

R.10974

T 886

Universidad de Sevilla
Facultad de Farmacia

**INTERCAMBIADORES IÓNICOS EN ENTEROCITOS DE
POLLO**

Tesis presentada para optar al grado de Doctor en Farmacia por la
Universidad de Sevilla por:
M^a Mercedes Cano Rodriguez

DIRECTORA:
Dra. M^a Anunciación A. Ilundáin Larrañeta



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FISILOGIA Y BIOLOGIA ANIMAL

C/. TRAMONTANA, S/N.

41012 - SEVILLA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

SECRETARÍA GENERAL

Quedan registradas esta Tesis Doctoral
al folio 45 número 196 del libro
correspondiente.

Sevilla,

El Jefe del Negociado de Tesis,

Rosa Raffelt

Dña ANUNCIACIÓN A. ILUNDÁIN LARRAÑETA, Catedrática de
Fisiología de la facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla

CERTIFICA:

Que Doña María Mercedes Cano Rodriguez, Licenciada en Farmacia, ha
realizado la tesis que lleva por título: INTERCAMBIADORES IÓNICOS EN
ENTEROCITOS DE POLLO, para optar al título de Doctor, bajo su dirección
en el departamento de Fisiología y Biología Animal de la Universidad de
Sevilla.

Para que conste donde proceda se expide el presente certificado en Sevilla a
cinco de Abril de mil novecientos noventa y cinco.

Anunciación A. Ilundáin Larrañeta

Fdo.: Anunciación A. Ilundáin Larrañeta

Este trabajo ha sido realizado con una beca de la Junta de Andalucía (ayuda de Consolidación de Grupos de Investigación y Desarrollo Tecnológico). El Proyecto de Investigación, PB89-0616, ha sido financiado por la Dirección General de Investigación Científica y Técnica (DGICYT).

A mis padres y hermanos.

A Roberto.

Agradezco a Ana Ilundáin, mi Directora de Tesis, su gran ayuda y valiosa orientación. A todos mis compañeros del Departamento su apoyo y amistad, ya que de una forma u otra, han hecho posible que este trabajo sea una realidad. Especialmente mi agradecimiento a Antonio Ayala de quien he aprendido muchas cosas, pero sobre todo por su amistad.

Asimismo extender mi agradecimiento a otros Departamentos como el de Bioquímica de la Facultad de Farmacia y el de Genética de la Facultad de Biología. Y a la Dra. S. Shirazi-Beechey del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Gales en Aberystwyth, donde se hicieron las determinaciones inmunológicas de los transportadores de azúcares.

De los resultados de este trabajo se han obtenido las siguientes publicaciones:

M. Cano, C.M. Vázquez and A. Ilundáin. Chloride transport in brush-border membrane vesicles from chick jejunum. *Pflügers Archives European Journal of Physiology*, 425: 395-400, 1993.

M. Cano, A. Ilundáin. Kinetics of the chloride-anion exchanger of brush-border membrane vesicles isolated from chicken jejunum. *Biochim. Biophys. Acta*, 1193, 138-142, 1994.

M. I. Ferrero, M. Cano and A. Ilunáin. (1994) $\text{Na}^+\text{-H}^+$ exchange activity in brush border membrane vesicles isolated from chick small intestine. *Biochim. Biophys. Acta*. (en prensa).

ABREVIATURAS

BBMV; Brush-border membrane vesicle.

BLMV; Basolateral membrane vesicle.

DMSO; Dimetilsulfóxido.

CCCP; carbonil cianida m-clorofenilhidrazona.

H₂ DIDS; ácido 4,4'-diisotiocianatodihidroestilbeno-2,2'-disulfónico.

HEPES; ácido N-[2-Hidroxietilpiperacina-N'-[2-etanosulfónico].

MES; ácido 2-[N-Morfolino]etanosulfónico.

SITS; ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico.

PMSF; fenilmetilsulfonilfluor.

PABA; ácido p-amino benzóico.

TRIS; Tris-hidroximetil-aminometano.

DCCD; N,N'- dicitclohexilcarbodiimida.

NEM; N-etilmaleimida.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
TRANSPORTADORES IÓNICOS DE MEMBRANA Y REGULACIÓN DEL pH	3
Intercambiador $\text{Na}^+\text{-H}^+$	4
Intercambiador $\text{Cl}^-\text{-HCO}_3^-$ dependiente de Na^+	14
Intercambiador $\text{Cl}^-\text{-HCO}_3^-$ independiente de Na^+	15
Cotransportador $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$	19
Bombas de H^+	22
TRANSPORTE TRANSEPITELIAL DE IONES EN EL INTESTINO	25
REGULACIÓN DEL VOLUMEN CELULAR	30
OBJETIVO DEL TRABAJO	33
MATERIALES Y MÉTODOS	35
ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	37
REACTIVOS	37
SOLUCIONES SALINAS	38
MARCADORES RADIOACTIVOS	40
MÉTODO DE OBTENCIÓN DE VESÍCULAS DE MEMBRANA APICAL DE ENTEROCITOS DE POLLO	40

Método de doble precipitación con magnesio (Método I)	40
Método de simple precipitación con magnesio (Método II)	43
MÉTODO DE OBTENCIÓN DE VESÍCULAS DE LA MEMBRANA BASOLATERAL	46
Preparación de los gradientes de sorbitol	49
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS	51
VALORACION VALORACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	52
Valoración de la actividad Sacarasa	52
Valoración de la actividad Na ⁺ -K ⁺ ATPasa	55
Valoración de la actividad K ⁺ -para-nitrofenil fosfatasa sensible a ouabaína	57
Valoración de la actividad Citrato Sintasa	58
VALORACION DEL TRANSPORTE DE SOLUTOS POR LAS VESÍCULAS DE MEMBRANA	60
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	62
RESULTADOS	63
PUREZA DE LAS PREPARACIONES DE LAS VESÍCULAS DE MEMBRANA DE BORDE EN CEPILLO Y BASOLATERAL DE ENTEROCITOS DE POLLO	65
<i>Transporte de azúcares acoplado al Na⁺</i>	67
<i>Transporte de azúcares por difusión facilitada</i>	68
Características de las vesículas de membrana apical (BBMV)	69
Características de las vesículas de membrana basolateral (BLMV)	75
TRANSPORTE DE Cl ⁻ EN VESÍCULAS DE MEMBRANA APICAL DE LOS ENTEROCITOS DE POLLO	81
Efecto de la osmolaridad sobre el transporte de cloruro	85
Efecto de los derivados de estilbeno sobre el transporte de cloruro dependiente de gradiente de pH	88

Efecto del bicarbonato sobre la entrada de cloruro a las vesículas de membrana apical	92
Efecto de diversos aniones sobre el transporte de cloruro dependiente de gradiente de pH en vesículas de la membrana apical	95
Efecto de aniones en el medio extravésicular sobre la entrada de cloruro a vesículas de la membrana apical	98
Entrada de $^{36}\text{Cl}^-$ a las vesículas en función de la concentración externa de cloruro	101
Actividad del intercambiador Cl^- -anion y pH intravesicular	107
Efecto del gradiente de K^+ sobre la entrada de cloruro independiente de pH	110
TRANSPORTE DE Na^+ EN VESÍCULAS DE MEMBRANA APICAL DE LOS ENTEROCITOS DE POLLO	115
Efecto de la osmolaridad sobre la entrada de Na^+	115
Entrada de Na^+ a las vesículas de la membrana apical y gradiente de pH	117
Efecto de la amilorida sobre el transporte de Na^+ en vesículas de la membrana apical	120
Velocidad de entrada de Na^+ a las vesículas de la membrana apical y concentración extravésicular del catión	123
Velocidad de entrada de Na^+ a vesículas de membrana apical y pH intravesicular	127
DISCUSIÓN	131
Aislamiento de vesículas	133
Intercambiador Cl^- /Base	137
Intercambiador Na^+/H^+	145
CONCLUSIONES	151
BIBLIOGRAFÍA	157

INTRODUCCIÓN

Los transportadores iónicos de la membrana plasmática son proteínas integrales que regulan diversas funciones celulares, como la composición iónica, el volumen y el pH intracelular (pH_i). En células epiteliales, además, estos sistemas de transporte llevan a cabo el movimiento transepitelial de electrolitos.

SISTEMAS DE TRANSPORTE IÓNICO DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA Y REGULACIÓN DEL pH_i .

Los procesos celulares presentan una marcada sensibilidad al pH, por lo que el pH intracelular (pH_i) debe mantenerse dentro de unos límites muy estrechos (Madshus, 1988; Frelin *et al.*, 1988; Ilundáin, 1992). En todos los tipos celulares estudiados hasta el momento, a excepción de los glóbulos rojos, el pH citosólico es más alcalino del que cabría esperar si los H^+ y el HCO_3^- se distribuyeran pasivamente a través de la membrana plasmática, lo que indica que el pH_i está regulado.

En términos generales las células presentan dos tipos de mecanismos para regular el pH_i . A corto plazo, la regulación depende de los tampones intracelulares, la denominada capacidad amortiguadora, que es reversible, de

capacidad limitada y solo es capaz de minimizar los cambios en el pH_i . A largo plazo, la regulación se debe a sistemas de transporte localizados en la membrana plasmática que llevan a cabo un flujo neto de protones (Roos y Boron, 1981; Madshus, 1988; Ilundáin, 1992).

Los transportadores iónicos implicados en la regulación del pH_i se dividen en dos grandes grupos: los independientes de bicarbonato y los dependientes de bicarbonato. Entre los primeros están el intercambiador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ y las bombas de protones y entre los dependientes de bicarbonato están el intercambiador $\text{Cl}^-\text{-HCO}_3^-$ independiente de Na^+ , el intercambiador $\text{Cl}^-\text{-HCO}_3^-$ dependiente de Na^+ y el cotransportador $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$.

Intercambiador $\text{Na}^+\text{-H}^+$

El intercambiador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ es una proteína integral de membrana que media el intercambio electroneutro de un Na^+ y un H^+ . En condiciones fisiológicas, la dirección del intercambio está determinada por la dirección del gradiente electroquímico del Na^+ , mantenido a su vez por la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa. En consecuencia el intercambiador funciona entrando el Na^+ a las células y sacando el H^+ . Es por tanto un mecanismo alcalinizante.

El intercambiador es inhibido reversiblemente por altas concentraciones de amilorida y por bajas concentraciones de sus derivados como la etil isopropil amilorida (EIPA) (Vigne *et al.*, 1983; L'Allemain *et al.*, 1984). Ambos inhibidores compiten con el Na^+ extracelular por el lugar externo de unión al transportador (Haggerty *et al.*, 1985).

Aunque en condiciones fisiológicas el "lugar" extracelular del transportador está saturado por el Na^+ externo, la relación entre su actividad y la

concentración del Na^+ extracelular sigue una cinética tipo Michaelis-Menten (Aronson, 1985; Calonge e Ilundáin, 1990; Knickelbein *et al.*, 1990a). Por otro lado, la velocidad del intercambiador aumenta al disminuir la concentración intracelular de Na^+ (Hoffman y Simonsen, 1989). La actividad del intercambiador se inhibe cuando disminuye el pH extracelular (Aronson, 1985; Vaughan-Jones, 1990; Boron, 1992;) debido a que los H^+ externos compiten con el Na^+ . Además del Na^+ , el intercambiador puede transportar Li^+ y NH_4^+ , aunque con menor afinidad (Aronson, 1985).

En 1982, Aronson *et al.* demostraron que el intercambiador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ localizado en la membrana apical del epitelio renal presenta en el lado citosólico al menos dos lugares de unión para el H^+ . Uno de ellos transporta el H^+ a través de la membrana en intercambio con el Na^+ y el otro regula alostéricamente la actividad del intercambiador. De este modo, a valores de pH_i fisiológicos, el intercambiador es poco activo o no funcional, aumentando su actividad alostéricamente al disminuir el pH_i por debajo de cierto valor umbral. Dada esta particularidad el intercambiador protege a las células de una excesiva acidificación o alcalinización citosólica. Un comportamiento similar se ha observado en otros tipos celulares (Aronson, 1982; Frelin *et al.*, 1988; Calonge e Ilundáin, 1990; Calonge *et al.*, 1993). Por el contrario, el intercambiador apical y el basolateral del fleón de conejo (Knickelbein *et al.*, 1990) y el apical de colon distal de rata (Rajendran *et al.*, 1990) no presentan regulación alostérica por el protón intracelular.

La identificación del intercambiador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ se basa en su dependencia del Na^+ , electroneutralidad e inhibición por la amilorida y los análogos de ésta. Inicialmente fue descrito por Murer *et al.* (1976) en el borde apical de las células del epitelio intestinal y renal, pero está ampliamente distribuido en

células procariotas y eucariotas (Frelin *et al.*, 1988; Madshus, 1988; Ilundáin, 1992).

El intercambiador interviene en la homeostasis celular por regular diversos parámetros y procesos celulares, como son el pH, el volumen, iniciación del crecimiento, respuestas metabólicas y el transporte transepitelial de sal y agua (Hoffmann y Simonsen, 1989; Roos y Boron, 1981; Clark y Limbird, 1991). Se ha sugerido que el intercambiador mantiene un microclima ácido en la membrana apical del intestino, regulando de esta manera la absorción intestinal de sustratos cuyo transporte está acoplado al gradiente de protones, como es el caso del transporte de dipéptidos (Calonge *et al.*, 1989).

Estudios farmacológicos, inmunológicos y cinéticos han revelado que hay múltiples isoformas del intercambiador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ y que en una misma célula, concretamente las epiteliales, pueden coexistir más de una isoforma. En el epitelio intestinal y renal estas isoformas exhiben diferencias en cuanto a su localización (en la membrana apical y en la basolateral), sensibilidad a la inhibición por la amilorida o análogos, activación por protones y especificidad inmunológica (Clark y Limbird, 1991). Así, la isoforma basolateral del epitelio del ileon de conejo (Knickelbein, 1990a) y de las células LLC-PK₁/C₁₄ (Haggerty *et al.*, 1988a) es más sensible a la amilorida y a la EIPA que la apical.

También presentan diferente regulación por hormonas, neurotransmisores y segundos mensajeros (Clark y Limbird, 1991). La isoforma basolateral de la línea celular LLC-PK₁ (Casavola *et al.*, 1989) es activada por los ésteres de forbol, que mimetizan la acción del diacilglicerol sobre la proteína cinasa C, mientras que su actividad no es modificada por el

AMPC. En cambio la isoforma apical de esa misma línea celular se inhibe por los ésteres de forbol, por la proteína cinasa A y en el epitelio renal de conejo, además, por la cinasa dependiente de la calmodulina (Weinman *et al.*, 1987, 1988a, 1988b).

Ambas isoformas, apical y basolateral, tienen diferente control genético. Haggerty *et al.* (1988b) obtuvieron mutantes de la línea celular LLC-PK₁ que o bien sobreexpresaban la isoforma apical, manteniendo niveles normales de la basolateral, o bien expresaban con valores normales la isoforma apical pero carecían de la basolateral.

En 1989, Sardet *et al.* clonaron un cDNA que codifica el intercambiador Na⁺-H⁺ humano. Este cDNA codifica una proteína de 894 a.a. que se denominó NHE-1 (Na, H, exchanger). La secuencia de aminoácidos no muestra analogía con ninguna otra proteína, ni con el intercambiador Na⁺-H⁺ de bacterias (Fliegel y Fröhlich, 1993). En la actualidad se conocen 4 isoformas del intercambiador Na⁺-H⁺ (NHE) denominadas NHE-1 hasta 4 según el orden de aparición (Tabla 1). De todas ellas, la NHE-1 es la más sensible a la amilorida y sus análogos y la menos sensible es la NHE-4.

Tabla 1. Isoformas del intercambiador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ en mamíferos

Isoforma	Especie	LOCALIZACIÓN	Referencia
NHE-1	hombre	ubicua	Sardet <i>et al.</i> , 1989 Tse <i>et al.</i> , 1991a Reilly <i>et al.</i> , 1991 Orlowski <i>et al.</i> , 1992 Fliegel y Fröhlich, 1993
	conejo	ubicua	
	cerdo	células LLC-PK ₁	
	rata	ubicua	
	hamster	células CCL39	
NHE-2	conejo	intestino, riñón, glándulas suprarrenales, etc.	Tse <i>et al.</i> , 1993
	rata	intestino, estómago,	Wang <i>et al.</i> , 1993; Collins <i>et al.</i> , 1993
	hombre	intestino	Yun <i>et al.</i> , 1995
NHE-3	conejo	riñón, parte del intestino	Tse <i>et al.</i> , 1992 Orlowski <i>et al.</i> , 1992 Soleimani <i>et al.</i> , 1994a Yun <i>et al.</i> , 1995
	rata	riñón, intestino, estómago	
	perro	riñón	
	hombre	intestino	
NHE-4	rata	estómago, intestino, riñón, etc.	Orlowski <i>et al.</i> , 1992

La isoforma NHE-1 se ha encontrado en todas las células en las que se ha estudiado su presencia (Yun *et al.*, 1995). Estudios inmunológicos, con anticuerpos que reconocen una determinada secuencia de aminoácidos de la NHE-1 humana, han revelado que en las células del epitelio intestinal (Tse *et al.*, 1991) y renal (Biemesderfer *et al.*, 1992) y en la línea celular de origen renal LLC-PK₁ (Reilly *et al.*, 1991), esta isoforma se localiza en la membrana basolateral. En el epitelio de la placenta humana, en cambio, la NHE-1 se localiza en la membrana apical (Kulanthaivel *et al.*, 1992) y está ausente en los segmentos corticales S₁ y S₂ del túbulo proximal de rata (Krapf y Solioz, 1991).

Tse *et al.* (1991) aislaron del epitelio de íleon del conejo un cDNA que codifica una isoforma del intercambiador Na⁺-H⁺ de baja sensibilidad a la EIPA, denominada NHE-2. Esta isoforma se expresa en la membrana apical de las células epiteliales del yeyuno de rata, de conejo y de hombre, y de corteza renal de conejo, pero no en la membrana basolateral (Yun *et al.*, 1995). Recientemente se ha descrito que la isoforma NHE-2 está localizada en la membrana basolateral de la línea celular de riñón IMCD-3 (Soleimani *et al.*, 1994b).

En 1992, Tse *et al.* clonaron el cDNA que codifica una tercera isoforma del intercambiador humano, la NHE-3. Se expresa en la membrana apical de las células epiteliales del túbulo proximal de riñón de conejo (Biemesderfer *et al.*, 1993), del yeyuno, íleon, colon ascendente y descendente y recto humanos, del yeyuno e íleon de conejo (Yun *et al.*, 1995) y en la médula renal de conejo y perro (Soleimani *et al.*, 1994a).

Orlowski en 1992 clonó el cDNA que codifica la isoforma NHE-4. Está presente en el estómago y en menor cantidad en el útero, cerebro, riñón, músculo esquelético e intestino delgado de rata (Orlowski *et al.*, 1992). Estudios inmunológicos han revelado que en túbulos medulares internos de rata la isoforma NHE-4 está en la membrana basolateral (Yun *et al.*, 1995).

Los glóbulos rojos de trucha expresan otra isoforma del intercambiador $\text{Na}^+\text{-H}^+$, la βNHE que se activa por la proteína cinasa A (Yun *et al.*, 1995) y por la proteína cinasa C (Yun *et al.*, 1995, Borgese *et al.*, 1992).

El significado fisiológico de la familia de isoformas del intercambiador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ puede estar relacionado con sus múltiples funciones. En las células polarizadas se ha sugerido que la isoforma basolateral (NHE-1) estaría implicada en la regulación del pH_i y del volumen celular (Biemesderfer *et al.*, 1992), mientras que la apical (NHE-2 y/o NHE-3) acoplada al intercambiador $\text{Cl}^-/\text{bicarbonato}$, llevaría a cabo la absorción de sal (Tse *et al.*, 1993; Yun *et al.*, 1993; Soleimani *et al.*, 1994a). Así, la isoforma NHE-3 del tracto gastrointestinal del conejo se expresa en aquellas zonas en donde tiene lugar la absorción electroneutra de NaCl , esto es en el yeyuno, íleon y colon ascendente, pero está ausente en el duodeno y colon descendente donde no ocurre absorción electroneutra de NaCl (Tse *et al.*, 1992). Se especula que la isoforma NHE-4 puede jugar un papel suplementario en la regulación del volumen celular (Bookstein *et al.*, 1994).

La actividad de las diferentes isoformas, expresadas en líneas celulares de fibroblastos, se modifica por factores de crecimiento, hormonas, ésteres de forbol, etc. En el caso de la NHE-2 y de la NHE-3 los diferentes agentes afectan a la V_{max} de transporte para el Na^+ . En el caso de la NHE-1 lo que

se modifica es su afinidad por el H^+ , lo que sugiere un cambio bien en la afinidad del protón bien por el "lugar" de transporte o por el lugar modificador del transportador (Levine *et al.*, 1993). Los ésteres de forbol aumentan la actividad de la NHE-1 y la NHE-2, pero disminuyen la de la NHE-3 (Fliegel y Fröhlich, 1993).

Todas las isoformas del intercambiador Na^+-H^+ clonadas hasta el momento tienen semejantes diagramas de hidrofobicidad. El análisis de estos diagramas sugiere que la proteína consta de dos dominios (Figura 1): un dominio N-terminal anfipático, que atraviesa la membrana de 10 a 12 veces, y el dominio C-terminal hidrofílico (Sardet *et al.*, 1989; Tse *et al.*, 1991a; Orłowski *et al.*, 1992) localizado en la cara citoplasmática de la membrana (Wakabayashi *et al.*, 1992). Estudios de delección del dominio C-terminal de la isoforma NHE-1 (Wakabayashi *et al.*, 1992, 1994) muestran que se mantiene la capacidad transportadora de la proteína y la regulación alostérica por protones citosólicos, pero se anula su capacidad para responder a la fosforilación por cinasas. De ello se deduce que el extremo N-terminal sería el responsable del intercambio iónico y presentaría el "sitio sensor" de la concentración citosólica del protón, mientras que el C-terminal estaría implicado en la regulación del intercambiador por fosforilación. Determinadas delecciones en el C-terminal, que no afectan el grado de fosforilación, disminuyen marcadamente la sensibilidad del intercambiador al pH_i y a factores externos. Se ha postulado que la regulación independiente de fosforilación es mediada por proteínas accesorias o reguladoras que se unen al C-terminal y al lugar "sensor del pH" del N-terminal (Wakabayashi *et al.*, 1994).

El dominio N-terminal de cada isoforma está bastante conservado entre las distintas especies de animales, mientras que las diferencias entre las isoformas aparecen en el dominio citoplasmático C-terminal (Fliegel y Fröhlich, 1993). Dado que cada intercambiador es diferentemente afectado por proteínas cinasas, la divergencia observada en el C-terminal puede representar la especificidad de la proteína para su regulación. El N-terminal parece tener secuencias que definen la especificidad de la expresión de la proteína en cada especie, tejido y localización celular. En general, las similitudes estructurales demuestran que las cuatro isoformas del intercambiador son producto de distintos genes, pero al estar tan relacionadas probablemente deriven de un gen ancestral común.

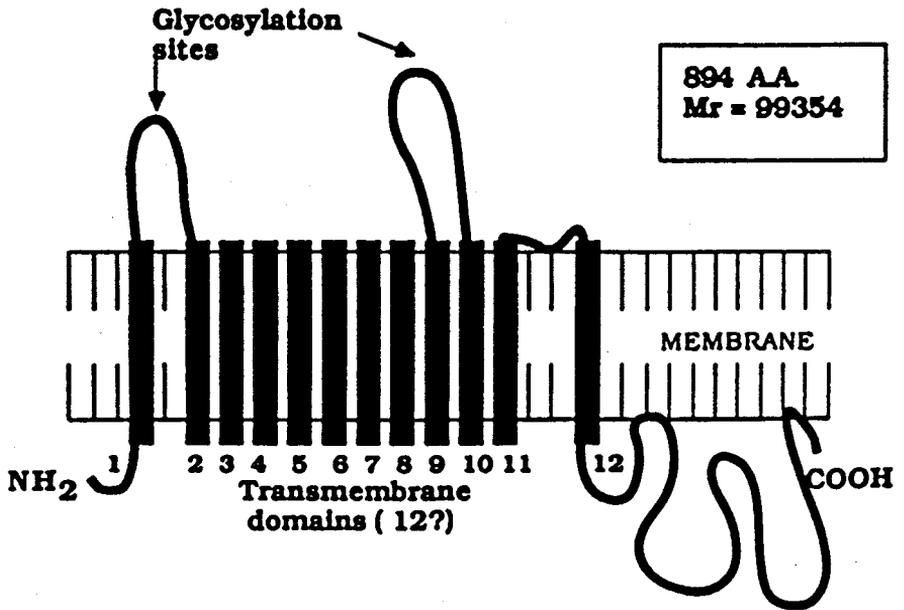


Figura 1. Modelo estructural del intercambiador Na⁺-H⁺ (Sardet et al., 1989).

Intercambiador Cl^- - HCO_3^- dependiente de Na^+

Este sistema de transporte intercambia Na^+ y HCO_3^- extracelular por Cl^- y H^+ intracelular. El intercambio solo se observa en presencia de bicarbonato y actúa como un mecanismo que elimina ácido (H^+) a expensas de la energía del gradiente electroquímico transmembrana de Na^+ (Roos y Boron, 1981). El intercambio es electroneutro y la estequiometría más probable es: 1 Na^+ : 1 Cl^- : 2 ácido/base (Boron, 1986; Olnes *et al.*, 1987).

La actividad del intercambiador es inhibida por los derivados de estilbeno, el 4,4'-diisotiocianoestilbeno-2,2'-disulfonato (DIDS) y el 4-acetamido-4'-isotiocianoestilbeno-2,2'-disulfonato (SITS). La relación entre la actividad del intercambiador y la concentración extracelular de Na^+ sigue una cinética tipo Michaelis-Menten (Roos y Boron, 1981).

Al igual que el intercambiador Na^+ - H^+ , el intercambiador Cl^- - HCO_3^- dependiente de Na^+ se inactiva a pH alcalino, activándose por debajo de un cierto valor umbral de pH_i , lo que indica que los H^+ intracelulares son moduladores alostéricos de la actividad del intercambiador (Hoffmann y Simonsen, 1989; Boron, 1992).

La identificación del intercambiador Cl^- - HCO_3^- dependiente de Na^+ se basa en su dependencia del Na^+ y el HCO_3^- extracelulares y del Cl^- intracelular, su inhibición por derivados de estilbeno (Cabanchick *et al.*, 1978), su insensibilidad a la EIPA o la amilorida y su electroneutralidad. Se identificó inicialmente en el axón del calamar (Boron y Russel, 1983) y más recientemente en células de vertebrados, tales como fibroblastos de hamster

(L'Allemain *et al.*, 1985), células del epitelio renal de *Necturus* (Boron, 1986; Frelin *et al.*, 1988; Preisig *et al.*, 1990) y en células Vero, línea celular de riñón de mono (Madshus y Olsnes, 1987).

Su regulación por factores extracelulares es poco conocida. Se ha descrito que agentes que aumentan los niveles de AMPc disminuyen la actividad del intercambiador (Reuss, 1987; Frelin *et al.*, 1988) y en células mesangiales de rata la arginina-vasopresina y los factores de crecimiento la aumentan (Ganz *et al.*, 1989, 1990). Tampoco se ha caracterizado molecularmente el intercambiador.

Intercambiador Cl^- - HCO_3^- independiente de Na^+

Este sistema de transporte intercambia Cl^- por HCO_3^- , con una estequiometría 1:1. En condiciones fisiológicas, los gradientes transmembrana del Cl^- y el HCO_3^- son tales que el intercambiador actúa sacando aniones (bicarbonato o hidroxilo) e introduciendo cloruro, lo cual lleva a una acidificación celular.

Su actividad es dependiente del Cl^- externo, independiente del Na^+ y se inhibe por los derivados de estilbeno SITS o DIDS. La relación entre la actividad del intercambiador y la concentración extracelular de cloruro sigue una cinética tipo Michaelis-Menten (Brown *et al.*, 1989; Olsnes *et al.*, 1987; Foster *et al.*, 1990; Hays y Alpern, 1990). En el "lugar" del cloruro puede transportar Br^- , I^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , NO_3^- , SCN^- (Frizzell *et al.*, 1973; Karniski, 1989; Knickelbein *et al.*, 1985). Según el tipo celular, el intercambiador puede tener un requerimiento absoluto del bicarbonato (Wenzl *et al.*, 1989; Nakhoul *et al.*, 1990; Seki *et al.*, 1990) o sólo tener preferencia por el bicar-

bonato sobre el hidroxilo (Knickelbein *et al.*, 1985; Kurzt y Golchini, 1987; Brown *et al.*, 1989; Mugharbil *et al.*, 1990; Calonge *et al.*, 1992).

La actividad del intercambiador depende del pH_i , de manera que cuando aumenta el pH_i aumenta su actividad y de forma alostérica (Olsnes *et al.*, 1986; Tønnessen *et al.*, 1987, 1990; Fineman *et al.*, 1990; Mugharbil *et al.*, 1990). Una excepción es la línea celular de origen renal BSC-1, donde la actividad del intercambiador es insensible a variaciones en el pH citosólico (Reitnertsen *et al.*, 1988).

La identificación del Cl^- - HCO_3^- independiente de Na^+ se basa en su dependencia del Cl^- , en su independencia del Na^+ , su electroneutralidad y en la inhibición por el SITS y el DIDS. El intercambiador se describió inicialmente en eritrocitos (Cabantchik *et al.*, 1978), en los que es crucial para el transporte de CO_2 . Su distribución es bastante ubicua (Frelin *et al.*, 1988) y en las células epiteliales se ha descrito en la membrana apical y en la basolateral (Boron, 1986; Preising *et al.*, 1990; Ilundáin, 1992).

Entre las funciones del intercambiador están el control del pH_i , del volumen celular y el transporte transepitelial del Cl^- y el HCO_3^- . En la homeostasis del pH_i el intercambiador permite a las células una rápida recuperación del pH_i cuando éste se desplaza hacia el lado alcalino, situación en la que los intercambiadores Na^+ - H^+ y Cl^- - HCO_3^- dependiente de Na^+ se inactivan (Boron, 1992; Calonge *et al.*, 1992; Ilundáin, 1992).

Diferentes hormonas y factores de crecimiento, así como ésteres de forbol (Kopito *et al.*, 1989), modifican la actividad del intercambiador Cl^- - HCO_3^- independiente de Na^+ (Bierman *et al.*, 1988; Ganz *et al.*; 1988,

1989). Algunos de estos agentes modifican el "set point" o umbral de activación del intercambiador (Olness *et al.*, 1986). El AMPc estimula la actividad de intercambiador aniónico en riñón (Schuster *et al.*, 1987) y la inhibe en músculo de aorta (Vigne *et al.*, 1988). En células Vero, los ésteres de forbol producen a corto plazo estimulación y a largo plazo inhibición de la actividad del intercambiador (Ludt *et al.*, 1991). En hepatocitos de rata, el AMPc incrementa la actividad del intercambiador y el efecto es bloqueado por los ésteres de forbol (Benedetti *et al.*, 1994).

El intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ independiente de Na^+ de los glóbulos rojos es conocido como la "Banda 3" y más recientemente como "AE-1" (Anion Exchanger), por ser el primer intercambiador clonado y secuenciado (Kopito y Lodish, 1985). Se han descrito dos genes más, el AE-2 y el AE-3, que codifican proteínas con alto grado de homología con la isoforma AE-1 (Kopito, 1990; Alper, 1991). De todas las isoformas, la AE-1 es la que presenta mayor afinidad por los derivados de estilbeno.

La isoforma AE-1 se ha clonado en eritrocitos de pollo (Kim *et al.*, 1988) y humanos (Tanner *et al.*, 1988) y en riñón de ratón (Brosius *et al.*, 1989) y rata (Kudrycki y Shull, 1989). Estudios inmunológicos y de microscopía electrónica han mostrado que el intercambiador aniónico de la membrana basolateral de las células intercalares de tipo A del riñón humano (Wagner *et al.*, 1987), rata (Drenckhahn *et al.*, 1985; Verlander *et al.*, 1988; Alper *et al.*, 1989), conejo (Schuster *et al.*, 1986) y ratón (Kopito *et al.*, 1988) presenta bastante homología con la isoforma AE-1 de eritrocitos.

La isoforma AE-2 se ha localizado en una gran variedad de tipos celulares que incluyen, células linfoides humanas de la línea K562 (Demuth *et*

al., 1986), células del riñón humano (Gehring *et al.*, 1992), células linfoides y renales de ratón (Alper *et al.*, 1988), células de mucosa gástrica de rata (Kudrycki *et al.*, 1990) y en glándulas anejas al tubo digestivo humano (Vázquez, Tesis Doctoral, 1994). Esta isoforma se ha detectado en la membrana basolateral de las células epiteliales del plexo coroideo de rata (Lindsey *et al.*, 1990) y de la mucosa gástrica de la rata y el conejo (Stuart-Tilley *et al.*, 1994), pero también en la membrana apical del epitelio del íleon de conejo (Chow *et al.*, 1992) y de las células intercalares de tipo B del túbulo colector de riñón humano (Drenckhahn *et al.*, 1989) y de conejo (Schuster y Stokes, 1987).

La AE-3 se ha localizado en el estómago, cerebro y corazón de rata (Kudrycki *et al.*, 1990) y en el corazón y cerebro de ratón (Kopito *et al.*, 1989). Se cree que existe otra isoforma del intercambiador aniónico, la AE-4, pero por el momento no se ha demostrado su expresión en ningún tejido ni se ha clonado su cDNA (Kopito, 1990).

Al igual que el intercambiador $\text{Na}^+\text{-H}^+$, la familia de isoformas del intercambiador $\text{Cl}^-\text{-HCO}_3^-$ puede estar relacionada con las diferentes funciones celulares. Así en el túbulo colector, las células intercalares de tipo A y B transportan bicarbonato en direcciones opuestas. En las de tipo A, que reabsorben el bicarbonato, el intercambiador $\text{Cl}^-\text{-HCO}_3^-$ es producto del gen AE-1 y se localiza en la membrana basolateral. En las de tipo B, responsables de la secreción de bicarbonato, el intercambiador está en la membrana apical y probablemente es un producto del gen AE-2 (Drenckhahn *et al.*, 1989; Schuster, 1993; Fejes-Tóth *et al.*, 1994).

Todas las proteínas AE descritas hasta el momento son glicoproteínas, de un peso molecular de aproximadamente 100.000 Da., que presentan dos dominios estructurales con funciones independientes (Kopito *et al.*, 1989; Kudrycki y Shull 1989; Alper, 1991). Tanto el extremo N-terminal como el C-terminal son citoplasmáticos (Liebermann y Reithmeier, 1988). El dominio transmembrana, correspondiente a la porción C-terminal de la proteína, la atraviesa de 10 a 14 veces y lleva a cabo el intercambio electroneutro de aniones. La parte de la secuencia de la banda 3 que se sabe con certeza que está implicada en la unión a los derivados de estilbena es la secuencia cercana al residuo de Lys 539, que se conserva en todas las isoformas descritas hasta el momento (Jennings, 1992). El dominio N-terminal está implicado en la regulación del intercambiador (Kopito *et al.*, 1989; Kopito, 1990). En glóbulos rojos el dominio N-terminal une a la membrana proteínas del citoesqueleto (espectrina y actina), vía su unión con anquirina (Bennett y Stenbuck, 1980). En eritrocitos humanos este dominio presenta lugares de unión para la hemoglobina y para enzimas glucolíticas (Low *et al.*, 1989). Las distintas isoformas difieren fundamentalmente en la región N-terminal, de manera que estas isoformas parecen productos del mismo gen pero con distinto procesamiento de sus correspondientes mRNAs (Kudrycki y Shull, 1989).

Cotransportador $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$

Es un cotransportador electrogénico que media el flujo isodireccional de un Na^+ y de dos a tres iones bicarbonato (Soleimani *et al.*, 1987; Boron y Boulapaep, 1989). La dirección del cotransporte está determinada por los gradientes electroquímicos transmembrana del Na^+ y el HCO_3^- y por el po-

tencial eléctrico de la membrana. En algunas células este sistema de transporte funciona como un mecanismo alcalinizante (Jentsch *et al.*, 1986; Wenzl *et al.*, 1989; Nakhoul *et al.*, 1990; Isenberg *et al.*, 1993; Teleky *et al.*, 1994) y en otras como acidificante (Kikeri *et al.*, 1990). Su actividad es inhibida por los derivados de estilbeno DIDS y SITS, y es independiente del Cl^- . En general, el cotransportador es inactivo en ausencia de bicarbonato (Kikeri *et al.*, 1990; Kurtz, 1989), pero en algunos tipos de células funciona gracias al HCO_3^- generado metabólicamente (Geibel *et al.*, 1989; Krapf *et al.* 1987).

