

Las membranas celulares. Los canales iónicos y nefrología molecular

Dres. Alberto Roseto, Horacio A. Repetto y Ramón Exeni

PARTE A

INTRODUCCIÓN

Todas las células de los procariontes y de los eucariontes están separadas de su medio externo por una membrana celular (MC). En realidad, cada organela intracelular también tiene su MC, a la que llamaremos y nombraremos específicamente.

En el capítulo de apoptosis, vimos que la primera célula tuvo como actor principal a la MC –fosfolípida– que encerró su material génico y lo aisló del medio, convirtiéndose así en un elemento fundamental en la evolución. En la actualidad, la MC (así como todas las MCs de las estructuras interiores de la célula) está compuesta por una doble lámina de fosfolípidos y proteínas. La presencia en cantidad y calidad de estas dos clases de moléculas establece la diferencia de fenotipos de todos los tipos celulares de la naturaleza y son fundamentales en las diferencias morfológicas y funcionales de las organelas de la célula. Los dos papeles principales que cumple la MC son: 1) aislar el citoplasma del medio exterior, dejando pasar los iones y moléculas que necesita la célula, manteniendo las constantes de pH, osmolaridad y temperatura adecuadas y 2) establecer todas las relaciones moleculares con otras células, con la matriz extracelular y con el medio ambiente en general.

Las dos láminas están constituidas, fundamentalmente, por 5 fosfolípidos, glucolípidos, colesterol y proteínas.

Estos constituyentes se distribuyen proporcionalmente en forma diferente en las láminas externa (LE) e interna (LI). Los 5 fosfolípidos (fosfatidiletanolamina [FE] y fosfatidilserina [FS] están principalmente en la LI; fosfatidilinositol [FI] sólo se encuentra en la LI y esfingomielina [EM] y fosfatidilcolina [FC] están principalmen-

te en la LE). Junto con los glucolípidos (por ejemplo, el glucoesfingolípido [GEL]) de la LE, constituyen el 50% de los lípidos de la MC.

El resto de los lípidos de la MC son el colesterol y los glucolípidos. El colesterol se distribuye por igual en ambas láminas de la MC (casi el 90% del colesterol se encuentra en la MC) de todas las células animales. Por el contrario, las MC de los hongos, bacterias, algas y plantas carecen de él.

Aunque las funciones principales de los lípidos serían fundamentalmente estructurales, su participación es capital para garantizar cierto número de propiedades fisiológicas esenciales de las MC. Es por eso, sin duda, que la naturaleza presenta tal variedad de lípidos que, modificados cuantitativamente según las circunstancias fisiológicas, ambientales y el tipo de membrana, permiten la adaptación de los organismos vivientes.

En las células animales, los lípidos predominantes en la estructura de las MC son los fosfolípidos, el colesterol y sus ésteres (como se mencionó anteriormente, el colesterol es exclusivo de la célula animal, y varía de un fenotipo celular al otro). El colesterol representa el 30% de los lípidos en la MC de las células hepáticas y el 25% en la de los eritrocitos. En las células animales, como en las bacterias, las membranas internas de las mitocondrias no contienen colesterol (véase Orígenes de la mitocondria, en el artículo de Apoptosis, Arch.argent.pediatr. 1999; [3]).

1) La característica común a las MC de todos los seres vivientes es la difusión del agua y de las moléculas solubles en ella según un coeficiente de permeabilidad. En general, las pequeñas moléculas no cargadas eléctricamente (no

iónicas) como H_2O , N_2 , O_2 , CO_2 , etanol, glicerol y los esteroides difunden bien a través de las dos láminas de la MC. Las pequeñas moléculas ionizadas como H^+ , Na^+ , Ca^{++} , Cl^- , glucosa y todos los aminoácidos, no difunden porque al estar cargadas eléctricamente están rodeadas de moléculas de H_2O que deben liberar para atravesar la parte hidrófoba de la MC (en realidad, en una MC constituida únicamente de lípidos sin proteínas –membrana artificial– estos iones tienen coeficientes de difusión muy bajos y diferentes, pero no nulos). A pesar de su polaridad el agua difunde debido a su pequeño tamaño (18 D) y su elevada concentración (>55 M) de cada lado de la MC. Sin embargo, la velocidad de difusión sería muy lenta para las células que necesitan intercambiar mucha agua con el exterior, como las de los epitelios renal e intestinal, los eritrocitos o las células vegetales de los estromas (en las hojas) y de las raíces. Los seres vivos compensaron la escasa difusión del agua y de otros componentes polares e ionizados con la presencia de canales proteicos llamados acuaporinas (por “agua”), canales iónicos específicos para cada una de esas moléculas (también llamados porinas en la MC externa de las bacterias) y con proteínas que trabajan como transportadoras o facilitadoras de la difusión en todas las MC.

