efectos del 4 α -PDD sobre la $\Delta R_{340/380}$. Utilizando una concentración de 1 μ M el aumento observado presenta una magnitud similar en ambos tipos celulares. Al elevar la concentración a 10 μ M observamos un incremento en el $\Delta R_{340/380}$ de más del 100 % en ambas líneas celulares. Por lo tanto, TRPV4 sería igualmente funcional ante la activación por 4 α -PDD en ambos tipos celulares, mostrando similitud incluso en el efecto dosis-dependiente.

Observamos que la activación del TRPV4 por 4 α -PDD se bloquea al remover calcio extracelular o al inhibir con rojo de rutenio de manera similar en ambos tipos celulares. Adicionalmente, observamos que existe una disminución significativa en el incremento de calcio producido por 4 α -PDD cuando tratamos las células con taspigargina 1 μ M, indicando que existiría un componente intracelular activado en la respuesta.

En paralelo se realizaron estudios funcionales utilizando capsaicina, un activador específico del TRPV1, evidenciando valores muy por debajo de los observados por la activación con 4 α -PDD y por hipotonía, demostrando que no existen incrementos significativos entre las dos líneas celulares ($\Delta[Ca^{2+}]_{AQP2-RCCD1}$: 12.72 ± 2.4 nM, $\Delta[Ca^{2+}]_{WT-RCCD1}$: 12.85 ± 1.2 nM, NS). La falta de respuesta al activador concuerda con los resultados moleculares que muestran ausencia de expresión de TRPV1 en las células RCCD₁.

Estos resultados nos permiten concluir que, en ausencia de gradiente osmótico, el TRPV4 es funcional en ambas líneas celulares y su activación por 4 α -PDD gatilla tanto una entrada de Ca²⁺ del medio extracelular así como un aumento dependiente de los depósitos intracelulares.

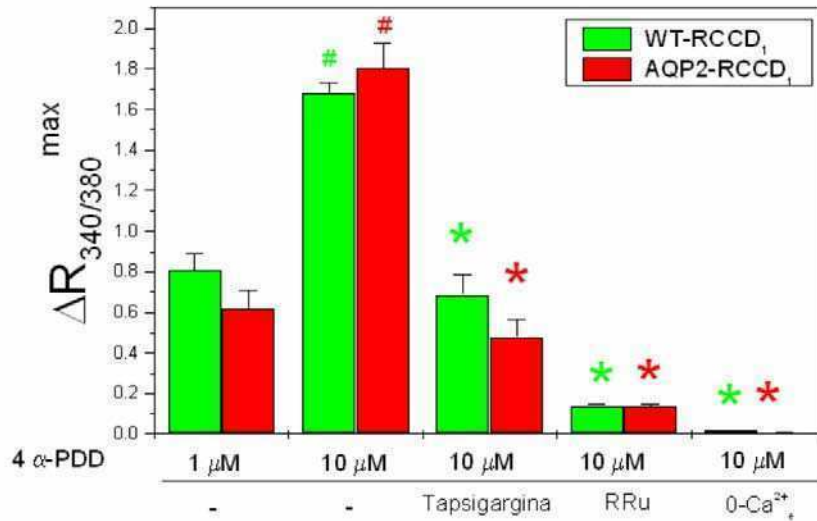


Figura 3.8: Efecto del 4 α -PDD en la [Ca²⁺]_i de las células AQP2-RCCD₁ y WT-RCCD₁. Se muestra el delta máximo de la relación de fluorescencias 340/380 ($\Delta R_{340/380}^{\max}$) de células AQP2-RCCD₁ y WT-RCCD₁ tratadas en condiciones de isotonía con 4 α -PDD 1 μ M y 10 μ M durante 30 minutos, en presencia de tapsigargina 1 μ M, RRu 10 μ M o en ausencia de calcio extracelular. Los valores representan la media \pm SEM, de 40 a 80 células de 3 a 4 experimentos. # $p < 0.001$ comparando las distintas dosis dentro de la misma línea celular. * $p < 0.001$, comparando los tratamientos dentro de la misma línea celular en la condición de 4 α -PDD 10 μ M.

Para estudiar si la activación con 4 α -PDD podía provocar una respuesta de regulación de volumen en las células que no expresan AQP2, realizamos experimentos de medición de cambio de volumen en respuesta a hipotonía en células WT-RCCD₁ tratadas con 4 α -PDD. El tratamiento de las células WT-RCCD₁ con dicho activador del canal TRPV4 mostró un %RVD₂₀ significativamente mayor que las células tratadas con vehículo (Figura 3.9), siendo semejante al que se produce cuando se activa la entrada de calcio por hipotonía Δ OsM = 100 mOsM en las células AQP2 en ausencia del activador (vehículo). Este resultado nos sugiere que, en las células WT-RCCD₁, la activación del canal TRPV4 por un mecanismo aunque distinto al hipotónico, permite la activación del RVD. En las células AQP2-RCCD₁, el 4 α -PDD también incrementa significativamente el %RVD₂₀ (Figura 3.9 A). Al estudiar los aumentos de calcio que ocurren en esta situación, observamos que el incremento de calcio producido en los primeros diez minutos del tratamiento con hipotonía en las células WT-RCCD₁ que fueron tratadas con 4 α -PDD resulta

significativamente mayor que el observado en el control (Figura 3.9 B), y de hecho el incremento máximo resulta similar al que se observa en las células AQP2 con hipotonía sin estimular con 4 α -PDD. Adicionalmente el tratamiento de las células AQP2-RCCD₁ con 4 α -PDD provocó un aumento mayor de la [Ca²⁺]_i en respuesta a hipotonía.

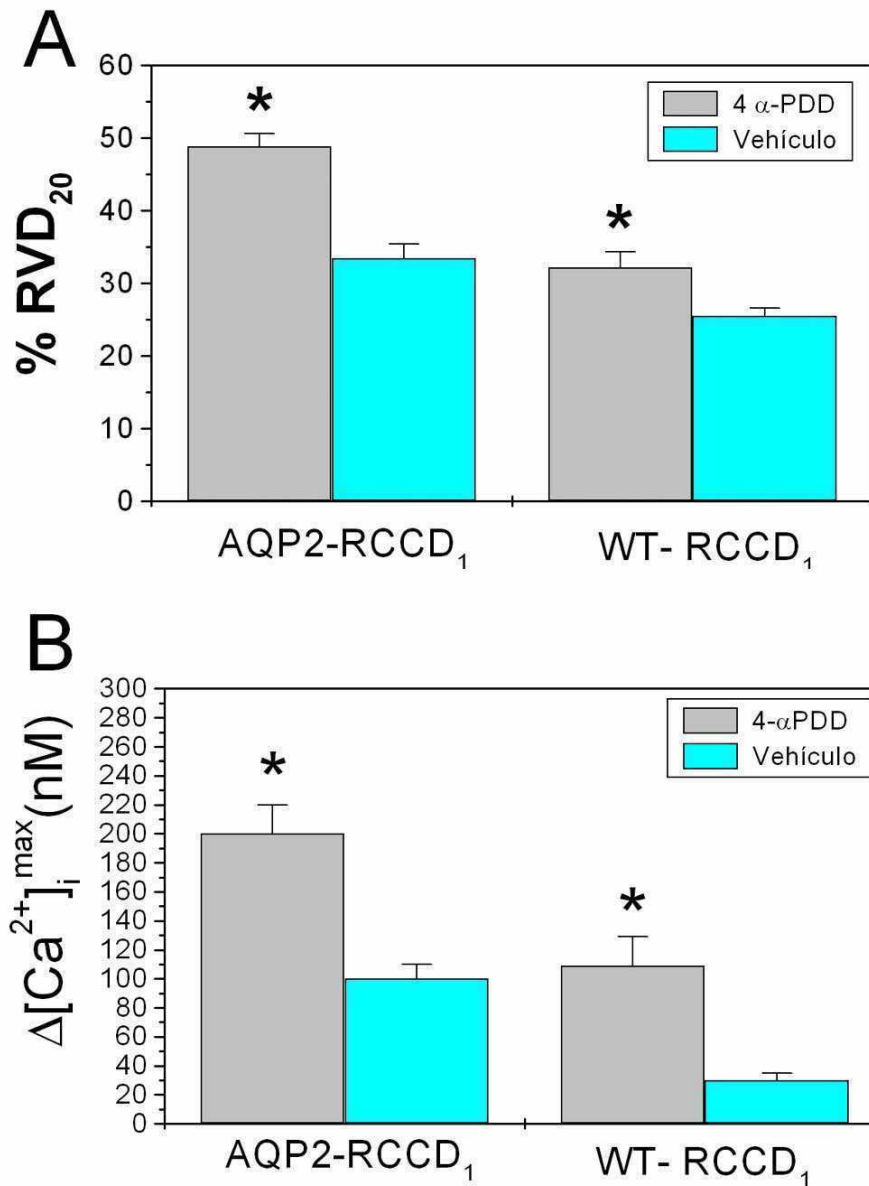


Figura 3.9: Efecto del 4 α -PDD sobre la regulación de volumen y sobre la concentración de calcio intracelular en hipotonía en células WT y AQP2-RCCD₁. El tratamiento con 4 α -PDD (1 μ M) fue realizado al mismo tiempo que el estímulo hipotónico (Δ OsM = 100 mOsM), y mantenido durante todo el experimento **A**: Porcentaje de recuperación de volumen a los 20 minutos (%RVD₂₀), para células tratadas con 4 α -PDD y vehículo (DMSO) **B**: Δ [Ca²⁺]_i^{max} en células AQP2 y WT-RCCD₁ en las mismas condiciones. El Δ [Ca²⁺]_i^{max} calculado corresponde a la máxima respuesta mostrada en los 10 primeros minutos. Los valores muestran media \pm SEM

de 40 a 100 células de 3 a 5 experimentos, * $p < 0.001$.

Concluimos que en las células WT-RCCD₁, la activación del TRPV4 mediante 4 α -PDD durante la hipotonía produce un aumento de calcio citosólico que permite activar el RVD. Estos resultados corroboran la participación del TRPV4 en la regulación de volumen de las células RCCD₁.

3.3.4. Los microfilamentos de actina y los microtúbulos son necesarios para la correcta osmoseñalización por TRPV4 ante estímulos hipotónicos en las células AQP2-RCCD₁.

Los experimentos mostrados hasta aquí, nos revelan la participación crítica del TRPV4 en la osmoseñalización en las células AQP2-RCCD₁, sugiriendo que este canal sólo puede activarse ante estímulos que provocan un incremento de volumen cuando la AQP2 es funcional. En busca de los posibles mecanismos celulares que subyacen esta activación estímulo-específica, indagamos acerca de los requerimientos del citoesqueleto en la correcta osmoseñalización.

Estudiamos la respuesta de activación de la señal de calcio ante estímulos osmóticos de las células AQP2-RCCD₁ cuando se impide la correcta polimerización de los microtúbulos de tubulina y de los microfilamentos de actina. Realizamos experimentos de medición de calcio intracelular en presencia de gradientes osmóticos utilizando los disruptores de citoesqueleto colchicina (inhibidor de la polimerización de microtúbulos de tubulina) y citocalasina-D (inhibidor de la polimerización de microfilamentos de actina). Los resultados se resumen en la figura 3.10. Se observa que la preincubación con colchicina 2.5 μ M por 30 minutos, y mantenida durante la exposición al gradiente, bloquea significativamente la señal transiente observada en el control (Figura 3.10 A) y reduce significativamente el máximo de concentración de calcio citosólico alcanzado (Figura 3.10 C).

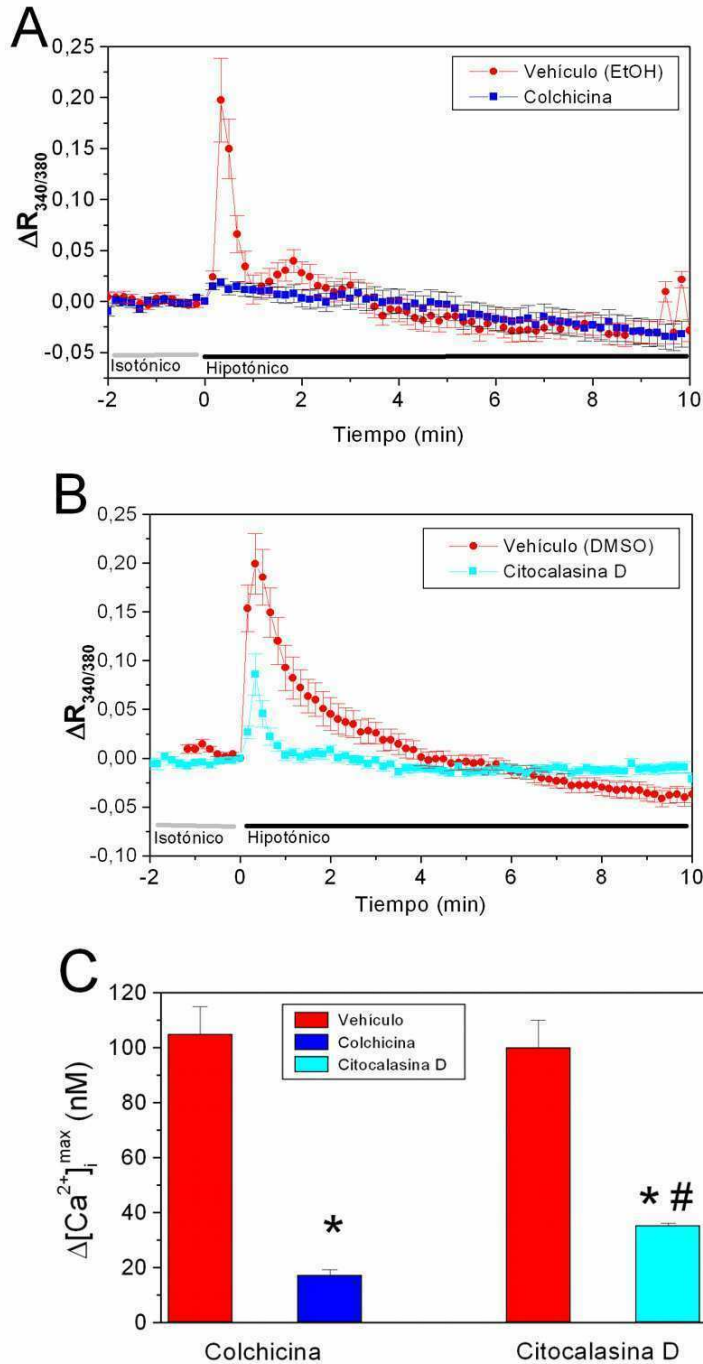


Figura 3.10: Efectos de la disrupción del citoesqueleto de actina y tubulina sobre la activación del TRPV4 ante estímulos hipotónicos en las células AQP2-RCCD₁. Curvas de dinámica de calcio citosólico expresado como $\Delta R_{340/380}$ de células AQP2-RCCD₁ durante el estímulo hipoosmótico ($\Delta OsM = 100$ mOsM) en células preincubadas con **(A)** colchicina (2.5 μM) o vehículo durante 30 minutos y mantenidos durante el estímulo y **(B)** citocalasina-D 4 (μM) durante 1 hora minutos previos al registro. **C:** Cambio máximo de calcio intracelular durante el gradiente en células expuestas a los disruptores antes citados. Los valores representan la media \pm SEM de 30 a 100 células de 3 a 5 experimentos, * $p < 0.001$ comparando tratamiento con su correspondiente vehículo, # $p < 0.05$ comparando ambos tratamientos entre sí.

El tratamiento con citocalasina-D (4 μ M) durante 1 hora previa a la exposición del gradiente osmótico, también provocó una disminución significativa en el incremento de calcio (Figura 3.10 C). Esta inhibición es menor a la provocada por la colchicina ya que el transiente de calcio no fue completamente inhibido (Figura 3.10 B) y que existe una diferencia significativa entre los valores máximos de calcio citosólico alcanzados durante el estímulo hipotónico entre estos fármacos (Figura 3.10 C).