La relación entre la actividad del intercambiador y la concentración extracelular del Na^+ sigue una cinética tipo Michaelis-Menten (Boron y Boulpaep, 1989; Akiba *et al.*, 1986; Rajendran y Binder, 1994). El cotransportador posee en el lado citosólico un lugar "modificador" sensible al pH, por lo que su actividad está regulada alostéricamente por el pH_i . Se inhibe a valores alcalinos del pH_i y la máxima actividad se observa a valores fisiológicos del pH_i (Soleimani *et al.*, 1991; 1992).

La identificación del cotransportador $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ se basa en su dependencia del Na^+ y del bicarbonato, su sensibilidad al potencial eléctrico de membrana, en su independencia del Cl^- y su inhibición por el DIDS y el SITS. Inicialmente fue descrito por Boron y Boulpaep (1983) en riñón de salamandra y posteriormente se ha descrito en la línea celular del epitelio renal de mono BSC₁ (Jentsch *et al.*, 1985), en células endoteliales de córnea bovina (Jentsch *et al.*, 1986) y en células del epitelio renal de rata (Alpern, 1985; Krapf, 1988) y conejo (Sasaki *et al.*, 1985). Más recientemente se ha identificado en la membrana basolateral del epitelio renal (Boron y Boulpaep, 1989; Preisig *et al.*, 1990), en la línea celular IEC-6 de origen intestinal (Wenzl *et al.*, 1989), en el colon distal de rata (Rajendran *et al.*, 1991), en el

duodeno de rata (Isenberg *et al.*, 1993) y en las células de las criptas del colon humano (Teleky *et al.*, 1994). No se ha identificado en la membrana basolateral de los enterocitos de rata ni de conejo (Knickelbein y Dobbins, 1990; Orsenigo *et al.*, 1991, 1992).

Las funciones del cotransportador $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ incluyen la regulación del pH_i . En algunos casos contribuye a la recuperación del pH_i tras una carga ácida (kuwahara *et al.*, 1991; Isenberg *et al.*, 1993; Teleky *et al.*, 1994) y en otros a la recuperación del pH_i tras alcalinización intracelular (Kikeri *et al.*, 1990). En células epiteliales, como las de los túbulos renales, el cotransportador puede limitarse a sacar HCO_3^- y Na^+ de la célula a través de la membrana basolateral, contribuyendo a la reabsorción de estos iones (Boron, 1992). En este caso, la acidificación provocada por el cotransportador es compensada mediante la salida de protones a través de la membrana luminal vía el intercambiador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ o las $\text{H}^+\text{-ATPasas}$ (Madshus, 1988).

La regulación del cotransportador por hormonas, factores de crecimiento y otros agentes no ha sido muy estudiada. En células del túbulo proximal de conejo se ha observado que la angiotensina II produce una estimulación paralela del intercambiador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ y del cotransportador $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$, aumentando así la reabsorción del HCO_3^- sin afectar al pH_i (Geibel *et al.*, 1990). Estudios sobre la regulación por proteínas cinasas A y C han mostrado que la primera inhibe la actividad del cotransportador $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$, mientras que la proteína cinasa C la incrementa (Ruiz y Arruda, 1990a; Krapf y Alpern, 1993). Determinadas condiciones como la acidosis metabólica aumentan la actividad del cotransportador (Akiba *et al.*, 1987;

Preisig y Alpern, 1988) y recientes estudios sugieren que esta respuesta es parcialmente dependiente de la proteína cinasa C (Soleimani *et al.*, 1994c).

El cotransportador $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ renal fue inicialmente expresado en oocitos de *Xenopus laevis*, pero en este primer estudio no se tuvieron en cuenta los cambios en el potencial de membrana debidos a otros sistemas de transporte electrogénicos (Ruiz y Arruda, 1990b). Recientemente ha sido de nuevo expresado en oocitos de *Xenopus laevis* y los resultados indican que en riñón de rata un ARNm de 2-3 Kb codifica el cotransportador $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ (Burckhardt *et al.*, 1994).

Bombas de protones.

Se han descrito tres tipos de bombas o ATPasas de protones: la H^+ -ATPasa vacuolar (tipo-V), la H^+ -ATPasa tipo F_1F_0 (tipo-F) y la $\text{H}^+\text{-K}^+$ ATPasa que es del tipo E_1E_2 (tipo-P). El transporte de protones llevado a cabo por las H^+ -ATPasas tipo-V y tipo-F es electrogénico al no estar acoplado directamente al movimiento de otro ión, que podría contrarrestar la carga eléctrica, como en el caso de la $\text{H}^+\text{-K}^+$ ATPasa.

La H^+ -ATPasa vacuolar se encuentra en los endosomas, los lisosomas, el aparato de Golgi y en los gránulos secretorios (Bowman *et al.*, 1988; Mellman *et al.*, 1986; Pedersen y Carafoli, 1989; Stone *et al.*, 1989), manteniendo un pH en el espacio intravacuolar que oscila entre 4,5 y 6,5 (Mellman *et al.*, 1986). Tras un estímulo metabólico, las vesículas con sus bombas de protones pueden insertarse en la membrana plasmática pudiendo así participar en la regulación del pH_i (Cannon *et al.*, 1985; Van Adelsberg y Al-Awati, 1986). También se han localizado en la membrana plasmática de

los hepatocitos (Stone *et al.*, 1989), los macrófagos (Swallow *et al.*, 1990), los osteoclastos (Vaananen *et al.*, 1990) y en células del epitelio renal (Turrini *et al.*, 1989), participando en la acidificación de la orina, en la resorción ósea y en la regulación del pH_i , respectivamente.

La H^+ -ATPasa tipo F_1F_0 se encuentra en la membrana interna mitocondrial, en los cloroplastos y en la membrana plasmática de las bacterias. En las mitocondrias y en los cloroplastos, la H^+ -ATPasa utiliza el gradiente electroquímico de protones para sintetizar ATP. En las bacterias la H^+ -ATPasa hidroliza ATP para sacar los protones desde la célula (Nelson, 1992; Fozzar *et al.*, 1992).

La H^+ - K^+ ATPasa se localizó inicialmente en la membrana apical de las células parietales del estómago (Ganser y Forte, 1973; Sachs *et al.*, 1976; Rabon *et al.*, 1985) y es la responsable de la acidificación del jugo gástrico. Posteriormente se la ha localizado en la membrana apical del epitelio del colon de distintas especies (Suzuki y Kaneko, 1989; Kaunitz y Sachs, 1986; Takeguchi *et al.*, 1990; Abrahamse *et al.*, 1993) y en células del epitelio renal (Wingo *et al.*, 1989; Curran *et al.*, 1992; Planelles *et al.*, 1991).

Los distintos tipos de ATPasas de protones se diferencian por su perfil farmacológico. Todas ellas son inhibidas por el DCCD, la NEM y la rotenona. La bafilomicina A_1 permite diferenciar los tres tipos de ATPasas de protones ya que inhibe fuertemente la de tipo-V, en menor grado la de tipo-P y no afecta a la mitocondrial (Bowman *et al.*, 1988; Swallow *et al.*, 1990). La H^+ - K^+ ATPasa es específicamente inhibida por la imidazopiridina SCH 28080, que compite con el K^+ por su "lugar" de unión a la proteína (Scott y Sundell, 1985, Wallmark *et al.*, 1987; Mendlein y Sachs, 1990), por

la omeprazola (Lorentzon *et al.*, 1985; Wallmark *et al.*, 1983) y por el vanadato (Faller *et al.*, 1982; Planelles *et al.*, 1991).

Estructuralmente las ATPasas de tipo-V y las del tipo F_1F_0 están formadas por 7 a 10 subunidades diferentes y algunas de ellas se repiten dentro de la misma estructura. La H^+-K^+ ATPasa está formada por dos subunidades denominadas α y β , que en su mayoría han sido clonadas y secuenciadas (Nelson, 1992; Shull y Lingrel, 1986; Maeda *et al.* 88). La estructura de la H^+-K^+ ATPasa presenta bastante similitud con la de la Na^+-K^+ ATPasa y la Ca^{2+} -ATPasa (Shull *et al.*, 1985; MacLennan *et al.*, 1985).

TRANSPORTE TRANSEPITELIAL DE IONES EN EL INTESTINO

La pared del intestino consta de capas sucesivas de tejido muscular, tejido conectivo y epitelio simple, que es el que controla el tránsito de materiales a través de la pared intestinal, desempeñando así un papel crucial en la homeostasis del organismo. La superficie externa del intestino, la que mira a la luz del órgano, presenta numerosas evaginaciones denominadas vellosidades, en cuyos valles se localizan las criptas. Las criptas contienen en su base células no diferenciadas en continua división. A medida que se van formando las células migran por las vellosidades y van adquiriendo sus propiedades enzimáticas y de transporte propias de las células adultas.

Las células epiteliales de las vellosidades son morfológica y funcionalmente asimétricas. Son células columnares, cuya superficie apical que mira a la luz intestinal, presenta, a manera de proyecciones digitales, un gran número de microvellosidades por lo que recibe el nombre de borde en cepillo. La basolateral es relativamente lisa. Hoy se sabe que las dos membranas poseen distintas permeasas lo que permite que el transporte transepitelial de sustratos sea direccional. La localización de los transportadores de iones en las células del epitelio intestinal presenta variaciones regionales y de especie (Figura 2).

El duodeno de la mayoría de las especies posee una considerable capacidad para la secreción de HCO_3^- (Hopfer y Liedke, 1987; Brown *et al.*, 1989) que depende de la presencia de bicarbonato en el lado serosal (Simson *et al.*, 1981).

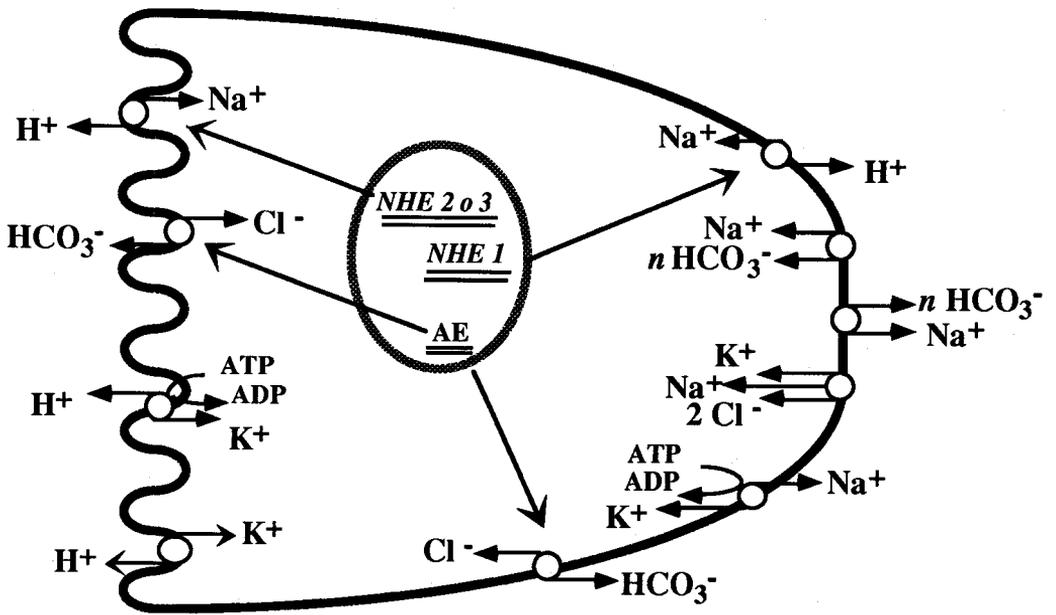


Figura 2. Transportadores iónicos en células del epitelio intestinal.

En el duodeno de rata se han descrito tres transportadores de iones: los intercambiadores Cl^- - HCO_3^- y Na^+ - H^+ y el cotransportador Na^+ - HCO_3^- (Isenberg *et al.*, 1993), y se ha propuesto que el bicarbonato entra a los enterocitos por la membrana basolateral mediante el cotransportador Na^+ - HCO_3^- y es transportado al lumen, a través de la membrana apical, por el intercambiador Cl^- - HCO_3^- y por un canal aniónico.

El cotransportador Na^+ - HCO_3^- parece estar ausente en el yeyuno y el íleon de mamíferos (Hagenbuch *et al.*, 1987; Orsenigo *et al.*, 1991,1992). En cambio, la membrana apical del epitelio del yeyuno (Cassano *et al.*, 1984; Kleinman *et al.*, 1988), íleon (Knickelbein *et al.*, 1985; 1990; Vasseur *et al.*, 1989 ; Mugharbil *et al.*,1990; Sundaran *et al.*, 1991) y colon ascendente (Foster *et al.*,1990) de varios mamíferos posee los intercambiadores Cl^- - HCO_3^- y Na^+ - H^+ .

En yeyuno se ha observado predominantemente absorción de sodio a través del intercambio Na^+ - H^+ y por tanto secreción de protones (Gunther y Wright, 1983). También se da absorción electroneutra de NaCl . La entrada de cloruro a las células, en contra de gradiente electroquímico, ocurre vía canales de Cl^- y está acoplada eléctricamente a la entrada de Na^+ . El Na^+ entra a la célula a favor de gradiente electroquímico vía canales de Na^+ (Liedtke, 1989). En yeyuno de rata la acción conjunta de los intercambiadores Na^+ - H^+ y Cl^- - HCO_3^- también da lugar a absorción electroneutra de NaCl (Cassano *et al.*, 1984), mientras que en yeyuno de conejo la actividad de estos intercambiadores no está acoplada (Gunther y Wright, 1983). La absorción de bicarbonato por el yeyuno de rata (Podestra y Mettrick, 1977) está probablemente mediada por el intercambiador Cl^- - HCO_3^- de la membrana basolateral, que ha

sido recientemente descrito por Orsenigo *et al.* (1991, 1992). En yeyuno de *Amphiuma* la absorción de bicarbonato está mediada por la secreción de protones vía la H^+ - K^+ ATPasa. Los protones segregados se unen al bicarbonato luminal, formándose CO_2 (Imon y White, 1984).

En íleon la absorción de Na^+ y Cl^- ocurre simultáneamente y de forma electroneutra vía la actuación en paralelo de los intercambiadores Na^+ - H^+ y Cl^- - HCO_3^- (Liedtke y Hopfer, 1982a; Knickelbein *et al.*, 1985). Se postula que la absorción de Cl^- acoplada al Na^+ está regulada probablemente por el pH_i y/o el HCO_3^- intracelular que acoplaría la actividad de los dos intercambiadores (Sellin y Duffey, 1990). En algunas especies, entre las que se incluye el conejo, el íleon tiene una considerable capacidad para segregar HCO_3^- mediante el intercambiador Cl^- - HCO_3^- (Podestra y Mettrick, 1977).

En general, el colon de mamíferos absorbe agua, sodio y cloruro mientras que segrega potasio y bicarbonato (Binder y Sandle, 1987). El transporte de electrolitos presenta significativas diferencias tanto regionales como de especie (Binder *et al.*, 1987b; Sellin y DeSoignie, 1984, 1987; Clauss *et al.*, 1985). En el segmento distal de colon de conejo (Frizzell *et al.*, 1976) y de humanos (Wills *et al.*, 1984) el Na^+ se absorbe vía canales de Na^+ . Esta absorción de Na^+ es electrogénica, sensible a la amilorida e independiente del cloruro. En colon distal de conejo el intercambio Cl^- - HCO_3^- apical funciona sin la coexistencia del intercambiador Na^+ - H^+ (Frizzell *et al.*, 1976; Gunther y Wright, 1983). El intercambiador Cl^- - HCO_3^- está también presente en colon humano (Davis *et al.*, 1983). En el colon distal de rata hay absorción electroneutra de $NaCl$ mediada por los intercambiadores Na^+ - H^+ y Cl^- - HCO_3^- , cuya actividad está acoplada por el pH intracelular. En la porción más proximal del colon de conejo (Sellin y DeSoignie, 1984), de

hombre (Sellin y DeSoignie, 1987), de rata (Foster *et al.*, 1986) y en el ciego de conejo (Hatch *et al.*, 1988) se ha identificado la absorción electroneutra de Na^+ mediada por el intercambiador Na^+-H^+ , la cual no está totalmente correlacionada con el transporte transepitelial de Cl^- , pero se altera claramente por la presencia o ausencia del Cl^- o el HCO_3^- .

El transporte de K^+ también presenta diferencias segmentales y de especie. En rata la secreción y la absorción activa de K^+ normalmente ocurre en colon proximal y distal, respectivamente (Foster *et al.*, 1984). En cambio, en colon descendente de conejo y humanos es dominante el proceso de secreción activa de K^+ (McCabe y Smith, 1985). Estos procesos son mediados por K^+-H^+ ATPasa (Suzuki y Kanako, 1989; Takeguchi *et al.*, 1990) y por la K^+-ATPasa (Kaunitz y Sachs, 1982; Watanabe *et al.*, 1989; Del Castillo *et al.*, 1991).

Respecto a la secreción intestinal de cloruro, este entra a las células en contra de su gradiente electroquímico vía el cotransportador $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ de la membrana basolateral (Heintze *et al.*, 1983). El cloruro, que se acumula en la célula, sale de esta por la membrana apical, a favor de gradiente electroquímico, a través de canales de Cl^- . La Na^+-K^+ ATPasa de la membrana basolateral mantiene el gradiente de Na^+ y la difusión de K^+ , a través de canales de K^+ regulados por Ca^{2+} de la membrana basolateral, repolariza la membrana (Liedtke, 1989; Halm y Frizzell, 1990). En el intestino delgado este proceso ocurre fundamentalmente en las células de las criptas (Donowitz y Welsh, 1987).

REGULACIÓN DEL VOLUMEN CELULAR

La membrana plasmática de virtualmente todas las células animales es permeable al agua y por tanto el volumen celular queda determinado por el contenido citosólico de solutos osmolarmente activos y por la osmolaridad del fluido extracelular. *In vitro* se han observado procesos de recuperación del volumen celular tras perturbaciones osmóticas del medio extracelular. Así, las células eliminan agua tras ser expuestas a medios hipotónicos que provocan hinchamiento celular y la captan tras exposición a medios hipertónicos, que provocan retracción de la membrana plasmática. Adicionalmente, las células que llevan a cabo un transporte activo de solutos están sometidas a una carga osmótica intracelular debido a la acumulación citosólica de solutos osmolarmente activos (Hoffmann y Simonsen, 1989; Spring y Hoffman, 1992).

En algunos casos, las respuestas celulares a cambios en su volumen son debidas a la activación de transportadores constitutivos latentes. En otros, la perturbación del volumen celular desencadena transcripción de genes que codifican proteínas transportadoras o enzimas implicados en la síntesis de osmolitos orgánicos (Parker, 1993).

Tras shock hipertónico se activan mecanismos que estimulan la captación celular de sal y de agua por arrastre osmótico. Entre los mecanismos descritos están: el cotransportador $\text{Na}^+-2\text{Cl}^--\text{K}^+$, y los intercambiadores Na^+-H^+ y $\text{Cl}^--\text{HCO}_3^-$.

La activación del cotransportador $\text{Na}^+-2\text{Cl}^--\text{K}^+$ se ha observado en células tumorales de Ehrlich (Hoffman y Simonsen, 1989), en glóbulos rojos de rata (Duhm, 1984) y hurón (Mercer y Hoffman, 1985), en células cardíacas de pollo (Frelin, 1986), en astrocitos de corteza cerebral de rata (Kimelberg y Frangakis, 1986), en la membrana basolateral de células epiteliales de piel de rana (Ussing, 1986), en enterocitos de pollo (Montero *et al.*, 1989) y en membranas apicales de médula de riñón de conejo (Eveloff y Warnock, 1987).

Medios hipertónicos provocan la estimulación simultánea de los intercambios Na^+-H^+ y $\text{Cl}^--\text{HCO}_3^-$ en glóbulos rojos de *Amphiuma* (Cala, 1986), linfocitos humanos (Grinstein *et al.*, 1984), membrana apical de vejiga urinaria de *Necturus* (Ericson y Spring, 1982), túbulo proximal de conejo (Grinstein y Rothstein, 1986) y en túbulos renales de asa ascendente de ratón (Hebert, 1986). El resultado de la activación de estos transportadores sería la entrada de NaCl al interior de la célula, y la salida de HCO_3^- y H^+ al medio extracelular, que se eliminan en forma de CO_2 .

La activación de los mecanismos que regulan el volumen celular tras shock hipertónico es, en la mayoría de los casos, desconocida. Algunos resultados sugieren que en linfocitos la proteína cinasa C regula la actividad del intercambiador Na^+-H^+ (Grinstein *et al.*, 1986, 1992). En células de riñón de ratón es el AMPc quien activa los intercambiadores Na^+-H^+ y $\text{Cl}^--\text{HCO}_3^-$ (Hebert y Sun, 1988).

En medios hipotónicos la regulación del volumen ocurre por activación del cotransportador K^+-Cl^- , activación paralela de los sistemas de intercambio K^+-H^+ y $\text{Cl}^--\text{HCO}_3^-$, y por activación de canales de K^+ y Cl^- .

El resultado es pérdida neta de ClK y de agua. También se ha observado inactivación del cotransportador $2\text{Cl}^- - \text{Na}^+ - \text{K}^+$ (Montero *et al.*, 1989).

La activación de los canales para el K^+ y el Cl^- en respuesta a medios hipotónicos fue inicialmente descrita en células tumorales de Ehrlich (Hoffman, 1985), y posteriormente en linfocitos (Grinstein *et al.*, 1984), en plaquetas (Livne *et al.*, 1987), en fibroblastos humanos (Rugolo *et al.*, 1989), en vesícula biliar de *Necturus* (Furlong y Spring, 1990), entre otros (Sarkadi y Parker, 1991). La activación del cotransportador $\text{K}^+ - \text{Cl}^+$, tras shock hipoosmótico, se ha descrito en glóbulos rojos de diversas especies: pato, perro, conejo, humanos, etc. (Kregenow, 1981; Parker, 1983; Lauf *et al.*, 1987) y la activación paralela de los sistemas de intercambio $\text{K}^+ - \text{H}^+$ y $\text{Cl}^- - \text{HCO}_3^-$ en glóbulos rojos de *Amphiuma* (Cala, 1980).

Diversos estudios sugieren que el Ca^{2+} citosólico interviene en la activación de los mecanismos que recuperan el volumen celular tras shock hipotónico (Eveloff y Warnock, 1987; Sarkadi y Parker, 1991; Peña-Rasgado *et al.*, 1994). También se ha observado que fármacos inhibidores de la calmodulina inhiben la pérdida celular de K^+ y Cl^- , lo cual sugiere la participación de esta proteína en la activación de los sistemas que median el transporte de Cl^- y K^+ (Hoffmann *et al.*, 1984).

Así mismo se ha sugerido que los componentes del citoesqueleto, red de microtúbulos y filamentos celulares, intervienen en la regulación del volumen celular actuando como mecanotransductores de algún tipo de sensor del volumen celular (Hoffmann y Simonsen, 1989; Kleinzeller y Ziyadeh, 1990).

OBJETO DEL TRABAJO

Durante los últimos cuatro años nuestro Grupo de Investigación se ha ocupado principalmente del estudio de los transportadores de iones presentes en la membrana plasmática y la regulación del pH intracelular en enterocitos de pollo, con la ayuda PB89-0616 de la Dirección General de Investigación Científica y Técnica. En el marco de este proyecto se ha desarrollado el trabajo experimental que presento para obtener el Grado de Doctor.

Los estudios fluorimétricos revelaron que los enterocitos de pollo regulaban su pH_i y esta regulación era en parte mediada por dos transportadores iónicos. Uno el intercambiador Na^+-H^+ que intervenía en el mantenimiento del pH_i basal y en la recuperación de éste tras una carga ácida. El otro transportador era el intercambiador Cl^-/base que también era funcional en condiciones basales y estaba implicado en la recuperación del pH_i cuando éste se desplazaba hacia el lado alcalino.

En estos estudios se utilizaron suspensiones celulares por lo que no se pudo determinar la localización apical y/o basolateral de dichos intercambiadores aniónicos. Por ello nos pareció interesante profundizar en el conocimiento del funcionamiento de las células epiteliales según el siguiente plan de trabajo:

1. Poner a punto las técnicas para obtener vesículas de membrana apical y basolateral de enterocitos de pollo.
2. Poner a punto las técnicas que permiten determinar la pureza de las preparaciones de vesículas de membrana obtenidas.

3. Determinar la presencia del intercambiador Cl^-/base en la membrana apical de los enterocitos de pollo y caracterizarlo.
4. Determinar la presencia del intercambiador Na^+-H^+ en la membrana apical de los enterocitos de pollo y caracterizarlo.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Se han utilizado pollos de la raza Hubbard, suministrados por las granjas de la empresa Copoll, de edades comprendidas entre cuatro y seis semanas. Fueron alimentados con piensos Sanders de composición estándar, con libre acceso al agua y mantenidos, en condiciones adecuadas de temperatura y humedad, en el estabulario de la Facultad de Farmacia.

REACTIVOS

Los reactivos utilizados y todas las sales fueron suministrados por Merck, Sharp y Dohme; y Sigma Chemical Co., Madrid; y el H₂DIDS de Molecular Probes (Eugene, OR). En la Tabla 2 se resumen las concentraciones de las soluciones "stocks" empleadas en el presente estudio.

Tabla 2. Soluciones stocks de los productos químicos utilizados (en mM).

Reactivo	Stock	disolvente
Amilorida	10	20% DMSO
CCCP	2	Etanol:Agua 1:1
Citocalasina B	14	DMSO
Floretina	50	DMSO
Florricina	100	etanol:Agua 1:1
H ₂ DIDS	75	DMSO
Ouabaína	400	DMSO
PABA	200	etanol
PMSF	300	etanol
SITS	100	DMSO
Valinomicina	14	DMSO

Todos los stocks fueron conservados a -20 °C sin pérdida de potencia.

COMPOSICIÓN DE LAS SOLUCIONES SALINAS.

Salvo que específicamente se indique, se han empleado las siguientes soluciones salinas:

Solución A: 100 mM Manitol, 50 mM GluconatoK y 70 mM Hepes/Tris (pH 7,7) o 70 mM Mes/Tris (pH 5,5).

Solución B: sin potasio, igual que la solución A pero sustituyendo el gluconatoK isosmóticamente por manitol (pH 7,7).

Solución C: con alto potasio, igual que la solución A pero sustituyendo el manitol isosmóticamente por gluconatoK (pH 7,7).

Solución D: con bicarbonato, 150 mM Manitol; 50 mM HCO₃K; 20 mM Hepes-Tris (pH 7,7).

Solución E: 300 mM manitol, 20 mM gluconatoK y 50 mM MES/Tris (pH 5,5) o HEPES/Tris (pH 7,5).

Solución F: 300 mM sorbitol, 10 mM HEPES/n-butilamina (pH 7,4).

Solución G: 100mM sorbitol, 10 mM HEPES/n-butilamina (pH 7,4) y 100 mM NaCl o 100 mM ColinaCl.

Solución H: 300 mM manitol, 20 mM HEPES/Tris (pH 7,5).

Solución I: 100 mM manitol, 20 mM HEPES/Tris (pH 7,5) y 100 mM SCN_{Na} o 100 mM SCNK.

La preparación de los medios fue extemporánea y los pH de las soluciones se midieron a la temperatura de uso de las mismas. Cuando a las soluciones se añadían sustratos y modificantes a concentraciones superiores a 10 mM se redujo equiosmolarmente la concentración de manitol. En el caso en que los modificantes añadidos procedieran de soluciones concentradas no acuosas, se adicionó a los controles la misma cantidad de disolvente (<1%).

Cuando se utilizaron inhibidores, estos se añadieron tanto a los medios de incubación como a la suspensión de vesículas, las cuales se incubaron durante 15 minutos con el correspondiente inhibidor.

MARCADORES RADIOACTIVOS

Se han empleados los siguientes radioisótopos: ^{36}Cl (HCl), que se neutralizó con Tris base antes de su uso, ^{22}Na (NaCl), ^{14}C - α -Metil-glucosa y ^{14}C -D-glucosa, ambos en disolución 1:9 Etanol:Agua. Los marcadores fueron adquiridos en DuPont NEN[®] y Amersham[®].

MÉTODOS PARA LA OBTENCION DE LAS VESÍCULAS DE LA MEMBRANA APICAL

1. Método de doble precipitación con magnesio (Método I).

Se ha seguido la técnica descrita por Dalle (tesis doctoral, 1993). Se decapita y desangra el pollo sin previo ayuno. Tras laparatomía se resecan aproximadamente 20 cm de la zona media del intestino delgado, desprendiendo el tejido mesentérico adherido.

El intestino se lava con suero fisiológico a 4°C (mantenido en baño de hielo), se abre longitudinalmente, se seca sobre papel de filtro, se pesa, se coloca en papel de aluminio, se congela en nitrógeno líquido y se guarda a -80 °C hasta su uso.

Para obtener las vesículas de la membrana apical se sigue el protocolo indicado en el esquema de la Figura 3. Se parte de aproximadamente 40 g de intestino entero, se descongela en 80 ml de una solución que contiene (en mM): 500 Sorbitol, 6 HEPES/N-butilamina (pH 7,4), 1 EGTA, 0,6 PMSF y 1 ácido p-aminobenzoico, y se corta en pequeñas piezas. Se homogeneiza con un triturador Waring Blender (W.B.) a alta velocidad durante 3 minutos,

se filtra a través de una gasa de algodón y después a través de una malla de nylon. De este homogeneizado se toman alícuotas, que se conservan a -20°C , para la posterior determinación enzimática y de la concentración de proteínas.

Al resto del homogeneizado se añade MgCl_2 para una concentración final de 10 mM y se vuelve a triturar a alta velocidad durante 30 segundos. La suspensión se deja en reposo 30 minutos y se centrifuga a 2.000 g durante 15 minutos. El sobrenadante se recoge y se centrifuga a 20.000 g durante 30 minutos. El sedimento resultante se resuspende en unos 10 ml de la solución con la que se van a cargar las vesículas de membrana que también contiene 0,5 % PMSF y 0,2 % PABA. Esta suspensión se homogeneiza mediante 10 golpes con homogeneizador teflón-cristal en Black-Decker (BD 156-H1D) y se lleva aproximadamente a 60 ml con la misma solución. Se añade de nuevo MgCl_2 para una concentración final de 10 mM y se deja en reposo 30 minutos.

A continuación se centrifuga a 2.000 g durante 15 minutos. El sobrenadante se recoge y centrifuga a 20.000 g durante 30 minutos. El precipitado final, que contiene las vesículas de la membrana apical (BBMV), se resuspende en la solución con la que se desea cargar las vesículas, para obtener una concentración final de 20-30 mg de proteína/ml. La resuspensión se hace con una jeringuilla de insulina (25 g) para favorecer la homogenización de las vesículas.

Finalmente, la suspensión de vesículas se distribuye en alícuotas de 50 a 100 μl en tubos eppendorf que se guardan en nitrógeno líquido hasta el momento de su utilización. Todo el proceso se realiza a 4°C y todas las centrifugaciones en Centrífuga Beckman J2-21, con rotor modelo J-21.

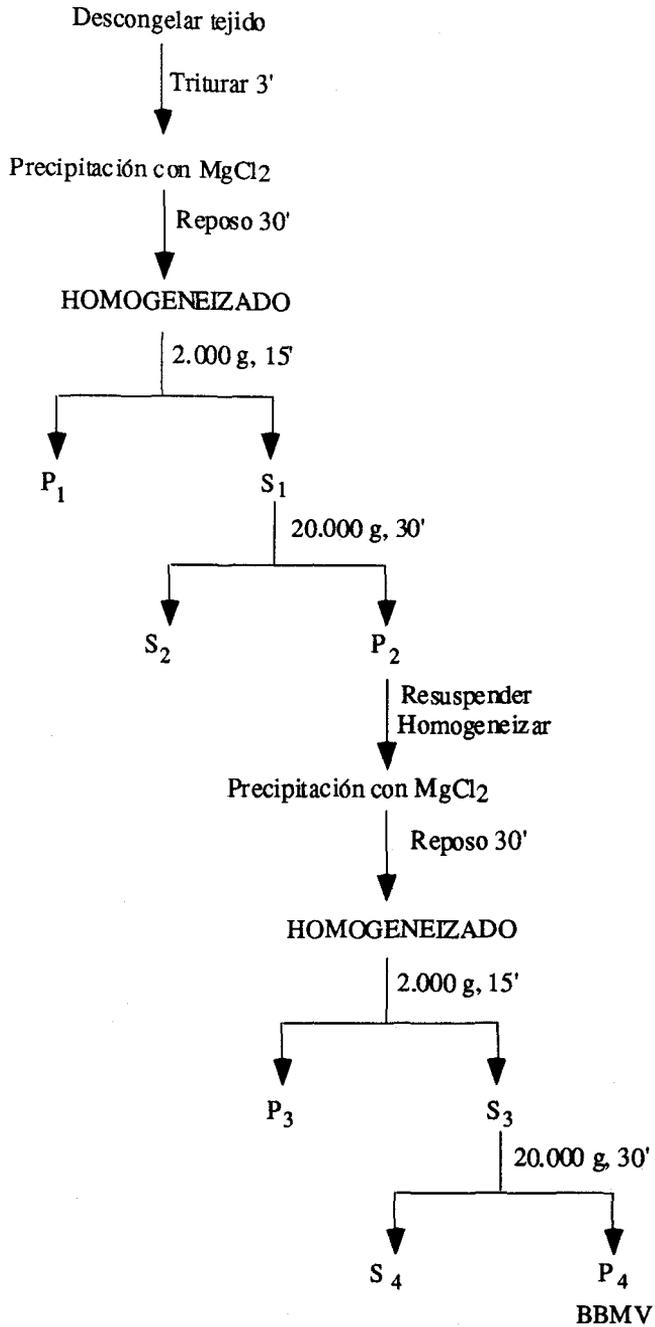


Figura 3. Esquema de obtención de BBMV por doble precipitación con Mg^{++} . (Método I)

2. Método de simple precipitación con magnesio (Método II)

Se ha utilizado la técnica descrita por Shirazi-Beechey, 1988. El pollo se sacrifica mediante inyección intravenosa de uretano (1g/Kg de peso). Tras laparatomía se resecan aproximadamente 20 cm de la zona media del intestino delgado, desprendiéndolo del tejido mesentérico adherido.

El intestino se lava con suero fisiológico a 4°C, (mantenido en baño de hielo), se abre longitudinalmente, se seca sobre papel de filtro y se raspa la mucosa. La mucosa se pesa, se coloca en papel de aluminio, se congela en nitrógeno líquido y se guarda a -80 °C hasta su uso.

Las vesículas se obtienen siguiendo el protocolo que se indica en el esquema de la Figura 4. Se colocan 6-10 g de mucosa en aproximadamente 100 ml de solución A que contiene (en mM): 100 Manitol, 2 HEPES-Tris, pH 7,1, se deja descongelar y se homogeneiza en triturador Waring-Blender (W. B.) a alta velocidad durante 30 minutos. El homogeneizado obtenido se pasa a través de un Buchner y se lava con la misma solución. Se toman alícuotas, que se filtran a través de una media de nylon y se congelan, para posteriores determinaciones enzimáticas y de proteínas.

Se añade al homogeneizado $MgCl_2$, gota a gota, para una concentración final de 10 mM y se agita suavemente durante 20 minutos. A continuación se centrifuga a 3.000 g durante 15 minutos, se recoge el sobrenadante y se centrifuga a 30.000 g durante 35 minutos.

El precipitado obtenido se resuspende en una solución B que contiene (en mM) 100 manitol, 0,1 $MgSO_4$, 2 HEPES-Tris, pH 7,4, con pipeta Pasteur de plástico. Esta suspensión se homogeneiza con homogeneizador

teflón/cristal a mano, con al menos 50 golpes. A continuación se lleva a un volumen de 35-40 ml de la misma solución y se centrifuga a 30.000 g durante 35 minutos.

El sedimento final, que contiene las vesículas de la membrana apical (BBMV), se resuspende con jeringuilla de insulina (25 g) en la solución con la que se desea cargar las vesículas, para obtener una concentración final de proteínas de 25-30 mg/ml. Después se pasa, al menos dos veces, por otra jeringuilla con aguja de (28 g). Se divide en alícuotas de 50 a 100 μ l en tubos eppendorf, que se congelan inmediatamente en nitrógeno líquido, donde se guardan hasta el momento de su utilización.

Todos los pasos se realizan sobre baño de hielo.