- 2) La otra propiedad fundamental de las MC es el establecimiento de contactos con otras células, el medio extracelular y el mundo exterior en general a través de sus moléculas proteicas (esencialmente proteínas, glucoproteínas y proteínas GPI). En los últimos años se ha aceptado una nueva visión de la estructura de las MC. En efecto, en el modelo del “mosaico fluido” (modelo de Nicholson), la MC es una estructura bilaminar, con una distribución aleatoria de sus componentes –lípidos y proteínas– sin que formen ninguna estructura diferente en el plano transversal o lateral. El nuevo panorama muestra que los lípidos están altamente ordenados y que son capaces de soportar curvaturas, variaciones en el espesor de una o ambas láminas, transformaciones de forma y una tendencia a formar fases “no laminares”. Estas variaciones de forma son las que sufren, por ejemplo, los linfocitos cuando atraviesan un capilar o los seudópodos de los macrófagos cuando migran o engullen una bacteria. Esta nueva visión de la MC se representaría en realidad como un “mapamundi” donde la estructura del modelo anterior representa un océano (megadominios), y los lípidos, balsas (*rafts*). Dentro de esos megadominios o estructuras *super lettices*, que no

cubren toda la MC, están los microdomios no aleatorios, de conformación bilipídica heterogénea “balsas lipídicas” (*rafts lipídicos*), cavéolas y la configuración no bicapa (o no laminar) (*Gráfico 3*).

Las funciones de las proteínas membranas

Enumeraremos los principales grupos de proteínas de las MC conocidas hasta la fecha, y sus principales funciones fisiológicas. En cada Gráfico les daremos un símbolo iconográfico, con la representación gráfica de su verdadera estructura molecular. Cada uno de estos grupos participa de una vía de transducción intracelular. En el capítulo de Señalización veremos globalmente cómo están constituidas las vías, aquí sólo mostraremos los primeros mensajeros (ligandos) solubles membrenarios y extramembrenarios (de la MC o de otras células), los receptores y los segundos mensajeros (como el Ca^{++}), en algunos casos. Finalmente, remitimos el lector al glosario y al capítulo donde se detallarán estas proteínas, junto con las patologías que pueden provocar .

A.

Los canales iónicos (CI) permiten el pasaje selectivo de iones como Na^+ , Ca^{++} , K^+ y Cl^- . Funcionan en dos conformaciones estructurales de “todo o nada”, es decir, abiertas o cerradas, sin gasto de energía o utilización del ATP. Estas proteínas son comandadas por moléculas de: 1) otras células, como la acetilcolina en la sinapsis nerviosa; 2) por la diferencia de potencial eléctrico entre las dos fases de la MC en las células nerviosas y musculares (en las uniones neuromusculares) o 3) por simple intercambio electrosmótico en las células en general. Ya se conoce la estructura aminoacídica de más de una centena de CI. Recientemente se cristalizó el primer CI, el del K^+ , en la bacteria *Streptomyces lividans* (KcsA).

B.

Las proteínas de transporte (PT), cuya función es hacer pasar las moléculas que no atraviesan normalmente la MC por simple difusión pasiva (DP).

- 1) En los casos más simples, están las que facilitan la difusión pasiva (DP) sin gasto de energía y con poca especificidad. Pueden permitir el pasaje de diferentes moléculas, como en el caso de las porinas o ser más específicas, como el transportador de la glucosa, las proteínas transportadoras y los canales iónicos (CI).
- 2) Existe otro grupo de proteínas que son canales iónicos que utilizan la energía desarrollada por un pasaje de iones, como el Na^+ o el K^+ , para hacer entrar (o salir) al mismo tiempo otra molécula, como la glucosa o intercambiadores

iónicos. Es también una DP, sin gasto suplementario de energía. Esto resulta fundamental para la célula para obtener y concentrar productos del exterior, así como para administrar los intercambios entre las mitocondrias y el citoplasma.