Por último, ensayamos entonces los efectos de la disrupción del citoesqueleto de tubulina en la regulación de volumen de las células AQP2, realizando una preincubación previa con colchicina 2.5 μ M durante 30 minutos y mantenida durante el shock osmótico. La recuperación de volumen de aquellas células en las que se impidió la correcta polimerización de los túbulos resultó significativamente inhibida (%RVD₂₀ colchicina: $30,05 \pm 2,54$ vs %RVD₂₀ control: $38,16 \pm 1,6$, $p < 0.05$).

Estos resultados nos permiten sugerir que la activación del TRPV4 por hinchamiento osmótico dependiente de AQP2, requiere la correcta estructura del citoesqueleto de actina y de tubulina. La participación de los microtúbulos en este mecanismo de activación parecería ser crucial además para activar el RVD.

3.3.5. El canal osmosensor TRPV4 aumenta su inserción en membrana plasmática en respuesta a un shock hipotónico en células AQP2-RCCD₁

La participación de los microtúbulos en la activación del TRPV4 por estímulos hipotónicos sugiere la necesidad de un proceso de tráfico en la activación por *swelling* dependiente de AQP2. Por lo tanto, el siguiente paso fue estudiar si la localización de TRPV4 en la membrana se encuentra modificada en condiciones de hipotonía en las células RCCD₁. Para ello realizamos inmunofluorescencias marcando TRPV4 en las células AQP2-RCCD₁ y WT-RCCD₁, en condiciones de isotonía y en condiciones de hipotonía (Δ Osm = 100 mOsM) durante 5 minutos. La figura 3.11 muestra las imágenes representativas

de microscopía confocal del TRPV4 en las células WT y AQP2-RCCD₁. En condiciones de isotonía, en ambos casos, la mayoría de las células muestran una distribución preferencialmente intracelular, probablemente debida a una acumulación del TRPV4 en vesículas de reciclado constitutivo, y además, puede notarse una fuerte distribución perinuclear, probablemente debido a la localización en RE y en Golgi. En mucho menor porcentaje, aparece marca en la membrana de las células. En cambio, el tratamiento con el estímulo hipotónico reveló respuestas diferentes en las células AQP2 y WT-RCCD₁, mostrando una acumulación del TRPV4 en la membrana de la mayoría de las células que expresan AQP2.

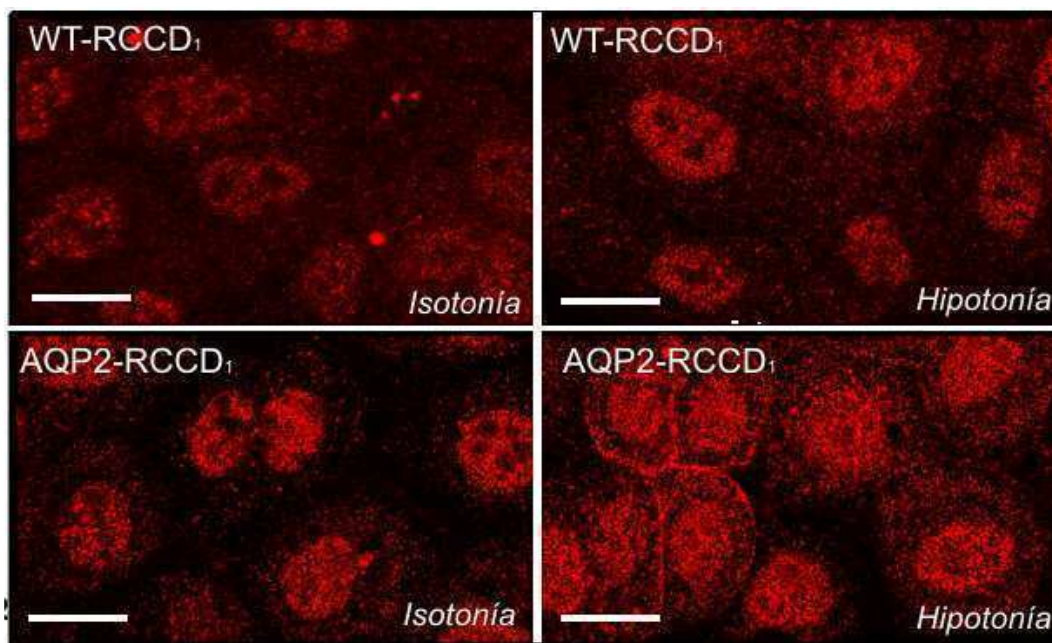


Figura 3.11: Localización del TRPV4 en las células AQP2-RCCD₁ y WT-RCCD₁ en respuesta hipotonía ($\Delta\text{OsM} = 100 \text{ mOsM}$). Se muestran fotografías de microscopía de confocal (Obj 60X). representativas de experimentos de inmunofluorescencia del TRPV4 (anti TRPV4 hecho en conejo, dilución 1:1500, Alomone) marcado con un anticuerpo secundario Cy3. Las células RCCD₁ mantenidas en isotonía, muestran una distribución mayoritariamente perinuclear del TRPV4. Las células AQP2-RCCD₁ tratadas durante 5 minutos con un gradiente $\Delta\text{OsM} = 100 \text{ mOsM}$ evidencian una acumulación de TRPV4 en la membrana plasmática que no se observa en las células WT-RCCD₁. Las barras representan 10 μm .

Posteriormente, evaluamos también la localización del TRPV4 incubando las células en con una solución hipoosmótica mas diluida. Utilizamos un estímulo de $\Delta\text{OsM} = 200 \text{ mOsM}$, que en el capítulo anterior mostramos que provoca un incremento sostenido del calcio intracelular en las AQP2-RCCD₁ y

no produce incrementos adicionales en WT-RCCD₁ (Figura 2.13, Cap. 2). Los resultados mostrados en la figura 3.12, nos indican que las células WT-RCCD₁ no muestran una acumulación aparente de TRPV4 en la membrana plasmática, mientras que este gradiente provoca en las células AQP2-RCCD₁ una acumulación marcada del TRPV4 en la membrana plasmática, percibiéndose notablemente en los bordes de las células.

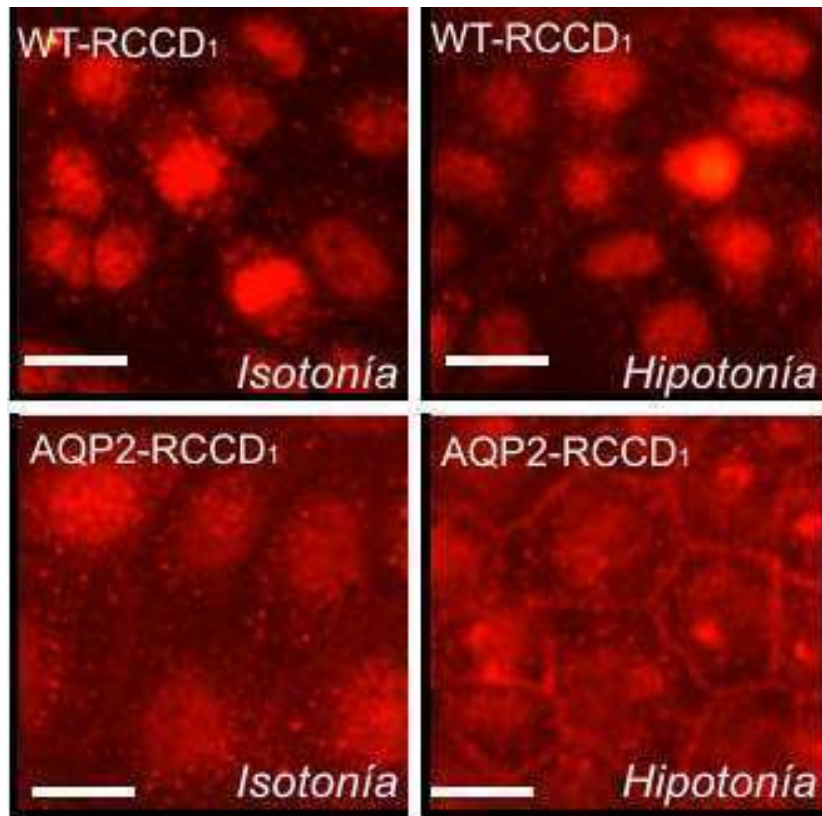


Figura 3.12: Localización del TRPV4 en las células AQP2-RCCD₁ y WT-RCCD₁ en respuesta hipotonía ($\Delta\text{Osm} = 200 \text{ mOsm}$). Se muestran fotografías representativas de experimentos de inmunofluorescencia del TRPV4 (anti TRPV4 hecho en conejo, dilución 1:1500, Alomone) marcado con un anticuerpo secundario Cy3 obtenidas por microscopía de fluorescencia (Obj 40X). Las células RCCD₁ mantenidas en isotonía, muestran una distribución mayoritariamente perinuclear del TRPV4. Las células AQP2-RCCD₁ tratadas durante 5 minutos con un gradiente $\Delta\text{Osm} = 200 \text{ mOsm}$ evidencian una acumulación de TRPV4 en la membrana plasmática que no se observa en las células WT-RCCD₁. Las barras representan $10 \mu\text{m}$

Los resultados nos permiten concluir que los estímulos hipotónicos producen la acumulación del TRPV4 en la membrana de las células de túbulo colector sólo en presencia de la AQP2.

3.3.6. La hipotonía no provocaría una importante colocalización en membrana de TRPV4 y AQP2

La acumulación del TRPV4 en la membrana de las células AQP2-RCCD₁ por estímulos osmóticos, podría deberse a un tráfico conjunto con AQP2, evidenciándose en una colocalización. Para estudiar esta posibilidad realizamos una doble inmunomarcación con anticuerpos anti-AQP2 y anti-TRPV4, sometiendo a las células AQP2-RCCD₁ en condiciones de isotonía e hipotonía, utilizando el gradiente de 200 mOsM.

La figura 3.13 corresponde a imágenes representativas para cada tratamiento realizado, y muestra en azul la marca del TRPV4, en verde la marca de la AQP2 y en el *merge* se muestran ambas imágenes fusionadas. En medio isoosmótico AQP2 se encuentra en membrana plasmática y en el compartimiento subapical mientras que el TRPV4 se encuentra principalmente en el compartimiento intracelular no existiendo colocalización. Al someter las células a un medio hiposmótico se ve un aumento de TRPV4 en la membrana apical en las células AQP2-RCCD₁. Este aumento del TRPV4 en la membrana parecería acompañar a un aumento de AQP2 en membrana, sin embargo no aparenta existir una colocalización absoluta, evidenciándose sólo algunos puntos donde los dos marcadores colocalizarían (ver flechas blancas en el *merge* de la Figura 3.13).

Las inmunofluorescencias muestran que en las células WT-RCCD₁ el TRPV4 no es capaz de insertarse en la membrana en presencia de gradiente hiposmótico 200 mOsM durante 10 minutos (Figura 3.14). La nula marcación utilizando anti-AQP2 corrobora que estas células no expresan AQP2 como ha sido previamente publicado por nuestro grupo (Capurro y col, 2001).

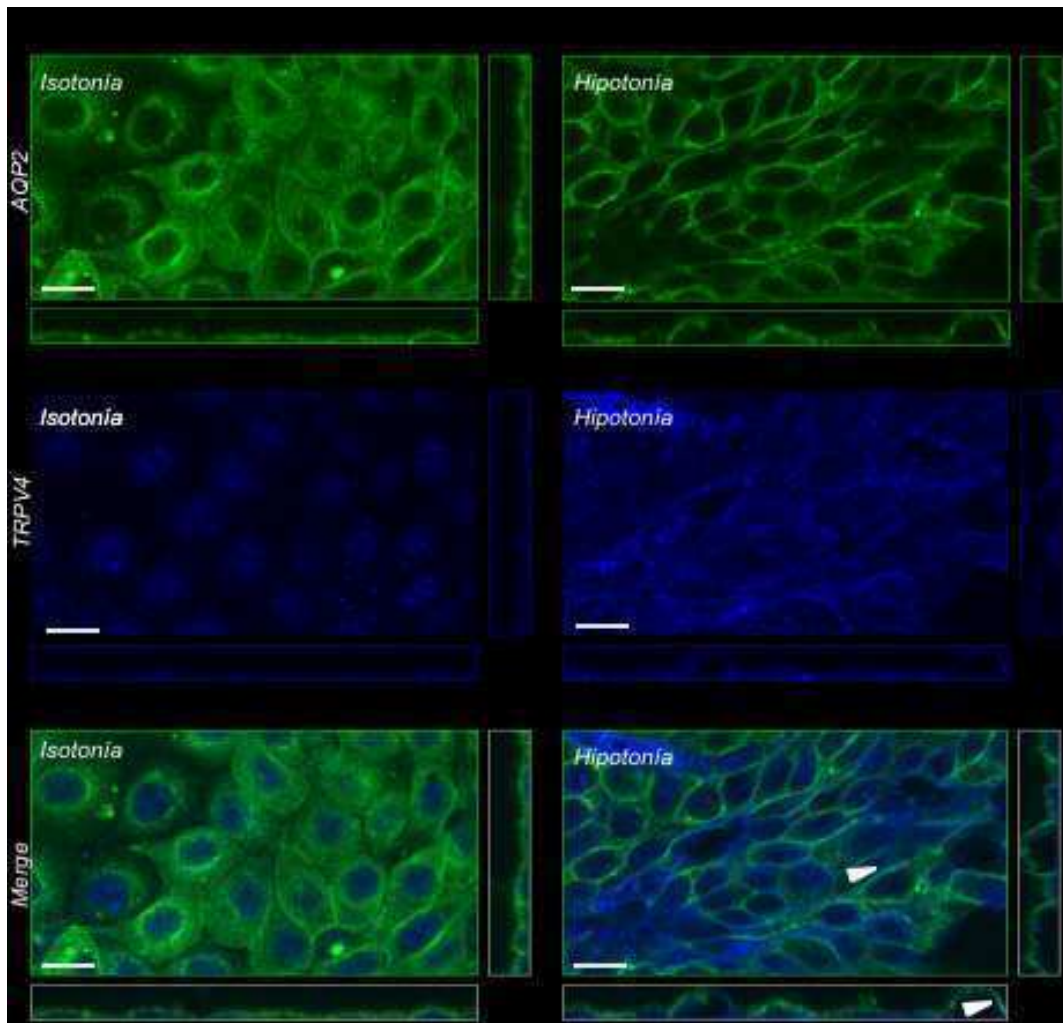


Figura 3.13: Localización del TRPV4 y de la AQP2 en las células AQP2-RCCD₁ en respuesta a estímulo hipotónico. Se muestran fotografías de microscopía de fluorescencia confocal del TRPV4 inmunomarcado con un anticuerpo anti TRPV4 (hecho en conejo, dilución 1:1500, Alomone) con un secundario IgG Cy5 (azul) y de la AQP2 con un anticuerpo anti AQP2 (hecho en cabra, dilución 1:50, Santa Cruz) inmunomarcado con un secundario IgG FITC (verde). Las células AQP2-RCCD₁ tratadas durante 10 minutos con un gradiente $\Delta\text{OsM} = 200$ mOsM muestran una acumulación de TRPV4 en la membrana plasmática. Las imágenes corresponden a planos xy , y a planos representativos xz , donde se pone de manifiesto el perfil de las células. En flechas blancas se muestran algunos puntos de colocalización evidente de ambos fluoróforos. Las barras representan 10 μm .

Estos resultados permiten concluir que en células de túbulo colector cortical, la acumulación de TRPV4 dependiente de AQP2 inducida por swelling, no involucra la colocalización de estas dos moléculas, sugiriendo que no existiría interacción física durante el tráfico.