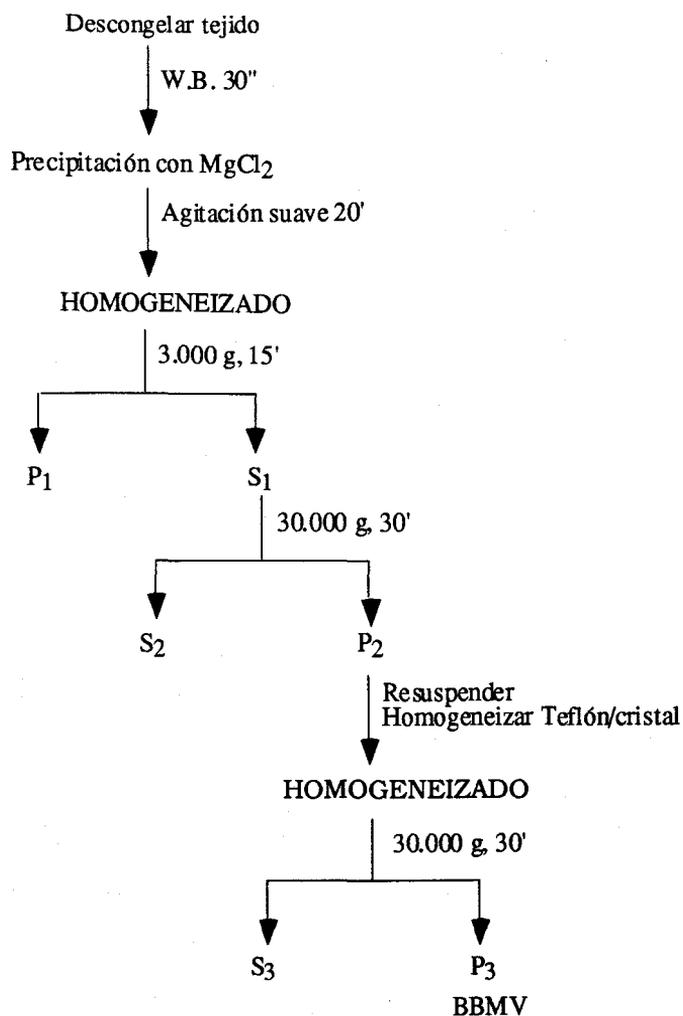


Figura 4. Esquema de obtención de BBMV por simple precipitación con Mg^{++} . (Método II).

OBTENCION DE VESÍCULAS DE LA MEMBRANA BASOLATERAL.

Se ha seguido el método descrito por Dyer *et al.* (1990). Todos los pasos se llevan a cabo a una temperatura entre 0-4 °C. La obtención de la mucosa se realiza del modo ya indicado en el apartado anterior y la de las vesículas según el protocolo del esquema de la Figura 5. Se toman entre 5-10 g de mucosa congelada y se colocan en la solución 1, que contiene (en mM) 12,5 NaCl, 1 Tris/HCl pH 8, 0,2 PMSF, 0,5 DTT, 0,2 Benzamidina en la proporción de 10 ml por cada gramo de mucosa.

Una vez descongelado el tejido se homogeneiza con un homogeneizador Ystral Politrón, en posición 5 durante 1 minuto. Del homogeneizado obtenido se toman muestras para posteriores determinaciones enzimáticas y de concentración de proteínas, que se filtran a través de una maya de nylon para quitar la espuma y el mucus. El resto del homogeneizado se diluye 10 veces con el mismo tampón y se centrifuga utilizando un rotor modelo JA-14 de ángulo fijo a 500 g durante 10 minutos. El sobrenadante se centrifuga a 20.000 g durante 15 minutos en el mismo rotor.

El precipitado obtenido se resuspende en 20 ml del tampón 2, que contiene (en mM) 100 manitol, 2 HEPES/Tris, pH 7,1. Se homogeneiza 2 veces durante 30 segundos con el Ystral Politrón en posición 4, y se lleva a 40 ml con la mismo solución. A este volumen se le añade MgCl₂ para una concentración final de 8 mM y se agita suavemente durante 20 minutos.

Las membranas se sedimentan por centrifugación a 2.000 g durante 10 minutos. El precipitado resultante se resuspende en 40 ml del tampón 2 y se centrifuga a 20.000 g durante 15 minutos. El precipitado que obtenemos se resuspende en 9 ml del tampón 3, que contiene (en mM) 250 sorbitol, 20 HEPES/Tris, pH 7,5, y la suspensión se homogeneiza con 100 golpes en homogeneizador Dounce (teflón-cristal). Alícuotas de aproximadamente 1,5 ml de este homogeneizado se colocan gota a gota sobre gradientes de sorbitol (ver siguiente apartado) y se centrifugan a 100.000 g, con rotor de balanceo modelo S.W.Ti en Ultracentrífuga Beckman L7-65, durante 1 hora.

Mediante una jeringa se recoge una discreta banda blanquecina que aparece cerca del borde superior de los tubos y se resuspende en 14 ml del tampón con el que se desea cargar las vesículas. La suspensión se centrifuga a 100.000 g durante 30 minutos en Ultracentrífuga con rotor modelo 42.1. El precipitado resultante se resuspende en unos 300 μ l del tampón anterior y se pasa a través de una jeringa 27 g varias veces. La suspensión de vesículas de la membrana basolateral se divide en alícuotas de 50 a 100 μ l, que se almacenan en N₂ líquido.

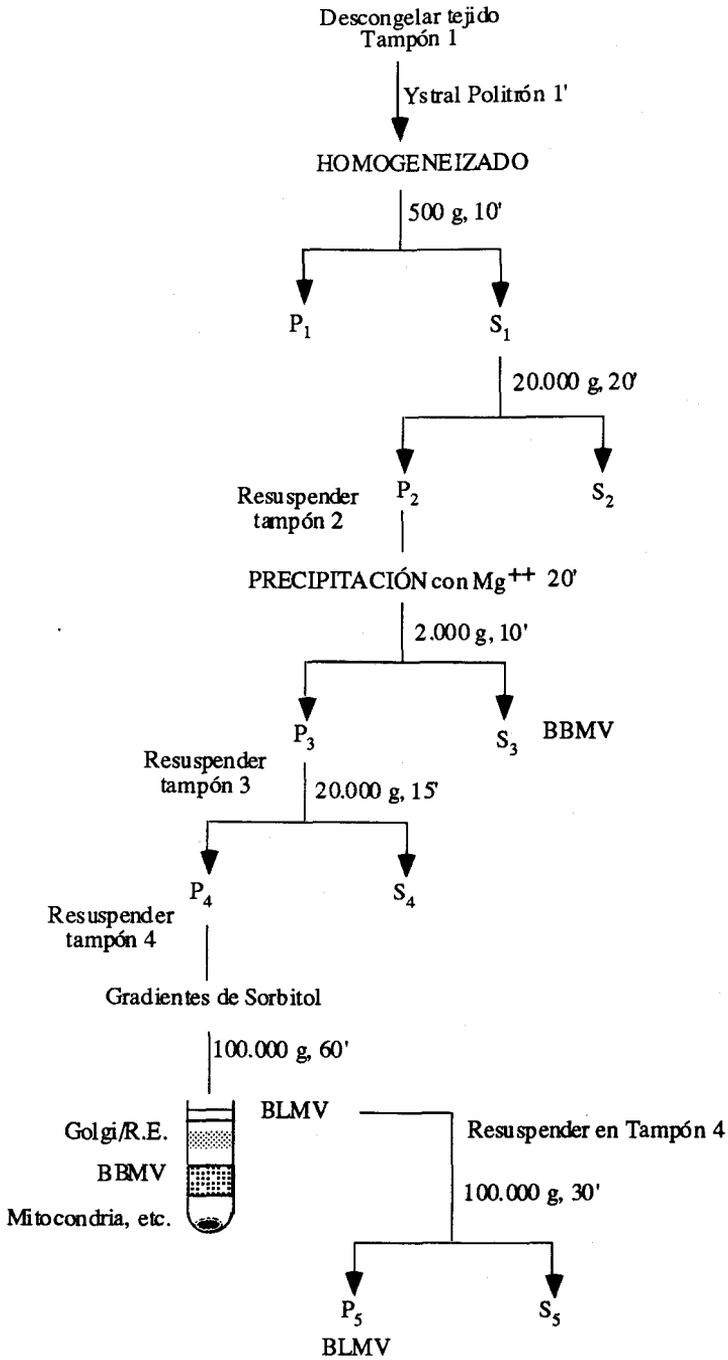


Figura 5. Esquema de la obtención de vesículas de la membrana basolateral

Preparación de los gradientes de sorbitol

Se preparan 2 soluciones de sorbitol, una al 35% (p/v) y otra al 55% (p/v), en tampón 20 mM HEPES/Tris, pH 7,5.

Para la formación de los gradientes se utilizan dos cámaras de vidrio (A y B) comunicadas por un capilar con llave de paso (Figura 6). En la cámara B se coloca un agitador magnético y posee un orificio de salida al que se conecta un tubo, que tras pasar por una bomba peristáltica (LKB Bromma 2132), llega hasta el fondo de los tubos de policarbonato de ultracentrífuga. Al final del conducto se coloca un capilar metálico de menor diámetro para evitar turbulencias.

En la cámara A se colocan 7,5 ml de la solución de sorbitol al 55% y en la cámara B 7,5 ml de la solución de sorbitol al 35%. A continuación se pone en marcha el agitador magnético y se abre la llave de paso que comunica ambas cámaras. La solución sale a través del tubo de goma y llega a los tubos de ultracentrífuga a una velocidad prefijada en la bomba peristáltica. De esta manera la velocidad de salida de la solución es siempre constante. El gradiente se va formando ya que la solución que llega al fondo del tubo es cada vez más densa y va desplazando hacia arriba a la menos densa.

Para comprobar que el gradiente de sorbitol se ha formado se centrifugan los tubos durante 1 hora a 100.000 g y se pesan fracciones sucesivas de 1 ml. La relación que se obtiene entre el peso de cada fracción y la posición de las fracciones en el tubo de centrífuga se muestra en la Figura 7.

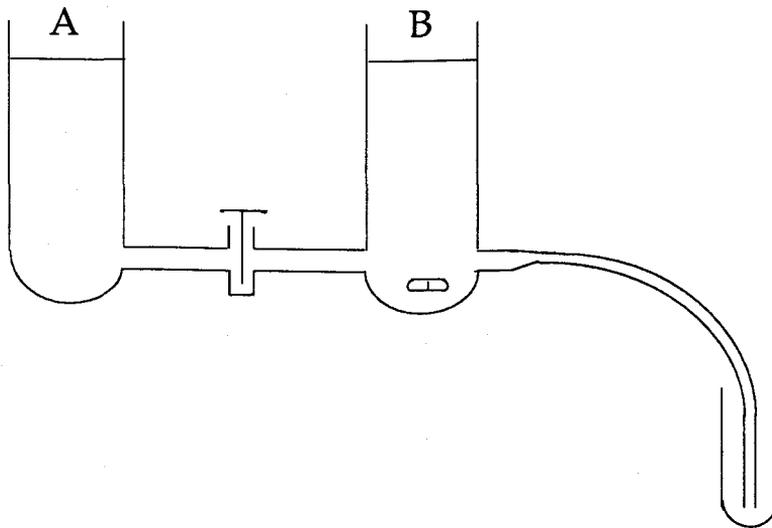


Figura 6. Esquema de las cámaras para la formación de los gradientes de sorbitol.

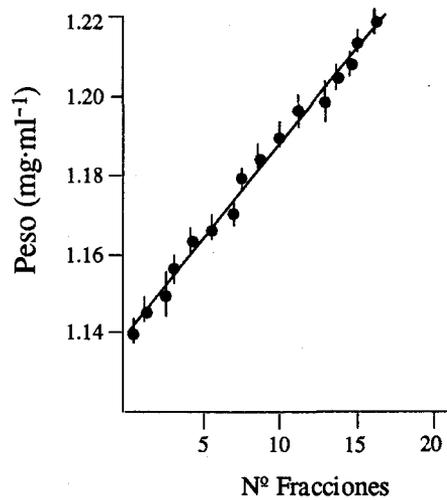


Figura 7. Perfil de los gradientes de densidad del sorbitol 35-55%.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS.

Fundamento

La concentración de las proteínas en las preparaciones biológicas empleadas se ha determinado utilizando reactivos BIO-RAD® y siguiendo el método descrito por Bradford (1976). Este método tiene la ventaja de ser muy sensible, rápido y específico.

El reactivo Coomassie Brilliant Blue G-250 se combina rápidamente con las proteínas dando lugar a un complejo azul, que queda en disolución durante al menos una hora.

Protocolo

Todo el ensayo se hace por duplicado

1. Preparación del reactivo Coomassie Brilliant Blue (CBB): Se diluye un volumen del reactivo Bio-Rad en 4 volúmenes de agua destilada. Se filtra a través de papel Whatman nº1 y se deja a temperatura ambiente.
2. Construcción de la curva patrón: A partir de una solución de 1,37 mg/ml de γ -Globulina (Bio-Rad), se preparan 6 soluciones estándares, cuya concentración de proteínas va desde 0,014 mg/ml a 1,37 mg/ml.
3. Se llevan a tubos de ensayo 100 μ l de cada solución patrón y de cada muestra problema, previamente diluida para que entre en el rango de la curva patrón.

4. Se añaden 5 ml del reactivo CBB a cada tubo de ensayo, se agita y espera 10 minutos.
5. Se lee a 595 nm frente al blanco (5 ml de reactivo CBB más 100 µl de agua), en un plazo de 50 minutos.

Una vez conocidas todas las absorbancias, se determina la concentración de proteínas de las muestras biológicas a partir de la curva patrón.

VALORACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

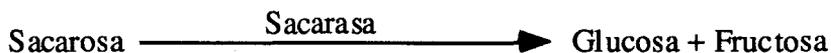
Todas las determinaciones enzimáticas se han llevado a cabo mediante métodos espectrofotométricos (Espectrofotómetro Shimadzu UV-120-01). Para conseguir mayor fiabilidad las muestras se han procesado por triplicado.

Valoración de la actividad Sacarasa

La actividad sacarasa, característica de la membrana apical de los enterocitos, se ha determinado siguiendo el método descrito por Dahlqvist (1963) y se ha utilizado el test Glucosa GOD-Perid[®] (Boehringer Mannheim).

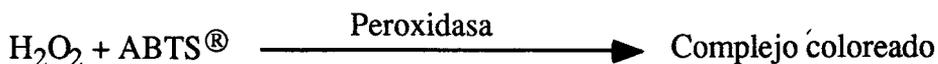
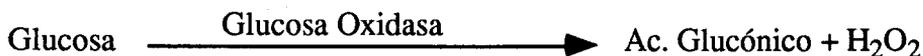
Fundamento

Se incuba la solución problema con una solución que lleva el sustrato (sacarosa) durante 30 minutos. Durante ese tiempo la sacarosa es transformada en glucosa y fructosa por la sacarasa presente en las muestras.



La actividad de la sacarasa se bloquea desnaturalizando la proteína con temperaturas elevadas antes de proceder a la determinación de la glucosa utilizando el test de la glucosa oxidasa.

La glucosa oxidasa (GOD) transforma la glucosa en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, el cual reacciona con 2,2'-azino-di-[3-etil-benzotiazolina-ácido sulfónico-(6)]-sal diamónica (ABTS[®]) dando lugar a un complejo coloreado. Esta reacción es catalizada por la peroxidasa (POD) y es estable. La absorbancia del complejo coloreado se mide a 436 nm.



Protocolo

1. Preparación de las muestras: En cada tubo de ensayo se colocan 50 μl de la muestra problema. La cantidad de proteína recomendada es 30-60 μg para el homogeneizado y 1-3 μg para las vesículas de la membrana apical.
2. Se añaden 50 μl de la solución tampón de sustrato (56 mM sacarosa en 0,1 M tampón de maleato a pH 6 con NaOH) y se incuba a 37°C en baño termostático BT (SBS) durante 30 minutos.
3. La reacción se para incubando los tubos a 100 °C durante 2 minutos y después se dejan enfriar a temperatura ambiente.

4. Se adicionan 5 ml de una solución (S) que contiene: 0,1 M tampón fosfato (pH 7), POD ($\geq 0,8$ U/I), GOD (≥ 10 U/I), ABTS[®] (1mg/ml) y dejamos a temperatura ambiente (20-25 °C) durante 25 minutos para el desarrollo del color.
5. Se lee frente al blanco (100 μ l agua destilada + 5 ml solución S).

Como estándar se toman 100 μ l de una solución de glucosa (0,5 mM) a la que también se le añaden 5 ml de la solución S.

Siempre se hace un blanco de cada muestra biológica que consiste en añadir los 50 μ l de sustrato a la muestra problema después de llevarla a ebullición durante 2 minutos y se procesan el resto de los tubos igual que a partir del punto 5. El valor de este blanco se restará del valor de sus respectivas muestras biológicas, ya que nos indica la cantidad de glucosa que hay en la muestra biológica antes de la reacción.

Una vez conocidas las absorbancias de las muestras y del estándar se calcula la cantidad de sacarosa que se ha catalizado:

$$\mu\text{mol glucosa}/\text{min}/\text{mg prot} = \frac{A_m - A_b \times C}{A_{\text{est}} \times t \times \text{mg prot vol}_m}$$

Donde la A_m , A_b , A_{est} , son las absorbancias de la muestra biológica, blanco y estándar respectivamente; C, mmoles de glucosa en la solución estándar; vol_m , volumen de muestra biológica; t, tiempo de reacción, y mg, mg de proteína en el tubo de ensayo..

Valoración de la actividad $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$.

Fundamento

La $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ se localiza en la membrana basolateral del epitelio intestinal y es inhibida por la ouabaína. Su actividad se ha determinado de acuerdo con el método descrito por Bevan *et al.* (1989), en presencia y ausencia de ouabaína. Por sustracción obtenemos el valor de la actividad de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$.

El método consiste en evaluar el fósforo inorgánico (Pi) liberado por la actuación del enzima presente en las muestras biológicas sobre el ATP. La cantidad de fósforo liberado se determina por la técnica colorimétrica de Peterson (1977).

Protocolo

1. Soluciones requeridas:

Solución 1 (en mM): 62,5 Imidazol, 50 KCl, 250 NaCl, 0,5 EDTA, 15 MgSO_4 , pH 7,6 con HCl. Estable 2-3 semanas a 4 °C.

Solución 2 (en mM): 62,5 Imidazol, 7,5 Tris/ATP, pH 7,6 con HCl. Estable 2-3 meses a -20 °C.

2. Soluciones estándares: se preparan soluciones que contienen distintas concentraciones de NaPO_4H_2 en un rango de 20-80 $\mu\text{g}/\text{tubo}$.

3. Procesamiento de las muestras problemas:

- a) En cada tubo de ensayo se colocan 50 μl de la correspondiente solución estándar y de la muestra biológica (200-500 μg proteína/ml). Se añaden 100 μl de solución 1 con o sin 4 mM de oubaína.
- b) Se preincuba la mezcla a 37 °C durante 10 minutos. Pasado este tiempo se añaden a cada tubo 100 μl de la solución 2, precalentada a 37 °C, con un intervalo de 10-15 segundos de tubo a tubo, se agita y se deja en baño a 37 °C durante 30 minutos.
- c) Se detiene la reacción añadiendo 450 μl de una solución de dodecil-sulfato sódico (SDS) al 5% y se sacan los tubos del baño.

4. Determinación del Pi:

- a) Se añaden a cada tubo (problemas y estándar) 500 μl de una solución 1,25% de heptamolibdato amónico en 2 N de HCl y después 50 μl del reactivo Fiske-Subbarow. Este reactivo se prepara según indicaciones del envase y se diluye 3 veces.
- b) Se mezcla y espera 30 minutos a temperatura ambiente y se lee a 700 nm frente al blanco.

Para ver el Pi que hay en la muestra problema se hace un blanco de cada uno de ellos, que consiste en añadir la muestra problema una vez añadido el SDS. El valor obtenido se resta de la muestra correspondiente.

Los μmoles de Pi se calculan a partir de la curva patrón y se expresan los resultados en μmoles de Pi/minuto/mg proteína.

Valoración de la actividad K-para-nitrofenil fosfatasa sensible a ouabaína

Fundamento

La actividad de la fosfatasa activada por K^+ y sensible a ouabaína (pNNPasa) es una reacción intermedia de las ATPasas del tipo E_1E_2 (Ray et al., 1976) al que pertenece la $Na^+-K^+-ATPasa$ y por tanto nos sirve de marcador de la membrana basolateral de los enterocitos.

Su actividad se ha determinado siguiendo el método descrito por Colas y Maroux (1980). Consiste en medir el para-nitrofenol liberado por acción de la para-nitrofenil fosfatasa (pNPPasa) sobre el para-nitrofenil fosfato disódico (pNPP).

La actividad de la enzima pNPPasa se define como la diferencia en la actividad observada en ausencia y presencia de ouabaína.

Protocolo

1. Se preincuban 5-10 μ l de la muestra biológica a 37°C durante 2 minutos (se toman aproximadamente 100 μ g, 20 μ g, 10 μ g de proteínas para el homogeneizado, BLMV, BBMV respectivamente)
2. Se incuban las muestras durante 10 minutos a 37°C con 0,5 ml de una solución que contiene (en mM): 50 Tris/HCl (pH 7,5), 10 $MgCl_2$, 5 EDTA, 25 KCl, 5 pNPP y 1,7 mg/ml saponina, con o sin ouabaína (4 mM).

3. La actividad de la enzima se bloquea añadiendo 0,5 ml de NaOH 1M, que además provee el pH adecuado para que el p-nitrofenol se transforme en una quinona de color amarillo que se mide, a 410 nm, frente a un blanco de agua al que también se le añade la solución que contiene el pNPP.

La cantidad de p-nitrofenol liberado se calcula:

$$\text{nmol pNPP/ min/ mg prot} = \frac{A \times \text{Vol}_c}{\epsilon \times t \times \text{mg}}$$

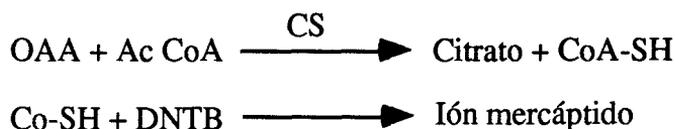
siendo A, la absorbancia de la muestra; Vol_c, volumen de la cubeta; ε, coeficiente de extinción molar que es 17.000 l/mol x cm; t, tiempo de reacción; mg, son los mg de proteínas en el volumen de la muestra problema.

Valoración de la actividad citrato sintasa

La determinación de la actividad de la citrato sintasa, marcador mitocondrial, se realizó según el método descrito por Srere (1969).

Fundamento

La citrato sintasa (CS) cataliza la reacción del acetyl coenzima A (Ac CoA) con el oxalacetato (OAA) para formar citrato y coenzima A (CoA-SH). El CoA-SH reacciona con el 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoato) (DTNB) dando el ión mercáptido que es el que se valora:



Protocolo

1. Se prepara de forma extemporánea el DTNB (0,8 mM) y el OAA (2mM) disolviéndolos en tampón Tris-HCl 0,5 M a pH 8. El Ac CoA se prepara en agua (3,4 mM).
2. En la cubeta de reacción se colocan 10-20 μ l de muestra biológica (10 μ g proteínas para el homogeneizado y 20-30 μ g de proteína para las vesículas de la membrana apical). Se añaden los reactivos para una concentración final de 0,2 mM de OAA y 0,25 mM de DTNB, en un volumen final de 1 ml. El Ac CoA, 0,1 mM, se añade justo antes de medir, ya que la reacción es muy rápida.
4. Se lee a 412 nm frente a un blanco donde se ha omitido el Ac CoA y la muestra biológica.
5. Los pmoles citrato/min/mg prot se calcula según la formula:

$$\text{pmoles citrato/min/mg prot} = \frac{A \times V_R}{\epsilon \times \text{mg}}$$

donde ϵ , es la absortividad molar que tiene un valor de $13,6 \times 10^6$ cm^2/mol ; A, es la absorbancia; V_R , es el volumen de reacción, y mg, son los mg de proteínas en el volumen de la muestra problema.

ESTUDIO DEL TRANSPORTE DE SOLUTOS POR LA MEMBRANA

Las vesículas de membrana se incuban con un medio de composición deseada, que contiene el sustrato en estudio, durante el periodo de tiempo requerido. La incubación se realiza a temperatura ambiente (25 °C), para lo que las vesículas se atemperan previamente durante 10 minutos. El periodo de incubación se inicia adicionando 10 μ l (250 μ g de proteína) de la suspensión de vesículas a 90 μ l de medio de incubación.

Transcurrido el periodo de tiempo deseado, la incubación se para con 2,5 ml de solución de "parada" (4 °C), que detiene el transporte del sustrato debido a su temperatura y a la dilución del medio de incubación. La composición de la solución de parada es la misma que la solución intravesicular.

La separación de las membranas del medio de incubación se ha realizado por filtración (Hopfer *et al.*, 1973), que permite una rápida separación y por tanto el empleo de tiempos de incubación del orden de segundos.

Las muestras se filtran rápidamente bajo vacío a través de un filtro de nitrocelulosa, de 0,22 μ m de tamaño de poro, que retiene las vesículas. Inmediatamente los filtros se lavan con 5 ml de solución de "parada" fría, con el fin de eliminar la radioactividad retenida por el filtro y que no corresponde a la contenida dentro de las vesículas. Los filtros se llevan a viales que contienen 5 ml de líquido de centelleo Ready Protein (Beckman). La

radioactividad se determina por espectrometría de centelleo líquido, en contador Kontron (β -Matic).

La unión no específica del radioisótopo al filtro se determinó adicionando solución de "parada" a la suspensión de vesículas antes de añadir el medio de incubación y el valor de radioactividad que se mide se sustrae del total de radioactividad medido en cada muestra.

Todos las medidas se hicieron por triplicado. Para determinar la actividad específica del radioisótopo en el medio de incubación se toman 50 μ l de la mezcla final (medio de incubación y solución de parada) en viales con líquido de centelleo.

La entrada de soluto a las vesículas se calcula como se indica a continuación:

$$\mu\text{moles/mg prot} = \frac{\text{cpm}_c - \text{cpm}_b}{\text{cpm}_{st}} \times \frac{V_{m_i} \times [S] \times V_{st}}{\text{mg} \times V_f}$$

donde cpm, son cuentas por minuto (p, del problema; b, del blanco; st, del estándar); V_{m_i} , es el volumen del medio de incubación en ml; [S], es la concentración de sustrato en mM; V_{st} , es el volumen del estándar en ml; mg, son los mg de proteínas que hay en el tubo de reacción, y V_f , es el volumen filtrado en ml.

TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los resultados se presentan como valores medios \pm el error estándar de la media, acompañados del número de experimentos independientes (n). La significación de las diferencias entre medias se valoró mediante el test de la t de Student, considerándose estadísticamente significativas para valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

PUREZA DE LAS PREPARACIONES DE LAS VESÍCULAS DE LA MEMBRANA APICAL Y DE LA MEMBRANA BASOLATERAL DE ENTEROCITOS DE POLLO

El movimiento de glucosa a través de la membrana plasmática necesita la interacción con permeasas específicas. La absorción de la glucosa en el intestino y en los riñones requiere el paso a través de las dos membranas de las células epiteliales: la apical, o borde en cepillo, situada en la luz del órgano, y la basolateral en contacto con el medio interno. El movimiento neto de la glucosa a través de los epitelios intestinal y renal se debe a que sus células presentan dos tipos de transporte para la glucosa: uno activo, dependiente de Na^+ , inhibido por florricina (Crane, 1960) y localizado en la membrana apical (Crane *et al.*, 1961), y otro pasivo, independiente de Na^+ , inhibido por floretina (Kimmich y Randles, 1978) y por citocalasina B (Kimmich y Randles, 1979) y localizado en la membrana basolateral (Bihler y Cybulski, 1973) (Figura 8). La glucosa atraviesa los epitelios en contra de su gradiente de concentración porque ambos tipos de transportadores actúan en serie: la glucosa se concentra en las células por transporte activo y difunde al plasma por difusión facilitada.

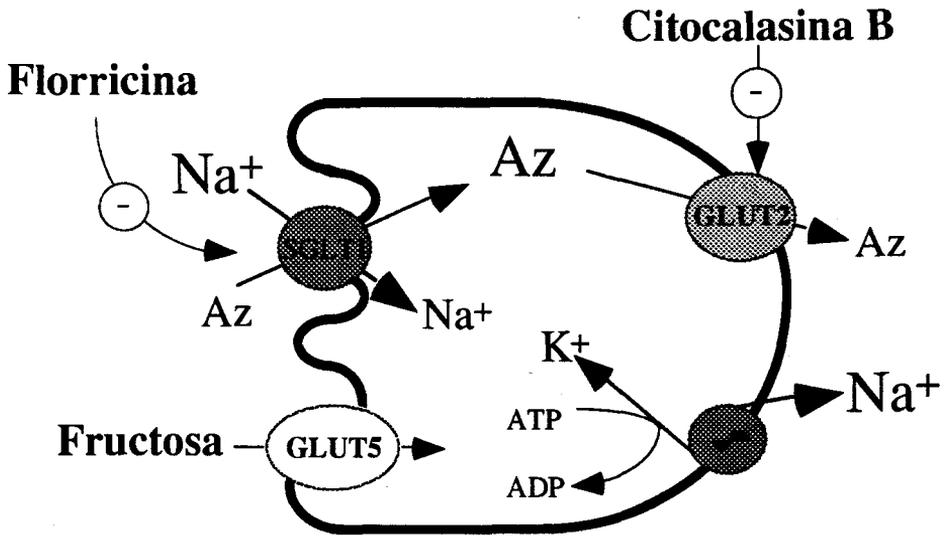


Figura 8. Transportadores de azúcares en la membrana plasmática de los enterocitos.

Transporte de azúcares acoplado al Na⁺

Se ha clonado y secuenciado el ADN complementario que codifica el transportador de glucosa acoplado al Na⁺ en intestino delgado de conejo, el llamado transportador SGLT-1 (Hediger *et al.*, 1987; Wright, 1989, 1991, 1993). Esta secuencia de ADN, que determina una proteína de 662 aminoácidos y 73 kDal, no es homóloga de los genes responsables del transporte de azúcares independiente de Na⁺ en mamíferos, levaduras o bacterias (Balwin y Henderson, 1989). El gen clonado se ha expresado en oocitos de *Xenopus* y en varios tipos de células de mamífero. En cada caso el transportador clonado reproduce las propiedades del transportador de la glucosa dependiente de Na⁺: selectividad para el azúcar y el Na⁺, dependencia del potencial de membrana, constante aparente de transporte (K_m) para el azúcar y constante aparente de inhibición (K_i) para la florricina (Umbach *et al.*, 1990). A partir de la secuencia de aminoácidos predicha se han sintetizado péptidos correspondientes a regiones extra e intracelulares del transportador y se han obtenido anticuerpos contra ellos. Estos anticuerpos reconocen una proteína de unos 70 kDal de la membrana apical del epitelio intestinal (Wright, 1989, 1991). Estos y otros estudios han revelado un gran parecido entre los transportadores intestinales y los renales y entre los transportadores intestinales de distintos mamíferos (Wright, 1989, 1991). Inicialmente se propuso que el transportador funcionaba como un homotetrámero (Stevens *et al.*, 1990). Mas recientemente se piensa que funciona como un monómero.

En la actualidad, además de SGLT-1 que transporta dos Na⁺ y una glucosa con alta afinidad, se han descrito otros dos transportadores de

glucosa acoplados al Na^+ : el SGLT-2, de baja afinidad, que transporta glucosa y Na^+ con estequiometría 1:1, y el SGLT-3 que presenta una homología del 60 % con SGLT-2. Estos últimos se localizan en el epitelio renal (Hediger *et al.*, 1995).

Transporte de azúcares por difusión facilitada

También se han clonado y secuenciado los genes responsables de los transportadores que median el transporte de glucosa por difusión, llamados genéricamente GLUT. El GLUT del eritrocito humano, que es relativamente abundante, fue aislado en 1977 y el gen correspondiente fue clonado en 1985 (Mueckler *et al.*, 1985). Esa secuencia de ADN sirvió de sonda para aislar genes homólogos responsables de otros transportadores numerados consecutivamente del 1 al 7 en orden de su descubrimiento (Thorens, 1993; Gould y Holman, 1993). Estos transportadores se parecen por su secuencia, estructura y función, pero difieren en su expresión en distintos tejidos. En los enterocitos se expresa el GLUT-2 que se encuentra en la membrana basolateral (Thorens *et al.*, 1990) y el GLUT-5 en la apical (Davidson *et al.*, 1992). Este último parece ser el transportador de la fructosa (Buran *et al.*, 1992). El GLUT-1 está presente en varios tejidos: eritrocitos, cerebro, placenta, retina, etc. y el GLUT-3 se expresan en tejidos con alta demanda de glucosa, como son cerebro y los nervios. El GLUT-4 solo se ha clonado y secuenciado en el músculo y tejido adiposo y el GLUT-6 parece ser una modificación del GLUT-3. Finalmente, el GLUT-7 se ha localizado en el retículo endoplásmico de hígado (Gould y Holman, 1993).

Características de las vesículas de la membrana apical o borde en cepillo (BBMV)

Se han utilizado dos métodos (I y II, ver Material y Métodos) para obtener vesículas de la membrana apical de los enterocitos de pollo, ambos basados en la precipitación de las membranas no apicales con el catión Mg^{2+} . El Mg^{2+} se une preferentemente a membranas no apicales, por presentar mayor densidad de carga positiva que el resto de las membranas celulares (Kessler *et al.*, 1978).

La pureza de las preparaciones de las vesículas de la membrana apical se evaluó midiendo las propiedades características de esta membrana (la actividad de la sacarasa y el transporte de α -Metil-Glucosa dependiente de Na^+), las de la membrana basolateral (la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa o de la p-NNPasa sensible a ouabaína) y las de membrana mitocondrial (la actividad de la citrato sintasa). Los resultados revelan (Tabla 3) que, respecto a la medida en el homogenado, la actividad de la sacarasa se enriqueció aproximadamente 10 veces en los preparados de vesículas de la membrana apical obtenidos con el Método I y 18 veces en los obtenidos con el Método II. La contaminación por membrana basolateral (actividad de la pNNPasa sensible a ouabaina y de la Na^+/K^+ ATPasa) o mitocondrial (actividad de la citrato sintasa) es pequeña en ambos tipos de membrana apical y algo menor en las obtenidas con el Método II.

Tabla 3. Actividades específicas y factores de enriquecimiento de enzimas marcadores .

Enzima	Marcador de:	Método	$\mu\text{mol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$		F. E.
			H	V	
Sacarasa	BBMV	I	2,2 $\pm 0,84$	21,2 $\pm 9,6$	9,6 $\pm 0,70$
		II	2,01 $\pm 0,23$	36,9 $\pm 5,6$	18,5 $\pm 1,8$
Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa	BLMV	I	4,86 $\pm 1,08$	5,4 $\pm 0,8$	1,1 $\pm 0,15$
pNPPasa	BLMV	II	1,2 $\pm 0,19$	0,22 $\pm 0,04$	0,2 $\pm 0,06$
Citrato Sintasa	Mitocondria	I	5,4 $\pm 0,5$	0,09 $\pm 0,01$	0,019 $\pm 0,001$
		II	5,8 $\pm 0,19$	0,043 $\pm 0,01$	0,007 $\pm 0,001$

H, homogenado; V, vesículas de la membrana apical; F.E., factor de enriquecimiento, que viene dado como la relación de la actividad específica medida en las preparaciones de vesículas de membrana respecto a la medida en el homogenado; Método I y Método II, métodos utilizados para la obtención de vesículas de la membrana apical. La actividad específica se expresa en $\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. n=8

La entrada del azúcar a las vesículas de la membrana apical obtenidas por el Método I se muestra en la Figura 9 y para las obtenidas con el Método II en la Figura 10. En ambos casos, la entrada del azúcar independiente de Na^+ aumentó con el tiempo de incubación, alcanzando una meseta o estado de equilibrio al cabo de 30 minutos. En el estado de equilibrio la concentración intravesicular de azúcar se iguala a la extravesicular. En presencia de Na^+ , las vesículas acumularon azúcar transitoriamente. En las obtenidas por el Método I la máxima acumulación se observó al cabo de un minuto y tiene un valor de 3 veces el medido en el equilibrio. En las vesículas obtenidas por el Método II la acumulación del azúcar fue máxima a los 30 segundos y 12 veces el valor obtenido en el equilibrio.

El volumen intravesicular se calculó a partir de la captación del azúcar medida en el equilibrio y es de $1 \pm 0,01 \mu\text{l}/\text{mg}$ proteína.