- 3) En los casos más complejos realizan un transporte activo con gasto de energía, de manera que la proteína trabaja más en un sentido que en otro. Como ejemplo de un transporte activo, se mencionan los canales iónicos que trabajan como bomba iónica (por ejemplo, $\text{ATPase Na}^+ \cdot \text{K}^+$) y las proteínas ABC. Ambas familias de proteínas utilizan el ATP como fuente de energía.

De esta manera, los seres vivos compensaron con la presencia de proteínas canaliculares y transportadoras, la escasa permeabilidad de las MC para los compuestos hidrófilos y polares. Casi como lo hace una enzima con su sustrato, estas proteínas actúan ligando específicamente un soluto y disminuyendo el umbral energético que le opone la hidrofobicidad de la MC, lo que permite su pasaje.

C.

Las moléculas adhesivas (MA), tema que ya abordamos en Arch.arg.pediatr. 1997; ④, en el que mencionamos las integrinas, las caderinas, las selectinas y las SFIg, que traducen mensajes al ligarse con moléculas de otras células o de la matriz extracelular (Gráfico 4a). En este rubro ubicaremos a las proteínas de las máculas comunicantes (*gap junction*) que, emplazadas en la pared lateral de las células, forman canales transmembranarios en el espacio entre dos células, permitiendo el intercambio de iones y de moléculas entre ellas. Las estructuras que forman se llaman conexones y las proteínas, conexinas. Nombraremos también las proteínas de adherencia especiales que forman las estructuras de las uniones: estrechas (*tight*), de la hendidura (*gap*), de los desmosomas, de la zona adherente (*zonula adherens*), de la zona ocluyente (*zonula occludens*) y otras. Estas proteínas podrían llamarse también proteínas estructurales, pero en alguna medida, todas las proteínas intrínsecas de la MC lo son, y en verdad a medida que se van descubriendo sus funciones, todas realizan alguna función específica, además de formar parte de la estructura de la MC.

D.

Los receptores específicos que forman parte de una vía de transmisión (VT) de las MC, son quizás el grupo de proteínas más extenso y el que incluye las principales moléculas que participan en el "diálogo" entre las

células entre sí, con las del mismo tejido y con otros fenotipos celulares a distancia. Se trata de hormonas, citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, receptores inmunitarios, receptores de la apoptosis (PCD), receptores nerviosos (cuyos ligandos no siempre son moléculas; pueden ser fotones en los conos y bastones de la retina u ondas sonoras en las células auditivas), criptocromos, receptores de morfogenes y receptores nucleares. En definitiva, la señal de transducción es el término común que define los más diversos tópicos que engloban los mecanismos bioquímicos que regulan la fisiología celular. Corresponden prácticamente a todos los procesos de la vida. Serán abarcados globalmente en los capítulos de las grandes vías de los mensajes biológicos.

Ehrlich, a principios de siglo, había elaborado una conceptualización del receptor cuando hablaba de las interacciones del antígeno y el anticuerpo: "la llave y la cerradura". Esto, claro está, no explicaba cómo esas señales transmitían el mensaje al interior de la célula (la VT). Un receptor es una proteína compuesta por varios dominios diferentes. Al menos uno de esos dominios debe ser específico del ligando natural. Un receptor puede interactuar con una sola vía o varias simultáneamente. A la inversa, en una cascada efectora pueden desembocar varias vías de diferentes receptores. La información que recibe el receptor al ligarse a su ligando se puede traducir por un cambio conformacional, desplazamiento, agregación, redistribución, una modificación química o una acción enzimática y efectora de la propia molécula receptora. Todos estos actos, en general, son reversibles, para que la molécula comience un nuevo ciclo. Las primeras moléculas que reciben esta transducción tienen por finalidad servir de mensajeros que van amplificando la información hasta llegar al ADN.

El gran grupo de receptores es el que participa de las VT propiamente dichas. Son cientos de ellos. Se expresan y se reprimen según sus funciones en diferentes fenotipos celulares y según el momento de la vida (desde el desarrollo del huevo hasta la vida adulta). Están o no presentes según la célula y la función que ésta cumple. Varían también en la cantidad de moléculas por cada uno de ellos (miles en general) en la superficie de la MC. Podemos subdividirlos según la manera de iniciar la VT.