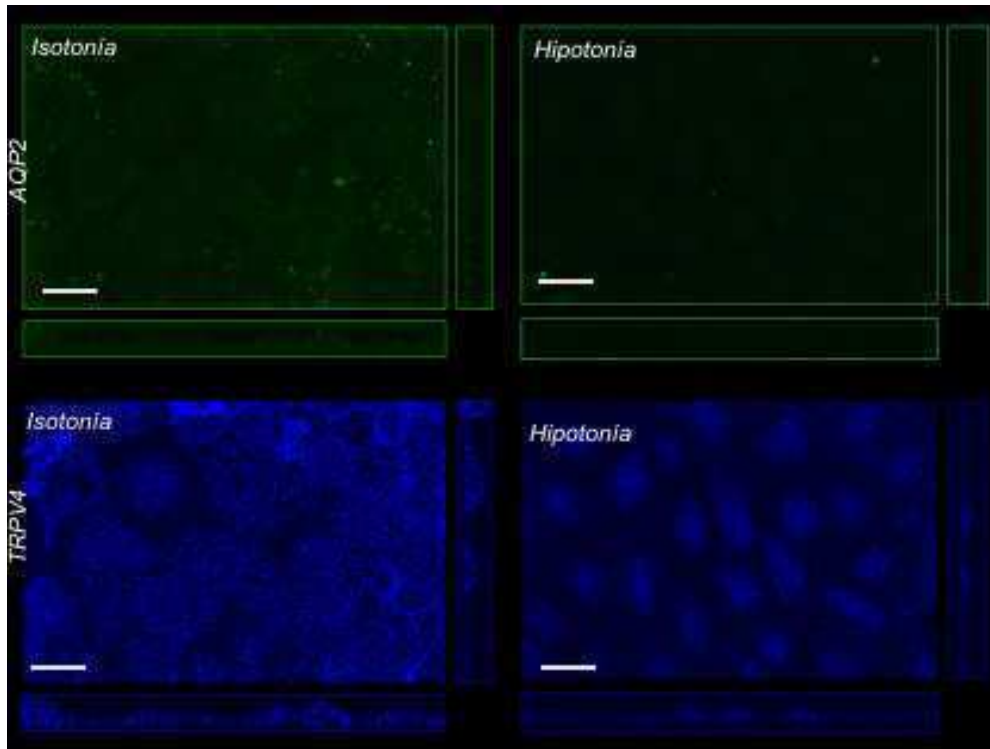


Figura 3.14: Localización del TRPV4 en las células WT-RCCD₁ en respuesta a estímulo hipotónico en la doble inmunomarcación con AQP2. Se muestran fotografías de microscopía de fluorescencia confocal del TRPV4 inmunomarcado con un anticuerpo anti TRPV4 (hecho en conejo, dilución 1:1500, Alomone) con un secundario IgG Cy5 y de la AQP2 con un anticuerpo anti AQP2 (hecho en cabra dilución 1:50, Santa Cruz) inmunomarcado con un secundario IgG FITC (verde). Las células WT-RCCD₁ tratadas durante 10 minutos con un gradiente $\Delta\text{Osm} = 200$ mOsm no muestran un incremento en la acumulación de TRPV4 en la membrana. Las imágenes corresponden a planos *xy*, y a planos representativos *xz*, donde se pone de manifiesto el perfil de las células. Las barras representan 10 μm .

3.3.7. La inserción del TRPV4 en la membrana inducida por *swelling* depende de la presencia de AQP2 funcional

Previamente nuestro grupo reportó que el tratamiento con compuestos mercuriales inhibe un 80 % la Posm de las células AQP2-RCCD₁ (Ford y col, 2005). En el capítulo anterior mostramos que además el HgCl₂ inhibe la respuesta transiente de calcio (Figura 2.10, Cap. 2). Para investigar si la inserción del TRPV4 en la membrana depende de AQP2 funcional, realizamos experimentos de doble inmunomarcación de TRPV4 y AQP2 en presencia de HgCl₂. Los efectos del HgCl₂ (0.3 mM) sobre la localización de TRPV4 y AQP2 pueden verse en la figura 3.15. En hipotonía, la inhibición de AQP2 con HgCl₂ disminuye la acumulación del TRPV4 en membrana.

Estos resultados nos indican que la translocación de TRPV4 mediada por hipotonía en las células AQP2-RCCD₁ depende de la funcionalidad de la AQP2.

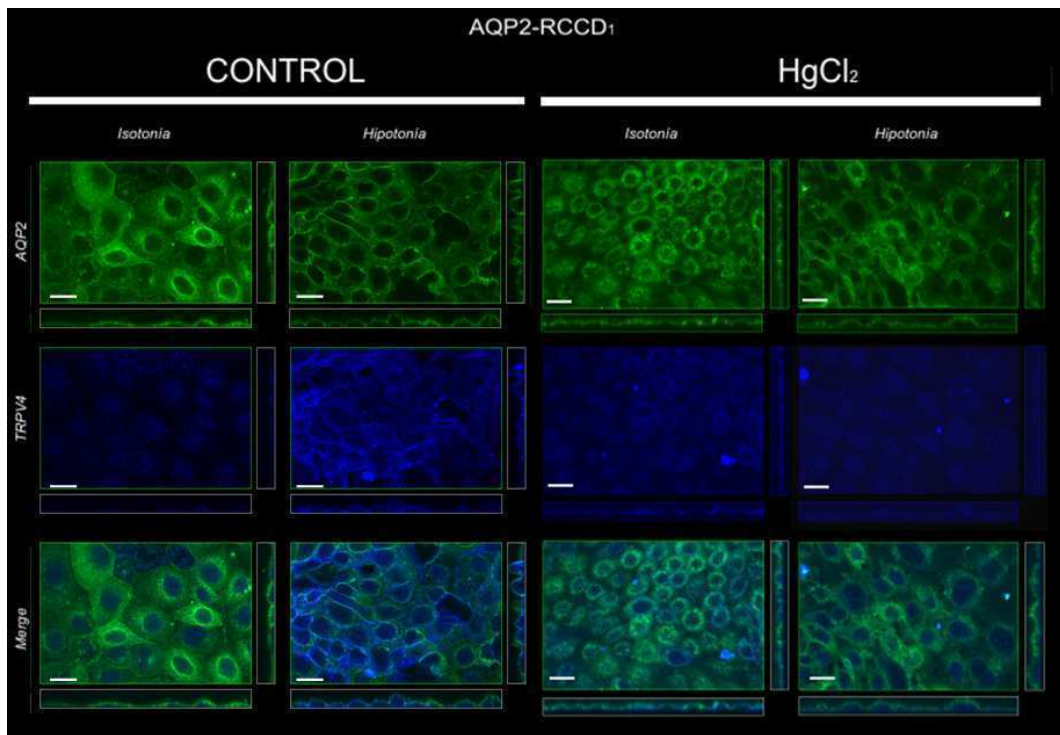


Figura 3.15: Efectos de la inhibición de la AQP2 con HgCl₂ (0.3 mM) en la acumulación de TRPV4 en la membrana inducida por hipotonía en las células AQP2-RCCD₁. Se muestran fotografías de microscopía de fluorescencia confocal del TRPV4 inmunomarcado con un anticuerpo anti TRPV4 (hecho en conejo, dilución 1:1500, Alomone) y un secundario IgG Cy5 (azul) y de la AQP2 marcada con anti-AQP2 (hecho en cabra dilución 1:50, Santa Cruz) con un secundario IgG FITC (verde). Las células tratadas con HgCl₂ (0.3 mM) se mantuvieron en isotonía por 10 minutos o adicionalmente 10 minutos en hipotonía con un gradiente de $\Delta\text{OsM} = 200$ mOsM, resultando inhibida la acumulación del TRPV4 en la membrana con este tratamiento. Se muestran los planos *xy* y *xz* donde se pone de manifiesto el perfil de las células. Las barras indican 10 μm .

3.3.8. La inserción del TRPV4 en la membrana de las células AQP2-RCCD₁ depende de microtúbulos.

Anteriormente mostramos que la activación del TRPV4 inducida por *swelling* en las células AQP2-RCCD₁ depende del citoesqueleto de tubulina (Figura 3.10). El paso siguiente fue estudiar la participación de los microtúbulos en la inserción inducida por swelling del TRPV4 en membrana en las células AQP2-RCCD₁. Realizamos experimentos de doble inmunofluorescencia

marcando el TRPV4 y la AQP2 de células AQP2-RCCD₁ preincubadas con colchicina expuestas a estímulos hipotónicos. La figura 3.16 muestra que la inhibición de la polimerización de microtúbulos impide el tráfico de TRPV4 a la membrana inducido por swelling.

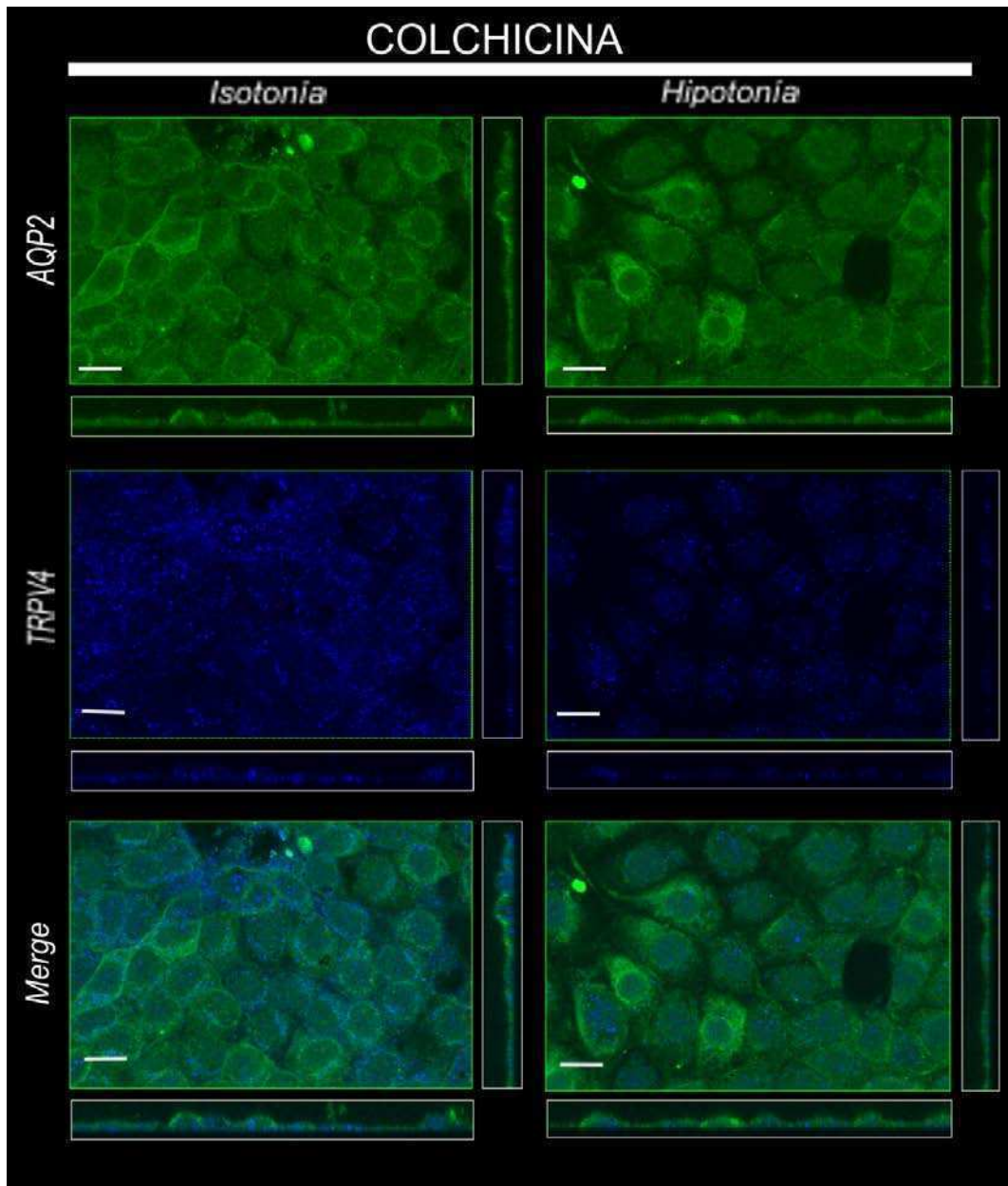


Figura 3.16: Efectos de la disrupción de microtúbulos sobre la inserción en membrana de TRPV4 en respuesta a hipotonía en las células AQP2-RCCD₁. Se muestran fotografías de microscopía confocal del TRPV4 inmunomarcado con un anticuerpo anti TRPV4 (hecho en conejo, dilución 1:1500, Alomone) con un secundario IgG Cy5 y de la AQP2 con un anticuerpo anti AQP2 (hecho en cabra dilución 1:50, Santa Cruz) con un secundario IgG FITC. Las células se incubaron con colchicina (2.5 μ M) durante 30 min y se sometieron a gradiente Hipoosmótico (Δ Osm = 200 mOsm) durante 10 min en presencia de la droga. Se observa el TRPV4 distribuido en el citoplasma en ambos casos. Se muestran los planos *xy* y *xz* donde se pone de manifiesto el

perfil de las células. Las barras indican 10 μm .

Este resultado sugiere que la inserción de TRPV4 en la membrana inducida por swelling en las células AQP2 depende de microtúbulos

3.3.9. La activación de TRPV4 por estímulos hipotónicos en las células RCCD₁ involucraría a los EETs

Finalmente indagamos acerca del posible mecanismo de activación de TRPV4 por swelling en las células RCCD₁. Dado que uno de los mecanismos clásicos de activación del TRPV4 por *swelling* se produce por la cascada del ácido araquidónico, ensayamos la participación de los EETs en la activación del TRPV4, en ambas líneas celulares.

La figura 3.17 muestra los efectos de la incubación con 5',6'-EET 1 μM sobre el calcio intracelular en condiciones de isotonía y en condiciones de hipotonía ($\Delta\text{OsM} = 100 \text{ mOsM}$) para las células AQP2-RCCD₁ y WT-RCCD₁. Observamos que el EET aplicado en isotonía muestra un incremento muy pequeño de calcio durante los primeros 10 minutos de su aplicación en las células WT-RCCD₁ y AQP2-RCCD₁. Sorprendentemente, luego de la preincubación con 5',6'-EET, la exposición al gradiente hiposmótico de ambas líneas celulares, produce un incremento sustancial en la respuesta de calcio máximo intracelular. El hecho de que WT muestre un incremento de calcio luego del swelling, sugiere que el TRPV4 presente en WT, es capaz de activarse por swelling, siendo los EETs un requerimiento.

Estos resultados sugieren que el 5',6'-EET es capaz de activar al canal TRPV4 en ambas líneas RCCD₁, pero que requiere de la hipotonía para producir grandes incrementos de calcio. Dado que en AQP2-RCCD₁ la hipotonía es capaz de producir incrementos, proponemos que la AQP2 participaría en la liberación de EETs durante el swelling.