En el laboratorio de la Dra. S. Shirazy-Beechey se ha realizado un estudio inmunológico ("Western blot") del SGLT-1 de las membranas apicales de enterocitos de conejo, pollo y cordero (Vazquez *et al.*, 1993). Se empleó un anticuerpo policlonal que reconoce la secuencia de aminoácidos 412-420 del SGLT-1 del intestino delgado de conejo. La Figura 11 muestra que dicho anticuerpo reconoce una proteína de aproximadamente 64 Kd en las membranas apicales de los enterocitos de pollo. En el caso del cordero y de la oveja la proteína es de 70 Kd y 75 Kd, respectivamente

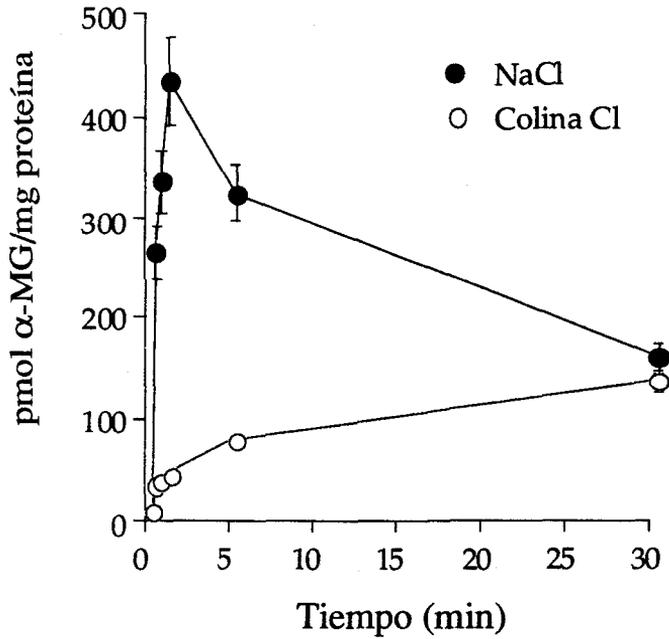


Figura 9. Entrada de α -Metil-Glucosa a lo largo del tiempo a BBMV aisladas del yeyuno de pollo con el Método I. Las vesículas estaban cargadas con la solución F y la composición de los medios de incubación fue la solución G que contenía 0,1 mM α -M-Glucosa y trazas de ^{14}C - α -MG. n=4.

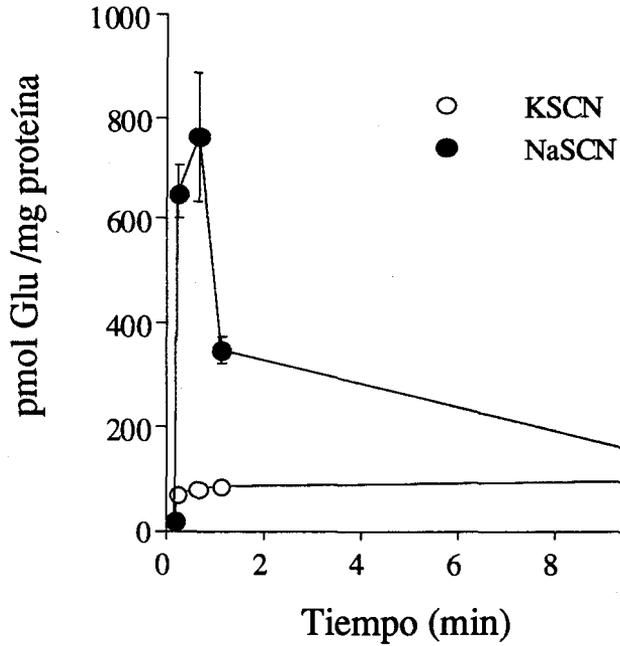


Figura 10. Entrada de Glucosa a lo largo del tiempo en BBMVs aisladas del yeyuno de pollo con el Método II. Las vesículas estaban cargadas con la solución H y la composición de los medios de incubación fue la solución I que contenía 0,1 mM Glucosa y trazas de ^{14}C -Glucosa. $n=4$.

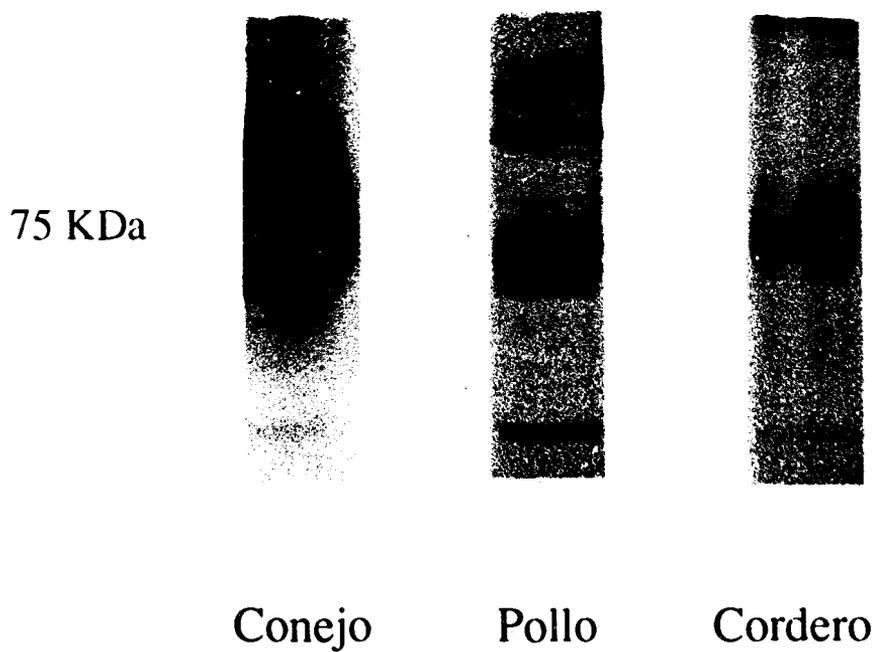


Figura 11. Análisis inmunológico del SGLT-1 en vesículas de membrana apical de intestino delgado del conejo, cordero y pollo.

Vesículas de la membrana basolateral (BLMV)

Al igual que en el caso de las preparaciones de vesículas de la membrana apical, la pureza de las preparaciones de vesículas de la membrana basolateral de los enterocitos de pollo se estimó midiendo la actividad de enzimas marcadores de membranas, el transporte de glucosa e inmunológicamente el tipo de transportador de glucosa presente en las membranas obtenidas.

En la Tabla 3 se resume la actividad de la sacarasa y de la p-NPPasa. Las preparaciones de vesículas de la membrana basolateral presentaron un enriquecimiento en la actividad de la p-NPPasa sensible a ouabaína de 8, mientras que el factor de enriquecimiento para la actividad sacarasa fue tan solo de 0,6.

La captación de glucosa por las vesículas de la membrana basolateral no se modificó por la presencia de Na^+ en el medio de incubación (Figura 12) y fue inhibida (Figura 13) por la citocalasina B (50 μM) y la floretina (100 μM) en un 30,5 % y 41,6 %, respectivamente.

En el laboratorio de la Dra. S. Shirazy-Beechey se realizó un estudio inmunológico ("Western Blot") del GLUT-2 de las membranas basolaterales de los enterocitos de pollo. Se empleó como control el homogenado de hígado de rata. La Figura 14 muestra que el anticuerpo reconoce en las membranas basolaterales de los enterocitos de pollo una proteína de semejante peso molecular a la (64 KDa) que el GLUT-2 presente en homogenado de hígado de rata.

Tabla 4. Actividades específicas y factores de enriquecimiento de enzimas marcadores de BLMV.

Enzima	Marcador de:	$\mu\text{mol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$		
		H	V	F. E.
pNPPasa	BLMV	1,22 $\pm 0,14$	9,8 $\pm 0,66$	8,0 $\pm 0,12$
Sacarasa	BBMV	2,6 $\pm 0,2$	1,56 $\pm 0,17$	0,6 $\pm 0,08$

H, homogenado; V, vesículas de la membrana basolateral; F.E., factor de enriquecimiento que viene dado como la relación de la actividad específica medida en las preparaciones de vesículas de membrana respecto a la medida en el homogenado. La actividad específica se expresa en $\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. n=7.

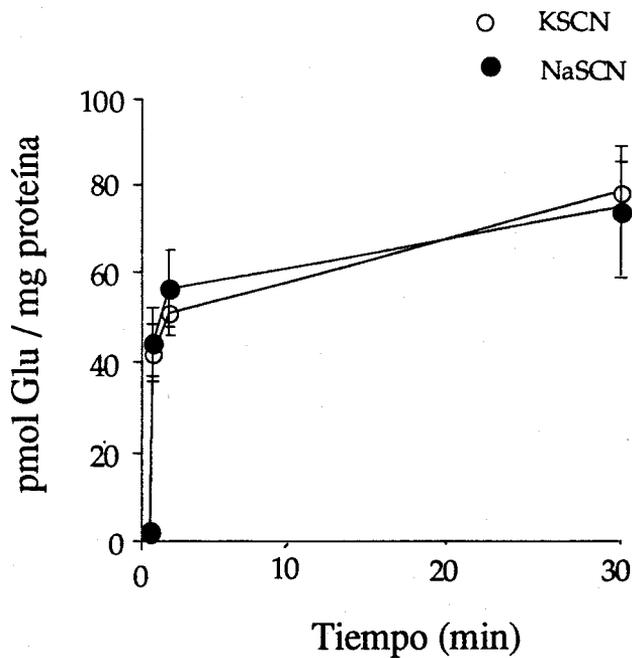


Figura 12. Entrada de Glucosa a lo largo del tiempo en BLMV aisladas de yeyuno de pollo. Las vesículas estaban cargadas con la solución H y la composición del medio de incubación fue la solución I que contenían 0,1 mM Glucosa y trazas de ^{14}C -Glucosa. n=4.

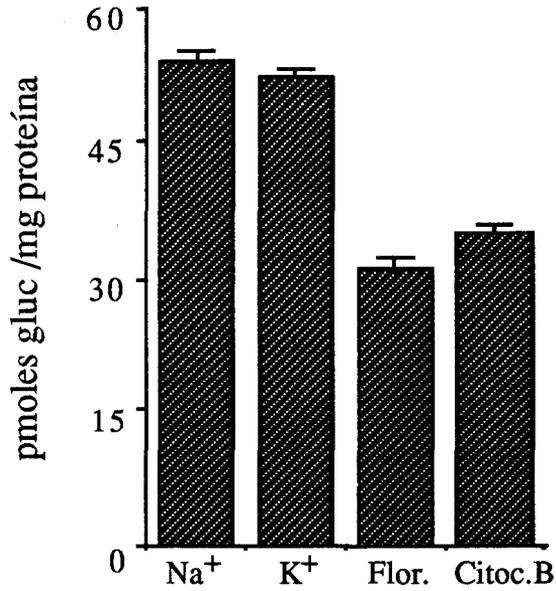


Figura 13. Entrada de glucosa a BLMV de enterocitos de pollo. Las vesículas se preincubaron durante 15 minutos con 50 μ M de citocalasina B (Citoc. B) o con 100 μ M de Floretina (Flor.). La duración del periodo de transporte fue de 1 minuto. n=4.

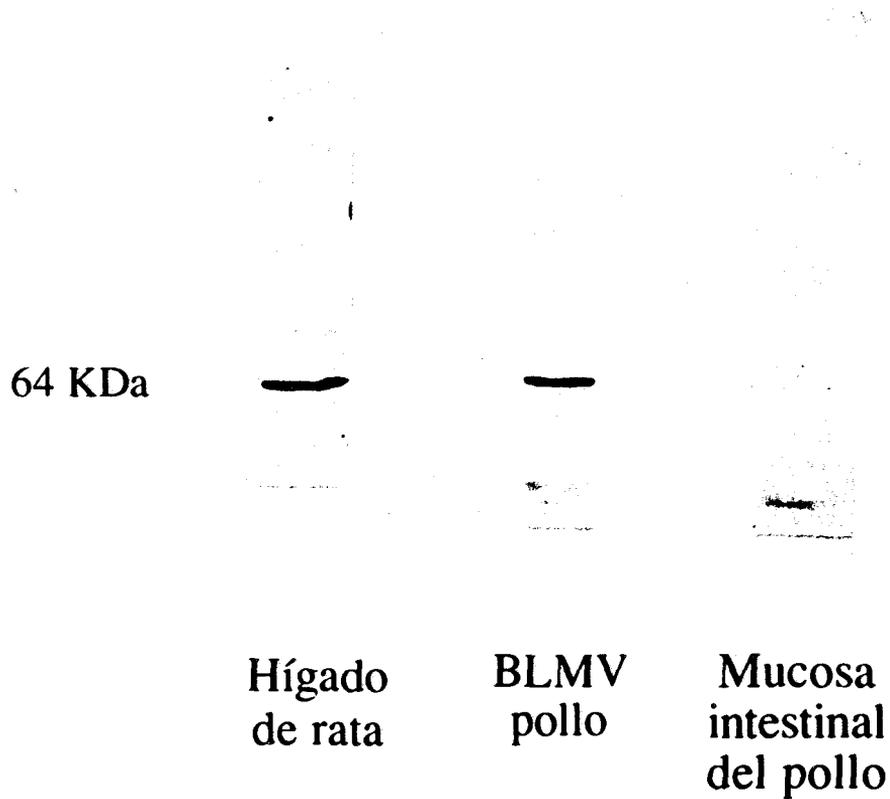


Figura 14. Análisis inmunológico del GLUT-2 en vesículas de membrana basolateral de intestino delgado del pollo y de hígado de rata.

TRANSPORTE DEL Cl^- EN VESÍCULAS DE LA MEMBRANA APICAL DE LOS ENTEROCITOS DE POLLO

La presencia del intercambiador Cl^- /base en las membranas apicales de los enterocitos de pollo se ha determinado midiendo la entrada de cloruro a las mismas en presencia (pH_i 7,7/ pH_o 5,5) y ausencia (pH_i 7,7/ pH_o 7,7) de un gradiente de pH. Se ha utilizado $^{36}\text{Cl}^-$ como marcador de Cl^- . Todas las medidas se han realizado en medios nominalmente libres de Na^+ .

Un gradiente de pH estimuló transitoriamente la entrada de cloruro a las vesículas de la membrana apical (Figura 15). La captación de cloruro fue máxima entre 1 y 10 minutos de incubación y aproximadamente el doble de la observada en el estado de equilibrio. En ausencia de un gradiente de pH la captación de Cl^- aumentó con el tiempo, alcanzando una meseta a partir de los 15 minutos.

El volumen intravesicular se calculó a partir de la captación de Cl^- medida en el estado de equilibrio y tiene un valor de $0,67 \pm 0,04 \mu\text{l}/\text{mg}$ proteína.

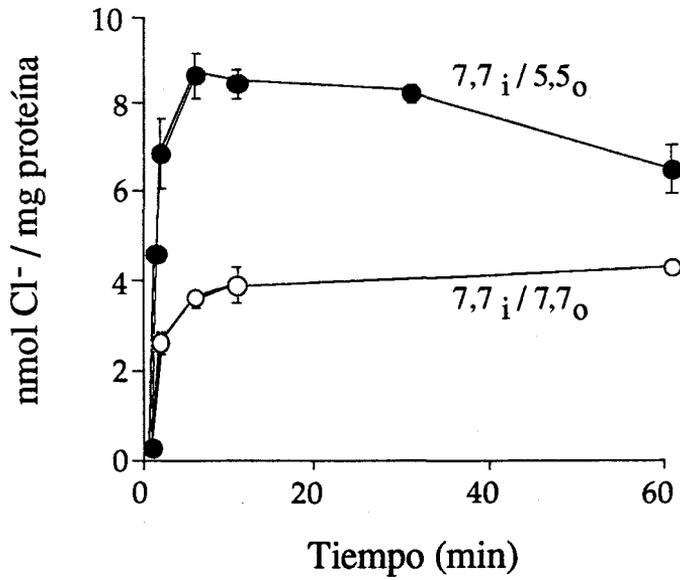


Figura 15. Gradiente de pH y entrada de Cl^- a BBMV. Vesículas cargadas con solución A, a pH 7,7, se incubaron en solución A, a pH 7,7 o 5,5. La concentración de ^{36}Cl fue 10 mM. n=4.

La estimulación en la entrada del cloruro a las vesículas de membrana inducida por el gradiente de pH podría ser debida, total o parcialmente, a la acumulación de cargas positivas dentro de las mismas, provocada por la disipación del gradiente de pH. Para evitar el efecto del gradiente eléctrico sobre la captación del cloruro por las vesículas de membranas apicales, las medidas se repitieron en condiciones experimentales en las que se anuló la generación del potencial de membrana. Para ello, se colocó la misma concentración de K^+ dentro y fuera de las vesículas y se añade valinomicina al medio de incubación (condiciones de "voltaje anulado").

La valinomicina causó una pequeña, pero significativa, disminución en la entrada del cloruro después de 5 minutos de incubación (Figura 16). El resto de los experimentos descritos en la presente Memoria se hicieron bajo condiciones de "voltaje anulado".

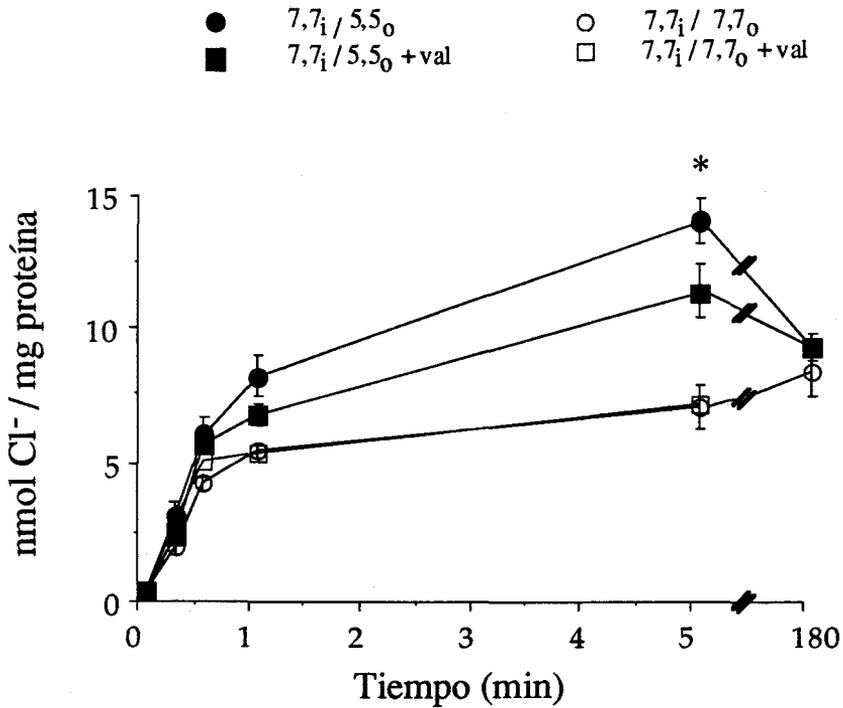


Figura 16. Efecto de la valinomicina sobre la entrada de Cl^- a BBMV con y sin gradiente de pH. Las vesículas cargadas con solución A, a pH 7,7, se incubaron en solución A, a pH 7,7 o 5,5. La concentración de $^{36}\text{Cl}^-$ fue de 10 mM y la de valinomicina (val) de 45 μM . $n=5$. * $P < 0,05$, la diferencia con y sin valinomicina.

Efecto de la osmolaridad sobre el transporte de cloruro

La cantidad de cloruro atrapado por las vesículas de membrana es el resultado de la unión no específica del anión a la membrana y de la entrada del anión al espacio intravesicular. La unión no específica de los sustratos a la superficie de la membrana puede sobreestimar los valores de transporte del sustrato por las vesículas de membrana. Para cuantificar la unión no específica se midió la entrada de cloruro a vesículas incubadas en medios con diferente osmolaridad, que se consiguió variando la concentración de manitol. Los experimentos se realizaron en presencia de un gradiente de pH y el período de incubación fue de 90 minutos.

La entrada de Cl^- a las vesículas disminuyó al aumentar la osmolaridad del medio de incubación (Figura 17). La relación entre la captación de cloruro y el inverso de la osmolaridad fue lineal. La extrapolación de la línea a osmolaridad infinita, donde el volumen intravesicular es cero, permite calcular la unión inespecífica del cloruro a las membranas. Dicha unión fue 0,13 nmol/mg proteína y representa un 3,5 % de la entrada de cloruro medida en condiciones estándar: osmolaridad de 270 mosmoles/l. Estos resultados indican que la unión inespecífica del cloruro a la membrana es despreciable y que prácticamente todo el Cl^- retenido por las vesículas de membrana se encuentra en el espacio intravesicular osmóticamente activo.

Estas conclusiones se vieron corroboradas por los resultados obtenidos empleando el ionóforo de protones carbonilcianida m-clorofenilhidrazona (CCCP). La Figura 18 muestra que, tras 5 min de incubación y en presencia de un gradiente de pH, la adición de 95 μM de CCCP provocó la liberación del cloruro previamente captado por las vesículas.

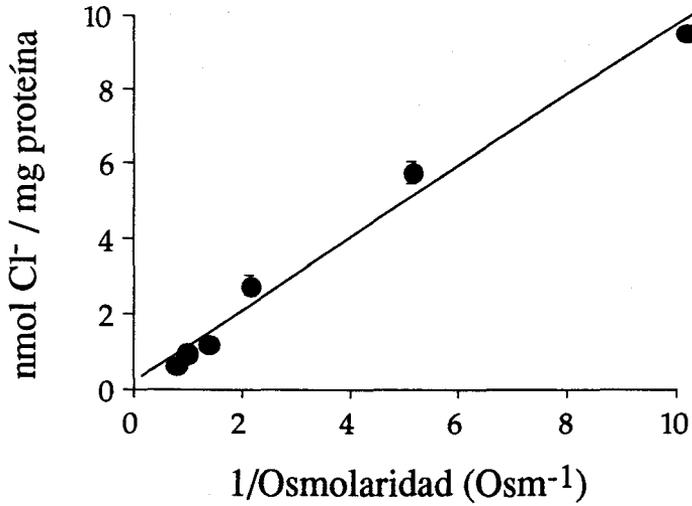


Figura 17. Efecto de la osmolaridad extravesicular sobre la entrada de Cl⁻ a las BBMV. Las vesículas cargadas con solución A, a pH 7,7 y osmolaridad de 270 mosmol/l, se incubaron durante 1 hora en la solución A, a pH 5,5, de osmolaridad variable. La concentración de ³⁶Cl⁻ fue de 5 mM. n=3. La ecuación de la recta es: $y = 0,12975 + 0,9453 x$, $r = 0,983$.

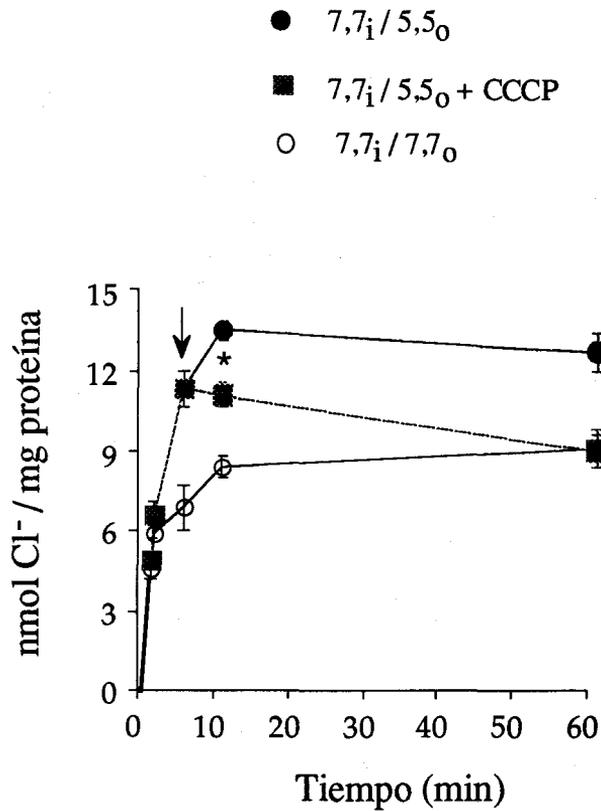


Figura 18. Efecto del CCCP sobre la entrada de Cl⁻ a las BBMV. Condiciones experimentales como en Figura 16. n=6. * P < 0,005 respecto al transporte medido con gradiente de pH.

Efecto de los derivados de estilbeno sobre el transporte de cloruro dependiente del gradiente de pH.

Los resultados expuestos revelan la presencia en la membrana apical de los enterocitos de pollo de un sistema electroneutro que transporta Cl^- acoplado al gradiente de protones o del ión hidroxilo. Para poner de manifiesto si dicho sistema de transporte era un transportador aniónico, se midió el efecto de los derivados de estilbeno, H₂-DIDS y SITS, sobre la entrada de cloruro a vesículas de la membrana apical. Los derivados de estilbeno se han descrito como inhibidores relativamente específicos de los transportadores aniónicos (Cabanchik *et al.*, 1978).

En estos experimentos se midió la entrada de Cl^- a las vesículas de la membrana apical en presencia y ausencia de un gradiente de pH y de los correspondientes inhibidores. En presencia de un gradiente de pH el SITS (Figura 19 A) y el H₂DIDS (Figura 19 B) inhibieron el transporte de cloruro en aproximadamente un 70 %. En ausencia de un gradiente de pH, la inhibición provocada por el SITS fue de un 32 %, mientras que el H₂DIDS no tuvo efecto.

La relación entre el porcentaje de inhibición de la entrada de cloruro dependiente de pH y el logaritmo de la concentración del SITS en el medio de incubación se muestra en la Figura 20. El 100 % de inhibición se obtuvo con 5 mM de SITS. La representación de Dixon (Figura 21) permite calcular la concentración de SITS necesaria para inhibir en un 50 % (IC₅₀) la entrada de cloruro dependiente de pH y tiene un valor de 700 μM .

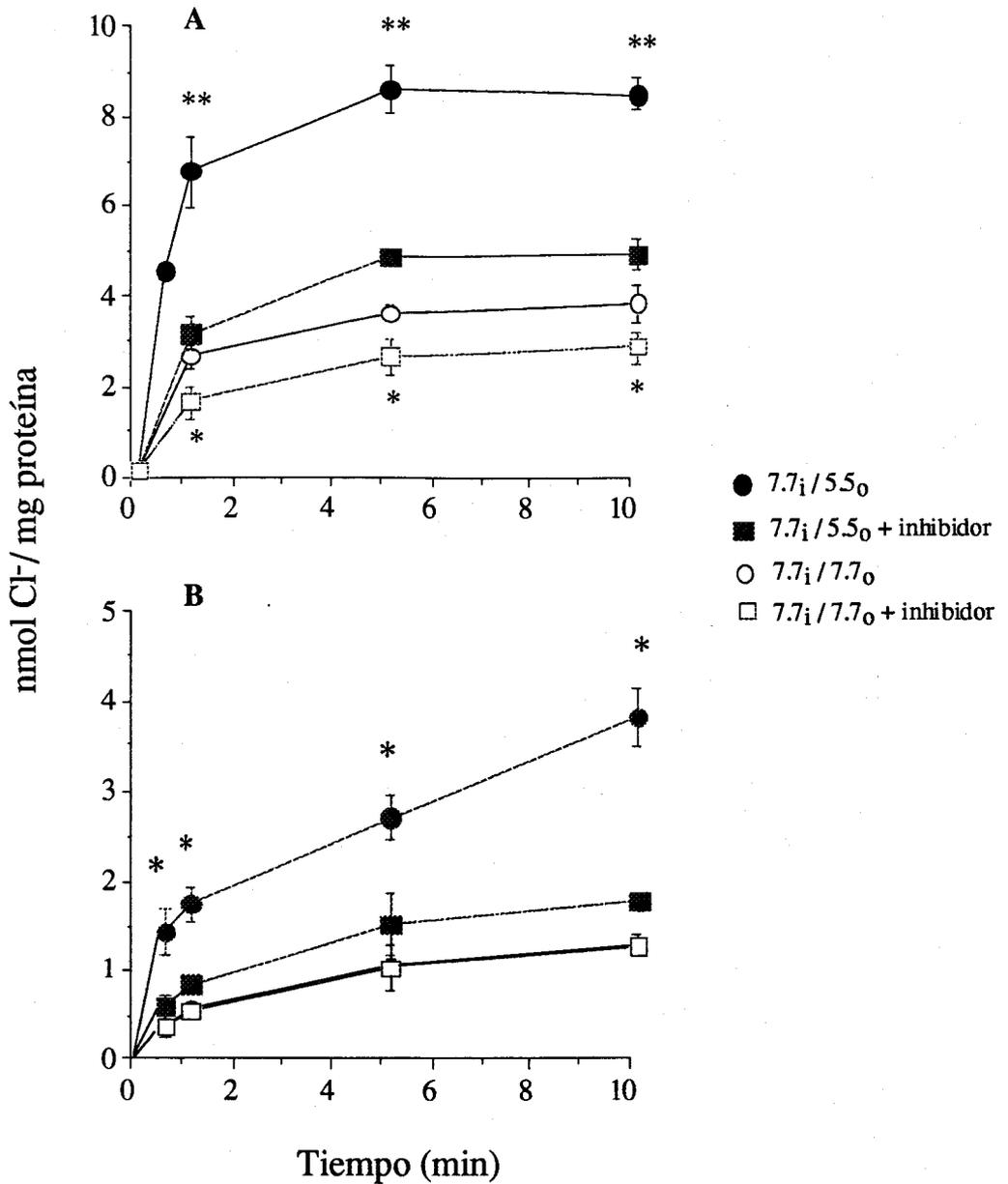


Figura 19. Efecto del SITS y el DIDS sobre la entrada de Cl^- a BBMV. Las vesícula se incubaron con o sin el inhibidor correspondiente. A. $^{36}\text{Cl}^-$ = 10 mM y [SITS] = 3 mM. B. $^{36}\text{Cl}^-$ = 5 mM y [H₂DIDS] = 2 mM. n=4. **P < 0,001, *P < 0,05, respecto al valor obtenido sin inhibidor.

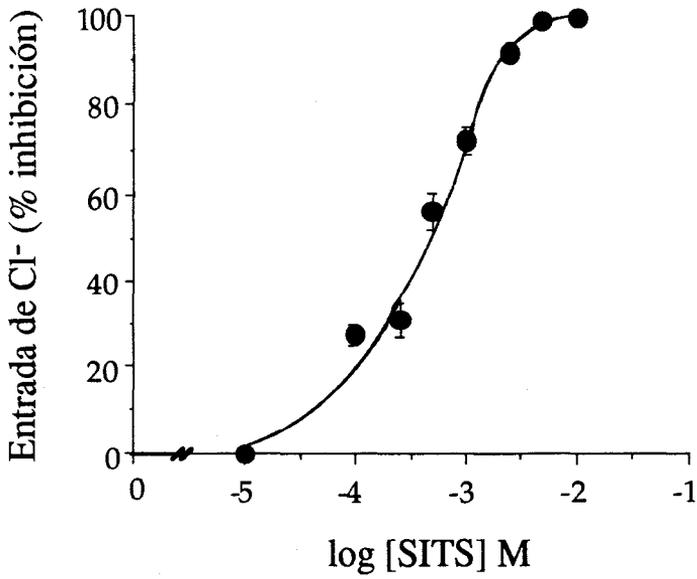


Figura 20. Efecto de la concentración del SITS sobre la entrada de cloruro a las BBMVs. Las vesículas cargadas con solución A, pH 7,7 se incubaron durante 15 s en solución A, pH 5,5 que contenía 10 mM $^{36}\text{Cl}^-$, 45 μM valinomicina y SITS a las concentraciones indicadas. n=9.

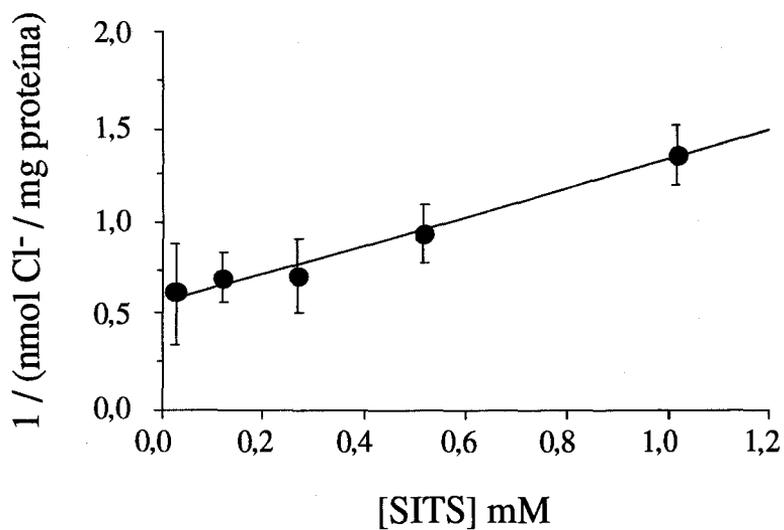


Figura 21. Representación de Dixon. Se representan los datos mostrados en la figura 20. La ecuación de la recta es: $y = 0,54166 + 0,75072 x$. $R = 0,980$.

Efecto del bicarbonato sobre la entrada de cloruro a las vesículas de la membrana apical.

Para investigar si el sistema electroneutro que transporta el Cl^- acoplado al gradiente de pH puede transportar bicarbonato en intercambio con Cl^- , se midió el efecto de un gradiente de bicarbonato, dirigido hacia el exterior de las vesículas de membrana, sobre la entrada de Cl^- a las mismas. Las condiciones experimentales empleadas se detallan en la Figura 22. Cuando se impuso un gradiente de bicarbonato, éste solo se añadió al medio intravesicular a una concentración de 50 mM y la capacidad amortiguadora de las vesículas se mantuvo constante, en las diferentes condiciones experimentales, modificando adecuadamente la concentración intravesicular del HEPES/Tris. Los medios que contenían bicarbonato se gasearon con 95% O_2 /5% CO_2 y los que no lo contenían con 100% N_2 .

Los resultados (Figura 23 A) revelan que la entrada del cloruro a las vesículas de membrana fue significativamente estimulada por la imposición de un gradiente de HCO_3^- , tanto en presencia como en ausencia del gradiente de pH.

Para eliminar el efecto del potencial de membrana, generado por la disipación de los gradientes de bicarbonato y de protones, los experimentos se repitieron bajo condiciones de "voltaje anulado" tal como se explicó anteriormente. Estas condiciones experimentales disminuyeron, pero no anularon, la estimulación en la entrada de cloruro a las vesículas inducida por un gradiente de bicarbonato (Figura 23 B), aunque la estimulación solo fue significativa en presencia de gradiente de pH. Los resultados sugieren que en

presencia de bicarbonato la entrada del cloruro a las vesículas de la membrana apical puede estar acoplada de forma eléctricamente neutra a la salida de bicarbonato.

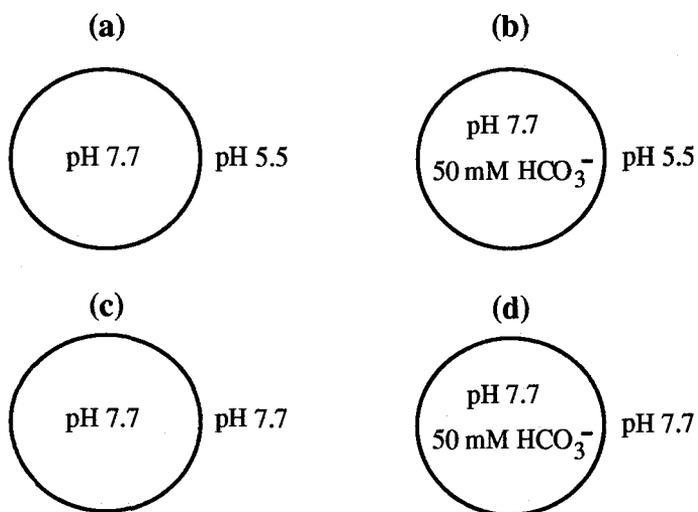


Figura 22. Condiciones experimentales. a) y c) la solución intra y extravésicular fue la solución A. b) y d) la solución intravesicular fue la solución D y la extravésicular la A. Todas ellas a los pH indicados.