Receptores de tipo I Los receptores tienen su propia actividad enzimática y su sitio catalítico está del lado citosólico; por ejemplo, el receptor de la insulina es una tirosina quinasa (RTK); el receptor del péptido natriurético auricular tiene una actividad intrínseca de guanilciclase; el receptor CD45 tiene una actividad intrínseca de tirosina fosfatasa (RTF); el receptor

TGF-beta tiene una actividad intrínseca de serina/ treonina quinasa y, finalmente, podemos incluir en esta subclase a los receptores como el de la hormona de crecimiento que, luego de dimerizarse, deben captar en el citoplasma una proteína que tiene una actividad de tirosina quinasa, puesto que ellos mismos carecen de actividad catalítica.

Receptores de tipo II. Los que al recibir su ligando, producen, por ejemplo, la entrada específica de iones K^+ o Ca^{++} y tienen una actividad intrínseca de canal iónico, como el receptor de la acetilcolina de la sinapsis o la rianodina en el retículo sarcoplásmico del músculo.

Receptores de tipo III. Los receptores con siete dominios TM que inician la VT al estar asociados a una de las proteínas, la gran superfamilia de las proteínas G (las cuales se activan al ligarse con la parte citoplasmática del receptor y luego activan al receptor adenilciclase); son los receptores dependientes de la proteína G (RCPG).

Los receptores específicos de las moléculas que intervienen en la respuesta inmunitaria. Los principales son las inmunoglobulinas membranarias de los linfocitos B que reconocen el antígeno y el receptor de la célula T (RCT) de los linfocitos T. Estas reconocen el péptido presentado por las moléculas del sistema HLA; estas mismas están presentes en la inmensa mayoría de las MC de todos los fenotipos celulares en el caso del HLA I y sólo en las células presentadoras de antígenos (CPA) en el caso del HLA II. Todo estos procesos son verdaderas VT que llegan hasta el ADN [Arch.arg.pediatr. 1998; (3) y (5)]. Los receptores de las citoquinas, las quimioquinas, verdaderas moléculas comunicadoras exclusivas del sistema inmunitario (SI) y los factores de crecimiento propios del SI, están incluidos en los tipos de receptores I, II y III mencionados en el párrafo anterior.

Los receptores de la MC de los ligandos de la apoptosis [Arch.arg.pediatr. 1999; (3)]. Las proteínas receptoras específicas de los ligandos del desarrollo embrionario, por ejemplo las proteínas Notch y la proteína receptora del factor Sonic Hedgehog (Shh) que veremos oportunamente, forman parte del mundo de la embriología molecular y la diferenciación celular.

Los receptores de los factores de crecimiento relacionados con plasminógenos (PRGF) y las semaforinas. Al igual que los factores de crecimiento morfogénicos del párrafo anterior, señalamos como diferentes los receptores PRGF, puesto que tienen un programa de acción único cuando son estimulados por sus ligandos PRG, también conocidos como factores de dispersión (*scatter factors*). En este mismo rubro ubicaremos

al conjunto de proteínas (pertenecientes a diversas familias) que actúan en el crecimiento del axón y sus conexiones específicas: efrinas, netrinas, *slit*, *Wnts*, *reelin*s, semaforinas, caderinas y protocaderinas, junto con sus receptores.

Las proteínas unidas al glicofosfatidil inositol (GPI), ancladas en la LE de la MC pertenecen a múltiples familias de proteínas que iremos nombrando según los temas y que serán reagrupadas en un gráfico en el glosario.

Las proteínas de las MC "internas", en el retículo endoplásmico (RE), el aparato de Golgi, la mitocondria, la MC nuclear, los lisosomas, los peroxisomas (véase cada capítulo de las organelas correspondientes).

Las proteínas de los procesos de óxido-reducción, como los citocromos y las deshidrogenasas flavínicas, que siempre están sobre la membrana. Una respiración implica por lo menos un citocromo que conduce una fuerza motriz de protones. Las moléculas gaseosas, como el O_2 y el CO_2 , difunden libremente a través de la MC y actúan del lado citoplasmático en las bacterias y en las membranas internas de las mitocondrias en los eucariotas.