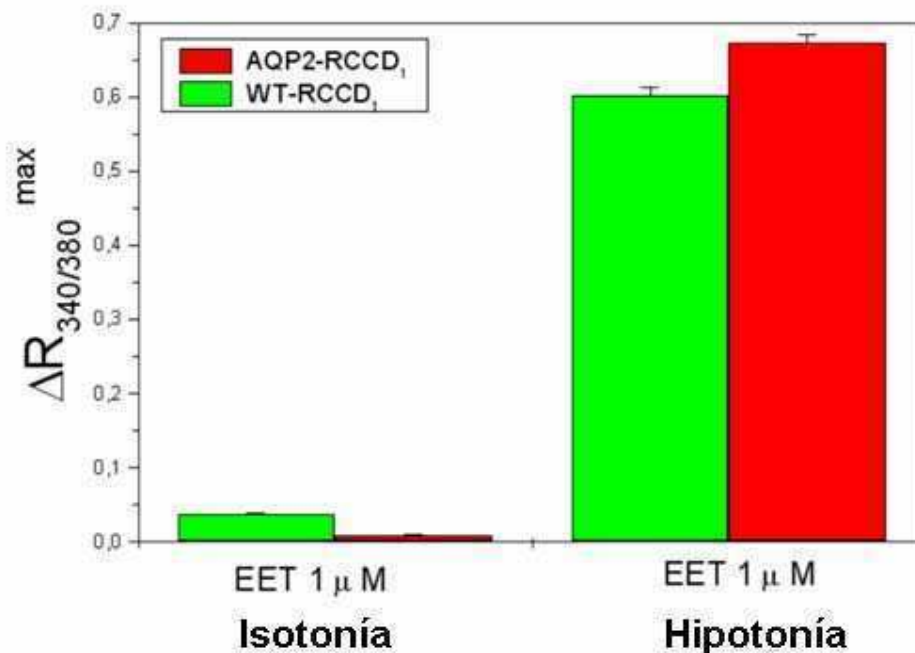


Figura 3.17: Efecto de la preincubación con 5',6'-EET en el incremento de calcio por hipotonía de las células AQP2-RCCD₁ y WT-RCCD₁. Cambio máximo de $\Delta R_{340/380}$ durante el 10 minutos de tratamiento 5,6-EET 1 μ M y posteriormente expuestas a gradiente hipotónicos ($\Delta Osm = 100$ mOsm) por a los 10 minutos. Los valores muestran media \pm SEM de 80 células correspondientes a 3 experimentos, * $p < 0.05$ compara la hipotonía luego del tratamiento con EET en ambas líneas celulares.

3.4. Discusión

3.4.1. La presencia del canal TRPV4 en las células del CCD es esencial para producir los incrementos de calcio necesarios para el RVD: Rol de la AQP2

La participación de los canales TRP en la generación de señales de calcio ante los diversos estímulos mecánicos es un fenómeno de conocimiento reciente. En el capítulo anterior mostramos que en las células AQP2-RCCD₁ el *swelling* osmótico produce incrementos de calcio sensibles a Gd³⁺ (conocido inhibidor de canales mecanosensibles). En el presente capítulo describimos que ésta señal transiente resultó ser sensible también a rojo de rutenio. Ambos compuestos han sido utilizados ampliamente como inhibidores del TRPV4 (Pan

y col, 2008; Becker y col, 2005; Andrade y col, 2005; Jian y col, 2008; Güler y col, 2002). Si bien el RRu también podría estar inhibiendo otros miembros de la familia TRPV, los únicos que son osmosensibles y además se han descrito en células del túbulo colector renal son el TRPV1 y el TRPV4 (Tian y col, 2004; Wu y col, 2007; Taniguchi y col, 2007; Feng y col, 2008). Nuestros resultados moleculares y funcionales indican que las células RCCD₁ expresan TRPV4 y no muestran expresión ni funcionalidad del TRPV1. Por lo tanto el incremento de calcio transiente inducido por *swelling* osmótico en las células AQP2-RCCD₁ se debería principalmente a la activación del TRPV4. Las células WT evidencian una diminuta entrada mediada por este canal ya que el pequeño incremento de calcio en estas células fue inhibido por RRu. Sin embargo sólo en presencia de la AQP2 funcional en la membrana de las células RCCD₁, se produciría una importante activación del TRPV4 por hipotonía.

Uno de los resultados más interesantes mostrados en el presente capítulo es que la activación de mecanismos rápidos de RVD dependientes de AQP2 en las células RCCD₁ requiere la activación del TRPV4. Nuestros experimentos de regulación de volumen utilizando el inhibidor rojo de rutenio durante el shock hipotónico en las células que expresan la AQP2 funcional, mostraron una inhibición de la recuperación del volumen. La función del TRPV4 en la activación de la regulación del volumen celular ha sido demostrada en muchos sistemas (Becker y col, 2005; Becker y col 2009; Liu y col, 2006; Pan y col, 2008; Arniges y col, 2004). En células renales su participación en el RVD ha sido sugerida (Wu y col 2007), sin embargo hasta el momento no ha sido reportada.

Adicionalmente caracterizamos la funcionalidad del TRPV4 con un activador específico artificial (4 α -PDD). Mostramos que en ausencia de gradiente osmótico el canal responde con incrementos de calcio al 4 α -PDD en ambas líneas celulares. Existen varios trabajos que explican que los mecanismos de activación del TRPV4 por hipotonía y por 4 α -PDD ocurren por vías diferentes, sin embargo ambos mecanismos no están completamente

dilucidados (Watanabe y col, 2002; Vriens y col, 2004; Vriens y col, 2007; Vriens y col, 2009). Al realizar experimentos con 4α -PDD en medio hipotónico logramos obtener una respuesta reguladora de volumen en las células WT. Sin embargo este RVD resulta menor al obtenido en las células AQP2-RCCD₁ en las mismas condiciones. De la misma manera que se ha reportado para otras líneas celulares epiteliales (Arniges y col, 2004; Liu y col, 2006), estos experimentos refuerzan la hipótesis de que el TRPV4 está involucrado en la regulación del volumen celular.

El mecanismo por el cual este canal participa en la activación del RVD se ha propuesto que estaría dado por un acoplamiento funcional con canales de potasio dependientes de calcio (Arniges y col, 2004). Este mecanismo de acoplamiento ha sido reportado también en la vasoconstricción (Earley y col, 2005). En el CCD se ha propuesto un mecanismo similar durante la activación del TRPV4 en la secreción de potasio mediada por flujo que resulta incrementada al activar con 4α -PDD (Taniguchi y col, 2007). Estas evidencias sugieren fuertemente que la activación de mecanismos rápidos de RVD en las células AQP2-RCCD₁ podría deberse a un acoplamiento funcional entre el TRPV4 y los canales de K⁺ dependientes de calcio, sensibles a bario presentes en esta línea celular (Ford y col, 2005).

Al ensayar la funcionalidad del TRPV4 con el 4α -PDD en ausencia de estímulos osmóticos demostramos que la presencia de AQP2 aparentemente no modifica la respuesta de calcio intracelular, ya que se observaron incrementos similares en las líneas AQP2 y WT. Como ha sido reportado para otras líneas celulares (Reiter y col, 2006; Arniges y col, 2004) incluso para el CCD (Wu y col, 2007), este incremento mostró ser altamente dependiente del calcio extracelular, ya que se inhibe casi completamente al remover el calcio extracelular o al bloquear el TRPV4 con RRu. Sin embargo la activación por 4α -PDD estaría dada adicionalmente por un componente intracelular, ya que nuestros resultados muestran una reducción de la activación con el 4α -PDD en presencia de taspigargina. Por lo tanto estos resultados nos permiten sugerir que el mecanismo de incremento de calcio a través del TRPV4 por 4α -PDD en las

células RCCD₁ sería a través de un mecanismo de CICR, donde luego de una entrada inicial de calcio desde el extracelular se activa una liberación desde los reservorios. Recientemente se sugirió, en condrocitos, que el TRPV4 estaría implicado en este mecanismo (Phan y col, 2009).

3.4.2. La activación del TRPV4 por hipotonía dependiente de AQP2 involucraría el tráfico a membrana

La expresión de TRPV4 en el túbulo colector ha sido previamente informada (Tian y col, 2004), aunque su localización subcelular precisa resulta controversial. Inicialmente un trabajo lo describió en la membrana basolateral (Tian y col, 2004), sin embargo varios trabajos posteriores lo reportan en la membrana apical de las células de túbulo colector cortical (Wu y col, 2007; Cuajungco y col, 2006; Taniguchi y col, 2007). Sin embargo ninguno de estos trabajos evalúa la localización subcelular en el túbulo expuesto a estímulos hiposmóticos.

Nuestros experimentos de inmunofluorescencia revelaron que en ausencia de gradiente osmótico el TRPV4 se distribuye de manera similar en las células AQP2-RCCD₁ y WT-RCCD₁, localizándose mayoritariamente en el citoplasma, probablemente en RE, en Golgi o en vesículas de exocitosis y en menor medida en la membrana plasmática. Este resultado sugeriría que esta ubicación citoplasmática del TRPV4 correspondería, como fue sugerido en CCD, a un *pool* de vesículas listas para su inserción en membrana luego de la aplicación del estímulo adecuado (Wu y col 2007). Las inmunofluorescencias realizadas en presencia de un medio hipotónico indican que se favorece la acumulación del TRPV4 en membrana plasmática sólo en las células que expresan AQP2 funcional.

Previamente se ha sugerido que los mecanismos que involucran la activación por *swelling* del TRPV4 se deberían a una translocación del canal a la membrana plasmática (Pedersen y Nilius, 2007, Cuajungco y col, 2006). Existen

algunos ejemplos de canales iónicos cuya activación por distintos estímulos está regulada por la inserción en membrana, por ej. ENaC y CFTR (Peters y col 2001). Se ha propuesto que el TRPV4 presentaría un reciclado vesicular regulado (Wegierski y col, 2006) sin embargo la participación de los estímulos hipotónicos en la inserción en la membrana ha sido poco estudiada.

Una posibilidad es que la inserción del TRPV4 en la membrana por estímulos hipotónicos, ocurra simultáneamente con la AQP2. Este mecanismo se ha demostrado para el TRPC3 en CCD estimulado con AVP (Goel y col, 2007). Sin embargo nuestros resultados de las inmunofluorescencias donde marcamos el TRPV4 y la AQP2, no evidencian una colocación importante de estos dos canales en las células sometidas a medio hipotónico, salvo en algunos puntos correspondientes a la membrana. Este resultado nos permitiría descartar la posibilidad de que exista una interacción física entre ambas moléculas, sugiriendo que el TRPV4 se encuentra en un *pool* de vesículas distinto al de la AQP2.

Investigamos también si el TRPV4 requiere del citoesqueleto para su inserción inducida por *swelling*. Nuestros resultados nos indican que tanto el citoesqueleto de actina y tubulina son requeridos para la activación del canal y adicionalmente mostramos que la inhibición de la polimerización de los microtúbulos, utilizando colchicina, impide la activación del RVD en las células AQP2-RCCD₁. Esto coincide con estudios realizados en varios tipos de células que informan que un citoesqueleto intacto es requerido para la entrada de calcio y el RVD luego de un *swelling* (Ebner y col, 2005; Liu y col, 2006; Becker y col, 2009). Nuestros resultados funcionales, en conjunto con la inhibición provocada por colchicina sobre la inserción del TRPV4 en membrana durante el *swelling*, mostrada en las inmunofluorescencias de las células AQP2-RCCD₁, sugieren un rol fundamental de los microtúbulos en el proceso de inserción y de activación del TRPV4. La participación de los microfilamentos de actina en las células AQP2 RCCD₁, si bien sería relevante, en la activación del TRPV4, parecería ser menos importante que el citoesqueleto de tubulina, dado que la inhibición del transiente de calcio resultó menor en las células tratadas con

citocalasina-D (Figura 3.10 C).

3.4.3. Evidencias de asociación funcional entre AQP2 y TRPV4 en las células del CCD

El TRPV4 se caracteriza por haberse encontrado asociado funcionalmente a una cantidad de proteínas, garantizando en muchos casos su activación por estímulos hipotónicos y la activación del RVD. El caso del CFTR, la AQP5 y la actina (Arniges y col, 2004; Liu y col, 2006; Becker y col 2009) han sido bien descritos. Adicionalmente en algunos casos se ha reportado que la interacción con proteínas asociadas al citoesqueleto o a vesículas, es indispensable en el correcto tráfico regulando la activación del TRPV4 por *swelling*. Por ejemplo Pacsina 3, una proteína de unión a vesículas fundamental en la regulación de la endocitosis, participa en la inserción del TRPV4 a la membrana, sin embargo muestra un efecto inhibitorio en respuesta al *swelling*. La proteína vinculada al citoesqueleto de tubulina y actina, MAP7 (*Microtubule-associated protein 7*), se asocia funcionalmente al TRPV4 incrementando su nivel en membrana plasmática provocando un aumento en su respuesta a *swelling* (Suzuki y col, 2003b).

El conjunto de los resultados mostrados en este capítulo sugieren una asociación funcional entre la AQP2 y el TRPV4, ya que la expresión de la AQP2 en la línea celular RCCD₁ convierte al TRPV4 en un canal funcional en respuesta al *swelling*. Demostramos que este mecanismo de asociación está vinculado a la inserción en la membrana. La acumulación del TRPV4 en la membrana de las células RCCD₁ provocada por la presencia de AQP2 ocurriría sólo durante el *swelling*, en respuesta a estímulos hipotónicos. El hecho de que las células AQP2 y WT-RCCD₁ no muestren diferencias evidentes en la localización subcelular del TRPV4 en isotonía y que además en estas condiciones el TRPV4 muestre en el western-blot estados similares de las

supuestas formas glicosiladas, refuerza la idea de que el rol que cumpliría la AQP2 en este tráfico no se manifestaría en medios isosmóticos.

Otros factores reportados que modifican la inserción del TRPV4 en la membrana son: modificaciones postraduccionales como glicosilación, fosforilación y ubiquitinación. Hasta el momento no se ha demostrado una vinculación directa entre estas modificaciones sobre el TRPV4 y la aplicación de un *swelling* osmótico o de estímulos mecánicos.

Por otro lado recientemente se ha reportado que la inserción en la membrana de TRPV4 en respuesta estímulos mecánicos como el *shear stress* en células endoteliales requeriría la formación de EETs (Loot y col, 2008), un mecanismo también reportado para el tráfico de TRPC6 en estas células (Fleming y col, 2007). Esta claro que la activación de la PLA2 y la subsiguiente formación de AA y EETs es un proceso que se considera como parte del mecano- osmosensado en diversas células, ya que la PLA2 es capaz de activarse ante el *swelling* osmótico o ante estímulos mecánicos. En el presente capítulo sugerimos que la activación por *swelling* del TRPV4 en las células RCCD₁ requeriría EETs. Estos EETs son capaces de activar al TRPV4 y provocar un incremento de calcio transiente. En presencia de AQP2 estos metabolitos serían producidos endógenamente por las células en respuesta a hipotonía pudiendo entonces interferir en el mecanismo de translocación.

Por último se ha sugerido que la asociación funcional del TRPV4 con otros canales podría estar involucrada con el tráfico. En las glándulas salivales la presencia de AQP5 en células que expresan TRPV4 mostró ser fundamental para la activación de la entrada de calcio estimulada por *swelling* y para el RVD. Este proceso se ha propuesto que requiere un incremento de la asociación de TRPV4, AQP5 y actina en la membrana ante estímulos osmóticos en células de las glándulas salivales (Liu y col, 2006). Sin embargo la participación de los EETs en esta activación no ha sido estudiada.

En conjunto los resultados mostrados en este capítulo, nos permiten proponer que en células del CCD durante un shock hipotónico la AQP2 participaría en el proceso de sensado del volumen celular a través de la activación del canal TRPV4, probablemente por un mecanismo dependiente de EETs. Este proceso de activación involucraría el tráfico de TRPV4 a membrana, sugiriendo la existencia de una asociación funcional entre el TRPV4 y la AQP2, en el que sería requerido el citoesqueleto de tubulina. Esta asociación funcional ocurrida durante el swelling es uno de los eventos críticos requeridos para que la AQP2 participe en la activación de los mecanismos rápidos de RVD.