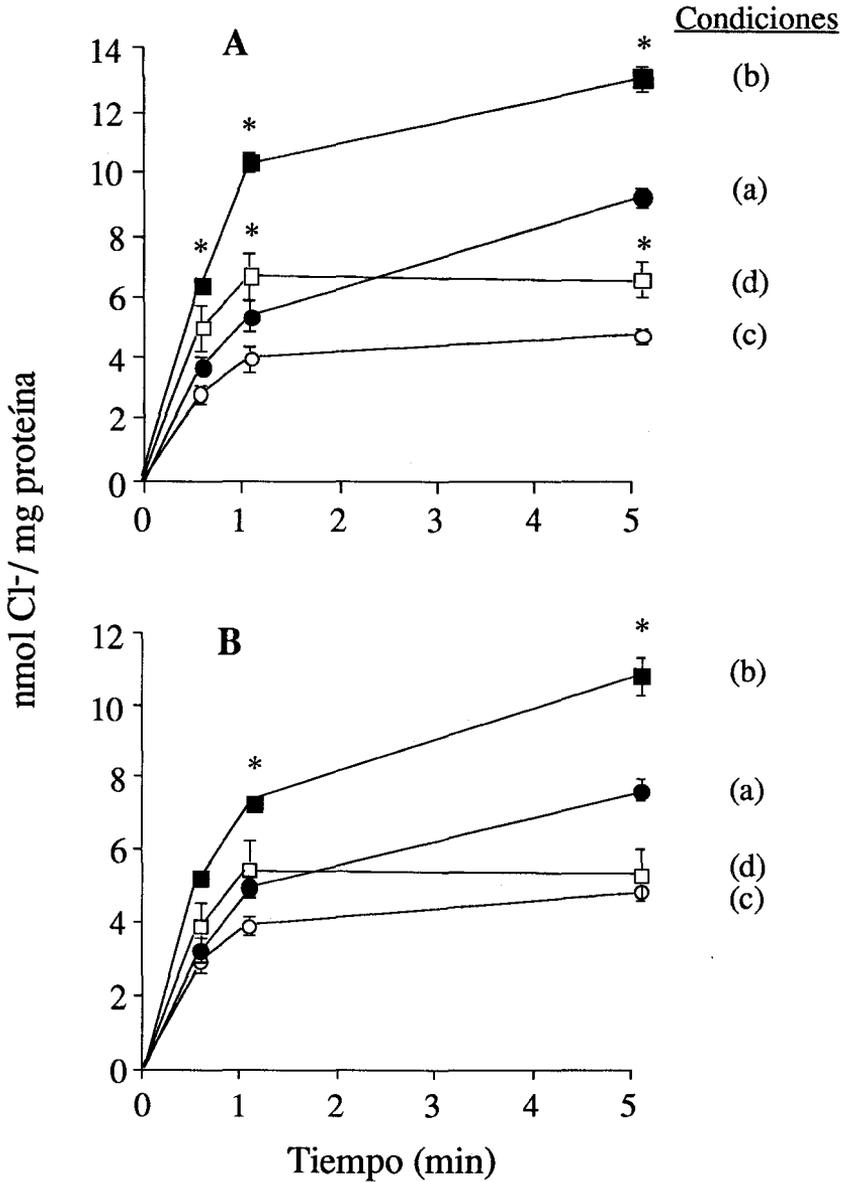


Figura 23. Gradiente de bicarbonato y entrada de Cl⁻ a las BBMV. Las condiciones experimentales se indican en la Figura 8. [³⁶Cl⁻]=5 mM. A. sin valinomicina en el medio extravascular; B. 45 μM valinomicina en el medio extravascular. * significativamente diferentes respecto al valor obtenido sin gradiente de bicarbonato (análisis del multifactor de la varianza seguido del test de Tukey, *p < 0,05). n=6.

Efecto de diversos aniones sobre el transporte de cloruro dependiente de gradiente de pH en vesículas de la membrana apical.

Para determinar la selectividad aniónica del "lugar" extracelular del transportador aniónico en estudio, se midió la entrada a las vesículas de la membrana apical de 10 mM ^{36}Cl en presencia de 50 mM de la sal potásica de Cl^- , SCN^- , HCO_3^- , I^- , Glu^- o H_2PO_4^- , y con o sin gradiente de pH.

En presencia de un gradiente de pH, la entrada del Cl^- a las vesículas de membrana fue diferentemente afectada por los distintos aniones (Tabla 5). En ausencia de un gradiente de pH la entrada de Cl^- a las vesículas de membrana no fue significativamente modificada por la presencia de otro anión en el medio de incubación (Tabla 5).

El transporte de Cl^- dependiente del gradiente de pH (entrada en presencia de gradiente de pH menos la observada en ausencia de gradiente de pH), en las distintas condiciones experimentales y expresada en porcentaje, se muestra en la Figura 24. El valor de 100 % se corresponde con la entrada de cloruro dependiente de pH observada en presencia de 50 mM gluconato. La selectividad aniónica por el "lugar" extracelular del transportador, que se deduce de estos resultados, es de $\text{Cl}^- > \text{SCN}^- > \text{HCO}_3^- > \text{I}^- > \text{Glu}^- > \text{H}_2\text{PO}_4^-$.

Tabla 5. Efecto de distintos aniones sobre el transporte de Cl⁻ en vesículas de membrana apical.

Condiciones	nmol ³⁶ Cl ⁻ / mg proteína					
	Gluc ⁻	HCO ₃ ⁻	H ₂ PO ₄ ⁻	Cl ⁻	I ⁻	SCN ⁻
7,7i/5,5o	3,31 ±0,35	2,45 ±0,14	3,78 ±0,30	2,19 ±0,26	2,68 ±0,17	2,29 ±0,19
7,7i/7,7o	1,93 ±0,08	1,90 ±0,17	1,89 ±0,08	2,08 ±0,29	2,01 ±0,12	1,91 ±0,11
Diferencia	1,38 ±0,15	0,55* ±0,03	1,89** 0,15	0,11* ±0,01	0,67* ±0,04	0,38* ±0,03

Las vesículas se cargaron con la solución C. El medio de incubación contenía (en mM): 5 ³⁶Cl⁻, 50 gluconatoK, 50 anión potásico, 70 HEPES/Tris, pH 7,7 o 70 MES/Tris, pH 5,5 y 45 μM valinomicina. El tiempo de incubación fue 1 minuto. Diferencia: transporte de Cl⁻ en presencia de gradiente de pH menos la observada en ausencia de gradiente de pH. *p < 0,001, ** p > 0,005 respecto a la observada en presencia de gluconato. n=8.

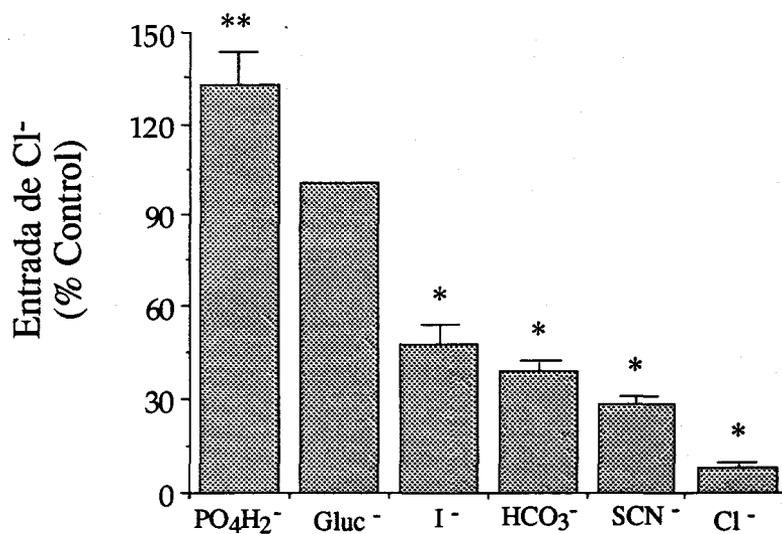


Figura 24. Efecto de distintos aniones sobre el transporte de Cl^- dependiente del gradiente de pH a BBMV. Se representan los datos "diferencia" de la Tabla 5 en porcentaje respecto al transporte observado en presencia de 50 mM gluconato. * $P < 0,001$, ** $P < 0,005$ comparado con el gluconato.

Efecto de aniones en el medio intravesicular sobre la entrada de cloruro a vesículas de la membrana apical.

También se ha investigado si el "lugar" citosólico del transportador en estudio puede ligar diferentes aniones, para lo que se impuso un gradiente de Cl^- , I^- , HCO_3^- , SCN^- o Gluconato $^-$ dirigido hacia el exterior de las vesículas de membrana. Las vesículas de membrana se cargaron con una solución que contenía 50 mM de la sal potásica del correspondiente anión. El medio extravesicular contenía en todos los casos 50 mM de gluconatoK. Se consideró condición experimental control aquella en la que el medio intravesicular contenía 50 mM GluconatoK. La entrada de Cl^- a las vesículas de membrana se midió en ausencia del gradiente de pH y con o sin H_2DIDS .

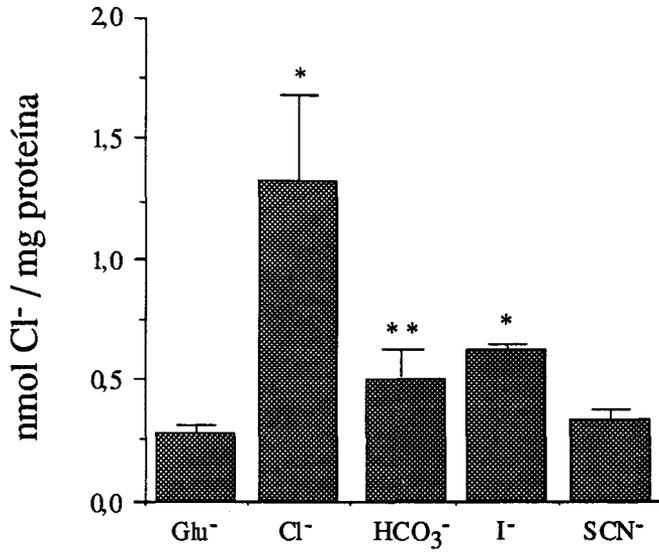
Los resultados obtenidos (Tabla 6) revelan que la entrada total de cloruro a las vesículas de membrana fue máxima en presencia de un gradiente de cloruro y en todos los casos significativamente inhibida por el H_2DIDS .

La entrada de Cl^- a las vesículas mediada por intercambio con el anión intravesicular viene dada por la diferencia entre la entrada total y la observada en presencia del inhibidor, en cada una de las situaciones experimentales. La Figura 25 revela que el transporte de cloruro sensible al inhibidor fue, respecto al observado en presencia de un gradiente de gluconato, significativamente estimulado por un gradiente de Cl^- , I^- o HCO_3^- , pero no por un gradiente de SCN^- , lo que sugiere que la selectividad aniónica del "lugar" citosólico del intercambiador es: $\text{Cl}^- > \text{I}^- \geq \text{HCO}_3^- > \text{SCN}^- = \text{Gluconato}^-$.

Tabla 6. Efecto del gradiente aniónico dirigido hacia fuera de las vesículas sobre la entrada de Cl^- a las mismas, en ausencia de un gradiente de pH.

	nmol $^{36}\text{Cl}^-$ / mg proteína				
	Gluc $^-$	Cl^-	HCO_3^-	I^-	SCN $^-$
TOTAL	1,08 $\pm 0,22$	3,26* $\pm 0,04$	1,78* $\pm 0,14$	1,81* $\pm 0,08$	1,54* $\pm 0,10$
H₂-DIDS	0,80 $\pm 0,03$	1,92* $\pm 0,38$	1,28* $\pm 0,25$	1,18* $\pm 0,07$	1,21* $\pm 0,13$
Diferencia	0,28 $\pm 0,03$	1,34* $\pm 0,34$	0,50** $\pm 0,12$	0,63* $\pm 0,02$	0,33 $\pm 0,05$

Las vesículas de membrana se cargaron con una solución que contenía (en mM): 100 manitol, 50 anión potásico y 70 HEPES/Tris, pH 7,7. El medio de incubación fue la solución A, pH 7,7. La concentración en el medio de incubación de la valinomicina, del $^{36}\text{Cl}^-$ y del H₂-DIDS fueron 45 μM , 10 mM y 1 mM, respectivamente. El tiempo incubación fue de 15 s. Diferencia: transporte de Cl^- medido en ausencia de H₂DIDS menos el medido en presencia del inhibidor. n=5. * P < 0,001, ** P < 0,05 comparada con la obtenida con gradiente de gluconato.



*Figura 25. Gradiente aniónico dirigido hacia fuera de las BBMV y entrada de cloruro a las mismas en ausencia de gradiente de pH. Se representan los valores "diferencia" de la Tabla 6. *p < 0,001, **p < 0,05, respecto al obtenido en presencia de gluconato.*

Entrada de $^{36}\text{Cl}^-$ a las vesículas de la membrana apical en función de la concentración externa de cloruro.

La entrada de cloruro a las vesículas de membrana se midió en presencia y ausencia de gradiente de pH, con o sin gradiente de bicarbonato dirigido hacia el exterior de las vesículas y con o sin 5 mM de SITS, tal como se muestra en la Figura 26. La concentración de Cl^- en el medio de incubación fue de 1, 5, 10, 20 y 40 mM.

En presencia de un gradiente de pH (condiciones experimentales a y b de la Figura 26), la velocidad de entrada de Cl^- a las vesículas de membrana aumentó con la concentración del cloruro en el medio de incubación, pero en forma no proporcional (Figura 27 A). La curva presenta una clara inflexión entre 1 y 20 mM de cloruro, pasando a ser una recta a concentraciones del anión superiores a 20 mM.

Los datos del transporte del Cl^- se ajustaron mediante ordenador (programa ENZFITER) a una curva que viene definida por la ecuación [1], en la que se distinguen dos componentes: uno saturable y otro no saturable (difusión):

$$V = (V_{\max} \cdot S / K_m + S) + K_d \cdot S \quad [1]$$

donde V , es la velocidad inicial de entrada; S , la concentración externa de cloruro; V_{\max} , el valor de velocidad máxima de transporte; K_m , la constante de Michaelis-Menten, y K_d , la constante aparente de difusión. Los valores de V_{\max} , K_m , y K_d para el Cl^- se indican en la Tabla 7.

La contribución del componente no saturable (difusión) a la entrada total de Cl^- a las vesículas de membrana también se evaluó experimentalmente midiendo el transporte de cloruro en presencia de SITS (condición experimental c de la Figura 26) o en ausencia de gradiente de pH (condición experimental d de la Figura 26). Bajo ambas condiciones experimentales, la relación entre el transporte de cloruro y su concentración externa fue lineal (Figura 27 A), no observándose diferencias significativas en el transporte de cloruro obtenido con una y otra condición experimental. A partir de esta relación se calculó la constante aparente de difusión para el cloruro, K_d (Tabla 7). La K_d obtenida experimentalmente no fue significativamente diferente de la K_d calculada mediante ordenador (programa ENZFITTER).

Un gradiente de bicarbonato, dirigido hacia el exterior de las vesículas, estimuló la entrada de cloruro medida en ausencia de SITS pero no en presencia del inhibidor (Figura 27 A).

La diferencia entre la entrada total de cloruro y la obtenida bien en presencia de SITS o en ausencia de gradiente de pH nos mide la entrada mediada por el intercambiador aniónico (Figura 27 B). La representación de estos valores de acuerdo con la ecuación de Eadie-Hofstee (Figura 28) permite calcular la constante aparente de transporte, K_m , y el valor de velocidad máxima de transporte para el cloruro, V_{max} . Los resultados se resumen en la Tabla 7. El gradiente de bicarbonato incrementó la V_{max} sin afectar a la K_m . Los valores de V_{max} y K_m calculados experimentalmente no se diferencian de los estimados por el ordenador.

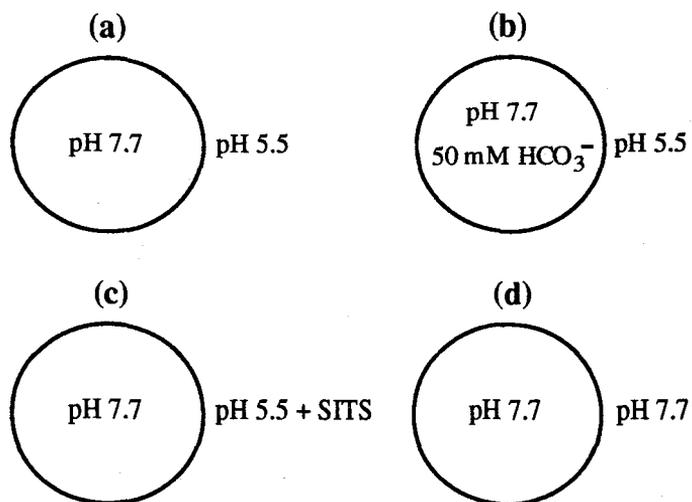


Figura 26. *Condiciones experimentales.* En a c y d la solución intra y extravesicular fue la solución A. En b la solución intravesicular fue la solución D y la extravesicular la A. En el caso c se añadió SITS tanto al medio intra como extravesicular.

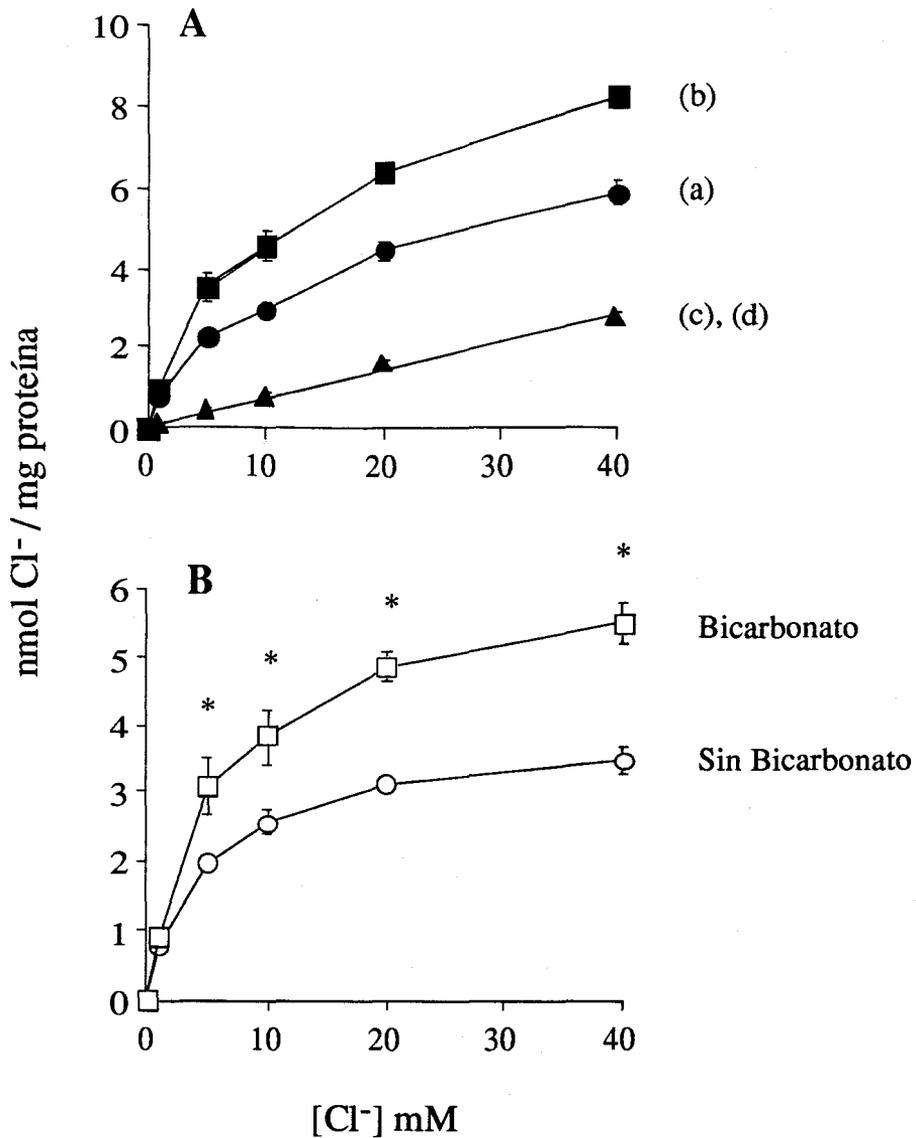
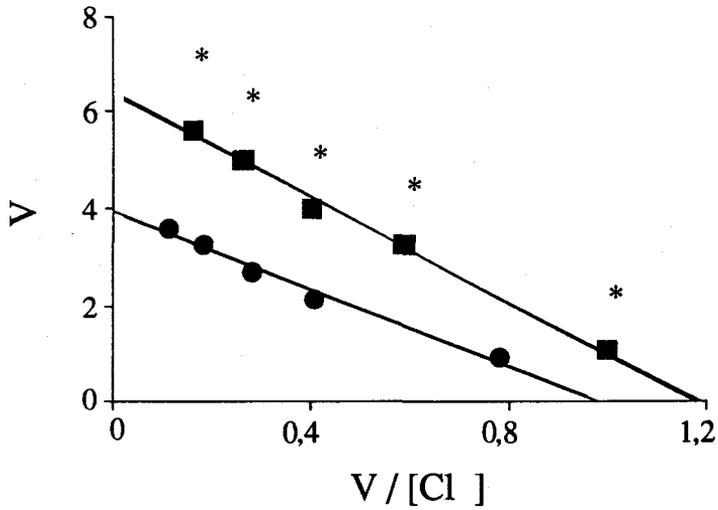


Figura 27. Velocidad de entrada de Cl^- a las BBMV en función de su concentración extravesicular. **A.** Las condiciones experimentales empleadas se detallan en la figura 26. La concentración del manitol extravesicular se redujo equiosmolarmente según la concentración de Cl^- . La concentración de valinomicina fue $45 \mu\text{M}$ y la de SITS 5 mM . El tiempo de incubación fue 15 s . **B.** Diferencia entre entrada observada en presencia de gradiente de pH y la observada en presencia de SITS o ausencia de gradiente de pH. $n=8$. * $P < 0,001$ respecto los datos obtenidos en presencia de gradiente de bicarbonato.



*Figura 28. Representación de Eadie-Hofstee. Se representan los datos mostrados en la Figura 20 B, con (■) o sin (●) gradiente de bicarbonato. V, nmol Cl/mg proteína por segundo. * P < 0,001 respecto a los datos obtenidos en presencia de gradiente de bicarbonato.*

Tabla 7. Constantes aparentes del transporte de cloruro.

	Vmax	Km	Kd
Sin HCO₃⁻			
Calculada	3,20 ±0,42	3,94 ±0,80	0,077 ±0,004
Experimental	3,63 ±0,33	5,00 ±0,90	0,068 ±0,002
Con HCO₃⁻			
Calculada	6,83 ±0,58*	4,13 ±0,82	0,084 ±0,008
Experimental	6,40 ±0,54*	5,26 ±0,80	0,068 ±0,002

Calculada: valores estimados mediante ordenador. Experimental: valores obtenidos al evaluar experimentalmente el componente de difusión del Cl⁻. La V_{max} se expresa en nmol · mg proteína⁻¹ · 15 s⁻¹, K_d en nmol · mg proteína⁻¹ · 15 s⁻¹ · mM y la K_m en mM. n=5. * p < 0,05 respecto a los valores obtenidos en ausencia de gradiente de bicarbonato.

Actividad del transportador aniónico y pH intravesicular

La sensibilidad del transportador aniónico, objeto de estudio, al pH intravesicular se investigó midiendo la entrada de cloruro a vesículas de la membrana apical cargadas con soluciones tamponadas a distintos valores de pH. El pH del medio extravesicular (pH_0) fue 6,5 u 8. Los resultados se muestran en la Figura 29.

El aumento del pH intravesicular (pH_i) de 7 a 8 marcadamente incrementó la entrada de cloruro a las vesículas de membrana cuando el pH_0 fue de 6,5 pero no a pH_0 de 8. La diferencia entre la entrada de Cl^- medida a pH_0 6,5 y la medida a pH_0 8 nos da la entrada inducida por el gradiente de pH.

La relación entre la entrada de cloruro y el pH_i de acuerdo con la ecuación de Hill da un coeficiente de interacción (n) de 2,11 y una constante de activación para el H^+ intravesicular, $[\text{H}^+]_{0,5}$, de 39 nM (Figura 30).

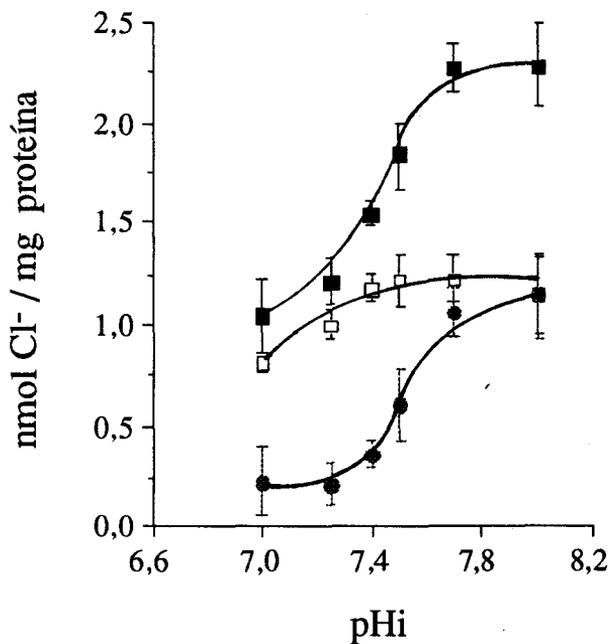


Figura 29. Efecto del pH intravesicular sobre la entrada de cloruro a BBMVs. Las vesículas cargadas con una solución que contenía (en mM): 100 manitol, 50 gluconatoK y 70 HEPES tamponada con Tris hasta el pH_i indicado, se incubaron durante 15 s con medios que contenían (en mM): 5 ³⁶Cl⁻, 100 manitol, 50 gluconatoK y 70 HEPES -Tris, pH 6.5 (■) u 8 (□). (●) Diferencia entre la entrada de cloruro a pH_o 6,5 y la observada a pH_o 8. n=5.

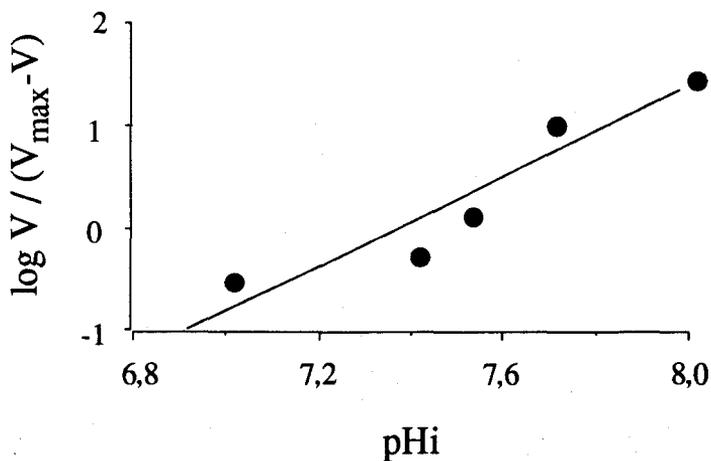


Figura 30. Representación de Hill. Se representa los datos diferencia entre la entrada de Cl^- a pH_0 6,5 y la entrada a pH_0 8, mostrados en la Figura 29. La V_{\max} , velocidad máxima de transporte de cloruro, se calculó a partir de la ecuación de Lineweaver-Burk. V , es la velocidad de entrada de cloruro para cada valor de pH_i . $y = -15,63 + 2,11 x$. $R = 0,90$

Efecto del gradiente de K^+ sobre el transporte de cloruro independiente de pH.

Además de la presencia de un sistema de transporte aniónico, se estudió si la membrana apical de los enterocitos de pollo poseía una conductancia aniónica. Para ello se midió el efecto del potencial eléctrico de membrana sobre la entrada de cloruro a las vesículas de membrana en ausencia de gradiente de pH. Un potencial eléctrico de membrana, positivo en el medio intravesicular, se generó cargando las vesículas con soluciones nominalmente libres de K^+ e incubándolas en medios que contenían 100 mM K^+ . La entrada de Cl^- a las vesículas de membrana se midió en ausencia de gradiente de pH, con y sin gradiente de K^+ y con y sin valinomicina en el medio de incubación. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 31.

El gradiente de K^+ aumentó significativamente la entrada de cloruro independiente de pH. En ausencia de gradiente transmembrana de K^+ la valinomicina no modificó la entrada de Cl^- a las vesículas de membrana. Por el contrario, en presencia de un gradiente de K^+ la valinomicina incrementó la entrada de Cl^- a las vesículas de membrana.

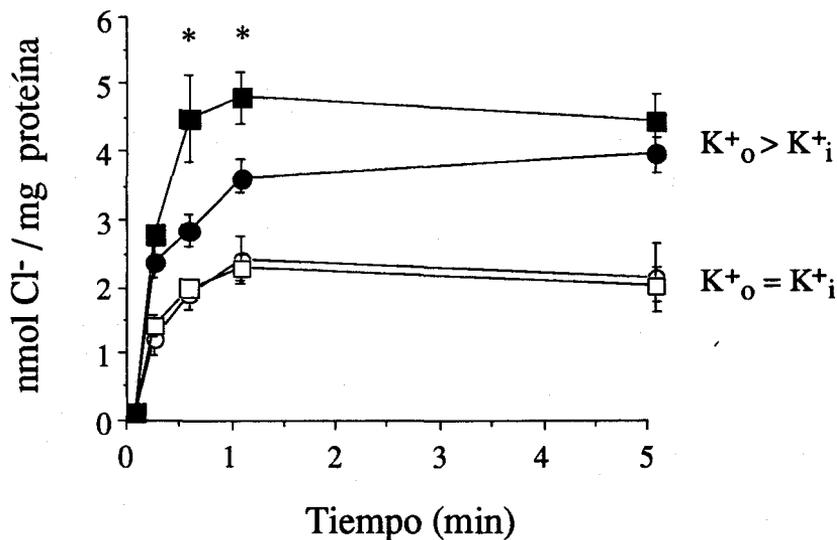
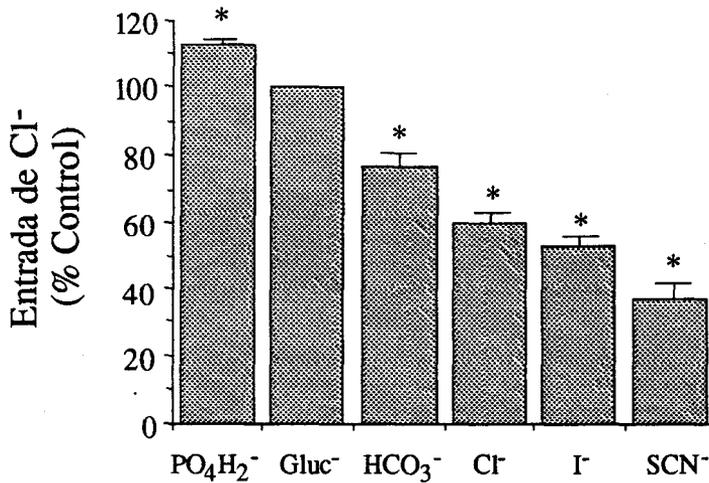


Figura 31. Efecto del potencial eléctrico de membrana sobre la entrada de cloruro a BBMVs en ausencia de gradiente de pH. Las vesículas se cargaron con la solución B. Los medios de incubación que contenían 10 mM $^{36}\text{Cl}^-$ fueron la solución B ($K_i = K_o$) (□, ○) o la solución C ($K_o > K_i$) (■, ●). (□, ■) 45 μM valinomicina. $n=8$. * $P < 0,005$ comparado con los valores obtenidos en ausencia de gradiente de K^+ y de valinomicina.

La selectividad aniónica del proceso que media el movimiento de Cl^- independiente de gradiente de pH y dependiente de potencial de membrana, se evaluó midiendo la entrada de cloruro a las vesículas de membrana en presencia de un gradiente, dirigido hacia el interior de las vesículas, de PO_4H_2^- , Gluconato $^-$, HCO_3^- , Cl^- , I^- o SCN^- . Las vesículas se cargaron con una solución nominalmente libre de potasio y se incubaron en medios que contenían 50 mM gluconato potásico y 50 mM del anión potásico correspondiente. Los experimentos se realizaron en ausencia de gradiente de pH.

La Figura 32 muestra la capacidad de los distintos aniones ensayados para inhibir la entrada del cloruro dependiente del potencial eléctrico de membrana. Los resultados se expresan como porcentaje respecto a la entrada del cloruro observada en presencia de gluconato potásico y sugieren la siguiente selectividad aniónica: $\text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{Cl}^- > \text{HCO}_3^- > \text{Glu}^- > \text{H}_2\text{PO}_4^-$.



*Figura 32. Efecto de distintos aniones sobre la entrada de cloruro a BBMV independiente de pH. Las vesículas se cargaron con la solución B. El medio de incubación contenía (en mM) 10 ³⁶Cl⁻, 50 gluconatoK, 50 anión potásico, 70 HEPES/Tris (pH 7,7), 5 SITS y 45 μM valinomicina. El periodo de incubación fue 1 minuto. n=8. * P < 0,001 comparado con la entrada de cloruro medida en presencia de GluconatoK (Gluc⁻).*

TRANSPORTE DE Na^+ EN LAS VESÍCULAS DE LA MEMBRANA APICAL DE LOS ENTEROCITOS DE POLLO

La presencia del intercambiador Na^+-H^+ en las vesículas de la membrana apical de los enterocitos de pollo se valoró midiendo la entrada de $^{22}\text{Na}^+$ a las mismas en presencia y ausencia de un gradiente de pH.

Efecto de la osmolaridad sobre la entrada de Na^+

Al igual que para el cloruro, la unión inespecífica del Na^+ a la superficie de la membrana se midió empleando medios de incubación con distinta osmolaridad. La captación de Na^+ por las vesículas guardó una relación lineal con el inverso de la osmolaridad del medio de incubación (Figura 33) y la unión inespecífica del Na^+ representa un 55% de la captación observada a 440 mosmol/l, osmolaridad a la que se han realizado los experimentos que a continuación se detallan.

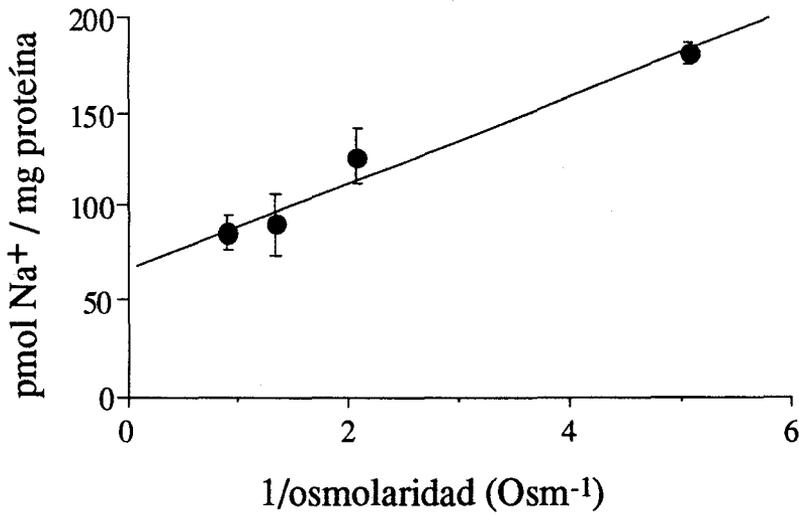


Figura 33. Efecto de la osmolaridad extravesicular sobre la entrada de Na^+ en BBMVs. La osmolaridad del medio se aumentó adicionando manitol a la solución E. El tiempo de incubación fue una hora. La concentración de Na^+ fue 0,1 mM. La recta se calculó mediante un análisis de regresión lineal. La ecuación de la recta es: $y = 64,4 + 22,86 x$, $r = 0,965$. $n=5$.

Entrada de Na⁺ a las vesículas de la membrana apical y gradiente de pH

La entrada de Na⁺ a las vesículas de membrana se midió con (pH_i 5,5/pH_o 7,5) y sin gradiente de pH (pH_i 5,5/pH_o 5,5). La presencia de un gradiente de pH estimuló transitoriamente la captación de Na⁺ por las vesículas de membrana (Figura 34). La entrada máxima ocurrió a los 5 minutos de incubación y fue aproximadamente 4 veces el valor de la entrada medida en ausencia del gradiente de pH en el equilibrio (30 minutos de incubación).

La disipación del gradiente de pH dará lugar a la acumulación de cargas negativas en el interior de las vesículas que estimularán la entrada de Na⁺. Para evitar la generación de un gradiente de potencial eléctrico de membrana, los experimentos se realizaron colocando la misma concentración de K⁺ dentro y fuera de las vesículas y añadiendo valinomicina al medio de incubación (condiciones de "voltaje anulado"), como ya se ha explicado al estudiar el transporte del cloruro.

Las condiciones de "voltaje anulado" significativamente disminuyeron, pero no anulaban, la estimulación en la entrada de Na⁺ inducida por el gradiente de pH (Figura 35). Esta observación permite concluir que, bajo estas condiciones experimentales, la entrada de Na⁺ estimulada por el gradiente de pH es electroneutra. El resto de los experimentos se realizaron bajo condiciones de "voltaje anulado".