Las enzimas ligadas a las MC, que participan de la biosíntesis de peptidoglicanos y lipopolisacáridos (LPS) en la membrana interna de las bacterias, así como las proteasas y esterases en la degradación de moléculas de otras bacterias o células eucariotas. La familia de las moléculas ADAM (por *adhesion, metalloproteinase*), como las sheddasas y convertasas, son enzimas de la MC que cumplen la función fundamental de liberar ligandos y sus receptores, modificando constantemente la "anatomía molecular" de la MC.

Las proteínas de membrana que participan de la motricidad de los flagelos y cilias, como los cuerpos basales de las bacterias flageladas y el de los espermatozoides.

Las que tienen por misión el transporte al interior de moléculas clave para el metabolismo, como las lipoproteínas de baja densidad (LDL) que llevan el colesterol, el receptor de la transferrina para incorporar el hierro, el receptor megalina y la proteína fijadora de vitamina D (DBP).

Finalmente, debemos mencionar con fines didácticos y conceptuales, el grupo de receptores de la gran superfamilia de los receptores nucleares (RN) y que, por lo tanto, no están en las MC (aunque habría receptores de estrógenos en la MC). En efecto, los receptores esteroides, de la vitamina D y la hormona tiroidea, por ejemplo, pertenecen a este grupo de proteínas nucleares que luego de recibir su ligando natural se ligan directamente al ADN, y son en sí

mismos factores de transcripción (FT).

Cabe destacar que los componentes esteroides penetran la MC por difusión simple; ellos son muy liposolubles.

Aunque "la selva tropical" que es la MC está lejos de ser completada, su extensión nos obliga a un capítulo introductorio siguiendo el orden enumerado que respetaremos en otros capítulos. A continuación veremos en detalle los principales grupos hasta ahora conocidos que hemos enumerado, dando ejemplos fisiológicos y clínico-patológicos de cada uno en especial.

PARTE B

CANALES IÓNICOS Y SUS PATOLOGÍAS (NEFROLOGÍA MOLECULAR)

Los CI forman poros estrechos (de unos pocos nM) a través de la MC y dejan pasar selectivamente pequeñas moléculas, aniones y cationes. Los CI tienen tres propiedades esenciales para cumplir estas funciones:

- I) Son muy específicos y selectivos para cada ligando; existen CI para el Na⁺, K⁺, Cl⁻, Ca⁺⁺, y para el H₂O (llamadas *aquaporinas*), aunque hay también CI no selectivos o inespecíficos.
- II) Permiten un pasaje muy rápido (hasta un millón de moléculas por segundo), casi mil veces superior a las PT.
- III) Las proteínas que forman los CI no siempre están abiertas, sino que tienen una especie de compuertas (*gates*) que regulan el pasaje en ambos sentidos por cambios conformacionales después de un estímulo biológico (*gating*). Esas compuertas se abren en función del ligando (*ligand-gated channels*), como los neurotransmisores; en respuesta a un cambio en la carga eléctrica de la MC (*voltage-gated channels*); a variaciones del pH, del ATP y de la tensión superficial o a movimientos acústicos y mecánicos en las células del sensorio somatoacústico. El transporte de K⁺, Na⁺, Cl⁻ y Ca⁺⁺ involucra también PT de la MC de diferentes familias: cotransportadores e intercambiadores iónicos.

Los canales iónicos de sodio

Los CI de Na⁺, así como los de K⁺, Ca⁺⁺ y Cl⁻, están presentes en todas las células del organismo, pero en proporciones diferentes y con distinta especificidad. Los principales grupos de CI de Na⁺ son:

- 1) Los CI Na⁺ dependientes del voltaje (CINaV), presentes en el sistema nervioso y en los músculos

cardíaco y esqueléticos, es decir, en todas las células excitables eléctricamente (*Gráfico 4*).

- 2) Los CI de Na⁺ dependientes de los ligandos, cuyo principal ejemplo es el receptor de la acetilcolina, para el K de la misma manera que lo es el receptor para el K.

Estos receptores se encuentran en las MC de las células posinápticas, donde reciben el mensaje de los neurotransmisores (*Gráfico 4*).

- 3) La SF de Mec-ENaC, constituida por los canales iónicos epiteliales (ENaC) y mecanosensitivos (Mec) en las neuronas sensoriales. El prototipo de esta SF es el ENaC; su papel fisiológico fundamental, es el de minimizar la pérdida de Na⁺, con una eficiente reabsorción del filtrado glomerular (FG) y de las secreciones de los organismos multicelulares superiores del reino animal (no existen en las plantas, ni en los hongos unicelulares).