Capítulo 4: Discusión general y perspectivas

4.1. Discusión general

Desde su descubrimiento, las acuaporinas han demostrado diversas funciones más allá del transporte de agua. A nivel celular se les han adjudicado roles en la migración, proliferación y apoptosis (Hara-Chikuma y Verkman, 2007; Saadoun y col, 2005; Hu y Verkman, 2006; Flamenco y col, 2009). Todos estos fenómenos están vinculados a procesos de control de volumen celular. La participación de las AQPs en la regulación de volumen es un fenómeno de conocimiento reciente y los mecanismos por los que desempeñarían esta función están siendo de a poco conocidos, con tendencia a involucrarlas en el mecanismo de osmosensado o en el sensado de los cambios de volumen (Hill y col, 2004; Ford y col, 2005; Kida y col, 2005). Nuestro grupo demostró por primera vez la participación crucial de la AQP2 en la activación rápida del RVD (Ford y col, 2005). En esta tesis hemos investigado la vinculación de la AQP2 con la activación de las vías de señalización del calcio intracelular y estudiamos los mecanismos moleculares que la subyacen y que son necesarios para el RVD.

4.1.1. Participación de la AQP2 en la activación de señales de calcio durante el *swelling*.

En una primera etapa demostramos en las células AQP2-RCCD₁ la existencia de una vía de entrada de calcio desde el extracelular activada por *swelling* y una movilización de calcio desde los depósitos. Posteriormente, al preguntarnos acerca de la identidad de los canales de calcio involucrados en esta señal, mostramos que el TRPV4 es un componente esencial de esta entrada. Si bien la expresión del canal osmosensible TRPV4 se reportó previamente en CCD, su vinculación con los mecanismos de RVD y con la AQP2 en estas células no había sido demostrada. **En esta tesis proponemos la existencia de una asociación funcional entre la AQP2 y el TRPV4, esencial para la generación de señales de calcio inducidas por *swelling* y necesarias para la activación rápida de los mecanismos de regulación de volumen celular.**

También demostramos que la asociación funcional entre la AQP2 y el TRPV4 necesita, para producirse adecuadamente, un citoesqueleto intacto. Interesantemente, encontramos que el *swelling* de las células que expresan AQP2, provoca la translocación del TRPV4 a la membrana celular. Los microtúbulos tendrían un rol fundamental en este proceso. Este mecanismo de inserción en membrana como parte de la activación luego de un estímulo sería una característica común de los TRPs (Cayoutte y Boulay, 2007) manteniendo una interacción con citoesqueleto de tubulina en este proceso (Goswami y Hucho, 2008).

4.1.2. Participación de la AQP2 y el TRPV4 en la activación de una CCE.

El proceso de inserción de un canal de calcio en la membrana, luego de la estimulación, es uno de los mecanismos propuestos en la activación de una vía de entrada de calcio capacitativa (CCE) (Ver Cap. 2 2.1.1). Algunos de los canales de la familia TRPC han mostrado ser esenciales para la activación de estos mecanismos de entrada (Ng y col, 2009; Jardín y col, 2008). En esta tesis mostramos que tanto las células WT-RCCD₁ como las AQP2- RCCD₁, tienen la maquinaria adecuada para producir una vía de entrada CCE pero solo puede ser activada por hipotonía en las células que expresan AQP2. **Por lo tanto proponemos que el TRPV4 en presencia de la AQP2, podría formar parte de una vía de entrada CCE.**

Conocer en detalle si el canal efectivamente produce su activación a través de la inserción en un proceso gatillado por el vaciamiento de los depósitos, contribuiría a entender los distintos mecanismos de activación de este canal en condiciones fisiológicas y patofisiológicas vinculadas a la regulación de volumen.

4.1.3. Participación de la asociación funcional entre AQP2 y TRPV4 en la activación de mecanismos rápidos de RVD

El mecanismo propuesto de asociación funcional entre el TRPV4 y la AQP2, sería fundamental para provocar la rápida activación de mecanismos de RVD en las células RCCD₁. Los mecanismos efectores activados, si bien no fueron estudiados en esta tesis, involucrarían canales de K⁺ sensibles a calcio, probablemente los canales BK y SK, presentes en el CCD (Liu y col, 2007). El acoplamiento funcional entre la activación del TRPV4 y la salida de potasio por el BK ha sido propuesto en células epiteliales (Arniges y col 2004; Fernández-Fernández y col, 2008).

Se ha reportado que en células renales que expresan AQP2 el *swelling* induce la exocitosis de vesículas que contienen canales que tendrían una función en el RVD, como el ICln en células de túbulo colector (Tamma, y col 2007b). En concordancia, nosotros mostramos que el RVD activado por AQP2 se gatilla al ponerse en marcha un proceso de inserción de vesículas específicas en la membrana que contienen TRPV4, mecanismo que asegura la entrada de calcio y por lo tanto la activación de la salida de potasio.

4.1.4. Modelo hipotético propuesto para explicar el rol de la AQP2 en la activación del RVD

En las células que expresan AQP2, a diferencia de lo que ocurre en las células WT-RCCD₁, la hipotonía produce un rápido *swelling* que es fundamental para activar una entrada de calcio necesaria para los mecanismos de RVD. En el capítulo 3 mostramos que en presencia de un gradiente hiposmótico, las células WT-RCCD₁, son capaces de producir un aumento del calcio intracelular cuando se las incubaba previamente con 5',6'-EET. Este resultado junto con datos de la bibliografía que informan que ante estímulos mecánicos los EETs facilitarían el tráfico de TRPV4 a la membrana (Loot y col, 2008) nos llevan a hipotetizar que

la presencia de la AQP2 en la membrana de las células del CCD podría activar la síntesis de estos metabolitos. Esta activación de la cascada del AA se iniciaría con un incremento en la actividad enzimática de la PLA2, sugiriendo un vínculo entre la actividad enzimática de la PLA2 y la AQP2. Si bien la PLA2 se ha postulado como una enzima mecanosensora su vinculación con las acuaporinas no ha sido reportada (Lehtonen y Kinnunen, 1995). Por otra parte recientemente se demostró que la activación de TRPV4 por EETs es sensibilizada con IP3 y que este proceso dependería de la unión del IP3R a una región carboxi-terminal del TRPV4 de unión a calmodulina (Fernades y col, 2008; Garcia-Elías y col 2008).

A partir de lo expuesto, podemos proponer un modelo general que se esquematiza en la Figura 4.1. Se muestran las células AQP2-RCCD₁ en condiciones de iso e hiposmolaridad. El estímulo hipotónico en presencia de la AQP2 en las células del CCD produce el vaciamiento de los depósitos intracelulares y la activación de la PLA2. La activación de esta enzima lleva a la síntesis del AA. El AA además de producir metabolitos como el 5'-6' EET podría también ocasionar la depleción de los reservorios. El EET participaría principalmente en la inserción del TRPV4 en la membrana en un proceso dependiente de microtúbulos. Adicionalmente podría existir una participación del IP3 en el mecanismo de activación por EETs, incluyendo la activación de la PLC. En conjunto se activaría una CCE que garantiza la entrada de calcio por TRPV4 y la activación de los mecanismos rápidos de RVD (canales de K⁺ dependientes de calcio, CFTR).

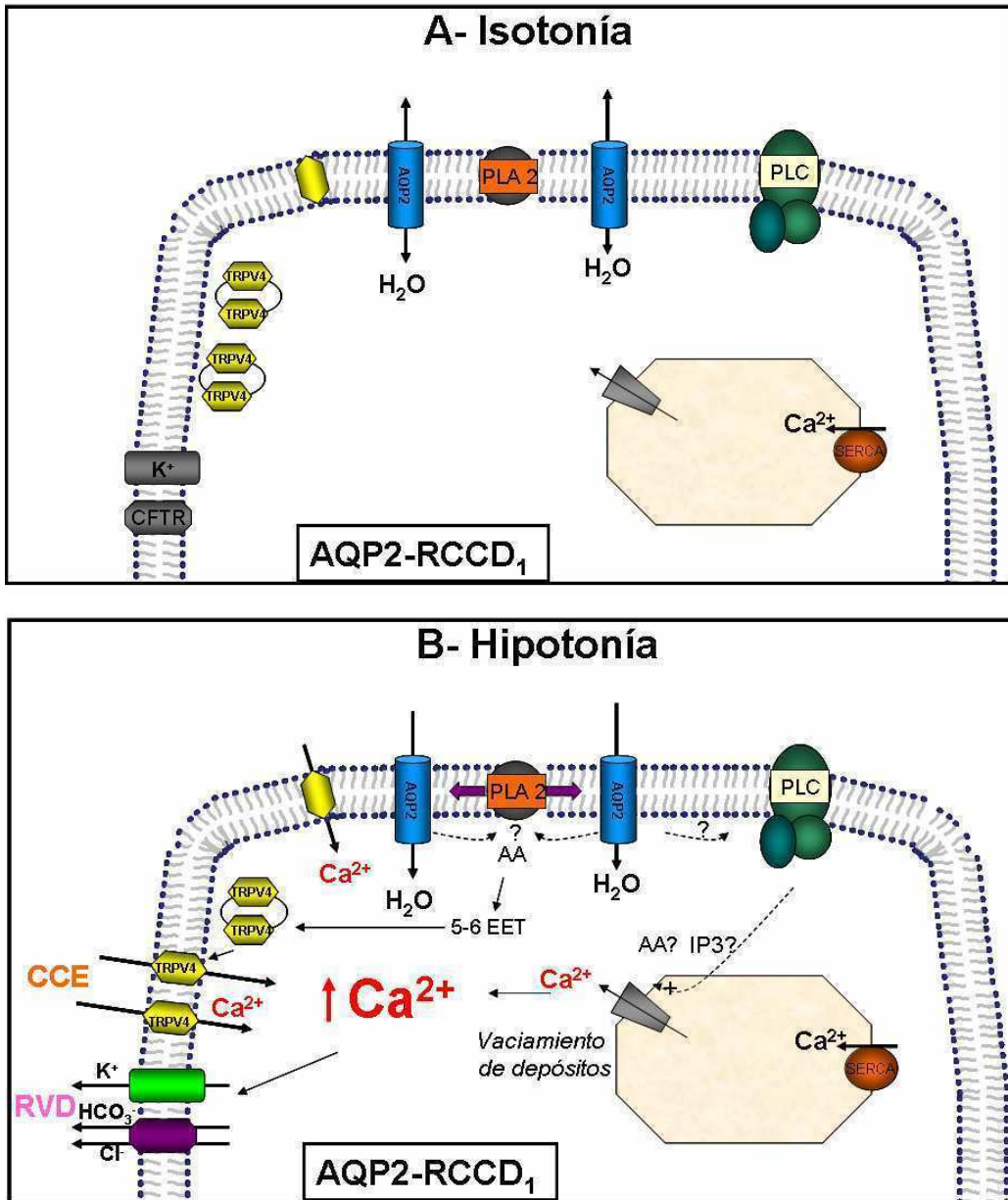


Figura 4.1: Modelo hipotético propuesto de la participación de la asociación funcional entre la AQP2 y el TRPV4 en la entrada de calcio por hipotonía y en el RVD. A: Células AQP2-RCCD₁ en condiciones de isosmolaridad. B: Células AQP2-RCCD₁ en condiciones de hiposmolaridad.

4.2 Perspectivas

Comprobar el modelo hipotético propuesto en el punto anterior permitiría profundizar aún más el conocimiento que tenemos sobre la AQP2 y su rol en procesos celulares que impliquen cambios de volumen. La participación de las

AQPs en el osmosensado a través de la activación de enzimas fosfolipasas, implicaría novedosos mecanismos de acción de las acuaporinas más allá del transporte de agua. Si bien los resultados de EETs son preliminares, abren una perspectiva muy interesante ya que son algunos de los metabolitos que están siendo reconocidos como principales reguladores de la función renal y cardíaca pudiendo tener propiedades pro o antihipertensivas.

Para determinar la vinculación entre la AQP2 y la síntesis de EETs se podrían realizar ensayos enzimáticos realizando mediciones de síntesis de ácido araquidónico en presencia de un swelling osmótico en ambas líneas celulares. Otra estrategia que se podría utilizar para investigar el rol de la PLA2 en el proceso de osmosensado de la AQP2 sería utilizar inhibidores específicos de esta enzima y realizar mediciones de calcio intracelular, de regulación de volumen y estudiar la localización subcelular del TRPV4 en estas condiciones en las células AQP2-RCCD₁. También se podría ensayar, con una estrategia similar, la participación de otras fosfolipasas como la PLC en este proceso.

En las células renales de CCD de ratón, el TRPV4 ha sido propuesto como sensor del flujo y también se lo ha sugerido como parte de un componente de un sensor de osmolaridad, ya que la respuesta a la hipotonía es abolida tras silenciar el TRPV4 (Wu y col, 2007). La interacción funcional encontrada entre TRPV4 y AQP2 en respuesta a *swelling* en esta tesis podría también ser extensiva al estímulo de *shear stress* que ocurre en el CCD y lleva al aumento de la secreción de K⁺ por una vía dependiente de TRPV4 a la membrana.

Sería también muy interesante estudiar la expresión y localización del TRPV4 en la membrana de túbulos nativos y tratados con AVP o en ratas sometidas a deshidratación (garantizando la presencia de AQP2 en la membrana). Es importante destacar el rol que se les ha dado en forma independiente tanto a la AQP2 como al TRPV4 en el mantenimiento de la osmolaridad sistémica por lo cual no es desatinado pensar que exista alguna interacción funcional entre ambas proteínas, como hemos mostrado en esta tesis.

Anexo Metodológico

Medición de cambios de volumen celular por fluorescencia en monocapas de células RCCD₁

A diferencia de lo que ocurre en muchas células crecidas en forma aislada que presentan una forma esférica, las células RCCD₁ cultivadas en cubreobjetos y crecidas en monocapas confluentes tienen una morfología semejante a una campana (Figura 2.6 A, Cap. 2). Al registrar los cambios de volumen luego de un shock hipotónico en una pequeña región (pinhole) en el centro (C) o en la periferia (P) de estas células, el comportamiento resultará diferente. Mientras que en la P, los cambios de fluorescencia (F) siempre se muestran proporcionales al incremento de volumen, su respuesta es variable en C (Figura 2.6 B). Esta no varía en diferentes condiciones de carga de los fluoróforos (BCECF o Calceína) utilizados en las células RCCD₁, por lo que el efecto observado no se debería a fenómenos de autoextinción como ha sido descrito en otras células epiteliales (Hamman y col, 2002).

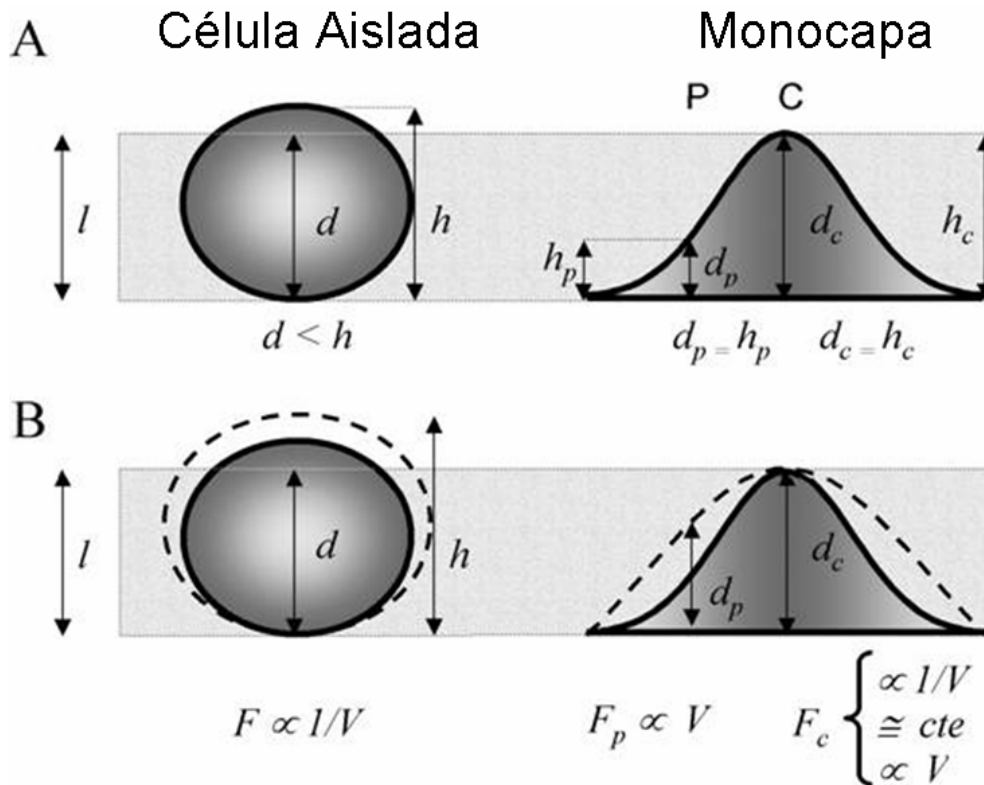


Figura 1. Parámetros geométricos involucrados en los cambios de volumen al utilizar técnicas de videomicroscopía de fluorescencia. Representación esquemática de una célula aislada y en monocapa cuando es tratada con una solución **A:** isosmótica y **B:** hiposmótica. l altura en la cual la luz emitida es colectada por el microscopio; d , camino óptico; h , altura celular; C área

central; P , area periférica; h_P , altura de las célula en P ; d_P , camino óptico en P , h_C , altura de las células en C ; F_P intensidad de fluorescencia registrada en P , d_C , camino óptico en C ; F_C intensidad de fluorescencia registrada en C .