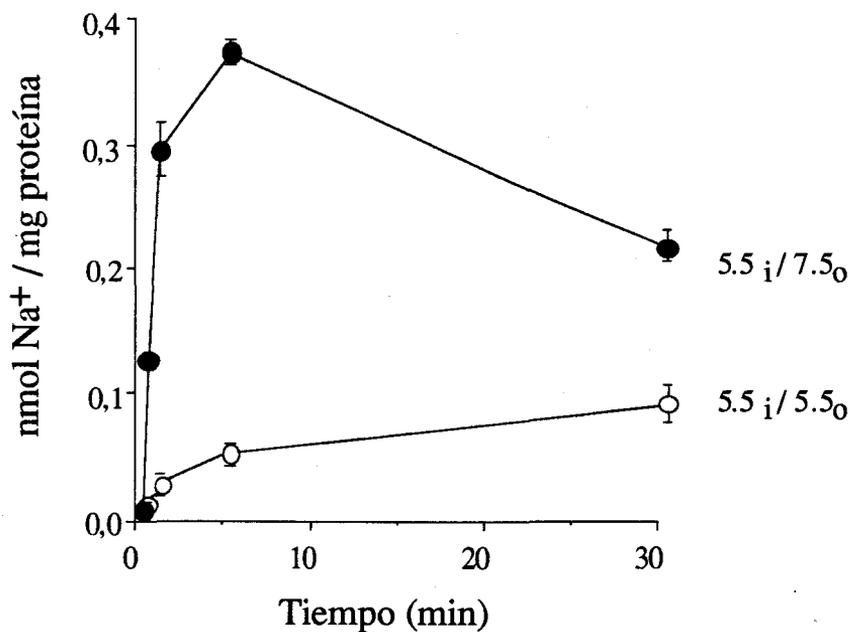


Figura 34. Entrada de Na^+ a las BBMV a lo largo del tiempo con o sin gradiente de pH. Las soluciones intra y extravesicular fueron la solución E, pH 5,5 ó 7,5, respectivamente. La entrada de 0,1 mM Na^+ se midió en presencia (●) y en ausencia (○) de gradiente de H^+ . n=6.

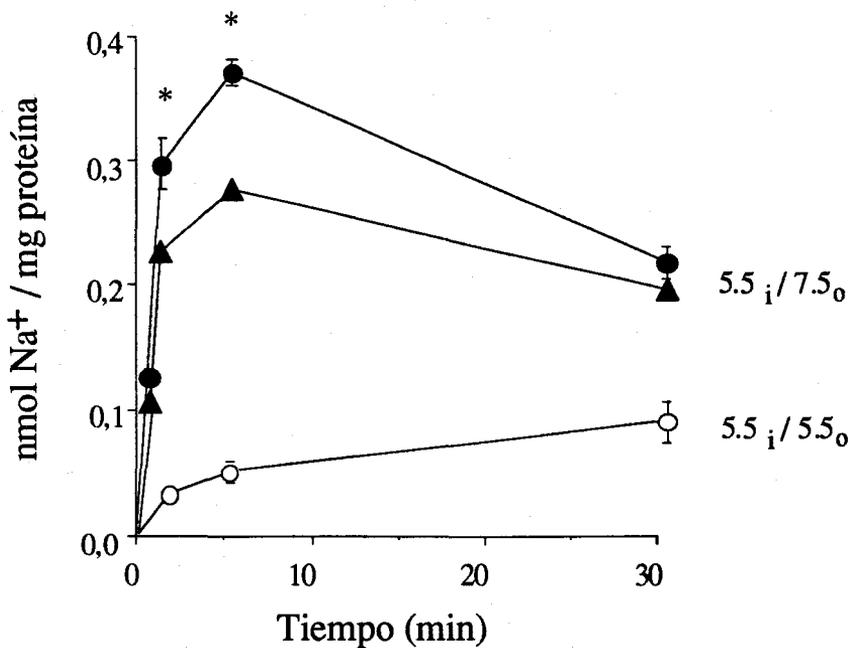


Figura 35. Efecto de la valinomicina sobre la entrada de Na^+ a las BBMV a lo largo del tiempo. Las soluciones intra y extravascular fueron la solución E, pH 5,5 ó 7,5, respectivamente. La entrada de 0,1 mM Na^+ se midió en presencia (●,▲) y en ausencia (○) de gradiente de H^+ . (▲), 45 μM valinomicina en el medio de incubación. $n=6$. * $p < 0,001$ comparados con los valores obtenidos con valinomicina.

Efecto de la amilorida sobre el transporte de Na^+ en vesículas de la membrana apical.

La amilorida inhibe varios sistemas de transporte de Na^+ , entre los que se incluye el intercambiador $\text{Na}^+\text{-H}^+$. La inhibición por la amilorida del transporte electroneutro de Na^+ dependiente de un gradiente de pH, es indicativo de la presencia del intercambiador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ en la preparación biológica utilizada.

En la Figura 36 se observa que a los 5 minutos la entrada de Na^+ , a las vesículas de la membrana apical, independiente de voltage e inducida por el gradiente de pH fue inhibida en un 65,5% por 0,1 mM amilorida. La amilorida no afectó significativamente a la entrada de Na^+ observada en ausencia de gradiente de protones.

El efecto de distintas concentraciones de la amilorida (0,1, 1, 10, 25, 50, 75, 100, 1.000 y 2.500 μM) sobre la captación de Na^+ por las vesículas de membrana se muestra en la Figura 37 A. La entrada de sodio disminuyó al aumentar la concentración de la amilorida, siendo prácticamente nula a una concentración de amilorida de 2,5 mM. La representación de estos valores de acuerdo con la ecuación de Dixon (Figura 37 B) revela que la concentración de amilorida necesaria para inhibir en un 50% (IC_{50}) el transporte de Na^+ dependiente de pH es de 44 μM .

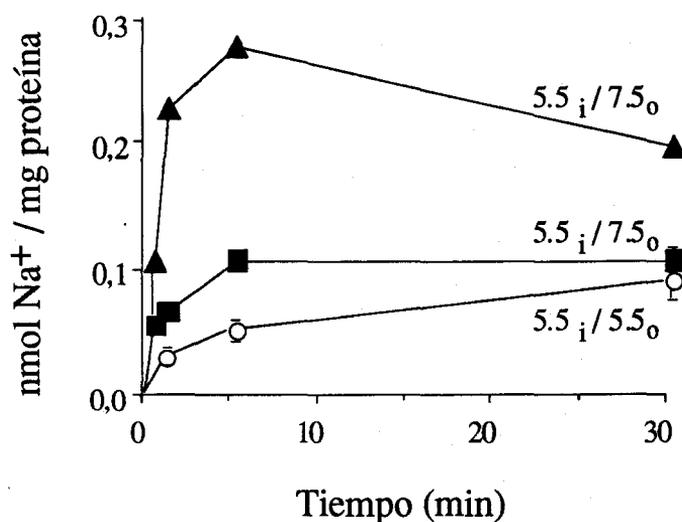


Figura 36. Efecto de la amilorida sobre la entrada de Na^+ a BBMV a lo largo del tiempo. Las vesículas estaban cargadas con solución E, que también fue la solución extravesicular. La entrada de 0,1 mM de Na^+ se midió en presencia (▲, ■) y en ausencia (○) de gradiente de H^+ . (■), 1 mM de amilorida. Los medios de incubación contenían 45 μM de valinomicina. $n=6$. * $p < 0,001$ comparado con los valores obtenidos con amilorida.

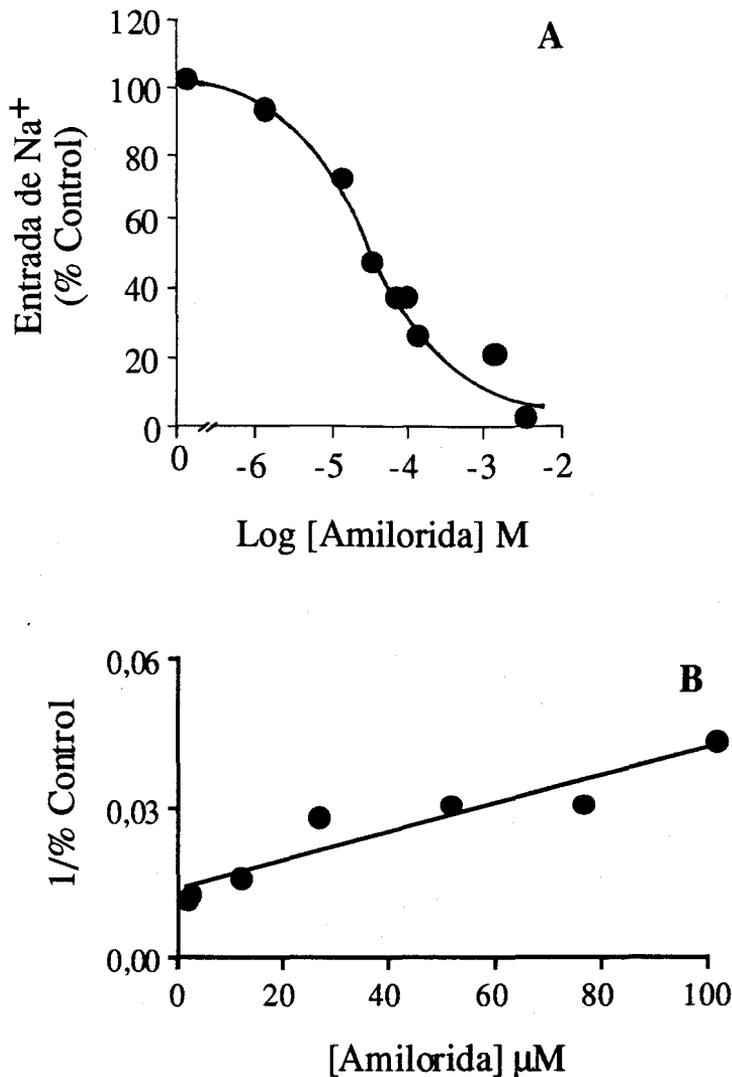


Figura 37. Efecto de la concentración de la amilorida sobre la entrada de Na^+ a BBMV. **A.** El transporte de 0,1 mM de Na^+ se midió durante 15 s en presencia y ausencia de gradiente de pH, con las condiciones experimentales indicadas en la Figura 34. Los datos representan el transporte dependiente de pH, en % respecto al obtenido en ausencia de la amilorida. La concentración de la amilorida en el medio de incubación varió de 0 a 2,5 mM. $n=7$. **B.** Representación de los datos mostrados en A.

Velocidad de entrada de Na⁺ a las vesículas de la membrana apical y concentración extravesicular del catión

La entrada de Na⁺ a las vesículas se midió en presencia y ausencia de gradiente de pH y con diferentes concentraciones de Na⁺ en el medio de incubación (1, 5, 10, 20, 40 y 80 mM).

La Figura 38 muestra que la cantidad de Na⁺ captado por las vesículas de la membrana apical aumenta con la concentración de éste en el medio de incubación. En presencia de un gradiente de pH la relación entre la velocidad de entrada de Na⁺ y su concentración extravesicular muestra una inflexión a bajas concentraciones de Na⁺ (1 a 10 mM) y se hace lineal a altas concentraciones de Na⁺ (10 a 40 mM). Este comportamiento hace pensar en la existencia de un componente saturable y de un componente de difusión que adquiere importancia conforme aumenta la concentración extravesicular de Na⁺.

Para evaluar el componente de difusión del transporte del Na⁺ se midió la velocidad de entrada del catión a las vesículas de membrana en ausencia de gradiente de pH. Bajo estas condiciones experimentales la captación de Na⁺ por las vesículas guarda una relación lineal con la concentración extravesicular del catión (Figura 38). A partir de esta relación se evaluó la constante aparente de difusión, K_d , para el Na⁺, que tiene un valor de 1,3 nmol / mg proteína / 15s / mM.

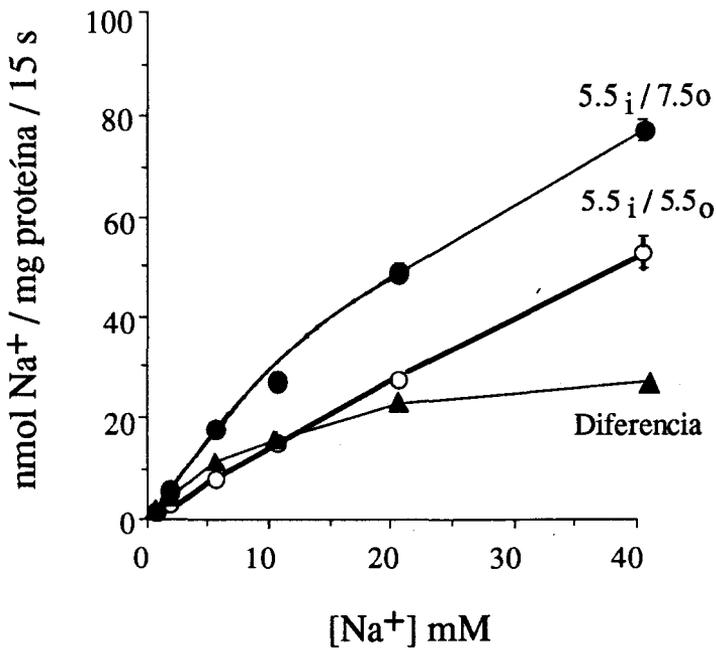


Figura 38. Efecto de la concentración externa de Na^+ sobre la velocidad de captación de Na^+ por las BBMV. El transporte de Na^+ se midió durante 15 s. La osmolaridad del medio extravésicular se mantuvo corrigiendo la concentración de manitol. Las otras condiciones experimentales como las indicadas en la Figura 34. Diferencia: entrada en presencia de gradiente de pH menos la medida en ausencia de gradiente de pH.

La diferencia entre la velocidad de entrada de Na^+ en presencia de gradiente de pH y la obtenida en ausencia de gradiente de pH sigue una cinética de saturación tipo Michaelis-Menten y representa la entrada de Na^+ mediada por el sistema de transporte saturable y dependiente de gradiente de pH (intercambiador Na^+-H^+). La representación de estos datos de acuerdo con la ecuación de Eadie-Hofstee (Figura 39) permite calcular la constante aparente de transporte, K_m , y la velocidad máxima de transporte, V_{max} , para el Na^+ que son 12 mM y 33 nmol/mg proteína/15 s, respectivamente.

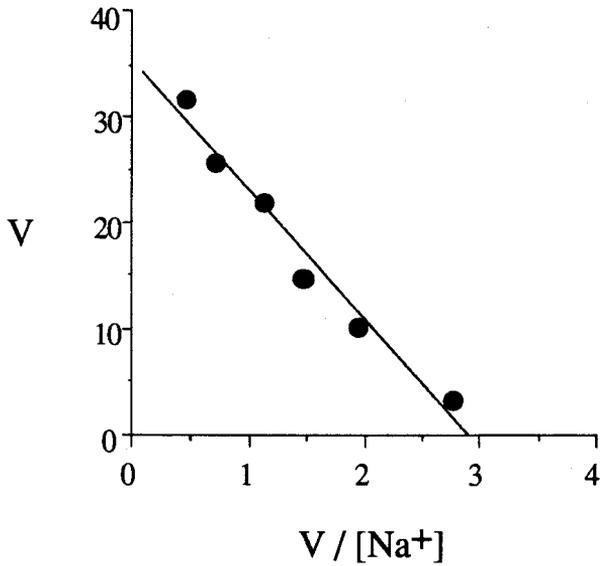


Figura 39. Representación gráfica de Eadie-Hofstee. Se representan los datos "diferencia" de la Figura 38. Los parámetros cinéticos se calcularon usando un análisis de regresión lineal. La ecuación de la recta es: $y = 33,5 - 12,17 x$, $r = 0,97$. $n=7$.

Velocidad de entrada de Na^+ a vesículas de la membrana apical y pH intravesicular

La sensibilidad del transporte electroneutro de Na^+ , dependiente de gradiente de pH, al pH intravesicular se investigó midiendo la captación de Na^+ por las vesículas de la membrana apical en función de distintas concentraciones intravesiculares del protón. Las vesículas se cargaron con medios tamponados a distintos valores de pH. El pH del medio extravesicular fue de 5,5 u 8.

La Figura 40 muestra que a pH_o 8, pero no a pH_o 5, la entrada de Na^+ a las vesículas de membrana aumenta al disminuir el pH_i . La diferencia entre la entrada de Na^+ medida a pH_o 8 y la medida a pH_o 5,5 nos da la entrada inducida por gradiente de pH.

La relación entre la entrada de Na^+ acoplada de forma electroneutra al gradiente de H^+ y el pH intravesicular sigue una cinética tipo Michaelis-Menten y la representación de acuerdo con la ecuación de Hill (Figura 41) da un coeficiente de interacción (n) de 1 y una constante de activación para los protones, $[\text{H}^+]_{0,5}$, de 221 nM.

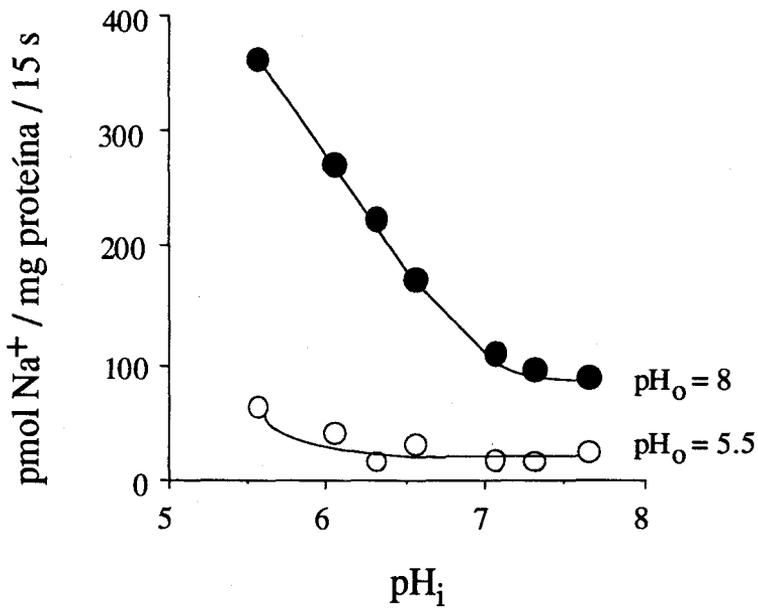


Figura 40. Efecto del pH intravesicular sobre la entrada de Na⁺ a las BBMVs. Las vesículas se cargaron con la solución E variando la concentración de Hapes/Tris o Mes/Tris para obtener distintos pH intravesiculares. La concentración de Na⁺ fue 0,1 mM y el tiempo de incubación 15 s.

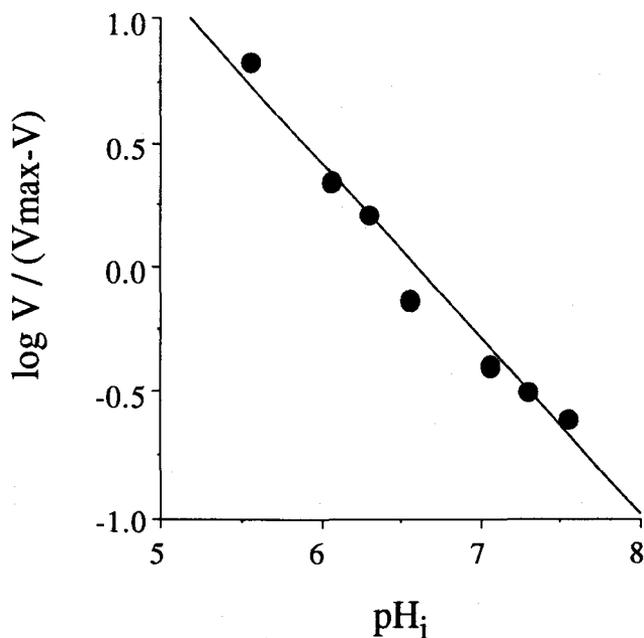


Figura 41. Representación de Hill. Se representa la diferencia entre el transporte observado a pH_0 8 y el observado a pH_0 5,5. La V_{\max} se calculó a partir de la representación de Lineweaver-Burk. La recta se calculó mediante análisis de regresión lineal. La ecuación de la recta es: $y = 7,03 - 1,06 x$, $r = 0,93$.

DISCUSIÓN

Aislamiento de vesículas

Entre los métodos ideados para investigar los mecanismos que median los procesos de transporte intestinal, las técnicas *in vitro* han resultado ser las más adecuadas, por permitir al experimentador un mayor control de la preparación, introducir nuevos factores con relativa facilidad y analizar más directamente los resultados. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que con estos métodos las condiciones de trabajo se alejan de las fisiológicas, por lo que se desconoce hasta que punto modifican la Fisiología del epitelio o cambian las circunstancias en las que tiene lugar el transporte, de modo que los resultados experimentales y las características de los procesos que se revelan con tales preparaciones sean aplicables sin más a lo que ocurre en el animal intacto.

La puesta a punto de los métodos para la separación de membranas apical y basolateral de los enterocitos, descritos en la presente Memoria, fue motivada por el deseo de determinar la localización de los transportadores iónicos en la membrana plasmática de los enterocitos y sus características. Los métodos de obtención de vesículas de la membrana apical y basolateral se basan en que ambas membranas son estructural y químicamente distintas.

Son varias las ventajas que presentan las vesículas de membrana para abordar los estudios de transporte de sustratos. No están sujetas a las limitaciones impuestas por el metabolismo celular como ocurre en tejidos enteros o células aisladas, lo que permite estudiar la absorción de sustratos metabolizables. Se puede manipular el medio intravesicular, además del extravascular, pudiendo caracterizar las condiciones que promueven el transporte de un determinado soluto. Son preparaciones biológicas que en nitrógeno líquido mantienen sus propiedades entre 6 y 9 meses (Semenza *et al.*, 1984).

En el presente trabajo se han utilizado dos métodos para la obtención de vesículas de la membrana apical (I y II). Ambos métodos están basados en los ya descritos por otros autores (Schmitz *et al.*, 1973; Kessler *et al.*, 1978) y hacen uso de la precipitación de las membranas con Mg^{2+} . El Mg^{2+} forma agregados, por interacción electrostática, con las membranas que no sean la apical (membranas de mitocondria, microsomas, basolateral y retículo endoplásmico) y con el DNA, debido a la menor densidad de cargas negativas de la membrana apical (Schmitz *et al.*, 1973). La diferencia de carga entre la membrana apical y el resto de las membranas fue determinada por Murer y Hopfer (1974) mediante electroforesis .

El método para aislar las membranas basolaterales se basa en la diferente densidad que poseen las distintas membranas celulares. Para evitar al máximo la contaminación con membrana apical el método hace uso de la precipitación de membranas con Mg^{2+} (Dyer *et al.*, 1990).

El grado de purificación de las preparaciones de vesículas de membrana se ha evaluado determinando las actividades enzimáticas y el tipo de transporte de azúcares, típicos de cada una de ellas.

Las preparaciones de vesículas de la membrana apical de yeyuno de pollo obtenidas con ambos métodos son relativamente puras. Ambas estaban enriquecidas en la actividad de la sacarasa, enzima localizado estrictamente en la membrana apical, y presentaban pequeña contaminación por membrana basolateral (actividad de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$) o mitocondrial (actividad de la citrato sintasa). Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores (Knickelbein *et al.*, 1985; Harig *et al.*, 1991; Vasseur *et al.*, 1989). De los dos métodos, el II ha resultado ser el más idóneo. Así, el enriquecimiento en la actividad de la sacarasa fue mayor en las vesículas obtenidas con el Método II que en aquellas obtenidas con el Método I. La contaminación por otras membranas (actividad de la ATPasa y de la citrato sintasa) fue menor en las vesículas obtenidas con el Método II que en las obtenidas con el Método I.

Las preparaciones de vesículas de la membrana basolateral de yeyuno de pollo presentaban un factor de enriquecimiento de 8 en la actividad de la pNPPasa activada por K^+ y sensible a ouabaína, enzima marcadora de la membrana basolateral del intestino delgado. La contaminación de membranas apicales fue muy pequeña. Estos resultados son semejantes a los descritos por otros autores (Knickelbein *et al.*, 1985; Dyer *et al.*, 1990).

La medida de la actividad específica de las enzimas marcadoras de membranas nos indica la purificación de las mismas pero no la funcionalidad de las vesículas, es decir, si las membranas aisladas encierran un espacio

osmóticamente activo y si las permeasas presentes mantienen sus propiedades de transporte intactas. El transporte de azúcares a través de la membrana nos permite comprobar la funcionalidad de las vesículas de membrana obtenidas.

En presencia de Na^+ , ambos tipos de preparaciones de vesículas de la membrana apical concentraron, de forma transitoria, el azúcar por encima de su valor de equilibrio. Estos resultados sugieren que las membranas apicales presentan el sistema de transporte de azúcares acoplado al Na^+ . La mayor (12 veces el valor del equilibrio) y mas rápida (pico a los 30 s) acumulación de azúcar observada en el caso de las vesículas de membrana obtenidas por el método II frente a las obtenidas con el método I (3 veces el valor del equilibrio y pico al minuto) se debe, en parte, a que el cotransporte glucosa- Na^+ es electrogénico. En el segundo caso se utilizó SCN^- que, al ser más permeable que el Cl^- , crea un mayor potencial de membrana. Las diferencias también podrían ser debidas a la mayor pureza de las vesículas de membrana obtenidas con el Método II.

Se ha identificado inmunológicamente el cotransportador glucosa- Na^+ en la membrana apical de los enterocitos de pollo, observándose que el anticuerpo utilizado reconoce una proteína similar al transportador SGLT-1 presente en la membrana apical de los enterocitos de conejo y cordero (Vazquez *et al.*, 1993).

El transporte de glucosa en preparaciones de vesículas de la membrana basolateral de los enterocitos de pollo no depende del Na^+ , no es concentrativo y se inhibe por la citocalasina B y la floretina, inhibidores específicos del transporte facilitado de glucosa. El estudio inmunológico nos reveló que el anticuerpo utilizado reconoce una proteína semejante al GLUT-2

de hígado de rata, que es el transportador típico de la membrana basolateral de los enterocitos (Thorens, 1993).

Todos estos resultados indican que en las preparaciones de vesículas de la membrana apical, empleadas en el presente estudio, se puede excluir la contribución de los procesos de transporte presentes en las membranas basolaterales, y lo contrario con las preparaciones de vesículas de la membrana basolateral.

Intercambiador Cl^- /base

El intercambiador Cl^- /base independiente de Na^+ se ha descrito en la membrana apical del intestino delgado de mamífero (Brown *et al.*, 1989; Fan *et al.*, 1983; Knickelbein *et al.*, 1985 y 1988; Liedtke y Hopfer, 1982b; Mugharbil *et al.*, 1990) y recientemente en la membrana basolateral (Orsenigo *et al.*, 1991). Los resultados obtenidos por Montrose *et al.* (1987) sugerían que los enterocitos de pollo carecían del intercambiador Cl^- /base. Sin embargo, estudios fluorimétricos realizados en nuestro laboratorio revelaron que los enterocitos de pollo poseían un intercambiador Cl^- /base implicado en la homeostasis del pH_i (Calonge *et al.*, 1992). El presente trabajo se realizó para corroborar estos resultados y determinar la localización apical o basolateral del intercambiador. Para ello se realizaron medidas de flujos de cloruro por la membrana utilizando radioisótopos y vesículas de la membrana apical de los enterocitos de pollo.

Los resultados descritos en la presente Memoria son consistentes con la presencia en la membrana apical de los enterocitos de pollo de un

intercambiador Cl^- /base independiente de Na^+ que es electroneutro. Así un gradiente de pH dirigido hacia fuera de las vesículas de membrana estimula, de forma transitoria, la entrada de cloruro al interior de las mismas y esta estimulación se observa en condiciones en las que se evita la generación de un potencial eléctrico de membrana (potasio dentro y fuera de la vesícula y en presencia de valinomicina). La estimulación transitoria en la entrada de cloruro, en ausencia de un potencial eléctrico de membrana, excluye un acoplamiento por electrodifusión entre el Cl^- y el H^+ o el OH^- .

El cloruro captado por las vesículas está prácticamente en su totalidad dentro del espacio intravesicular ya que la unión inespecífica del anión a la membrana es despreciable (3.5 % del total captado). La adición del ionóforo de protones CCCP provoca la liberación del cloruro previamente captado por las vesículas de membrana, lo que ratifica que el Cl^- se encuentra libre dentro del espacio intravesicular. El efecto del protonóforo CCCP confirma, además, que la entrada de cloruro no es debida a un acoplamiento eléctrico entre el Cl^- y el H^+ o el OH^- . Si éste fuera el caso, el CCCP incrementaría el potencial de difusión de los H^+ y en consecuencia la entrada del cloruro a las vesículas por electrodifusión. Los resultados son exactamente los opuestos y lo que hace el CCCP es facilitar la disipación del gradiente de pH.

Los derivados de estilbeno fueron inicialmente descritos como inhibidores relativamente específicos del transportador aniónico de los glóbulos rojos (Cabanchik *et al.*, 1978) y posteriormente de los transportadores aniónicos presentes en otros tejidos, como el intestino delgado (Liedtke y Hopfer, 1982b; Calonge *et al.*, 1992), el epitelio renal (Seifter y Aronson, 1984) y la placenta humana (Shennan *et al.*, 1986). La entrada de cloruro a las vesículas de la membrana apical, independiente de

potencial de membrana e inducida por gradiente de pH, fue inhibida por el H₂DIDS y el SITS. La IC₅₀ del SITS es de 700 μ M. Este valor es comparable a los ya descritos en otros tipos de células (Brown *et al.*, 1989; Knickelbein *et al.*, 1985; Karniski, 1989).

Se ha descrito que el intercambiador Cl⁻/base pueden tener un absoluto requerimiento de bicarbonato y por tanto no funcionar en ausencia del mismo (Jentsch *et al.*, 1986; Nakhoul *et al.*, 1990; Seki y Frömter, 1990; Wenzl *et al.*, 1989) o solo preferencia por el bicarbonato sobre el OH⁻ (Brown *et al.*, 1989; Calonge *et al.*, 1992; Chaillet *et al.*, 1986; Hays y Alpern, 1990; Knickelbein *et al.*, 1985; Kutz y Golchini, 1987; Kutz *et al.*, 1989; Mugharbil *et al.*, 1990) o puede no transportar el bicarbonato (Vasseur *et al.*, 1989). Estudios fluorimétricos realizados en nuestro laboratorio con enterocitos de pollo mostraron que el intercambiador Cl⁻/Base no tenía un requerimiento absoluto de bicarbonato exógeno, ya que funcionaba en soluciones nominalmente libres de bicarbonato, aunque a menor velocidad (Calonge *et al.*, 1992).

Los resultados descritos en la presente Memoria muestran que, en condiciones en las que el potencial eléctrico de membrana no se había anulado, la presencia de un gradiente de bicarbonato, dirigido hacia el exterior de las vesículas, estimuló la entrada del cloruro a las mismas, tanto en presencia como en ausencia de un gradiente de pH. Cuando se repitieron los experimentos en condiciones experimentales en las que se evitó la generación de un potencial eléctrico de membrana, el gradiente del bicarbonato solo estimuló la entrada de cloruro en presencia de un gradiente de pH. Estos resultados indican que si bien el intercambiador aniónico de los enterocitos de pollo no tiene un requerimiento absoluto de bicarbonato puede transportarlo

en intercambio con el Cl^- . La estimulación provocada por el bicarbonato en ausencia de gradiente de pH se debe a que la difusión del bicarbonato genera un potencial de membrana, positivo en el interior de la vesícula.

La capacidad de distintos aniones extravasculares para inhibir la entrada del cloruro a las vesículas de membrana, dependiente de pH, fue: $\text{Cl}^- > \text{SCN}^- > \text{HCO}_3^- > \text{I}^- > \text{Glu}^- > \text{H}_2\text{PO}_4^-$. Estas observaciones nos indican que el "lugar" extracelular del intercambiador aniónico, en estudio, puede transportar otros aniones en intercambio con la base, con el grado de preferencia arriba indicado. La misma selectividad aniónica se ha observado en el intercambiador Cl^-/base del íleon de conejo (Knickelbein *et al.*, 1985) y del riñón de conejo (Karniski *et al.*, 1989).

La selectividad aniónica del "lugar" citosólico del intercambiador Cl^-/Base presente en las vesículas de la membrana apical del yeyuno de pollo es: $\text{Cl}^- > \text{I}^- \geq \text{HCO}_3^- > \text{SCN}^- = \text{Glu}^-$, lo que sugiere que el intercambiador es capaz de catalizar además del intercambio Cl^-/OH^- , el intercambio Cl^-/Cl^- , el $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ y el Cl^-/I^- . Estos resultados son semejantes a los obtenidos en vesículas de la membrana apical del intestino delgado de rata (Brown *et al.*, 1989; Vaandrager y De Jonge, 1988).

El estudio cinético del transporte de Cl^- por las vesículas de la membrana apical reveló que, en presencia de un gradiente de pH, la relación entre la velocidad de entrada del Cl^- a las vesículas y la concentración del cloruro extravascular muestra una inflexión a bajas concentraciones del anión, es decir, tendencia a la saturación, mientras que a altas concentraciones la relación se hace lineal. La forma de esta curva sugiere que existe un proceso saturable y otro de difusión, que va adquiriendo importancia

conforme aumenta la concentración de cloruro en el medio extravascular. Por ello, resulta necesario evaluar la cantidad de cloruro que entra a las vesículas por difusión, con el fin de restarla a la captación total y calcular así la cantidad que entra utilizando un sistema de transporte saturable.

El componente de difusión se ha evaluado midiendo la entrada de cloruro, en función de su concentración extravascular, en presencia del SITS o en ausencia de gradiente de pH. En ambas condiciones experimentales la relación entre velocidad de entrada del Cl^- y su concentración extravascular fue lineal y permitió calcular la constante aparente de difusión, K_d , del cloruro. La diferencia entre la entrada total del cloruro y la observada en presencia del inhibidor muestra saturación representa la cantidad de cloruro que entra a las vesículas mediante el intercambiador Cl^-/base .

El análisis cinético del componente saturable mediante la ecuación de Eadie-Hofstee da una relación lineal, indicando que la membrana apical del epitelio intestinal del pollo posee un solo tipo de intercambiador Cl^-/base . El valor de la constante aparente K_m para el cloruro externo es de 4 mM, similar al observado para el intercambiador Cl^-/base de íleon de conejo (Knickelbein *et al.*, 1985), de las células MDCK (Olsnes *et al.*, 1987) y de las células Vero (Vasseur *et al.*, 1989) y más bajo que el observado en el duodeno de rata (Brown, 1989), íleon de conejo (Foster *et al.*, 1990), colon de rata (Liedtke y Hopfer, 1982b), intestino delgado de rata (Hays y Alpern, 1990) y conducto colector de conejo (Kurtz y Golchini, 1987). La presencia de bicarbonato intravesicular estimuló la velocidad máxima de transporte de Cl^- , V_{max} , sin afectar a la K_m .

El componente de difusión también se estimó ajustando los datos de transporte del cloruro, obtenidos en presencia de gradiente de pH y sin inhibidor, a una ecuación no lineal, tal como se describe en el apartado de Resultados. Los valores de las constantes aparentes de transporte obtenidos con este método no se diferencian de los obtenidos cuando el componente de difusión se estimó inhibiendo el transporte de cloruro con el SITS o midiendo la entrada de Cl^- en ausencia de gradiente de pH.

En diversos tipos celulares (Olnes *et al.*, 1987; Vasseur *et al.*, 1989; Olnes *et al.*, 1986; Mugharbil *et al.*, 1990; Tønnessen *et al.*, 1990; Fineman *et al.*, 1990) se ha observado que el intercambiador Cl^- /base independiente del Na^+ funciona a baja velocidad a pH_i basal y se activa alostéricamente al aumentar el pH_i . Es decir, el lado citosólico de la proteína, además de tener un lugar al que se une el anión que se transporta en intercambio con el Cl^- , tiene otro "lugar" sensor del pH_i . Los resultados de la presente Memoria revelan que la relación entre la velocidad de entrada del cloruro a las vesículas de membrana y el pH intravesicular no sigue una cinética simple tipo Michaelis-Menten. La representación de los datos de acuerdo con la ecuación de Hill nos da un coeficiente de interacción de 2.11 y una constante de activación por el protón intravesicular de 39 nM ($\text{pH}=7.4$). Estas observaciones revelan que el intercambiador Cl^- /base presente en la membrana apical de los enterocitos de pollo está alostéricamente regulado por el pH_i y sugieren que puede ser el implicado en la regulación del pH_i de los enterocitos de pollo, previamente evidenciado fluorimétricamente (Calonge *et al.*, 1992).

La Figura 42 resume las características del intercambiador Cl^- /Base presente en la membrana apical de los enterocitos de pollo.

En el transcurso de estos estudios observamos que, además de un proceso de intercambio electroneutro, el cloruro entraba a las vesículas de la membrana apical por un mecanismo pasivo y electrogénico. Así, en ausencia de un gradiente de pH la entrada de cloruro a las vesículas de membrana se estimuló cuando se impuso un potencial de membrana positivo en el interior de las mismas. La selectividad aniónica de este proceso fue $\text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{Cl}^- > \text{HCO}_3^- > \text{Glu}^- > \text{H}_2\text{PO}_4^-$. Una selectividad aniónica similar se ha observado en vesículas de la membrana apical del duodeno de rata (Brown *et al.*, 1989; Garner *et al.*, 1987). La especificidad aniónica del proceso electrogénico es distinta a la del intercambiador, lo que apoya la idea de la existencia de al menos dos mecanismos distintos que median la entrada de cloruro a las vesículas de la membrana apical de yeyuno de pollo: uno el intercambiador Cl^-/base independiente de Na^+ y otro una conductancia aniónica. Las características de esta conductancia se indican en la Figura 42.