Los canales iónicos del calcio

Ya dijimos que una de las propiedades más importantes de una célula es su capacidad para comunicarse con otras células del mismo fenotipo o de otros diferentes en un organismo multicelular (veremos que los unicelulares tienen propiedades similares). Esas interacciones ocurren a través de señales moleculares y biofísicas recibidas en la MC. Esas señales afectan los grandes procesos de la vida: el desarrollo, la proliferación, la diferenciación, la motilidad, la excitabilidad, el envejecimiento y la apoptosis, transfiriendo el mensaje exterior a un segundo mensajero. Entre los segundos mensajeros conocidos, el Ca⁺⁺ es el más antiguo filogenéticamente y participa en la mayoría de las vías nombradas en procesos clave, como la transcripción y traducción de un gen en proteína, la secreción y actividad de ésta y el metabolismo celular. Los eucariontes pueden incrementar su concentración de Ca⁺⁺ intracelular (Ca⁺⁺ⁱ) (que es muy baja y en consecuencia, muy sensible a una variación mínima) de dos maneras: 1) liberando el Ca⁺⁺ contenido en diferentes compartimientos IC (como en el RE y en la membrana nuclear); y, 2) permitiendo el ingreso del Ca⁺⁺ del medio EC. La primera es, en general, una fase rápida y transitoria, de una decena de segundos como máximo, y muchos procesos biológicos (secreción de hormonas, contracción de vasos sanguíneos, transcripción de genes, etc.) requieren un incremento considerable del Ca⁺⁺ⁱ. Por lo tanto, en estos casos, el mecanismo que predomina es el de facilitación de la entrada del Ca⁺⁺ EC. Así, las células excitables como las neuronas, las células musculares y las células neuroendocrinas, usan principalmente los CI de Ca

dependientes del voltaje para que el Ca^{++} ingrese a la célula, aprovechando tiempos más prolongados de excitabilidad, que generan una corriente de entrada sustancial de Ca^{++} . En las células no excitables (los fenotipos restantes: células inmunológicas, endoteliales, epiteliales, etc., que también se mueven, secretan, etc.), los CI de Ca dependientes del voltaje no se expresan, de manera que esas células utilizan las reservas IC de calcio y las reponen con el Ca^{++} EC. Este Ca^{++} extracelular ingresa fundamentalmente por canales iónicos no dependientes del voltaje conocidos como SOCC (por *store-operated calcium channels* o simplemente SOC). Si se tienen en cuenta estas dos formas de penetración del Ca^{++} , hablaremos de:

1) Los CI de Ca^{++} dependientes del voltaje (VDCC, por *voltage dependent calcium channel*) que, al igual que los CI de Na^+ y K^+ , son responsables de la conducción de las señales eléctricas en las MC de las neuronas y otras células excitables. Los CI de estos tres cationes son generados por genes pertenecientes a una misma familia. Las principales subunidades proteicas (las alfa) que los constituyen pueden tener forma y función de CI en sí mismas. Ellas pueden asociarse con otras subunidades (por ejemplo, las beta) que aumentan la expresión funcional y modifican la funcionalidad de las subunidades principales (*Gráfico 4*). Así, sobre un mismo modelo molecular-estructural, distintas variaciones determinan las diferencias de los CI dependientes del voltaje de estos tres cationes. Según su única conductancia iónica, su dependencia del voltaje, su perfil de reactividad con distintos fármacos y su biología molecular, los CI de Ca se denominan como tipos L, T, N, P, Q y R. Como toda familia de proteínas cuyos miembros se descubren año a año (y esto sucede con casi todas las familias de proteínas, sobre todo a medida que se identifican las secuencias de los organismos de todos los géneros y reinos), hay diferentes niveles de clasificación que deben ser unificados para comprender la vasta nomenclatura. Así, los CI de Ca que necesitan voltajes ligeramente más altos que el de reposo (que es de -60mV) para ser activados se denominan LVA (por *low voltage-activated channels*); los que necesitan un voltaje muy superior (cerca de 0mV) para activar el canal se denominan HVA (*high voltage-activated channels*).