Una de las limitaciones del uso de técnicas de videomicroscopía de fluorescencia para la medición de cambios de volumen celular es que se colecta luz emitida desde una capa comparable con la altura de las células (Zelenina y Brismar, 2000). Para resolver esta limitación se debe tener en cuenta la geometría del sistema (Figura 1). Tendremos en cuenta 3 parámetros: la altura de la capa en la cual la luz emitida es colectada (l), el camino óptico (d) y la altura de la célula (h). Como describe la ley de Lambert Beer, F resulta proporcional a d y a la concentración de fluoróforo (c) $F \propto c \cdot d$

En el caso de células esféricas aisladas h excede l , y por lo tanto d siempre es igual a l . Si un shock hipotónico es aplicado, el valor del camino óptico se mantiene constante. (Figura 1). Por lo tanto F resulta inversamente proporcional al volumen celular, ya que sólo c es variable como fue reportado (Muallem y col, 1992; Crowe y col, 1995, Pafundo y col, 2004).

Cuando se utilizan monocapas, la situación es diferente. En los experimentos realizados en esta tesis, la fluorescencia de las células $RCCD_1$ tiene una distribución en forma de campana, que se corresponde con una mayor altura en el centro que en la periferia ($h_C > h_P$, Figura 1.A). El camino óptico en P (d_P) es siempre menor que l y se modifica significativamente cuando se aplica un shock osmótico (Figura 1. B). En consecuencia, si los cambios en d_P son mucho mayores que los cambios en la concentración de fluoróforo, F resultará directamente proporcional al volumen celular. En las monocapas de $RCCD_1$, las diferencias entre las regiones analizadas (C y P) puede ser explicada por el hecho de que las células pueden incrementar su altura en P mucho mas que en C ante un shock hipotónico.

El modelo presentado fue propuesto en un trabajo de nuestro grupo previo al desarrollo de esta tesis (Ford y col, 2005). En resumen, en las células $RCCD_1$, es la altura de las células más que la autoextinción de fluorescencia, lo que vincula la relación observada entre la fluorescencia y los cambios de volumen. La relación lineal entre la fluorescencia relativa (F_t/F_0) y la osmolaridad relativa externa (OsM_0/OsM_t) valida esta técnica (Figura 2.6 D, Cap. 2). Adicionalmente los valores de P_{osm} reportados para las células en dicho trabajo y en esta tesis (Figura 2.13) son similares a muchos de los reportes de P_{osm} en células renales obtenidos con diferentes técnicas.

Bibliografía

Agre, P. y Kozono, D. (2003). Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases, *FEBS Letters* 555, 72-78.

Agre, P., King, L. S., Yasui, M., Guggino, W. B., Ottersen, O. P., Fujiyoshi, Y., Engel, A., Nielsen, S. (2002) Aquaporin water channels: from atomic structure to clinical medicine, *The Journal of Physiology* 542, 3-16.

Alessandri-Haber N, Dina OA, Chen X, Levine JD. (2009). TRPC1 and TRPC6 channels cooperate with TRPV4 to mediate mechanical hyperalgesia and nociceptor sensitization . *J Neurosci.* 29, 6217-28.

Alvarez-Leefmans F., Altamirano J., Crowe W. (1995). Use of ion-selective Microelectrodes and fluorescent probes to measure cell volume, *Meth. Neuroscience* 27, 361-391.

Alvarez-Leefmans, F., Altamirano, J., Crowe, W. (1997). Measurement of volume changes in single cells with fluorescent probes, *Axobits* 20, 10-13.

Alvarez-Leefmans, F., Herrera-Pérez, J. J., Márquez, M. S., Blanco, V. M. (2006). Simultaneous measurement of water volume and pH in single cells using BCECF and fluorescence imaging microscopy, *Biophysical journal* 90, 608-18.

Andrade, Y. N., Fernandes, J., Vázquez, E., Fernández-Fernández, J. M., Arniges, M., Sánchez, T. M., Villalón, M., Valverde, M. A. (2005). TRPV4 channel is involved in the coupling of fluid viscosity changes to epithelial ciliary activity, *The Journal of cell biology* 168, 869-74.

Andrews, S., Reichow, S.L., Gonen, T. (2008). Electron crystallography of aquaporins. *IUBMB Life*, 60, 430-6.

Ankorina-Stark, I., Haxelmans, S., Hirsch, J.R., Lohrmann, E., Schlatter, E. (1997). Ca²⁺ Entry in Isolated Rat Cortical Collecting Duct Is pH- and Voltage-Sensitive, *Cell Physiol Biochem.* 7, 333-344.

Anthony, T., Brooks, H., Boassa, D., Leonov, S., Yanochko, G., Regan, J., Yool, A. (2000). Cloned human aquaporin-1 is a cyclic GMP-gated ion channel, *Molecular Pharmacology* 57, 576.

Arniges, M., Vázquez, E., Fernández-Fernández J., Valverde M. (2004). Swelling-activated Ca²⁺ entry via TRPV4 channel is defective in cystic fibrosis airway epithelia, *J Biol Chem.* 279, 54062-8.

Beck, J.S., Breton, S., Laprade, R., Giebisch, G. (1991). Volume regulation and intracellular calcium in the rabbit proximal convoluted tubule, *Am.J.Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 260, F861-F867.

- Becker, D., Bereiter-Hahn, J., Jendrach, M. (2009). Functional interaction of the cation channel transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) and actin in volume regulation, *Eur. J cell boil.* 88, 141-52.
- Becker, D., Blase, C., Bereiter-Hahn, J., Jendrach, M. (2005). TRPV4 exhibits a functional role in cell-volume regulation, *Journal of cell Science* 118, 2435-40.
- Becker, D., Müller, M., Leuner, K., Jendrach, M. (2008). The C-terminal domain of TRPV4 is essential for plasma membrane localization, *Molecular Membrane Biology* 25, 139-51.
- Benfenati, V., Nicchia, G. P., Svelto, M., Rapisarda, C., Frigeri, A., and Ferroni, S. (2007). Functional down-regulation of volume-regulated anion channels in AQP4 knockdown cultured rat cortical astrocytes, *Journal of neurochemistry* 100, 87-104.
- Bertrand, C. A., and Frizzell, R. A. (2003). The role of regulated CFTR trafficking in epithelial secretion, *Am J Physiol . Cell physiol* 285, C1-18.
- Best L, Sheader EA, Brown PD. (1996). A volume-activated anion conductance in insulin-secreting cells, *Pflugers Arch* 431, 363-370.
- Birder L.A., Nakamura Y, Kiss S., Nealen M.L., Barrick S., Kanai A.J., Wang E., Ruiz G., de Groat W., Apodaca G., Watkins S., Caterina M.J (2002). Altered bladder function in mice lacking the vanilloid receptor TRPV1, *Nat Neurosci* 5, 856-860.
- Blot-Chabaud, M., Laplace, M., Cluzeaud, F., Capurro, C., Cassingéna, R., Vandewalle, a., Farman, N., Bonvalet, J. P. (1996). Characteristics of a rat cortical collecting duct cell line that maintains high transepithelial resistance, *Kidney Int* 50, 367-76.
- Bradbury, N. A., Jilling, T., Berta, G., Sorscher, E. J., Bridges, R. J., Kirk, K. L. (1992). Regulation of plasma membrane recycling by CFTR, *Science* 256, 530-532.
- Braunstein, G. M., Roman, R. M., Clancy, J. P., Kudlow, B. a., Taylor, a. L., Shylonsky, V. G., Jovov, B., Peter, K., Jilling, T., Ismailov, I. I., Benos, D. J., Schwiebert, L. M., Fitz, J. G., Schwiebert, E. M. (2001). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator facilitates ATP release by stimulating a separate ATP release channel for autocrine control of cell volume regulation, *J.Biol.Chem* 276, 6621-30.
- Bucheimer, R. E. y Linden, J. (2004). Purinergic regulation of epithelial transport, *The Journal of physiology* 555, 311-21.
- Burg, M.B. (2000). Macromolecular crowding as a cell volume sensor, *Cell Physiol Biochem.*10, 251-6.

- Callies, C., Cooper, T., Yeung, CH. (2008). Channels for water influx and efflux involved in volume regulation of murine spermatozoa, *Reproduction*.136, 401-10.
- Capurro, C., Ford, P., Ibarra, C., Ripoche, P., Parisi, M. (1994). Water permeability properties of the ovarian oocytes from *Bufo arenarum* and *Xenopus laevis*: a comparative study, *J. Membr. Biol.*138,151-7.
- Capurro, C., Galizia, L., Ford P. (2008). Cell volume regulation and aquaporins, *Physiological Mini-Reviews*, 4, 9-17.
- Capurro, C., Rivarola, V., Kierbel, A., Escoubet, B., Farman, N., Blot-Chabaud, M., Parisi, M. (2001). Vasopressin regulates water flow in a rat cortical collecting duct cell line not containing known aquaporins, *J Membr Biol.* 179, 63-70.
- Capurro, C., y Parisi, M. (1992). Water handling in the rat jejunum: effects of acidification of the medium, *Pflugers Archivs.* 421,17-21.
- Cayouette, S. y Boulay, G. (2007). Intracellular trafficking of TRP channels., *Cell calcium* 42, 225-32.
- Chara, O., Ford, P., Rivarola, V., Parisi, M., Capurro, C. (2005). Asymmetry in the osmotic response of a rat cortical collecting duct cell line: role of aquaporin-2, *J Membr.Biol.* 207, 143-50.
- Cho, W. K., Siegrist, V. J., Zinzow, W. (2004). Impaired regulatory volume decrease in freshly isolated cholangiocytes from cystic fibrosis mice: implications for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator effect on potassium conductance, *J.Biol.Chem.* 279, 14610-8.
- Chung, M. K., Lee, H., Caterina, M. J. (2003). Warm temperatures activate TRPV4 in mouse 308 keratinocytes, *J.Biol.Chem.* 278, 32037-32046.
- Coakley, R. D., Grubb, B. R., Paradiso, A. M., Gatzky, J. T., Johnson, L. G., Kreda, S. M., O'Neal, W. K., Boucher, R. C. (2003). Abnormal surface liquid pH regulation by cultured cystic fibrosis bronchial epithelium, *PNAS* 100, 16083-8.
- Cohen, D. M. (2005). TRPV4 and the mammalian kidney, *Pflügers Archiv.* 451, 168-75.
- Cooper, G. y Boron, W. (1998). Effect of PCMBs on CO₂ permeability of *Xenopus* oocytes expressing aquaporin 1 or its C189S mutant, *Am J. Physiol.* 275, C1481-C1486.
- Courtois-Coutry, N., Le Moellic, C., Boulkroun, S., Fay, M., Cluzeaud, F., Escoubet, B., Farman, N., Blot-Chabaud, M. (2002). Calcyclin is an early vasopressin-induced gene in the renal collecting duct. Role in the long term regulation of ion transport, *J.Biol.Chem* 277, 25728-34.

- Crowe, W.E., Altamirano, J., Huerto L., Alvarez-Leefmans FJ. (1995). Volume changes in single N1E-115 neuroblastoma cells measured with a fluorescent probe, *Neuroscience* 69, 283–296.
- Cuajungco, M. P., Grimm, C., Oshima, K., D'hoedt, D., Nilius, B., Mensenkamp, A. R., Bindels, R. J., Plomann, M., Heller, S. (2006). PACSINs bind to the TRPV4 cation channel. PACSIN 3 modulates the subcellular localization of TRPV4, *J.Biol.Chem* 281, 18753-62.
- Delany, N., Hurle, M., Facer, P., Alnadaf, T., Plumpton, C., Kinghorn, .I, See, C., Costigan, M., Anand P., Woolf, C., Crowther, D, Sanseau P, Tate, SN. (2001). Identification and characterization of a novel human vanilloid receptor-like protein, VRL-2, *Physiol Genomics*. 4, 165-74.
- D'hoedt, D., Owsianik, G., Prenen, J., Cuajungco, M. P., Grimm, C., Heller, S., Voets, T., Gasthuisberg, C., Nilius (2008). Stimulus-specific modulation of the cation channel TRPV4 by PACSIN 3, *J.Biol.Chem*. 283, 6272-80.
- Dibas, A., Yang, M.H., Bobich, J., and Yorio, T. (2007). Stress-induced changes in neuronal Aquaporin-9 (AQP9) in a retinal ganglion cell-line. *Pharmacol Res*. 55, 378-384.
- Djelidi, S., Fay, M., Cluzeaud, F., Escoubet, B., Eugene, E., Capurro, C., Bonvalet, J. P., Farman, N., and Blot-Chabaud, M. (1997). Transcriptional regulation of sodium transport by vasopressin in renal cells, *J.Biol.Chem*. 272, 32919-24.
- Djelidi, S., Fay, M., Cluzeaud, F., Thomas-Soumarmon, A., Bonvalet, J. P., Farman, N., and Blot-Chabaud, M. (1999). Vasopressin stimulates long-term net chloride secretion in cortical collecting duct cells, *FEBS letters*. 460, 533-8.
- Earley, S., Heppner, T. J., Nelson, M. T., and Brayden, J. E. (2005). TRPV4 forms a novel Ca²⁺ signaling complex with ryanodine receptors and BKCa channels., *Circulation research* 97, 1270-9.
- Ebner, H. L., Cordas, A., Pafundo, D. E., Schwarzbaum, P. J., Pelster, B., and Krumschnabel, G. (2005). Importance of cytoskeletal elements in volume regulatory responses of trout hepatocytes, *Am J Physiol . Reg.Int.Comp. Physiol*. 289, R877-90.
- Elliott A. C. (2001). Recent developments in non-excitabile cell calcium entry, *Cell Calcium*. 30, 73-93.
- Escobar, E., Ibarra, C., Todisco, E., Parisi M. (1990). Water and ion handling in the rat cecum, *Am. J. Physiol*. 259, G786-G791.

Everaerts, W., Nilius, B., and Owsianik, G. (2009). The vallinoid transient receptor potential channel Trpv4: From structure to disease, *Progress in biophysics and molecular biology* 1-15.

Feng, N., Lee, H., Shiang, J., Ma, M. (2008). Transient receptor potential vanilloid type 1 channels act as mechanoreceptors and cause substance P release and sensory activation in rat kidneys, *Am J Physiol Renal Physiol* 294, F316-25.