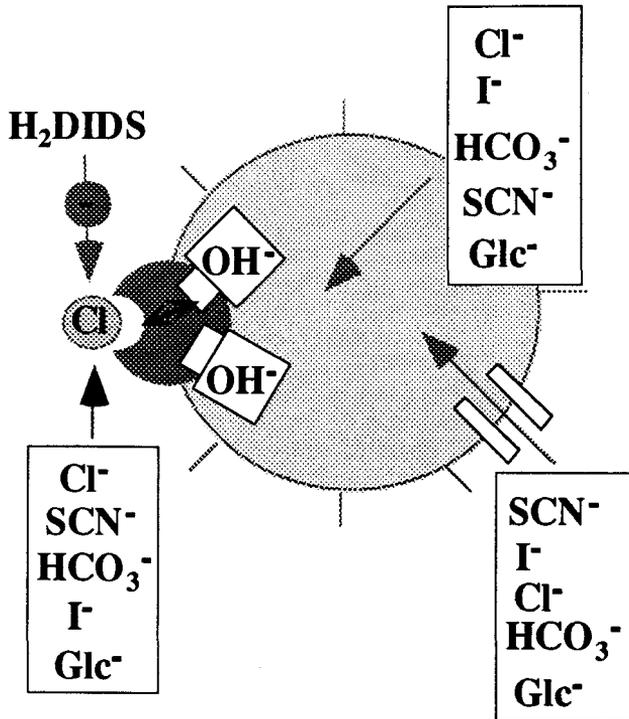


Figura 42. Características del intercambiador Cl^- /base y de la conductancia aniónica en vesículas de la membrana apical del yeyuno de pollo.

Intercambiador $\text{Na}^+\text{-H}^+$

El intercambiador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ es una proteína integral de membrana implicada en diversas funciones fisiológicas como el control del volumen y pH celular (Roos y Boron, 1981; Hoffmann y Simonsen, 1989; Clark y Limbird, 1991; Ilundáin, 1992). Hasta la fecha se han clonado y secuenciado cuatro isoformas del intercambiador. La NHE-1 tiene una distribución ubicua y en células epiteliales se localiza en la membrana basolateral (Tse *et al.*, 1991). En células no epiteliales la isoforma NHE-1 es la encargada de la regulación del pH_i (Biemesderfer *et al.*, 1992) y por extensión se admite que también lo hace en las células epiteliales. Estas células tienen además un intercambiador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ en su membrana apical, isoformas NHE-2 (Yun *et al.*, 1995) o NHE-3 (Biemesderfer *et al.*, 1993), que probablemente se encargue del transporte transepitelial de Na^+ (Fliegel y Frölich, 1993; Yun *et al.*, 1993; Soleimani *et al.*, 1994a).

Estudios fluorimétricos realizados en nuestro laboratorio revelaron la presencia en los enterocitos de pollo de un intercambiador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ que interviene en la regulación del pH_i y que está alostéricamente regulado por el pH_i (Calonge e Ilundáin, 1990). En estos estudios no se determinó su localización apical o basolateral. Si, como ya se ha mencionado, la isoforma que regula el pH_i es la basolateral, nos planteamos determinar si la membrana apical de los enterocitos de pollo presentaba otra isoforma del intercambiador.

Los resultados muestran que un gradiente de pH dirigido hacia el exterior de las vesículas de la membrana apical estimula, de forma transitoria, la entrada del sodio al interior de las mismas, en condiciones en las que se

evita la generación de un potencial eléctrico de membrana (potasio dentro y fuera de la vesícula y en presencia de valinomicina). Estas observaciones son consistentes con la presencia en la membrana apical de los enterocitos de pollo de un intercambiador Na^+/H^+ o un cotransportador Na^+/OH^- . Al igual que en el caso del transporte del cloruro dependiente de pH, la estimulación transitoria en la entrada del sodio en ausencia de un potencial eléctrico de membrana descarta la electrodifusión como la causa de la entrada de Na^+ dependiente de gradiente de protón.

La amilorida inhibe varios sistemas de transporte de Na^+ , dentro de los que se encuentra el intercambiador Na^+-H^+ (Vigne *et al.*, 1982; Benos, 1988). La entrada del Na^+ a las vesículas de la membrana apical, independiente del potencial de membrana y estimulada por un gradiente de pH, fue inhibida en un 70 % por la amilorida, lo que corrobora que este transporte de Na^+ es mediado por el intercambiador Na^+-H^+ . La IC_{50} de la amilorida fue de 44 μM . Este valor de IC_{50} está dentro del orden de sensibilidad a la amilorida descrita para el intercambiador Na^+-H^+ localizado en membrana apical de otros tipos de células epiteliales y mucho más alto que los valores descritos para la isoforma localizada en la membrana basolateral (Clark y Limbird, 1991).

El estudio cinético del transporte del Na^+ por las vesículas de la membrana apical reveló que, en presencia de un gradiente de pH, la relación entre la la velocidad de entrada del Na^+ a las vesículas y su concentración no es del tipo Michaelis-Menten, sino que muestra una inflexión a bajas concentraciones de Na^+ , pasando a ser una línea recta a altas concentraciones del catión. La forma de esta curva sugiere que, al igual que en el caso del cloruro, el Na^+ entra a las vesículas de membrana por al menos dos

mecanismos: por difusión y por un sistema de transporte saturable. Para evaluar el componente de difusión se midió la velocidad de entrada de Na^+ , en función de su concentración extravesicular, pero sin gradiente de pH. En esta situación la relación entre ambos parámetros fue lineal. La diferencia entre la velocidad de entrada del Na^+ en presencia y ausencia de gradiente de pH nos mide la entrada del Na^+ mediada por el intercambiador, que presenta una cinética de saturación de primer orden (tipo Michaelis-Menten). El análisis cinético del componente saturable mediante la ecuación de Eadie-Hofstee reveló que la membrana apical de los enterocitos presenta un solo tipo de intercambiador $\text{Na}^+\text{-H}^+$, con una constante aparente de transporte para el Na^+ de 12 mM. Este valor es del mismo orden que el descrito para el intercambiador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ de la membrana apical del colon de rata (Rajendran y Binder, 1990) y de las células del epitelio renal (Selvaggio *et al.*, 1986), y más bajo que el medido en el íleon de conejo (Knickelbein y Dobbins, 1990). La constante de difusión, K_d , para el Na^+ fue de 1,3 nmol/mg proteína/15 s/mM.

En varios tipos de células el intercambiador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ es virtualmente silente a un valor de pH_i cercano al fisiológico, activándose alostéricamente al disminuir el pH_i por debajo de un cierto valor umbral (Aronson *et al.*, 1982; Frelí *et al.*, 1988; Calonge e Ilundain, 1990; Calonge *et al.*, 1993). Esta cooperatividad es característica del intercambiador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ (NHE-1) que en células no epiteliales interviene en la regulación del pH_i . Como ya se ha mencionado anteriormente, estudios fluorimétricos realizados en nuestro laboratorio (Calonge e Ilundáin, 1990) habían revelado que el intercambiador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ que interviene en la regulación del pH_i de los enterocitos de pollo está alostericamente regulado por el pH_i . En las vesículas de la membrana

apical del yeyuno de pollo, sin embargo, la relación entre la velocidad de entrada del Na^+ , dependiente de gradiente de pH, y el pH intravesicular guardó una cinética tipo Michaelis-Menten y el análisis de los datos de acuerdo con la ecuación de Hill da un coeficiente de interacción (n) de 1. Esto nos indica que, a diferencia de lo que observábamos con la técnica fluorimétrica, no hay cooperatividad entre el protón y el intercambiador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ localizado en la membrana apical de los enterocitos de pollo. Observaciones semejantes han sido realizadas en la membrana apical del colon de rata (Rajendran y Binder, 1990).

En conjunto nuestros resultados revelan que los enterocitos de pollo presentan en su membrana apical un intercambiador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ que no está alostéricamente regulado por el pH_i y sugiere que dichas células poseen dos intercambiadores $\text{Na}^+\text{-H}^+$ (Figura 43). El localizado en la membrana apical, podría ser el responsable de la absorción de sal. Y el evidenciado fluorimétricamente e implicado en la regulación del pH_i , estaría localizado en la membrana basolateral.

RADIOISÓTOPOS

FLUORIMETRÍA

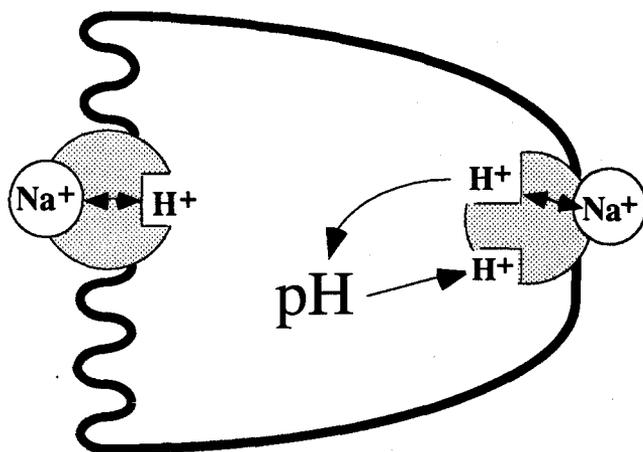


Figura 43. Características de los intercambiadores Na⁺-H⁺ en los enterocitos de pollo.

CONCLUSIONES

1. Se han puesto a punto dos métodos para la obtención de vesículas de la membrana apical del yeyuno de pollo. Con ambos métodos se obtienen preparaciones de vesículas de la membrana apical relativamente puras, ya que estaban enriquecidas en marcadores propios de dicha membrana (actividad de sacarasa y transportador de glucosa tipo SGLT-1), presentando una contaminación pequeña por membrana basolateral (actividad de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa) o mitocondrial (actividad de citrato sintasa). De los dos métodos, el II ha resultado ser el más idóneo.
2. Se ha puesto a punto un método para la obtención de vesículas de la membrana basolateral del yeyuno de pollo. Las preparaciones de vesículas de la membrana basolateral estaban enriquecidas en marcadores propios de dicha membrana (actividad de pNPPasa, dependiente de K^+ y sensible a ouabaína, y transportador de glucosa tipo GLUT-2). La contaminación por membranas apicales fue muy pequeña.
3. La membrana apical del yeyuno de pollo presenta un intercambiador Cl^-/base independiente de Na^+ , electroneutro e inhibido por el H₂DIDS y el SITS. Siendo la constante aparente de inhibición, IC_{50} , del SITS es de 700 μM .

4. El intercambiador Cl^-/base de enterocitos de pollo no tiene un requerimiento absoluto de bicarbonato, ya que funcionaba en soluciones nominalmente libres de dicho anión. La presencia de un gradiente de bicarbonato, dirigido hacia el exterior de las vesículas, estimula la actividad del intercambiador Cl^-/base .
5. El "lugar" extracelular del intercambiador Cl^-/base presenta la siguiente selectividad aniónica: $\text{Cl}^- > \text{SCN}^- > \text{HCO}_3^- > \text{I}^- > \text{Glu}^- > \text{H}_2\text{PO}_4^-$. La selectividad aniónica del "lugar" citosólico del intercambiador Cl^-/base es: $\text{Cl}^- > \text{I}^- \geq \text{HCO}_3^- > \text{SCN}^- = \text{Glu}^-$.
6. El intercambiador Cl^-/base presente en la membrana apical de los enterocitos de pollo está alostéricamente regulado por el pH_i , lo que sugiere que puede estar implicado en la regulación del pH_i . La constante de afinidad para el protón citosólico es 39 nM.
7. En presencia de un gradiente de pH, la entrada de Cl^- a las vesículas de la membrana apical está mediada por dos sistemas: uno es el intercambiador Cl^-/base y el otro la difusión. La constante aparente de transporte para el cloruro externo, K_m , fue 4 mM; la velocidad máxima de transporte, V_{max} , 3,2 nmol/mg proteína/15s y la constante aparente de difusión, K_d , 0,077 nmol/mg proteína/15s/mM.
8. La presencia de un gradiente de bicarbonato estimuló la velocidad máxima de transporte del intercambiador Cl^-/base , V_{max} , para el cloruro, sin afectar a la constante aparente de transporte, K_m .

9. La membrana apical de los enterocitos de pollo presenta una conductancia aniónica cuya selectividad es: $\text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{Cl}^- > \text{HCO}_3^- > \text{Glu}^- > \text{H}_2\text{PO}_4^-$.
10. La membrana apical de enterocitos de pollo posee un intercambiador Na^+/H^+ , eléctricamente neutro e inhibido por la amilorida. La constante aparente de inhibición, IC_{50} , de la amilorida fue de $44 \mu\text{M}$.
11. El estudio cinético del transporte de Na^+ reveló que la membrana apical de yeyuno de pollo presenta un solo tipo de intercambiador Na^+-H^+ ; con una constante aparente de transporte para el Na^+ , K_m , de 12 mM ; una velocidad máxima de transporte, V_{max} , de $33 \text{ nmol/mg proteína/15s}$ y una constante aparente de difusión, K_d , de $1,3 \text{ nmol/mg proteína/15s/mM}$.
12. El intercambiador Na^+-H^+ de la membrana apical del yeyuno de pollo no está alostéricamente regulado por el pH intravesicular.
13. Los resultados sugieren que los enterocitos de pollo poseen dos intercambiadores Na^+-H^+ . Uno localizado en la membrana basolateral que estaría implicado en la regulación del pH_i y el otro, localizado en la membrana apical, podría ser el responsable de la absorción de sal.

BIBLIOGRAFÍA

- Abrahamse S.L., de Jong M.D., Bindels R.J.M. y van Os C.H. (1993) Isolated of apical membrane fragments from surface and crypt cells of rabbit distal colon. *FASEB J.*: A573.
- Akiba T., Alpern R.J., Eveloff J., Calamina J. y Warnock D. (1986) Electrogenic sodium/bicarbonate cotransport in rabbit renal cortical basolateral membrane vesicles. *J. Clin. Invest.* 78: 1472-1478.
- Akiba T., Rocco V.K. y D.G. Warnock. (1987) Parallel adaptation of the rabbit renal cortical sodium/protom antiporter and sodium /bicarbonate cotransporter in metabolic acidosis and alkalosis. *J. Clin. Invest.* 80: 308-315.
- Alper S.L. (1991) The band 3-related anion exchanger (AE) gene family. *Annu. Rev. Physiol.* 53: 549-564.
- Alper S.L., Kopito R.R., Libresco S.M. y Lodish H.F. (1988) Cloning and characterization of a murine band 3-related cDNA from kidney and from a lymphoid cell line. *J. Biol. Chem.* 263: 17092-17099.
- Alper S.L., Natale J., Gluck S., Lodish H.F. y Brown D. (1989) Subtype of intercalated cells in rat kidney collecting duct defined by antibodies

- against erythroid band 3 and renal vacuolar H⁺-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 5429-5433.
- Alpern R.J. (1985) Mechanism of basolateral membrane H⁺/OH⁻/HCO₃⁻ transport in the rat proximal convoluted tubule. A sodium-coupled electrogenic process. *J. Gen. Physiol.* 86: 613-636.
- Aronson, P.S. (1985) Kinetic properties of the plasma membrane Na⁺-H⁺ exchanger. *Ann. Rev. Physiol.* 47: 545-560.
- Aronson, P.S., Nee J. y Suhm M.A. (1982) Modifier role of internal H⁺ in activating the Na⁺-H⁺ exchanger in renal microvillus membrane vesicles. *Nature* 299: 161-163.
- Baldwin S.A. y Henderson P.J.F. (1989). Homologies between sugar transporters from eukaryotes and prokaryotes. *Annu. Rev. Physiol.* 51: 459-471.
- Benedetti A., Strazzabosco M., Ng O.C. y Boyer J.L. (1994) Regulation of activity and apical targeting of the Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger in rat hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 792-796.
- Bennett V. y Stenbuck P.J. (1980) Association between ankyrin and the cytoplasmic domain of band 3 isolated from the human erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* 255: 6424-6432.
- Benos D.J. (1988) Amiloride: Chemistry, kinetics, and structure-activity relationships. En : "Na⁺/H⁺ Exchange", S. Grinstein, ed.). CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 121-136.

- Bevan C., Kinne-Safran E., Foulkes E.C. y Kinne R.K.H. (1989) Cadmium inhibition of L-alanine transport into renal brush border membrane vesicles isolated from the winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) Toxicol. appl. Pharmacol. 101: 461-469.
- Bhiler I. y Cybulski R. (1973) Sugar transport at the basal and lateral aspect of the small intestinal cell. Biochim. Biophys. Acta 298: 429-433.
- Biemesderfer D., Pizzonia J., Exner M., Reilly R., Igarashi P. y Aronson P.S. (1993) NHE-3: a Na⁺/H⁺ exchanger isoform of renal brush border. Am. J. Physiol. 265: F736-F742.
- Biemesderfer D., Reilly R.F., Exner M., Igarashi P. y Aronson P.S. (1992) Immunocytochemical characterization of Na⁺-H⁺ exchanger isoform NHE1 in rabbit kidney. Am. J. Physiol. 263: F833-F840.
- Bierman A. J., Cragoe E. J., Jr., de Latt S.W. y Moolenaar W.H. (1988) Bicarbonate determines cytoplasmatic pH and suppresses mitogen-induced alkalization in fibroblastic cells. J. Biol. Chem. 263: 15253-15256.
- Binder H.J. y Sandle G.I (1987) Electrolyte absorption and secretion in the mammalian colon. En: "Physiology of the gastrointestinal tract" second edition, edited by Leonard R.J. Raven Press, New York.
- Binder H.J., Foster E.S., Budinger M.E. y Hayslett J.P. (1987) Mechanism of electroneutral sodium-chloride absorption in distal colon of the rat. Gastroenterology 93: 449-455.

- Bookstein C., Mush M.W., Depaloi A., Xie Y., Villereal M., Rao M.C. y Chang E.B. (1994) A unique sodium-hydrogen exchange isoform (NHE-4) of the inner medulla of the rat kidney is induced by hyperosmolarity. *J. Biol. Chem.* 269: 29704-29709.
- Borgese F., Sardet C., Cappadoro M., Poussegur J. y Motais R. (1992) Cloning and expression of a cAMP activatable Na^+/H^+ exchanger. Evidence that the cytoplasmic domain mediates hormonal regulation *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6765-6769.
- Boron W. F. (1992) Control of intracellular pH. En "The Kidney: Physiology and Pathophysiology". Segunda edición, (D.W. Seldin y G. Giebisch, eds.), Raven Press, New York, pp. 219-263.
- Boron W.F. (1986) Intracellular pH regulation in epithelial cells. *Ann. Rev. Physiol.* 48: 377-388.
- Boron W.F. y Boulpaep E.L. (1983) Intracellular pH regulation in the renal proximal tubule of the Salamander: basolateral HCO_3^- transport. *J. Gen. Physiol.* 81: 53-94.
- Boron W.F. y Boulpaep E.L. (1989) The electrogenic $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ transport. *Kidney. Int.* 36:392-402.
- Boron W.F. y Russell J.M. (1983) Stoichiometry and ion dependencies of the intracellular -pH- regulating mechanism in squid giant axons. *J. Gen. Physiol.* 81: 373-399.

- Bowman E.J., Siebers A. y Altendorf K. (1988) Bafilomycins: A class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 7972-7976.
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- Brosius F.C., III, Alper S.L., Garcia A.M. y Lodish H.F. (1989) The major kidney band 3 gene transcript predicts an amino-terminal truncated band 3 polypeptide. *J. Biol. Chem.* 264: 7784-7787.
- Brown C.D.A., Dunk C.R. y Turnberg L.A. (1989) $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange and anion conductance in rat duodenal apical membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* 257: G661-G667.
- Buran C.F., Takeda J., Brot-Laroche E., Bell G.I. y Davidson N.O. (1992) Fructose transporter in human spermatozoa and small intestine is GLUT5. *J. Biol. Chem.* 267, 14523-14526.
- Burckhardt B.C., Thelen P. y Burckhardt G. (1994) Expression of rat renal $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes. *Pflügers Arch.* 429:294-296.
- Cabantchik Z.I., Knauf P.A. y Rothstein A. (1978) The anion transport system of the red blood cell. The role of membrane protein evaluated by the use of "probes". *Biochim. Biophys. Acta* 515: 239-302.
- Cala P. M. (1986) Volume-sensitive alkali metal-H transport in *Amphiuma* red blood cells. En : $\text{Na}^+\text{-H}^+$ Exchange, Intracellular pH, and Cel

- Function, edited by P.S. Aronson and W. F. Boron. Orlando, FL: Academic, vol. 26, p. 79-99. (Curr. Top. Membr. Transp.).
- Cala P.M. (1980) Volume regulation by *Amphiuma* red blood cells. The membrane potential and its implications regarding the nature of the ion flux pathways. *J. Gen. Physiol.* 76: 683-708.
- Calonge M. L., Ilundáin A. y Bolufer J. (1989) Ionic dependence of glycylsarcosine uptake by isolated enterocytes. *J. Cell. Physiol.* 138: 579-585.
- Calonge M.L. e Ilundáin A. (1990) Na⁺-H⁺ activity and cellular pH regulation in enterocytes isolated from chick small intestine. *Biochim. Biophys. Acta* 1029: 201-210.
- Calonge M.L., Molina M.T. y Ilundáin A. (1992) Cl⁻/base exchange and cellular pH regulation in enterocytes isolated from small intestine. *Biochim. Biophys. Acta* 1203: 45-50.
- Calonge M.L., Peral M.J. e Ilundáin A. (1993) Intracellular pH regulation in cecal epithelial cells from the chick. *Biochim. Biophys. Acta.* 1153: 213-218.
- Cannon C., Van Adelsberg J., Kelly S. y Al-Awqati Q. (1985) Carbon-dioxide-induced exocytotic insertion of H⁺ pump in turtle-bladder luminal membrane: role of cell pH and Calcium. *Nature* 314: 443-446.
- Casavola V., Helmle-Kolb C. y Murer H. (1989) Separate regulatory control of apical and basolateral Na⁺/H⁺ exchange in renal epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165: 833-837.

- Cassano G., Steiger B. y Murer H. (1984) Na/H y Cl/OH-exchange in rat jejunal and rat proximal tubular brush border membrane vesicles. Studies with acridine orange. *Pflügers Arch.* 400: 309-317.
- Clark, J.D. y Limbird, L.E. (1991). Na⁺-H⁺ exchanger subtypes: a predictive review. *Am. J. Physiol.* 261: C945-C953.
- Clauss W., Schafer H., Horch I. y Hornicke H. (1985) Segmental differences in electrical properties and Na-transport of rabbit caecum, proximal and distal colon *in vitro*. *Pflügers Arch.* 403: 278-282.
- Colas, B. y Maroux, S. (1980) Simultaneous isolation of brush border and basolateral membrane from rabbit enterocytes. Presence of brush border hydrolases in the basolateral membrane of rabbit enterocytes. *Biochem. Biophys. Acta* 600: 406-420.
- Crane R.K. (1960) Intestinal absorption of sugars. *Physiol. Rev.* 40: 789-825.
- Crane R.K., Miller D. y Bihler I. (1961) The restrictions on possible mechanisms of intestinal active transport of sugars. En "Membrane Transport and Metabolism" (A. Kleinzeller y Kotyk K., eds.), Academic press, New York, pp. 439-449.
- Chaillet J.R., Amsler K. y Boron W.F. (1986) Optical measurement of intracellular pH in single LLC-PK1 cells: Demonstration of Cl/HCO₃ exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* 83: 522-526.

- Chow A., Dobbins J.W., Aronson P.S. y Igarashi P. (1992) cDNA cloning and localization of a band 3-related protein from ileum. *Am.J. Physiol.* 263, G345-G352.
- Dahlquist, A. (1963) Method for assay of intestinal disaccharidases. *Anal.Biochem.* 7: 18-25.
- Dalle K.J. (1993) Transporte de monosacáridos en vesículas apicales del intestino delgado y grueso del *Gallus gallus domesticus*. . Tesis Doctoral.
- Davidson N.O., Hausman A.M.L, Ifkovits C.A., Buse J.B., Gould G.W., Burant C.F. y Bell G.I. (1992) Human intestinal glucose transporter expression and localization of GLUT5. *Am. J. Physiol.* 262, C795-C800.
- Davis G., Morawski S., Santa Ana C. y Fordtran J. (1983) Evaluation of chloride/bicarbonate exchange in the human colon in vivo. *J. Clin. Invest.* 71: 201- 207.
- Del Castillo J.R., Rajendran V.M. y Binder H.J. (1991) Apical membrane localization of ouabain-sensitive K⁺-activated ATPase activities in rat distal colon. *Am. J. Physiol.* 261: G1005-G1011.
- Demuth D.R., Showe L.C., Ballantine M., Palumbo A., Fraser J., Cioe L., Giovanni R. y Curtis P.J. (1986) Cloning and structural characterization of a human non-erythroid band 3-like protein. *EMBO J.* 5: 1205-1214.

- Donowitz M. y Welsh M. J. (1987) Regulation of mammalian small intestinal electrolyte secretion. En "Physiology of the gastrointestinal tract", Second edición (L. R. Johnson, ed.), Raven press, New York, pp. 1351-1388.
- Drenckhahn D., Schluter K., Allen D.P. y Bennett V. (1985) Colocalization of band 3 with ankyrin and spectrin at the basal membrane of intercalated cells in the rat kidney. *Science* 230: 1287-1289.
- Drenckhahn D., Wagner S., Jons T., Oelmann M. y Koob R. (1989) Molecular characterization of band 3-related anion exchangers in the vertebrate urinary system and Golgi apparatus. En "Anion Transport Protein of the Red Blood Cell Membrane" (N. Hamsaki y M.L. Jennings, eds.), Amsterdam: Elsevier, pp. 165-178.
- Duhm J. y Göbel B.O. (1984) Na^+ - K^+ transport and volumen of rat erythrocytes under dietary K^+ deficiency. *Am. J. Physiol. (Cell Physiol. 15)* : C20-C29.
- Dyer J., Beechey R.B., Gorvel J-P, Smith R.T., Wootton R. y Shirazi-Beechey S.P. (1990) Glycyl-L-proline transport in rabbit enterocytes basolateral membrane vesicles. *Biochim. J.* 269: 565-571.
- Ericson A. C. y Spring K.R. (1982): Volumen regulation by *Necturus gallbladder*: Na^+ - H^+ and Cl^- - HCO_3^- exchange. *Am. J. Physiol.*, 243:C146-C150.
- Eveloff J. L. y D. G. Warnock. (1987) Activation of ion transport system during cell volume regulation. *Am. J. Physiol.* 252: F1-F10.

- Faller L., Jackson R., Malinowska D., Mukidjam E. y Rabon E. (1982) Mechanistic aspects of gastric (H+K)-ATPase. *Ann. NY Acad. Sci.* 402 : 146-163.
- Fan C.C., Faust R.G. y Powell D.W. (1983) Coupled Na-Cl transport by rabbit ileal brush border membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* 244: G375-G385.
- Fejes-Tóth G., Chen W.-R., Rusvai E., Moser T. y Náráy-Fejes-Tóth A. (1994) Differential expression of AE1 in renal HCO₃ secreting and -reabsorbing intercalated cells. *J. Biol. Chem.* 269: 26717-26721.
- Fineman I., Hart D. y Nord E.P. (1990) Intracellular pH regulates Na⁺-independent Cl⁻-base exchange in JTC-12 (proximal tubule) cells. *Am. J. Physiol.* 258: F883-F892.
- Fliegel L. y Fröhlich O. (1993) The Na⁺-H⁺ exchanger: an update on structure, regulation and cardiac physiology. *Biochem. J.* 296: 273-285.
- Foster E.S., Budinger M.E., Hayslett J.P. y Binder H.J. (1986) Ion transport in proximal colon of the rat. Sodium depletion stimulates neutral sodium chloride absorption. *J. Clin. Invest.* 77: 228-235.
- Foster E.S., Dudeja P.K. y Brasitus, T.A. (1990) Contribution of Cl⁻-OH⁻ exchange to electroneutral NaCl absorption in rat distal colon. *Am. J. Physiol.* 258: G261-G267.

- Foster E.S., Hayslett J.P y Binder H.J. (1984) Mechanism of active potassium absorption and secretion in the rat colon. *Am. J. Physiol.* 246: G611-G617.
- Fozzar H.A. y Gunn R. (1992) Membrane Transport. En "The heart and Cardiovascular System", Segunda Edición (H.A.Fozzar et al., eds.), Raven Press, New York, pp. 100-110.
- Frelin C., O. Chassande y M. Lazdunski. (1986) Biochemical characterization of the Na/K/Cl cotransport in chick cardiac cells. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 134: 326-331.
- Frelin C., Vigne P., Ladoux A. y Lazdunski M. (1988) The regulation of the intracellular pH in cells from vertebrates. *Eur. J. Biochemistry* 174: 3-14.
- Frizzel R.A., Nellans H.N., Rose R.C., Markscheid-Kaspi L. y Schultz S.G. (1973) Intracellular Cl⁻ concentration and influxes across the brush border of rabbit ileum. *Am. J. Physiol.* 224: 328-337.
- Frizzell R.A., Koch M.J. y Schultz S.G. (1976) Ion transport by rabbit colon . I. Active and passive components. *J. Membr. Biol.* 27: 297-316.
- Furlong T. J. y Spring K.R. (1990) Mechanisms underlying volume regulatory decrease by *Necturus gallbladder* epithelium. *Am. J. Physiol.* 258: C1016-C1020.
- Ganser A.L. y Forte J.G. (1973) K⁺-stimulated ATPase in purified microsomes of bullfrog oxyntic cells. *Biochim. Biophys. Acta* 307: 169-180.

- Ganz M.B., Boyarsky G., Boron W.F. y Sterzel R.B. (1988) Effects of angiotensin II and vasopressin on intracellular pH of glomerular mesangial cells. *Am. J. Physiol.* 254: F787-F794.
- Ganz M.B., Boyarsky G., Sterzel R.B. y Boron W.F. (1989) Arginine vasopressin enhances pH_i regulation in the presence of HCO_3^- by stimulating three acid-base transport systems. *Nature (London)* 337: 648-651.
- Ganz M.B., Perfetto M.C. y Boron W.F. (1990) Effects of mitogens and other agents on mesangial cell proliferation, pH and Ca^{2+} . *Am. J. Physiol.* 259: F269-F278.
- Garner A., Peters T.J. y Wilkes J.M. (1987) Passive permeation of ions in rat duodenal brush border membranes *J. Physiol (London)* (abstract) 384: 39p
- Gehring H., Müller W. y Appelhans H. (1992) Complete nucleotide sequence of band 3 related anion transport protein AE2 from human kidney. *Biochim. Biophys. Acta* 1130: 326-328.
- Geibel J., Giebisch G. y Boron W.F. (1989) Basolateral sodium-coupled acid-base transport mechanisms of the rabbit proximal tubule. *Am. J. Physiol.* 257: F790-F797.
- Geibel J., Giebisch G. y Boron W.F. (1990) Angiotensin II stimulates both $\text{Na}^+\text{-H}^+$ exchange and $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransport in the rabbit proximal tubule. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 87: 7917-7920.

- Gould W. y Holman G. (1993) The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. *Biochem J.* 295: 329-341.
- Grinstein S. y Rothstein A. (1986) Mechanisms of regulation of the Na^+/H^+ exchanger. *J. Membr. Biol.* 90: 1-12.
- Grinstein S., A. Rothstein, B. Sarkadi y E.W. Gelfand. (1984) Responses of lymphocytes to anisotonic media: volume-regulating behavior. *Am. J. Physiol.* 246: C204-C215.
- Grinstein S., Goetz-Smith J.D., Stewart D., Beresford B. J. y Mellors A. (1986) Protein Phosphorylation during activation of Na^+/H^+ exchange by phorbol esters and by osmotic shrinking. Possible relation to cell pH and volume regulation. *J. Biol. Chem.*, 261: 8009-8016.
- Grinstein, S., Furuya, W. y Bianchini, L. (1992) Protein Kinases Phosphatases, and the control of cell volume. *News in Physiological Sciences* 7: 232-237.
- Gunther R.D. y Wrigt E.M. (1983) Na^+ , Li^+ y Cl^- transport by brush border membranes from rabbit jejunum. *J. Membran. Biol.* 74: 85-94.
- Hagenbuch B.G., Heylings J.R. y Garner A. (1987) Sodium-bicarbonate cotransport occurs in rat kidney cortical membranes but not in rat small intestinal basolateral membranes. *Biochem J* 246: 543-545.
- Haggerty J.G., Agarwal N., Cragoe E.J.Jr., Slayman C.W. y Adelberg E.A. (1988b) LLC-PK11 mutant with increased Na^+/H^+ exchange and decreased sensitivity to amiloride. 255: C495-C501.

- Haggerty J.G., Agarwal N., Reilly R.F., Adelberg E.A. y Slayman C.W. (1988a) Pharmacologically different Na/H antiporters on the apical and basolateral surfaces of cultured porcine kidney cells (LLC-PK1) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 6797-6801.
- Haggerty J.G., Cragoe E.J.Jr., Slayman C.W. y Adelberg E.A. (1985) Na⁺-H⁺ exchanger activity in the pig kidney epithelial cell line, LLC-PK1: inhibition by amiloride and its derivatives. Biochem. Biophys. Res. Commun. 127: 759-767.
- Halm D.R. y Frizzell R. A. (1990) Intestinal Chloride Secretion. En: Textbook of secretory diarrhea. edited by E. Lebenthal and M. Duffey. Raven press, Ltd. New York.
- Harig J.M., Soergel K.H., Barry J.A. y Ramaswamy K. (1991) Transport of propionate by human ileal brush border membrane vesicles. Am J. Physiol. 260: G776-G782.
- Hatch M. y Freel R.W. (1988) Electrolyte transport across the rabbit caecum *in vitro*. Pflügers Arch. 411: 333-338.
- Hays S.R. y Alpern R.J. (1990a) Basolateral membrane Na⁺-independent Cl⁻/HCO₃⁻ exchange in the inner stripe of the rabbit outer medullary collecting tubule. J. Gen. Physiol. 95,347-367.
- Hebert S. C. y Sun A. (1988) Hypotonic cell volumen regulation in mouse medullary thick ascending limb: Effects of ADH. Am. J. Physiol., 255: F962-969.

- Hediger M.A., Coady M.J., Ikeda T.S. y Wright E.M. (1987) Expression cloning and cDNA sequencing of the Na⁺/glucose cotransporter. *Nature* 330: 379-381.
- Hediger M.A., Kanai Y., You G. y Nussberger S. (1995) Mammalian ion-coupled solute transporters. *J. Physiol.* 482. P.
- Heintze K., Stewart C.P. y Frizzell R.A. (1983) Sodium dependent chloride secretion across rabbit descending colon. *Am. J. Physiol.* 244: G357-G365.
- Hoffmann E.K. (1985) Role of separate K⁺ and Cl⁻ channels and of Na⁺/Cl⁻ cotransport in volume regulation in Ehrlich cells. *Federation Proc.* 44: 2513-2519.
- Hoffmann E.K., Simonsen L.O. y Lambert I.H. (1984) Volumen-induced increase of K⁺ and Cl⁻ permeabilities in Ehrlich ascites cells. Role of internal Ca²⁺. *J. Membr. Biol.* 78: 211-222.
- Hopfer U., Sigrist-Nelson K., Perrotto J. y Isselbacher K.J. (1973) Glucose transport in isolated brush border membranes from rat small intestine. *J. Biol. Chem.* 248: 25-32.
- Hopfer U. y Liedtke C.M. (1987) Proton and bicarbonate transport mechanisms in the intestine. *Ann. Rev. Physiol.* 49: 51-67.
- Ilundáin A. (1992) Intracellular pH regulation in intestinal and renal epithelial cells. *Comp. Biochem. Physiol.* 101A: 413-424.

- Imon M. A. y White J.F. (1984) Association between HCO_3^- absorption and K^+ uptake by *Amphiuma jejunum*: Relations among HCO_3^- absorption, luminal K^+ , and intracellular K^+ activity. *Am. J. Physiol.* 246: G732-G744.
- Isenberg J I, Ljungström M, Säfsten B y Flemström G (1993) Proximal duodenal enterocyte transport: evidence for $\text{Na}^+\text{-H}^+$ and $\text{Cl}^-\text{-HCO}_3^-$ exchange and NaHCO_3 cotransport. *Am J Physiol* 265: G677-G685
- Jennings M.L. (1992) Anion transport proteins. En: *The kidney physiology and Pathophysiology*, Seldin D.W. y Giebisch G. eds. Raven Press New York. 503-535.
- Jentsch T.J., Janicke I., Sorgenfrei D., Keller S.K. y Wiederholt M. (1986) The regulation of intracellular pH in monkey kidney epithelial cells (BSC-1). Roles of $\text{Na}^+\text{/H}^+$ antiport, $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ (NaCO_3) symport, y $\text{Cl}^-\text{/HCO}_3^-$ exchange. *J. Biol. Chem.* 261: 12120-12127.
- Jentsch T.J., Schill B.S., Schwartz H., Keller S.K. y Wiederholt M. (1985) Kidney epithelial cell of monkey origin (BSC-1) express a sodium bicarbonate cotransport. *J. Biol. Chem.* 260: 15554-15560.
- Karniski L.P. (1989) Activation of Cl^-/OH^- exchange by Parachloromercuribenzoic acid in rabbit renal brush border membranes. *J. Membr. Biol.* 112: 59-66.
- Kaunitz J.D. y Sachs G. (1986) Identification of a vanadate-sensitive potassium-dependent proton pump from rabbit colon. *J. Biol. Chem.* 261: 14005-14010.