A su vez, como farmacológicamente reaccionan en más o en menos (como con la dihidropiridina, [DHP]), aparecen subdivisiones que al mismo tiempo se corresponden con la estructura molecular (véase más adelante). En consecuencia, los CI de Ca HVA se denominan de tipo L (por,

long lasting) si son sensibles a la DHP, y de tipo N (por *neither*) si no lo son. Otros dos tipos de HVA, los tipos P (por haberse descrito en las células de Purkinje) y Q, se diferencian según su sensibilidad a ciertas toxinas, como la agatoxina (en general cuesta diferenciarlos y se los llama de tipo P/Q). Los LVA de tipo T (por *transient*) por su sensibilidad transitoria a la DHP. Otro canal es el tipo R (por *resting*), que permanece activo cuando una mezcla de esas sustancias bloquea todos los otros tipos, por ejemplo, en la MC presináptica. Esto se debe a que sobre una misma MC, como la del axón, puede haber hasta 40 clases diferentes de CI (para iones como el Ca^{++} , K^+ , Na^+ , Cl^- , dependientes de ligandos, etc.) y miles de moléculas de cada una de ellas. Finalmente, se encuentra el canal iónico no selectivo (CINS) dependiente del voltaje, es decir, que deja entrar tanto el Ca^{++} como Na^+ , K^+ y Cl^- en la MC presináptica. Este tipo de CINS sigue los pasos de apertura y cierre de los CI específicos, con la despolarización y repolarización posterior que lleva a la MC al potencial de reposo.

- 2)** Los CI de Ca dependientes de los ligandos, constituyen otras vías de DPF de Ca^{++} hacia el interior de la célula. Podemos nombrar:
- a)** El CI receptor del inositol 1,4,5-trifosfato (IP3R), que se encuentra en la MC y en las MC de los reservorios de Ca^{++} intracelulares. Cuando se liga al IP3, el IP3R se abre y deja entrar el Ca^{++} tanto extracelular como intracelular desde los depósitos al citoplasma.
 - b)** El CI receptor nicotínico de la acetilcolina (nACR), en la MC de los axones y vesículas presinápticas deja entrar también los iones de Ca^{++} así como los de Na^+ .
 - c)** Los DHPR en el sarcolema (la MC de la célula muscular) junto con los receptores de riadonina del RE de la misma célula.
- 3)** Los CI de Ca de las membranas de los compartimientos intracelulares (IC), que sirven de reserva de Ca^{++} . Está bien establecido que las múltiples vías en las que participa el Ca^{++} en el interior de la célula implican (además de su papel como segundo mensajero cuando una señal viene del exterior) la liberación de este catión de las reservas IC. La concentración intracelular de Ca es 100.000 veces menor que en el exterior de la célula (0,01 μM y 1 mM , respectivamente); sensores internos de Ca^{++} (que estarían en el IP3R) determinan mínimas variaciones moleculares de la concentración en el citoplasma. En las células no excitables, las corrientes de iones de Ca^{++} que salen de los reservorios se encuentran en sectores

especializados o invaden globalmente toda la célula. Se han identificado varias proteínas que intervienen en la fijación, secuestro, acumulación y liberación. Dos familias de proteínas participan en la liberación de Ca^{++} IC y son canales iónicos: los CI receptores de la rianodina (RyR) y los CI IP3R. Los RyR se encuentran en la MC del RE en todos los géneros animales y constituyen una familia de proteínas de muchos isomorfos. Así, existen RyR 1, 2 y 3, en el músculo esquelético, en el músculo cardíaco y en las neuronas, respectivamente. La otra gran familia de CI de liberación intracelular de Ca^{++} , los CI IP3R, también consisten en múltiples isomorfos y variantes de cortes y empalmes alternativos, que incluso pueden expresarse en una misma célula y existen en todos los fenotipos celulares.