Fernandes, J., Lorenzo, I. M., Andrade, Y. N., Garcia-Elias, A., Serra, S. A., Fernández-Fernández, J. M., Valverde, M. A. (2008). IP3 sensitizes TRPV4 channel to the mechano- and osmotransducing messenger 5'-6'-epoxyeicosatrienoic acid, *The Journal of cell biology* 181, 143-55.

Fernández-Fernández, J. M., Andrade, Y. N., Arniges, M., Fernandes, J., Plata, C., Rubio-Moscardo, F., Vázquez, E., and Valverde, M. (2008). Functional coupling of TRPV4 cationic channel and large conductance, calcium-dependent potassium channel in human bronchial epithelial cell lines, *Pflügers Archiv* 457, 149-59.

Figarella, K., LeFurgey, A., Uzcategui, N. L., Zhou, Y., Ouellette, M., Bhattacharjee, H., and Mukhopadhyay, R. (2007). Biochemical characterization of *Leishmania major* aquaglyceroporin LmAQP1: possible role in volume regulation and osmotaxis, *Molecular microbiology* 65, 1006-17.

Finkelstein, A. (1987). Water movement through lipid bilayers, pores, and plasma membranes, Wiley & sons. New York.

Flamenco, P., Galizia, L., Rivarola, V., Fernandez, J., Ford, P., and Capurro, C. (2009). Role of AQP2 during apoptosis in cortical collecting duct cells, *Biology of the cell* 101, 237-50.

Fleming, I., Rueben, A., Popp, R., Fisslthaler, B., Schrodtt, S., Sander, A., Haendeler, J., Falck, J. R., Morisseau, C., Hammock, B. D., and Busse, R. (2007). Epoxyeicosatrienoic acids regulate Trp channel dependent Ca²⁺ signaling and hyperpolarization in endothelial cells, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27, 2612-8.

Ford, P., Rivarola, V., Chara, O., Blot-Chabaud, M., Cluzeaud, F., Farman, N., Parisi, M., and Capurro, C. (2005). Volume regulation in cortical collecting duct cells: role of AQP2, *Biology of the cell* 97, 687-97.

Ford, P., Rivarola, V., Kierbel, A., Chara, O., Blot-Chabaud, M., Farman, N., Parisi, M., and Capurro, C. (2002). Differential role of Na⁺/H⁺ exchange isoforms NHE-1 and NHE-2 in a rat cortical collecting duct cell line, *J.Membr.Biol.* 190, 117-25.

- Fushimi, K. (1999). Aquaporin-2 vasopressin water channel, *Clinical and Experimental Nephrology* 3, 154-158.
- Gao, X., Wu, L., O'neil, R. G. (2003). Temperature-modulated diversity of TRPV4 channel gating: activation by physical stresses and phorbol ester derivatives through protein kinase C-dependent and -independent pathways, *J.Biol.Chem.* 278, 27129-27137.
- Garcia-Elias, A., Lorenzo, I. M., Valverde, M. (2008). IP3 receptor binds to and sensitizes TRPV4 channel to osmotic stimuli via a calmodulin-binding site, *J.Biol. Chem* 283, 31284-8.
- Giamarchi, A., Padilla, F., Coste, B., Raoux, M., Crest, M., Honoré, E., Delmas, P. (2006). The versatile nature of the calcium-permeable cation channel TRPP2, *EMBO.* 7, 787-93.
- Goel, M., Sinkins, W. G., Zuo, C., Hopfer, U., Schilling, W. P. (2007). Vasopressin-induced membrane trafficking of TRPC3 and AQP2 channels in cells of the rat renal collecting duct, *Am. J. Physiol. Renal Physiology* 293, F1476-88.
- Goswami, C. y Hucho, T. (2008). Submembraneous microtubule cytoskeleton: biochemical and functional interplay of TRP channels with the cytoskeleton, *The FEBS Journal* 275, 4684-99.
- Grimm C, Kraft R, Sauerbruch S, Schultz G, Harteneck C. (2003). Molecular and functional characterization of the melastatin-related cation channel TRPM3, *J Biol Chem.* 278, 21493-501.
- Grunnet, M., Jespersen, T., Macaulay, N., MacAulay, N., Jørgensen, N. K., Schmitt, N., Pongs, O., Olesen, S., Klaerke, D. A. (2003). KCNQ1 channels sense small changes in cell volume, *The Journal of physiology* 549, 419-27.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties, *J. Biol. Chem* 260, 3440-50.
- Güler, A. D., Lee, H., Iida, T., Shimizu, I., Tominaga, M., Caterina, M. (2002). Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4, *J.Neurosci.* 22, 6408-6414.
- Hallows, R. H., Knauf, P. A. (1995). Principles of cell volume regulation. *In Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation* (Kevin Strange, ed) 3-29, CRC Press.
- Hamann, S., Kiilgaard, J. F., Litman, T., Alvarez-Leefmans, F. J., Winther, B. R., Zeuthen, T. (2002). Measurement of Cell Volume Changes by Fluorescence Self-Quenching, *Journal of fluorescence* 12, 139-145.

- Hansen, A., Galtung, H. K. (2007). Aquaporin expression and cell volume regulation in the SV40 immortalized rat submandibular acinar cell line, *Pflügers Archiv: European journal of physiology* 453, 787-96.
- Hara-Chikuma, M., y Verkman, A. S. (2007). Aquaporin-3 facilitates epidermal cell migration and proliferation during wound healing, *Journal of Mol. Med* .86, 221-231.
- Herrmann, H., Bär, H., Kreplak, L., Strelkov, S.V., Aebi U. (2007). Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics, *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8, 562-73.
- Hill, A. E., Shachar-Hill, B., Shachar-Hill, Y. (2004). What are aquaporins for?, *J Membr Biol*. 7, 1-32.
- Hirsch J., Leipziger J., Frobe U, Schlatter E. (1993). Regulation and possible physiological role of the Ca²⁺-dependent K⁺ channel of cortical collecting ducts of the rat, *Pflugers Arch*. 442,492-498.
- Hoffmann, E. K., Lambert, I. A., Pedersen, S. F. (2009). Physiology of Cell Volume Regulation in Vertebrates, *Signal Transduction* , 193-277.
- Hoffmann, E.K. (2000). Intracellular signalling involved in volume regulatory decrease, *Cell Physiol Biochem*. 10(5-6):273-88.
- Hoffmann, E.K. y Dunham P.B. (1995). Membrane mechanisms and intracellular signalling in cell volume regulation, *Int Rev Cytol*. 161,173-262.
- Holz, R., Finkelstein, A. (1970). The Water and Nonelectrolyte Permeability Induced in Thin Lipid Membranes by the Polyene Antibiotics Nystatin and Amphotericin B. *J Gen Physiol* 56: 125-145.
- Hu, J. y Verkman, A.S. (2006). Increased migration and metastatic potential of tumor cells expressing aquaporin water channels. *FASEB J*. 20,1892-4.
- Jakab, M., Furst, J., Gschwentner, M., Botta, G., Garavaglia, M. L., Bazzini, C., Rodighiero, S., Meyer, G., Eichmueller, S., Woll, E., Chwatal, S., Ritter, M., Paulmichl, M. (2002). Mechanisms sensing and modulating signals arising from cell swelling, *Cell Physiol Biochem*. 12, 235-258.
- Jardín, I., Redondo, P.C., Salido, G.M., Rosado, J.A. (2008). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate enhances store-operated calcium entry through hTRPC6 channel in human platelets. *Biochim Biophys Acta*. 1783, 84-97.
- Jian, M., King, J. A., Al-Mehdi, A., Liedtke, W., Townsley, M. I. (2008). High vascular pressure-induced lung injury requires P450 epoxygenase-dependent

activation of TRPV4, *American journal of respiratory cell and molecular biology* 38, 386-92.

Kida, H., Miyoshi, T., Manabe, K., Takahashi, N., Konno, T., Ueda, S., Chiba, T., Shimizu, T., Okada, Y., Morishima, S. (2005). Roles of aquaporin-3 water channels in volume-regulatory water flow in a human epithelial cell line, *J.Membr.Biol.*208, 5-64.

King, L.S., Kozono, D., Agre, P. (2004). From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology, *Nat.Rev.Mol.Cell.Biol.* 5, 687-698.

Krane, C. M., Melvin, J. E., Nguyen, H. V., Richardson, L., Towne, J. E., Doetschman, T., Menon, A. G. (2001). Salivary acinar cells from aquaporin 5-deficient mice have decreased membrane water permeability and altered cell volume regulation, *J.Biol.Chem.* 276, 23413-20.

Kuang, K., Yiming, M., Wen, Q., Li, Y., Ma, L., Iserovich, P., Verkman, A. S., Fischbarg, J. (2004). Fluid transport across cultured layers of corneal endothelium from aquaporin-1 null mice, *Exp eye res.* 78, 791-8.

Kunzelmann, K. (1999). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and its function in epithelial transport, *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol* 137, 1-70.

Kunzelmann, K. (2001). CFTR: interacting with everything?, *News Physiol Sci.* 16, 167-170.

Lang, F., Busch, G., Ritter, M., Volkl, H., Waldegger, S., Gulbins, E., Haussinger, D. (1998). Functional significance of cell volume regulatory mechanisms, *Physiological reviews.* 78, 247.

Lang, F., Foller, M., Lang, K., Lang, P., Ritter, M., Vereninov, A., Szabo, I., Mhuber, S., y Gulbins, E. (2007). Cell Volume Regulatory Ion Channels in Cell Proliferation and Cell Death, *Methods in Enzymology* 428, 209-225.

Lehtonen, J.Y., Kinnunen, P.K. (1995). Phospholipase A2 as a mechanosensor, *Biophys J.* 68, 1888-94.

Leipzig, J. (2003). Control of epithelial transport via luminal P2 receptors., *Am J Physiol . Renal physiology* 284, F419-32.

Liedtke, (2006). Transient receptor potential vanilloid channels functioning in transduction of osmotic stimuli, *J Endocrinol.* 191, 515-23.

Liedtke, W. (2005). TRPV4 as osmosensor: a transgenic approach, *Pflügers Archiv* 451, 176-80.

Liedtke, W., Choe, Y., Marti-Renom, M. A., Bell, A. M., Denis, C. S., Sali, A., Hudspeth, A. J., Friedman, J. M., Heller, S. (2000). Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor, *Cell* 103, 525-535.

Liedtke, W., y Kim, C. (2005). Functionality of the TRPV subfamily of TRP ion channels: add mechano-TRP and osmo-TRP to the lexicon!, *CMLS* 62, 2985-3001.

Liu, W., Morimoto, T., Woda, C., Kleyman, T. R., Satlin, L. M. (2007). Ca²⁺ dependence of flow-stimulated K secretion in the mammalian cortical collecting duct, *Am J. Physiol . Renal physiology* 293, F227-35.

Liu, X., Bandyopadhyay, B. C., Bandyopadhyay, B., Nakamoto, T., Singh, B., Liedtke, W., Melvin, J. E., Ambudkar, I. (2006). A role for AQP5 in activation of TRPV4 by hypotonicity: concerted involvement of AQP5 and TRPV4 in regulation of cell volume recovery, *J.Biol.Chem* 281, 15485-95.

Liu, Z., Shen, J., Carbrey, J. M., Mukhopadhyay, R., Agre, P., Rosen, B. P. (2002). Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9, *PNAS* 99, 6053-8.

Loo, D.F., Zeuthen, T., Chandy, G., Wright E.M. (1996). Cotransport of water by the Na⁺/glucose cotransporter, *PNAS*. 93:13367-13370.

Loot, A. E., Popp, R., Fisslthaler, B., Vriens, J., Nilius, B., Fleming, I. (2008). Role of cytochrome P450-dependent transient receptor potential V4 activation in flow-induced vasodilatation, *Cardiovascular research* 80, 445-52.

MacLeod, R. J. (1994). How an epithelial cell swells is a determinant of the signaling pathways that activate RVD, In *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation* (Kevin Strange, ed) 191-200.

Maroto, R., Raso, A., Wood, T.G., Kurosky, A., Martinac, B., Hamill, O.P. (2005). TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells, *Nat Cell Biol.* 7,179-85.

McCarty, N. A. y O'Neil, R. G. (1992). Calcium signaling in cell volume regulation., *Physiological reviews*,72, 1037-61.

Mederos y Schnitzler, M., Storch, U., Meibers, S., Nurwakagari, P., Breit, A., Essin, K., Gollasch, M., Gudermann, T. (2008). Gq-coupled receptors as mechanosensors mediating myogenic vasoconstriction, *The EMBO journal* 27, 3092-103.

Minton, A.P. (1993). Macromolecular crowding and molecular recognition, *J Mol Recognit.* 6, 211-4.

Missiaen, L., Robberecht, W., van den Bosch, L., Callewaert, G., Parys, J.B., Wuytack F., Raeymaekers L., Nilius, B., Eggermont J., De Smedt, H. (2000). Abnormal intracellular Ca^{2+} homeostasis and disease, *Cell Calcium*. 28, 1-21.

Montalbetti, N., Li, Q., González-Perrett, S., Semprine, J., Chen, X., Cantiello, H. F. (2005). Effect of hydro-osmotic pressure on polycystin-2 channel function in the human syncytiotrophoblast, *Pflügers Archiv* 451, 294-303.

Morris, C.E. (1990). Mechanosensitive ion channels, *Membr.Biol.*113,93-107.

Muallem, S., Zhang, B. X., Loessberg, P. a., Star, R. A. (1992). Simultaneous recording of cell volume changes and intracellular pH or Ca^{2+} concentration in single osteosarcoma cells UMR-106-01, *J.Biol.Chem* 267, 17658-64.

Munaron, L., Antoniotti, S., Lovisolò, D. (2004). Intracellular calcium signals and control of cell proliferation: how many mechanisms?, *J.Cell.Mol.Med* 8, 161-8.

Muraki, K., Iwata, Y., Katanosaka, Y., Ito, T., Ohya, S., Shigekawa, M., Imaizumi, Y. (2003). TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes, *Circ. Res.* 93, 829-38.

Naftalin, R.J., Triphati, S. (1986). The roles of paracellular and transcellular pathways and submucosal space in isotonic water absorption by rabbit ileum, *J. Physiol.* 370: 409-432.

Nakhoul, N. L., Hering-Smith, K. S., Abdulnour-Nakhoul, S. M., Hamm, L. L. (2001). Transport of NH_3/NH_4^+ in oocytes expressing aquaporin-1, *Am J Physiol . Renal physiol.* 281, F255-63.

Németh-Cahalan, K. L., and Hall, J. E. (2000). pH and calcium regulate the water permeability of aquaporin 0, *J.Biol.Chem* 275, 6777-82.

Németh-Cahalan, K. L., Kalman, K., and Hall, J. E. (2004). Molecular basis of pH and Ca^{2+} regulation of aquaporin water permeability, *J.Gen.Physiol.* 123, 573-80.

Ng, L.C., McCormack, M.D., Airey, J.A., Singer C.A., Keller, P.S., Shen, X.M., Hume, J.R. (2009). TRPC1 and STIM1 mediate capacitative Ca^{2+} entry in mouse pulmonary arterial smooth muscle cells, *J Physiol.* 587, 2429-42.

Nilius, B. (2007). TRP channels in disease, *Biochim Biophys Acta.* 1772, 805-12.

Noda, Y., Sasaki, S. (2006). Regulation of aquaporin-2 trafficking and its binding protein complex, *Biochimica et Biophysica Acta* 1758, 1117-25.

Novak, I. (2003). ATP as a signaling molecule: the exocrine focus, *News in physiological sciences* 18, 12-7.

Numata, T., Shimizu, T., Okada, Y. (2007). TRPM7 is a stretch- and swelling-activated cation channel involved in volume regulation in human epithelial cells, *Am J Physiol. Cell physiol.* 292, C460-7.