- Kessler M., Acuto O., Storelli C., Murer H., Müller M., Semenza G. (1978) A modifier procedure for the rapid preparation of efficiently transporting vesicles from small intestinal brush border membranes. Their use in investigating some properties of D-Glucose and choline transport systems. *Biochim. Biophys. Acta.* 506: 136-154.
- Kikeri J.D., Azar, S., Sun A., Zeidel M.L. y Hebert S.C. (1990) $\text{Na}^+\text{-H}^+$ antiporter and $\text{Na}^+\text{-(HCO}_3^-)_n$ symporter regulate intracellular pH in mouse medullary thick limbs of Henle. *Am. J. Physiol.* 258: F445-F456.
- Kim H.-R.C., Yew N.S., Ansorge W., Voss H., Schwager C., Vennstrom B., Zenke M. y Engel J.D. (1988) Two different mRNAs are transcribed from a single genomic locus encoding the chicken erythrocyte anion transport proteins (band 3). *Mol. Cell. Biol.* 8: 4416-4423.
- Kimelberg H.K. y M. V. Frangakis. (1986) Volume regulation in primary astrocyte cultures. *Adv. Biosci.* 61: 177-186.
- Kimmich G.A. y Randles J. (1978) Phloretin-like action of bioflavonoids on sugar accumulation capability of isolated intestinal cells. *Membr. Biochim.* 1: 221-237.
- Kimmich G.A. y Randles J. (1979) Energetics of sugar transport by isolated intestinal epithelial cells: Effects of cytochalasin B. *Am. J. Physiol.* 237: C56-C63.

- Kleinman J.G., Harig J.M. y Barry J.A. (1988) Na^+ and H^+ transport in human jejunal brush-border membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* 255: G206-G211.
- Kleinzeller A. y Ziyadeh F.N. (1990) Cell volumen regulation in epithelia with emphasis on the role of osmolytes and the cytoskeleton. *Comp. Physiol. Basel, Karger.* Vol. 4: 59-86.
- Knickelbein R. y Dobbins J.W. (1990) Sulfate and oxalate exchange for bicarbonate across the basolateral membrane of rabbit ileum. *Am J Physiol* 259: G807-G813.
- Knickelbein R., Aronson P.S., Schron C.M., Seifter J. y Dobbins J.W. (1985) Sodium and chloride transport across rabbit ileal brush border. II. Evidence for Cl^- - HCO_3^- exchange and mechanism of coupling. *Am J Physiol* 249: G236-G245.
- Knickelbein R.G., Aronson P.S. y Dobbins J.W. (1990) Characterization of Na^+ - H^+ exchangers on villus cells in rabbit ileum. *Am. J. Physiol.* 259: G802-G806.
- Knickelbein R.G., Aronson P.S. y Dobbins J.W. (1988) Membrane distribution of sodium-hydrogen and chloride-bicarbonate exchangers in crypt and villus cell membranes from rabbit ileum. *J. Clin. Invest.* 82,2158-2163
- Kopito R.R. (1990) Molecular biology of the anion exchanger gene family. *Int. Rev. Cytol.* 123: 177-199.

- Kopito R.R. y Lodish H.F. (1985) Primary structure and transmembrane orientation of the murine anion exchange protein. *Nature (London)* 316: 234-238.
- Kopito R.R., Andersson M.A., Herzlinger D.A., Al-Awqati Q. y Lodish H.F. (1988) Structure and tissue-specific expression of the mouse anion exchanger gene in erythroid and renal cells. En "Cell Physiology of Blood" (R.B. Gunn y J.C. Parker, eds.), New York: Rockefeller University press, pp. 151-161.
- Kopito R.R., Lee B.S., Simmons D.M., Lindsey A.E., Morgans C.W. y Schneider K. (1989) Regulation of intracellular pH by a neuronal homolog of the erythrocyte anion exchanger. *Cell* 59: 927-937.
- Krapf G. y Solioz M. (1991) Na/H antiporter mRNA expression in single nephron segments of rat kidney cortex. *J. Clin. Invest.* 88: 783-788.
- Krapf R. (1988) Basolateral membrane H/OH/HCO₃ transport in the rat cortical thick ascending limb. Evidence for an electrogenic Na/HCO₃ cotransporter in parallel with a Na⁺/H⁺ antiporter. *J. Clin. Invest.* 82: 234-241
- Krapf R. y Alpern R.J. (1993) Cell pH and transepithelial H/HCO₃-transport in the renal proximal tubule. *J. Membr. Biol.* 131: 1-10.
- Krapf R., Alpern R.J., Rector Jr F.C. y Berry C.A. (1987) Basolateral membrane Na⁺/base cotransport is dependent on CO₂/HCO₃⁻ in the proximal convoluted tubule. *J. Gen. Physiol.* 90: 833-853.

- Krejenow F. M. (1981): Osmoregulatory salt transporting mechanisms: control of cell volume in anisotonic media. *Annu. Rev. Physiol.*, 43: 493-505.
- Kudrycki K.E. y Shull G.E. (1989) Primary structure of the rat kidney band 3 anion exchange protein deduced from a cDNA. *J. Biol. Chem.* 264: 8185-8192.
- Kudrycki K.E., Newman P.R. y Shull G.E. (1990) cDNA cloning and tissue distribution of mRNAs for two proteins that are related to the band 3 Cl/HCO₃ exchanger. *J. Biol. Chem.* 265: 462-471.
- Kulanthaivel P.L., Furesz T.C., Moe A.J., Smith C.H., Mahesh V.B., Leibach F.H. y Ganapathy V. (1992) Human placental syncytiotrophoblast expresses two pharmacologically distinguishable types of Na⁺-H⁺ exchangers, NHE-1 in the maternal-facing (brush border) membrane and NHE-2 in the fetal-facing (basal) membrane. *Biochem. J.* 284: 33-38.
- Kurtz I. (1989) Basolateral membrane Na⁺/H⁺ antiporter, Na⁺/base cotransport and Na⁺-independent Cl⁻/base exchange in the rabbit S3 proximal tubule. *J. Clin. Invest.* 83: 616-622.
- Kurtz I. y Golchini K. (1987) Na⁺-independent Cl⁻/HCO₃⁻ exchange in Madin-Darby canine kidney cells. Role in intracellular pH regulation. *J. Biol. Chem.* 262,4516-4520.
- Kuwahara M., Sasaki S. y Marumo F. (1991) Cl-HCO₃ exchange and Na-HCO₃ symport in rabbit outer medullary collecting duct cells. *Am. J. Physiol.* 260: F635- F642.

- L'Allemain G., Franchi A., Cragoe E.Jr. y Pouysségur (1984) Blockade off the $\text{Na}^+\text{-H}^+$ antiport abolishes growth factor-induced DNA synthesis in fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 259: 4313-4319.
- L'Allemain G., Paris S. y Pouyssegur J. (1985) Role of a Na^+ -dependent $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange in regulation of intracellular pH in fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 260: 4877-4883.
- Lauf P. K., McManus T. J., Haas M. y Forbush B. (1987) Physiology and biophysics of chloride and cation cotransport across cell membranes. *Fed. Proc.*, 46: 2377-2394.
- Levine, S.A., Montrose, M.H., Tse, C.M. y Donowitz, M. (1993) Kinetics and regulation of three cloned mammalian Na^+/H^+ exchangers stably expressed in a fibroblast cell line. *J. Biol. Chem.* 268: 25527-25535.
- Lieberman D.M. y Reitmeier R.A.F. (1988) Localization of the carboxyl terminus of band 3 to the cytoplasmic side of the erytrocite membrane using antibodies raised against a syntetic peptide. *J. BIOL. Chem.* 263: 10022-10028.
- Liedtke C.M. (1989) Regulation of Chloride transport in epithelial. *Ann. Rev. Physiol.* 51: 143-160.
- Liedtke C.M. y Hopfer U. (1982a) Mechanism of Cl^- translocation across small intestinal brush-border membrane I. Absence of $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ cotransport. *Am. J. Physiol.* 242, G 263-G 271

- Liedtke C.M. y Hopfer U. (1982b) Mechanism of Cl^- translocation across small intestinal brush-border membrane II. Demonstration of Cl^- - OH^- exchange and Cl^- conductance. *Am. J. Physiol.* 242, G 272-G 280.
- Lindsey A.E., Schneider K., Simmons D.M., Baron R., Lee B.S. y Kopito R.R. (1990) Functional expression and subcellular localization of an anion exchanger cloned from choroid plexus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 5278-5282.
- Livne A., Grinstein S. y Rothstein A. (1987): Volume-regulating behavior of human platelets. *J. Cell. Physiol.*, 131:354-363.
- Lorentzon P., Eklundh B., Brandstrom A. y Walmark B. (1985) The mechanism for inhibition of gastric (H+K)-ATPase by omeprazole. *Biochim. Biophys. Acta* 817: 25-32.
- Low P.S., Willardson B.M., Thevenin B., Kannan R. y Mehler E. (1989) The other functions of erythrocyte membrane band 3. En "Anion Transport Protein of the Red Blood Cell Membrane". (N. Hamasaki y M.L. Jennings, eds.), Amsterdam: Elsevier, pp. 103-108.
- Ludt J., Tønnensen T.I., Sandvig K. y Olnes S. (1991) Evidence for Involvement of Protein Kinase C in Regulation of Intracellular pH by $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Antiport. *J. Membrane. Biol.* 119: 179-186.
- MacLennan D.H., Brandl C.J., Korczak B. y Green N.M. (1985) Amino acid sequence of a Ca-Mg-dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. *Nature* 316: 696-700.

- Madshus I.H. (1988) Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells. *Biochem. J.* 250: 1-8.
- Madshus I.H. y Olsnes S. (1987) Selective inhibition of sodium-linked and sodium -independent bicarbonate/chloride antiport in Vero cells. *J. Biol. Chem.* 262,7486-7491.
- Maeda M., Isshizaki J. y Futai M. (1988) cDNA cloning and sequence determination of pig gastric H,K-ATPase. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 157: 203-209.
- McCabe R. y Smith P. (1985) Colonic potassium and cchloride secretion: Role of AMPc and calcium. *Am. J. Physiol.* 248: G103-G109.
- Mellman I., Fuchs R. y Helenius A. (1986) Acidification of the endocytotic and exocytotic pathways. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 663-700.
- Mendlein J. y Sachs G. (1990) Interaction of a K⁺ competitive inhibitor, a substituted imidazol [1,2 α] pyridine, with phospho and dephosphoenzyme forms of H⁺/K⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* 265: 20823-20826.
- Mercer R. W. y J. F. Hoffman. (1985) Bumetanida sensitive Na/K cotransport in ferret red blood cells (Abstract) *Byophys. J.* 47: 157a.
- Montero M.C. e Ilundáin A. (1989) Effects of anisosmotic buffers on K⁺ transport in isolated chicken enterocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 979: 269-271.
- Montrose M., Randles J. y Kimmich G.A. (1987) SITS-sensitive Cl⁻ conductance in chick intestinal cells. *Am. J. Physiol* 258:F 371-F381.

- Mueckler M., Caruso C., Baldwin S.A., Panico M., Blench I., Morris H.R., Allard W.J., Lienhard G.E. y Lodish H.F. (1985) Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* 229, 941-945.
- Mugharbil A., Knickelbein R.G., Aronson P.S. y Dobbins J.W. (1990) Rabbit ileal brush-border membrane Cl-HCO₃ exchanger is activated by an internal pH-sensitive modifier site. *Am. J. Physiol.* 259: G666-G670.
- Murer H. y Hopfer U. (1974) Demonstration of electrogenic Na⁺-dependent D-glucose transport in intestinal brush border membranes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71: 484-488.
- Murer H., Hopfer U. y Kinne R. (1976) Sodium/proton antiport in brush-border membrane vesicles isolated from rat small intestine and kidney. *Biochem. J.* 154: 597-604.
- Musch M.W., Bookstein C., Arvans D.L., Cragoe E.J.Jr., Rao M.C. y Chang E.B. (1992) Characterization of chicken intestinal brush border membrane Na/H exchange. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 103A, No. 3: 439-444.
- Nakhoul N.L., Chen L.K. y Boron W.F. (1990) Intracellular pH regulation in rabbit S₃ proximal tubule: basolateral Cl⁻/HCO₃⁻ exchange and Na⁺/HCO₃ cotransport. *Am. J. Physiol.* 258: F371-F381.
- Nelson N. (1992) Evolution of organellar proton-ATPases. *Biochim. Biophys. Acta* 1100: 109-124.

- Olsnes S., Ludt J., Tønnessen T.I. y Sandvig K. (1987). Bicarbonate/Chloride antiport in Vero cells: II Mechanisms for bicarbonate-dependent regulation of intracellular pH. *J. Cell. Physiol* 132: 192-202.
- Olsnes S., Tønnessen T.I. y Sandvig K. (1986) pH-regulated anion antiport in nucleated mammalian cells. *J. Cell Biol.* 102,967-971
- Orlowski J. (1993) Heterologous expression and functional properties of amiloride high affinity (NHE-1) and low affinity (NHE-3) isoforms of the rat Na/H exchanger. *J. Biol. Chem.* 268: 16369-16377.
- Orlowski J., Kandasami R.A. y Shull G.E. (1992) Molecular cloning of putative members of the Na/H Exchanger gene family. *J. Biol. Chem.* 267: 9331-9339.
- Orsenigo M.N., Tosco M. y Faelli A. (1991) Cl/HCO₃ exchange in the basolateral membrane domain of rat jejunal enterocytes. *J. Membr. Biol.* 124: 13-19.
- Orsenigo M.N., Tosco M. y Faelli A. (1992) Basolateral Cl/HCO₃ exchange in rat jejunum: evidence from H¹⁴HCO₃⁻ uptake in membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1108: 140-144.
- Parker J.C. (1983) Volumen-responsive sodium movements in dog red cells. *Am. J. Physiol.* 244: C324-C330.
- Parker J.C. (1993) In defense of cell volumen ?. *Am. J. Physiol.* 265: C1191-C1200.

- Pedersen P.L. y Carafoli E. (1989) Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function. *Trends Biochem. Sci.* 12: 146-150.
- Peña-Rasgado C., McGruder K.D., Summers J.C. y Rasgado-Flores H. (1994) Effect of isosmotic removal of extracellular Ca^{2+} and of membrane potencial on cell volume in muscle cells. *Am. J. Physiol.* 267: C768-C775.
- Peterson G.L. (1978) A simplified method for analisis of inorganic phosphate in the presence of interfering substances. *Anal. Biochim.* 84: 164-172.
- Planelles G., Anagnostopoulos T., Cheval L. y Doucet A. (1991) Biochemical and functional characterization of $\text{H}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ in distal amphibian nephron. *Am. J. Physiol.* 260: F806-F812.
- Podestra R.B. y Mettrick D.F. (1977) HCO_3^- and H^+ secretion in rat ileum in vivo. *Am. J. Physiol.* 232: E574-E579.
- Podestra R.B. y Mettrick D.F. (1977) HCO_3^- transport in rat jejunum: Relation- ship to NaCl and H_2O transport in vivo. *Am. J. Physiol.* 232: E62-E68.
- Preisig P.A. y Alpern R.J. (1988) Chronic metabolic acidosis causes an adaptation in the apical membrane Na/H antiport and basolateral membrane $\text{Na}(\text{HCO}_3)_3$ symport in the rat proximal convoluted tubule. *J. Clin. Invest.* 82: 1445-1453.

- Preisig P.A., Hays S.R. y Alpern R.J. (1990) Basolateral membrane H/OH/HCO₃ transport mechanisms along the nephron: Role in control of pH_i and transepithelial bicarbonate transport. *Seminars in Nephrology* 10: 104-114.
- Rabon E., Gunther R. D., Soumarmon A., Bassilian S., Lewin M. y Sachs G. (1985) Solubilization and reconstitution of the gastric H,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 260: 10200-10207.
- Rajendran M. V. y Binder H. (1994) Differential modulation of Na-HCO₃ cotransport and Na-H exchange by pH in basolateral membrane vesicles of rat distal colon. *J. Biol. Chem.* 269: 156-160.
- Rajendran M. V., Oesterlin M. y Binder H. (1991) Sodium uptake across basolateral membrane of rat distal colon. Evidence for Na⁺-H⁺ exchange and Na⁺-anion cotransport. *J. Clin. Invest.* 88: 1379-1385.
- Rajendran M.V. y Binder H.J. (1990) Characterization of Na⁺-H⁺ exchange in apical membrane vesicles of rat colon. *J. Biological Chemistry* 265: 8408-8414.
- Ray T.J. y Forte J.G.(1976) Studies on the phosphorylated intermediates of a K-stimulated ATPase from gastric mucosa. *Biochim. Biophys. Acta* 443: 451-467.
- Reilly R.F., Hildebrandt D., Biemesderfer D., Sardet C., Pouyssegur J., Aronson P.S., Slayman C.W. y Igarashi P. (1991) cDNA cloning and immunolocalization of a Na⁺-H⁺ exchanger in LLC-PK₁ renal epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 261: F1088-F1094.

- Reitnertsen K.V., Tønnessen T.I., Jacobsen J., Sandvig K. y Olsnes S. (1988) Role of Chloride/bicarbonate antiport in the control of cytosolic pH. Cell-line differences in activity and regulation of antiport. *J. Biol. Chem.* 263: 11117-11125.
- Reuss L. (1987) Cyclic AMP Inhibits Cl⁻/HCO₃⁻ Exchanger at the apical Membrane of *Necturus* Gallbladder Epithelium. *J. Gen. Physiol.* 90: 173-196.
- Roos, A. y Boron, W.F.(1981). Intracellular pH. *Physiol. Rev.* 61, 296-434.
- Rugolo M., Mastrocola T., Flamigni A. y Lenaz G. (1989) Chloride transport in human fibroblasts is activated by hipotonic shock. *Boichem. Biophys. Res. Commun.*, 154:719-726.
- Ruiz O.S. y Arruda J.A.L. (1990a) Modulation of renal Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter by protein kinasas A y C. *Kidney. Int.* 37: 544A.
- Ruiz O.S. y Arruda J.A.L. (1990b) Messenger RNA induced expression of the renal Na-HCO₃ cotransporter in frog oocytes. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1: 51P.
- Sachs G., Chang H.H., Rabon E., Schackmann R., Lewin M. y Saccomani G. (1976) A nonelectrogenic H pump in plasma membranes of hog stomach. *J. Biol. Chem.* 251: 7690-7698.
- Sardet C., Franchi A. y Pouyssegur J. (1989) Molecular cloning, primary structure and expression of the human growth factor-activatable Na⁺/H⁺ antiporter. *Cell* 56: 271-280.

- Sarkadi B. y Parker J.C. (1991) Activation of ion transport pathways by changes in cell volume. *Biochim. Biophys. Acta.* 1071: 407-427.
- Sasaki S., Shiigai T. y Takeuchi J. (1985) Intracellular pH in the isolated perfused rabbit proximal straight tubule. *Am. J. Physiol.* 249: F417-F423.
- Scott C.K. y Sundell E. (1985) Inhibition of H,K-ATPase by SCH 28080 and SCH 32651. *Eur. J. Pharmacol.* 112: 268-270.
- Schmitz R., Preiser H., Maestracci D., Ghosh B.K. Cerda J.J. y Crane R.K. (1973) Purification of human intestinal brush border membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 323: 98-112.
- Schuster V.L. (1993) Function and regulation of collecting duct intercalated cells. *Ann. Rev. Physiol.* 55: 267-288.
- Schuster V.L. y Stokes J.B. (1987) Chloride transport by the cortical outer medullary collecting duct. *Am. J. Physiol.* 253: F203-F212.
- Schuster V.L., Bonsib S.M. y Jennings M.L. (1986) Two types of collecting duct mitochondria-rich (intercalated) cells: lectin and band 3 cytochemistry. *Am. J. Physiol.* 251: C347-C355.
- Seifter J.L. y Aronson P.S. (1984) Cl transport via anion exchange in *Necturus* renal microvillus membranes. *Am. J. Physiol.* 247: F888-F895.
- Seki G. y Frömter E. (1990) The chloride/base exchanger in the basolateral cell membrane of rabbit renal proximal tubule S3 segment requires bicarbonate to operate. *Pflügers. Arch.* 417: 37-41.

- Selvaggio A.M., Schwartz J.H., Bengel H.H. y Alexander E.A. (1986) Kinetics of the Na^+ - H^+ antiporter as assessed by the change in intracellular pH in MDCK cells. *Am. J. Physiol.* 251: C558-C562.
- Sellin J. y DeSoigne R. (1984) Rabbit proximal colon: a distinct transport epithelium. *Am. J. Physiol.* 246: G603-G610.
- Sellin J. y DeSoigne R. (1987) Ion transport in human colon *in vitro*. *Gastroenterology* 93: 441-448.
- Sellin J.H. y Duffey M.E. (1990) Mechanisms of intestinal chloride absorption. En "Textbook of secretory Diarrhea" (E. Lebenthal y M. Duffey, eds.), Raven Press, Ltd., New York, pp. 81-93.
- Semenza G., Kessler G., Hosang M., Weber y Schmidt U. (1984) Biochemistry of the Na^+ -glucose cotransport of the small intestinal brush border membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 779: 343-379.
- Shennan D.B., Davis B. y Boyd C.A.R. (1986) Chloride transport in human placental microvillus membrane vesicles. I. Evidence for anion exchange. *Pflügers Arch.* 406: 60-64.
- Shirazi-Beechey S. P., Gorvel J.P. y Beechey R. B. (1988) Phosphate transport in intestinal brush-border membrane. *J. Bioenerg. Biomemb.* 20: 273-288.
- Shull G.E. y Lingrel J.B. (1986) Molecular cloning of the rat stomach (H + K)-ATPase. *J. Biol. Chem.* 16788-16791.

- Simson J.N.L., Merhav A. y Silen W. (1981) Alkaline secretion by amphibian duodenum. I. General characteristics. *Am. J. Physiol.* 240: G472-G479.
- Soleimani M., Bizal G.L., McKinney T.D. y Hattabaugh Y.J. (1992) Effect of in vitro metabolic acidosis on luminal Na^+/H^+ exchange and basolateral $\text{Na}^+:\text{HCO}_3^-$ cotransport in rabbit kidney proximal tubules. *J. Clin. Invest.* 90: 211-218.
- Soleimani M., Bookstein C., Bizal G.L., Musch M.W., Hattabaugh Y.J. Rao M.C. y Chang E.B. (1994a) Localization of the Na^+/H^+ exchanger isoform NHE-3 in rabbit and canine Kidney. *Biochim. Biophys. Acta.* 1195: 89-95.
- Soleimani M., Grassl S.M. y Aronson P.S. (1987) Stoichiometry of $\text{Na}^+:\text{HCO}_3^-$ cotransport in basolateral membrane vesicles isolated from rabbit renal cortex. *J. Clin. Invest.* 79: 1276-1280.
- Soleimani M., Gurinder S., Bizal G. L., Gullans S.R. y McAteer J.A. (1994b) $\text{Na}^+:\text{H}^+$ exchanger isoforms NHE-2 and NHE-1 in inner medulary collecting duct cells. *J. Biol. Chem.* 269: 27973-27978.
- Soleimani M., Hattabaugh Y.J. y Bizal G.L. (1994c) Acute regulation of Na^+/H^+ exchange, $\text{Na}^+:\text{HCO}_3^-$ cotransport, and Cl^- base exchange in acid base disorders. *J. Lab. Clin. Med.* 124, N°1: 69-78.
- Soleimani M., Lesoine G.A. Bergman J.A. y Aronson P.S. (1991) Cation specificity and modes of the $\text{Na}:\text{CO}_3:\text{HCO}_3$ cotransporter in renal basolateral membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 266: 8706-8710.

- Spring K. R. y Hoffmann E. K. (1992) Cellular Volume Control. Chapter 6. The Kidney: Physiology and Pathophysiology, Second Edition.
- Srere, P (1969) Citrate Synthase. Methods in Enzimology 13: 3-11.
- Stevens B.R., Fernandez A., Hirayama B., Wright E.M. y Kempner E.S. (1990) Intestinal brush-border membrane Na⁺/glucose cotransporter functions *in situ* as a homotetramer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 1456-1460.
- Stone D.K., Xie X.-S., Wu L.-T. y Racker E. (1989) Proton translocating ATPases of clathrin coated vesicles, renal medulla and Ehrlich. En: Hydrogen Ion Transport in Epithelia (J. Forte y F.C. Rector, eds) New York: Wiley.
- Sundaram U., Knickelbein R.G. y Dobbins J.W. (1991) pH regulation in ileum: Na⁺-H⁺ and Cl⁻-HCO₃⁻ exchange in isolated crypt and villus cells. Am. J. Physiol. 260: G440-G449.
- Stuart-Tilley A., Sardet C., Pouyssegur J., Schwartz M.A., Brown D. y Alpern S.L. (1994) Immunolocalization of anion exchanger AE2 and cation exchanger NHE-1 in distinct adjacent cells of gastric mucosa. Am. J. Physiol. 266: C568-C599.
- Suzuki Y. y Kaneko K. (1989) Ouabain-sensitive H⁺-K⁺ exchange mechanism in the apical membrane of guinea pig colon. Am. J. Physiol. 256: G979-G988.

- Swallow C.J., Grinstein S. y Rotstein O.D. (1990) A vacuolar type H⁺-ATPase regulates cytoplasmic pH in murine macrophages. *J. Biol. Chem.* 265: 7645-7654.
- Takeguchi M., Asano S., Tabuchi Y. y Takeguchi N. (1990) The presence of (H⁺-K⁺)-ATPase in the crypt of rabbit distal colon demonstrated with monoclonal antibodies against gastric (H⁺-K⁺)-ATPase. *Gastroenterology* 99: 1339-1346.
- Tanner M.J.A., Martin P.G. y High S. (1988) The complete amino acid sequence of the human erythrocyte membrane anion transport protein deduced from the cDNA sequence. *Biochem. J.* 256: 703-712.
- Teleky B., Hamilto G., Cosentini E., Bischof G., Riegler M., Koperna T. F. W., Schiessel R. y Etienne W. (1994) Intracellular pH regulation of human colonic crypt cells. *Pflügers. Arch.* 426: 267-275.
- Thorens B. (1993) Facilitated glucose transporters in epithelial cells. *Annu. Rev. Physiol.* 55, 591-608.
- Thorens B., Cheng Z.-Q., Brown D. y Lodish H.F. (1990) Liver glucose transporter: a basolateral protein in hepatocytes and intestine and kidney epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 259, C279-C285.
- Tønnessen T.I., Ludt J., Sandvig K. y Olsnes S. (1987) Bicarbonate/chloride antiport in Vero cells: I Evidence for both sodium-linked and sodium-independent exchange. *J. Cell Physiol.* 132: 183-191.

- Tønnessen T.I., Sandvig K. y Olsnes S. (1990) Role of Na^+ - H^+ and $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ antiports in the regulation of cytosolic pH near neutrality. *Am. J. Physiol.* 258: C1117-C1126.
- Tse C.-M., Brant S.R., Walker M.S., Pouyssegur J. y Donowitz M. (1992) Cloning and sequencing of rabbit cDNA encoding an intestinal and kidney-specific Na^+ - H^+ exchanger isoform (NHE3). *J. Biol. Chem.* 267: 9340-9346.
- Tse C.-M., Levine S.A., Yun C.H.C., Montrose M.H., Little P.J., Pouyssegur J. y Donowitz M. (1993) Cloning and expression of a rabbit cDNA encoding a serum-activated ethylisopropilamiloride-resistant epithelial Na^+ - H^+ exchanger isoform (NHE2). *J. Biol. Chem.* 268: 11917-11924.
- Tse C.M., Ma A.I., Yang V.W., Watson A.J.M., Levine S., Montrose M.H., Potter J., Sardet C., Pouyssegur J. y Donowitz M. (1991a) Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the rabbit ileal villus cell basolateral membrane Na^+ - H^+ exchanger. *EMBO J.* 10: 1957-1967.
- Tse C.M., Watson A.J.M., Ma A.I., Pouyssegur J. y Donowitz M. (1991b) Cloning and functional expression of a second novel rabbit ileal villus epithelial cell Na^+ - H^+ exchanger (NHE2) (Abstract). *Gastroenterology* 100: 258.
- Turrini F., Sabolic I., Zimoto Z., Moewes B. y Burckhardt G. (1989) Relation of ATPases in rat renal brush-border membranes to ATP-driven H^+ secretion. *J. Membr. Biol.* 107: 1-12.

- Umbach J.A., Coady M.J. y Wright E.M. (1990) Intestinal Na⁺/glucose cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes is electrogenic. *Biophys. J.*, 57, 1217-1224.
- Ussing H. (1986) Epithelial cell volume regulation illustrated by experiments in frog skin. *Renal Physiol.* 9: 38-46.
- Väänänen H.K., Karhukorpi E.-K., Sundquist K., Wallmark B., Roinen I., Hentunen T., Tuukkanen J. y Lakkakorpi P. (1990) Evidence for the presence of a proton pump of the vacuolar H⁺-ATPase type in the ruffled borders of osteoclasts. *J. Cell Biol.* 111: 1305-1311.
- Vaandrager A.B. y De Jonge H.R. (1988) A sensitive technique for the determination of anion exchange activities in brush-border membrane vesicles. Evidence for two exchangers with different affinities for HCO₃⁻ and SITS in rat intestinal epithelium. *Biochim. Biophys. Acta.* 939: 305-314.
- Van Adelsberg J. y Al-Awqati Q. (1986) Regulation of cell pH and Ca²⁺-mediated exocytotic insertion of H⁺-ATPases. *J. Cell Biol.* 102: 1638-1645.
- Vasseur M., Caüzac M. y Alvarado F. (1989) Electroneutral, HCO₃⁻-independent, pH gradient-dependent uphill transpor of Cl⁻ by ileal brush-border membrane vesicles. *Biochem. J.* 263: 775-784.
- Vaughan-Jones R.D. y Wu M.L. (1990) Extracellular H⁺ inactivation of Na⁺-H⁺ exchange in the sheep cardiac Purkinje fibre. *J. Physiol.* 428: 441-466.

- Vazquez C.M., Wood I.S., Dyer J., Planas J.M., Ilundáin A. y Shirazi-Beechey S.P. (1993) Regulation of sugar transport in chicken enterocytes. *Biochim. Soc. Trans.* 21: 479S.
- Vázquez M. (1994) Nuevos procedimientos para la exploración funcional del intercambiador aniónico 2 (AE2). Tesis Doctoral. Universidad de Navarra.
- Verlander J.W., Madsen K.M., Allen D.P., Low P.S. y Tisher C.C. (1988) Immunocytochemical localization of band 3 protein in the rat collecting duct. *Am. J. Physiol.* 255: F115-F125.
- Vigne P., Breittmayer J.P., Frelin C., y Lazdunski M. (1988) Dual control of the intracellular pH in aortic smooth muscle cells by a cAMP-sensitive $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ antiporter and a protein kinase C-sensitive Na^+/H^+ antiporter. *J. Biol. Chem.* 263: 18023-18029.
- Vigne P., Frelin C., Cragoe E.J. y Lazdunski M. (1983) Ethylisopropylamiloride: a new and highly potent derivative of amiloride for the inhibition of the Na^+/H^+ exchange system in various cell types. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 116: 86-90.
- Vigne P., Frelin C. y Lazdunski M. (1982) The amiloride sensitive Na^+/H^+ exchange system in skeletal muscle cells in culture. *J. Biol. Chem.* 257: 9394-9400.
- Wagner S., Vogel R., Lietzke R., Koob R. y Drenckhahn D. (1987) Immunochemical characterization of a band 3-like anion exchanger in collecting duct of human kidney. *Am. J. Physiol.* 253: F213-F221.

- Wakabayashi S., Bertrand B., Shigekawa M., Fafournoux P. y Poussegur J. (1994) Growth factor activation and "H-sensing" of the Na⁺-H⁺ exchanger isoform 1 (NHE-1). *J. Biol. Chem.* 269: 5583-5587.
- Wakabayashi S., Fafournoux P., Sardet C. y Poussegur J. (1992) The Na⁺-H⁺ antiporter cytoplasmic domain mediates growth factor signals and controls "H-sensing". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2424-2428.
- Wallmark B., Briving C., Fryklund J., Munson K., Jackson R., Mendlein J., Rabon E. y Sachs G. (1987) Inhibition of gastric H⁺,K⁺-ATPase and acid secretion by SCH 28080, a substituted pyridyl (1,2 a) imidazole. *J. Biol. Chem.* 262: 2077-2084.
- Wallmark B., Jaresten B.M., Larsson H., Ryberg B., Brandstrom A. y Fellenius E. (1983) Differentiation among inhibitory actions of omeprazole, cimetidine, and, SCN⁻ on gastric acid secretion. *Am. J. Physiol.* 245: G64-G71.
- Wang Z., Orloski J. y Shull G.E. (1993) Primary structure and functional expression of a novel gastrointestinal isoform of the rat Na/H exchanger. *J. Biol. Chem.* 268: 11925-11928.
- Watanabe T., Suzuki T. y Suzuki Y. (1989) Ouabain-sensitive K⁺-ATAPase in epithelial cells from guinea pig distal colon. *Am. J. Physiol.* 256: G979-988.
- Weinman E.J., Hanley R., Morell G., Yuan N., Steeplock D., Bui G. y Shenilokar S. (1992) Regulation of the renal Na⁺-H⁺ exchanger by

calcium calmodulin-dependent multifunctional protein Kinase II. *Miner Electrolyte Metab.* 18: 35-39.

Weinman E.J., Shenolikar S. y Kahn A.M. (1987) cAMP-associated inhibition of Na^+ - H^+ exchanger in rabbit kidney brush-border membranes. *Am. J. Physiol.* 252/21: F19-F25.

Weinmam E.J., Dubinsky W.P. y Shenolikar S. (1988a) Reconstitution of cAMP-dependent protein kinase regulated renal Na^+ - H^+ exchanger. *J. Membr. Biol.* 101:11-18.

Weinmam E.J., Dubinsky W.P., Fischer K., Steplock D., Dinh Q., Chang L. y Shenolikar S. (1988b) Regulation of reconstituted renal Na^+ - H^+ exchanger by calcium dependent protein kinases. *J. Membr. Biol.* 103: 237-244.

Wenzl E., Sjaastad M.D., Weintraub W.H. y Machen T.E. (1989) Intracellular pH regulation in IEC-6 cells, a cryptlike intestinal cell line. *Am. J. Physiol.* 257: G732-G740.

Wills N.K., Alles W.P., Sandle G.I. y Binder H.J. (1984) Apical membrane properties and amiloride binding kinetics of the human descending colon. *Am J. Physiol.* 247: G749-G757.

Wingo C.S. (1989) Active proton secretion and potassium absorption in the rabbit outer medullary collecting duct. Functional evidence for proton-potassium-activated adenosine triphosphatase. *J. Clin. Invest.* 84: 361-365.

Wright E.M. (1989) Intestinal sugar transport. In *Textbook of Secretory Diarrhea*, ed. E. Lebenthal and M. Duffey. Raven Press, LTD., New York, pp 119-124.

Wright E.M. (1993) The intestinal Na⁺/glucose cotransporter. *Annu. Rev. Physiol.* 55: 575-589.

Wright E.M., Turk E., Zabel B., Mundlos S, y Dyer J. (1991) Molecular genetics of glucose transport. *J. Clin. Invest.* 88, 1435-1440.

Yun C.H., Tse C.M., Nath S., Levine S.L. y Donowitz M. (1995) Structure/function studies of mammalian Na-H exchangers-an update. *J. Physiol.* 482P: 1S-6S.

Reunido el Tribunal Integrado Provincial de Exámenes de Bachillerato en el día de la fecha, para juzgar a la Srta. D.ª M.ª Mercedes Cano Rodríguez titulada Intercambiador iónicos en enterocitos de pollo acordó otorgarle la calificación de Apt con laude

Sevilla, 19 de Julio 1995

El Vocal,

El Presidente

Juan Gómez

El Vocal,

El Secretario,

N.ª Luisa Celoye

El Vocal,

El Doctorado,