Okada, Y., Maeno, E., Shimizu, T., Dezaki, K., Wang, J., Morishima, S. (2001). Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD), *J Physiol.* 532,3-16.

O'Neil, R. G., Brown, R. C. (2003). The vanilloid receptor family of calcium permeable channels: molecular integrators of microenvironmental stimuli, *News Physiol Sci.* 18, 226-231.

Pafundo, D. E., Chara, O., Faillace, M. P., Krumschnabel, G., Schwarzbaum, P. J. (2008). Kinetics of ATP release and cell volume regulation of hyposmotically challenged goldfish hepatocytes, *Am J Physiol . Reg. Int. Comp. Physiol.* 294, R220-230.

Pafundo, D. E., Mut, P., Pérez Recalde, M., González-Lebrero, R. M., Fachino, V., Krumschnabel, G., Schwarzbaum, P. J. (2004). Effects of extracellular nucleotides and their hydrolysis products on regulatory volume decrease of trout hepatocytes, *Am J Physiol . Reg. Int. Comp. Physiol.* 287, R833-43.

Pan, Z., Yang, H., Mergler, S., Liu, H., Tachado, S. D., Zhang, F., Kao, W. W., Koziel, H., Pleyer, U., Reinach, P. S. (2008). Dependence of regulatory volume decrease on transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) expression in human corneal epithelial cells, *Cell calcium* 44, 374-85.

Parisi, M. e Ibarra, C. (1996). Aquaporins and water transfer across epithelial barriers. *Braz J Med Biol Res.* 29,933-9.

Parisi, M., Bourguet, J. (1983). The single file hypothesis and the water channels induced by antidiuretic hormone, *J Membr Biol.* 71, 189-93.

Park, M., Ko, S.B., Choi, J.Y., Muallem, G., Thomas, P.J., Pushkin, A., Lee, M.S., Kim, J.Y., Lee, M.G., Muallem, S. (2002). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator interacts with and regulates the activity of the HCO₃⁻-salvage transporter human Na⁺/HCO₃⁻ cotransport isoform 3, *J. Biol. Chem.* 277, 50503–50509.

Parker, J.C., Dunham, P.B., Minton, A.P. (1995). Effects of ionic strength on the regulation of Na/H exchange and K-Cl cotransport in dog red blood cells, *J Gen Physiol.* 105,677-99.

Pasantes-Morales, H., Lezama, R. A., Ramos-Mandujano, G., and Tuz, K. L. (2006). Mechanisms of cell volume regulation in hypo-osmolality, *The American journal of medicine* 119, S4-11.

- Pedersen SF y Nilius, B. (2007). Transient Receptor Potential Channels in Mechanosensing and Cell Volume Regulation, *Methods Enzymol.* 428,183-207.
- Pedersen, S. F., Owsianik, G., Nilius, B. (2005). TRP channels: an overview, *Cell Calcium* 38, 233-252.
- Peters, K. W., Qi, J., Johnson, J. P., Watkins, S. C., Frizzell, R. A. (2001). Role of snare proteins in CFTR and ENaC trafficking, *Pflügers Archiv* : 443, S65-9.
- Phan, M.N., Leddy, H.A., Votta, B.J., Kumar, S., Levy, D.S., Lipshutz, D.B., Lee, S.H., Liedtke, W., Guilak, F. (2009). Functional characterization of TRPV4 as an osmotically sensitive ion channel in porcine articular chondrocytes, *Arthritis Rheum.* 60,3028-37.
- Plant, T.D. y Strotmann R. (2007). TRPV4, *Handb Exp Pharmacol.*179,189-205.
- Preston, G.M., Carroll T.P., Guggino W.B., Agre, P. (1992). Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein, *Science.* 256,385-7.
- Putney JW Jr. (2001). Pharmacology of capacitative calcium entry. *Mol Interv.* 1, 4-94.
- Putney, J.W. Jr, Broad, L. , Braun, F. , Lievremont, J., Bird G.S. (2001). Mechanisms of capacitative calcium entry, *J Cell Sci.*114,2223-9.
- Reiter, B., Kraft, R., Günzel, D., Zeissig, S., Schulzke, J., Fromm, M., Harteneck, C. (2006). TRPV4-mediated regulation of epithelial permeability. *FASEB J*: 20, 1802-12.
- Rivarola, V., Ford, P., Chara, O., Parisi, M., Capurro, C. (2005). Functional and Molecular Adaptation of Cl⁻/HCO₃⁻ Exchanger to Chronic Alkaline Media in Renal Cells, *Cell.Physiol.Biochem.* 0503, 271-280.
- Rivarola, V., Ford, P., Flamenco, M. P., Galizia, L., Capurro, C. (2007). Arginine-Vasopressin Modulates Intracellular pH via V1 and V2 Receptors in Renal Collecting Duct Cells, *Cell Physiol Biochem* 0503, 549-558.
- Saadoun, S., Papadopoulos, M. C., Watanabe, H., Yan, D., Manley, G. T., Verkman, A. S. (2005). Involvement of aquaporin-4 in astroglial cell migration and glial scar formation, *J Cell Sci.* 118, 5691-8.
- Schafer J.A., Hawk, C.T. (1992). Regulation of Na⁺ channels in the cortical collecting duct by AVP and mineralocorticoids, *Kidney Int.* 41, 255-6.
- Schreiber, R., Boucherot, A., Mürle, B., Sun, J., Kunzelmann, K. (2004). Control of epithelial ion transport by Cl⁻ and PDZ proteins., *J Membr Biol.* 199, 85-98.

- Schwiebert, E. M., Egan, M. E., Hwang, T. H., Fulmer, S. B., Allen, S. S., Cutting, G. R., Guggino, W. B. (1995). CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. *Cell* 81, 1063-1073.
- Shigematsu, H., Sokabe, T., Danev, R., Tominaga, M., Nagayama, K. (2009). A 3.5-nm structure of rat TRPV4 cation channel revealed by zernike phase-contrast cryo-EM., *J.Biol.Chem* doi/10.1074/jbc.M109.090712.
- Simons, K., van Meer, G. (1988). Lipid sorting in epithelial cells, *Biochemistry*. 27, 6197-6202.
- Solenov, E., Watanabe, H., Manley, G. T., Verkman, A. S. (2007). Sevenfold-reduced osmotic water permeability in primary astrocyte cultures from AQP-4-deficient mice, measured by a fluorescence quenching method, *Am J Physiol . Cell physiol*. 286, C426-32.
- Spassova, M. A., Hewavitharana, T., Xu, W., Soboloff, J., Gill, D. L. (2006). A common mechanism underlies stretch activation receptor activation of TRPC6 channels, *PNAS* 103, 16586-91.
- Stamer, W.D., Peppel, K., O'Donnell, M.E., Roberts, B.C., Wu, F. Epstein, D.L. (2001). Expression of aquaporin-1 in human trabecular meshwork cells: role in resting cell volume, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42: 1803-1811.
- Storm, R., Klussmann, E., Geelhaar, A., Rosenthal, W., Maric K. (2003). Osmolality and solute composition are strong regulators of AQP2 expression in renal principal cells, *Am J Physiol Renal Physiol*. 284, F189-98.
- Strange, K. (2004). Cellular volume homeostasis, *Advances in physiology education* 28, 155-9.
- Strotmann, R., Harteneck, C., Nunnenmacher, K., Schultz, G., Plant, T. D. (2000). OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity, *Nat.Cell Biol.* 2, 695-702.
- Suzuki, M., Hirao, A., Mizuno, A. (2003 b). Microtubule-associated protein 7 increases the membrane expression of transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4), *J Biol Chem*. 278, 51448-53.
- Suzuki, M., Mizuno, A., Kodaira, K., Imai, M. (2003 a). Impaired pressure sensation in mice lacking TRPV4, *J.Biol.Chem*. 278, 22664-22668.
- Tamma, G., Procino, G., Strafino, A., Bononi, E., Meyer, G., Paulmichl, M., Formoso V., Svelto, M., Valenti, G. (2007b). Hypotonicity induces aquaporin-2 internalization and cytosol-to-membrane translocation of ICln in renal cells, *Endocrinology*. 148,1118-30.

- Tamma, G., Procino, G., Svelto, M., Valenti, G. (2007). Hypotonicity causes actin reorganization and recruitment of the actin-binding ERM protein moesin in membrane protrusions in collecting duct principal cells, *Am J Physiol . Cell physiology* 292, C1476-84.
- Taniguchi, J., Tsuruoka, S., Mizuno, A., Sato, J., Fujimura, A., Suzuki, M. (2007). TRPV4 as a flow sensor in flow-dependent K⁺ secretion from the cortical collecting duct, *Am J Physiol Renal physiол.* 292, F667-73.
- Thastrup, O., Cullen, P. J., Drøbak, B. K., Hanley, M. R., Dawson, a. P. (1990). Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase, *PNAS* 87, 2466-70.
- Tian, W., Salanova, M., Xu, H., Lindsley, J. N., Oyama, T. T., Anderson, S., Bachmann, S., Cohen, D. M. (2004). Renal expression of osmotically responsive cation channel TRPV4 is restricted to water-impermeant nephron segments, *Am J Physiol . Renal Physiology* 287, F17-24.
- Tinel, H., Kinne-Saffran, E., Kinne, R. H. (2002). Calcium-induced calcium release participates in cell volume regulation of rabbit TALH cells, *Pflügers Archiv* 443, 754-61.
- Tinel, H., Kinne-saffran, E., Kinne, R. K. (2000). Cellular Physiology and Biochemistry, *Cell.Physiol.Biochem.* 297-302.
- Tsien, R. Y. (1981). A non disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells, *Nature* 290,527-528.
- Urbach, V., Leguen, I., O'Kelly, I., Harvey, B. J. (1999). Mechanosensitive calcium entry and mobilization in renal A6 cells, *J.Membr.Biol.* 168, 29-37.
- Vázquez, E., Nobles, M., Valverde, M. A. (2001). Defective regulatory volume decrease in human cystic fibrosis tracheal cells because of altered regulation of intermediate conductance Ca²⁺-dependent potassium channels, *PNAS* 98, 5329-34.
- Verkman, A. S. (2002). Does aquaporin-1 pass gas? An opposing view, *The Journal of Physiology* 542, 31-31.
- Verkman, A. S. (2005). More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins, *Journal of cell science* 118, 3225-32.
- Verkman, A. S., y Mitra, A. K. (2000). Structure and function of aquaporin water channels, *Am J Physiol Renal physiology* 278, F13-28.

- Verkman, A. S., Zhang R.B. (1991). Water and urea permeability properties of *Xenopus* oocytes: expression of mRNA from toad urinary bladder, *Am J Physiol.* 260, 26-34.
- Voets T, Talavera K, Owsianik G, Nilius B (2005). Sensing with TRP channels, *Nat Chem Biol.*1, 85-92.
- Voets, T., Prenen, J., Vriens, J., Watanabe, H., Janssens, A., Wissenbach, U., Bodding, M., Droogmans, G., Nilius, B. (2002). Molecular determinants of permeation through the cation channel TRPV4, *J Biol Chem.* 3, 33704-33710.
- Vriens J, Appendino G, Nilius B. (2009). Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels, *Mol Pharmacol.*75,1262-79.
- Vriens J, Owsianik G, Janssens A, Voets T, Nilius B. (2007). Determinants of 4 alpha-phorbol sensitivity in transmembrane domains 3 and 4 of the cation channel TRPV4, *J Biol Chem.* 282, 12796-803.
- Vriens, J., Watanabe, H., Janssens, A., Droogmans, G., Voets, T., Nilius, B. (2004). Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4, *PNAS* 101, 396-401.
- Watanabe, H., Vriens, J., Prenen, J., Droogmans, G., Voets, T., Nilius, B. (2003). Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels, *Nature* 424, 434-438.
- Watanabe, H., Vriens, J., Suh, S. H., Benham, C. D., Droogmans, G., Nilius, B. (2002). Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells, *J.Biol.Chem.* 277, 47044-47051.
- Wegierski, T., Hill, K., Schaefer, M., Walz, G. (2006). The HECT ubiquitin ligase AIP4 regulates the cell surface expression of select TRP channels, *EMBO* 25, 5659-5669.
- Wehner, F. (1998). Cell volume-regulated cation channels, *Contrib Nephrol*,123,8-20.
- Wehner, F., Olsen, H., Tinel, H., Kinne-Saffran, E., Kinne, R. K. (2003). Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction, *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* 148, 1-80.
- Wehner, F., Sauer, H., Kinne, R. K. (1995). Hypertonic stress increases the Na⁺ conductance of rat hepatocytes in primary culture, *The Journal of general physiology* 105, 507-35.
- Weiss, T. (1996). Cellular Biophysics, Massachusetts Institute of Technology.

- Wheat, V. J., Shumaker, H., Burnham, C., Shull, G. E., R, J., Kolls, J. K., Yankaskas, J. R., Soleimani, M., J, V., Burn, C. (2001). CFTR induces the expression of DRA along with Cl⁻ / HCO₃⁻ exchange activity in tracheal epithelial cells CFTR induces the expression of DRA along with Cl⁻/HCO₃⁻ exchange activity in tracheal epithelial cells, *J.Biol.Chem.* 62-71.
- Whittembury, G., Paz Alliaga, A., Biondi, A., Carpi-Medina, P., Gonzalez, E., Linares H., (1985). Pathways for volume flow and volume regulation in leaky epithelia *Pflugers Archiv* 405: 517-522.
- Wissenbach, U., Bodding, M., Freichel, M., Flockerzi, V. (2000). Trp12, a novel Trp related protein from kidney, *FEBS Lett.* 485, 127-134.
- Woda, C. B., Leite, M., Rohatgi, R., Satlin, L. M. (2002). Effects of luminal flow and nucleotides on [Ca(2+)](i) in rabbit cortical collecting duct, *Am JPhysiol, Renal physiol.* 283, F437-46.
- Wu, L., Gao, X., Brown, R. C., Heller, S., O'Neil, R. G. (2007). Dual role of the TRPV4 channel as a sensor of flow and osmolality in renal epithelial cells, *Am J Physiol. Renal physiol* 293, F1699-713.
- Xu, F., Satoh, E., Iijima, T. (2003). Protein kinase C-mediated Ca²⁺ entry in HEK 293 cells transiently expressing human TRPV4, *British journal of pharmacology* 140, 413-21.
- Yamamoto, T., Sasaki, S. (1998). Aquaporins in the kidney: emerging new aspects, *Kidney Int.* 54:1041-1051.
- Yano, M., Marinelli, R. a., Roberts, S. K., Balan, V., Pham, L., Tarara, J. E., de Groen, P. C., LaRusso, N. F. (1996). Rat hepatocytes transport water mainly via a non-channel-mediated pathway, *J.Biol.Chem* 271, 6702-7.
- Yasui, M. (2004). Molecular mechanisms and drug development in aquaporin water channel diseases: Structure and function of aquaporins, *J. Pharmacol. Sci.* 96,260-263.
- Zelenina, M. y Brismar, H. (2000). Osmotic water permeability measurements using confocal laser scanning microscopy, *European Biophysics Journal.* 29, 165-171.
- Zeuthen, T. (2002). General models for water transport across leaky epithelia, *Int. Rev. Cit.* 215,285-319.
- Zhang, R. y Verkman A.S. (1991). Water and urea permeability properties of Xenopus oocytes: expression of mRNA from toad urinary bladder, *Am J Physiol Cell Physiol* 260: C26-C34.

Zhang, X., Chen, J., Faltynek, C. R., Moreland, R. B., Neelands, T. R. (2008). Transient receptor potential A1 mediates an osmotically activated ion channel, *The European journal of neuroscience* 27, 605-11.

Zitt, C., Halaszovich C.R., Lückhoff, A. (2002). The TRP family of cation channels: probing and advancing the concepts on receptor-activated calcium entry, *Prog Neurobiol.* 66, 243-64.