Como dijimos, el Ca^{++} juega un papel crucial en varias funciones celulares de todos los fenotipos. Los agonistas que aumentan el Ca^{++} en las células excitables inducen la liberación de las reservas IC (a través de los RyR y los IP3R), seguida de la entrada del Ca EC. En las células no excitables, el flujo de Ca^{++} del exterior penetra por CI de Ca de la MC (los SOCC) bajo la regulación de mecanismos sensores de la cantidad de reserva IC de Ca. En una amplia variedad de células se constató la regulación por la concentración del Ca^{++} . La corriente de Ca^{++} activada por la depleción del Ca^{++} , fue llamada ICRAC (por, *Ca release-activated Ca current*). Los SOCC, que responden a este mecanismo (no dependiente de ligandos exteriores, ni del voltaje de la MC), son las proteínas codificadas por los genes hTRP (por, *transient receptor potential*). Siete homólogos en los mamíferos, (el primero de estos genes se descubrió en la drosófila), forman 4 subfamilias. El hTRP (por *human TRP*) produce una proteína de la MC, con 6 bucles TM similares a los clásicos CI de Ca^{++} . Este mecanismo de acoplamiento entre el RE y la MC para la reposición del Ca^{++} también sería mediado físicamente por un mecanismo secretorio, por la disposición de los microfilamentos de actina del citoesqueleto debajo de la MC, que bloquean y desbloquean reversiblemente el ingreso del Ca^{++} a través de los SOCC.

Los canales iónicos del potasio

De acuerdo con las propiedades de respuesta a diferentes estímulos biológicos, los CI de K se clasifican en cinco grandes grupos:

1) Los CI de K dependientes del voltaje que se abren o cierran en relación con el potencial eléctrico de la MC.

- 2) Los CI de K- Ca dependientes de la concentración (KCa), igual que los anteriores, se modulan según la concentración de Ca intracelular.
 - 3) Los CI K dependientes de los ligandos de neurotransmisores (serotonina, en este caso se llama S), acetilcolina y noradrenalina, nucleótidos cíclicos intracelulares como el GMP o nucleótidos extracelulares (purigénicos o purinoceptores). Se regulan de la misma forma.
 - 4) Los CI de K sensibles al ATP (KATP), en los que el "gating" es regulado por la concentración intracelular de ATP.
 - 5) Los CI de K dependientes del estiramiento, que son regulados por fuerzas mecánicas.
- En cada grupo puede haber CI muy diferentes en cuanto a sus estructuras moleculares, propiedades electrofisiológicas y farmacológicas. Por lo tanto, pueden clasificarse según tales propiedades (Gráficos 4 y 6).

Los canales iónicos del cloro

Los canales iónicos de Cl (CI de Cl⁻), están presentes en todos los organismos, incluidos los unicelulares, tanto en el reino animal como en el vegetal, en la mayoría de los fenotipos celulares. Tanto en la MC como en las membranas de las organelas (mitocondrias, endosomas, sinaptosomas) participan en la regulación del pH intracelular y el volumen celular, en el transporte transepitelial y en la excitabilidad de la MC. Aunque el Cl⁻ representa menos del 50% de los aniones de la célula, es el principal anión difusible en la mayoría de las células y el anión extracelular más abundante. En el transporte de Cl, como en el del K⁺, Na⁺ y Ca⁺⁺, participan proteínas TM de la MC de diferentes familias: cotransportadoras, intercambiadoras de aniones y canales iónicos. Veremos las dos primeras en otros capítulos, y en cuanto a los CI de Cl⁻, diremos que se ha señalado una amplia diversidad de proteínas con actividad funcional de canal iónico según diferentes comportamientos electrofisiológicos y farmacológicos. Esta diversidad funcional de canales de Cl⁻ excede largamente a los pocos que existen de acuerdo con la clasificación según criterios moleculares. Una vez sabido esto, podemos hablar de las muy bien caracterizadas familias de proteínas con funciones de CI de Cl⁻.

1) CI de Cl⁻ de la gran familia de los CIC (*chloride ion channel*), que dependen de la fijación del Cl⁻ en la entrada del canal y se abren o cierran directamente con el anión mismo, contrariamente a los CI de los cationes dependientes del voltaje de la MC (potencial de membrana). En efecto, estos últimos tienen un sensor de voltaje que no tienen los CIC, y son dependientes del potencial de membrana

de reposo. Los CIC fueron clonados en 1990, en la anguila eléctrica *Torpedo marmorata* (y otras, como la *californica*). El primero se denominó CIC-0 y se descubrieron otros nueve (CIC-1 a CIC-7 y CIC-Ka, CIC-Kb.) en esos peces. En el ser humano, cumplen algunas de las funciones que citamos al principio según su ubicación tisular, y se ha detectado una cantidad importante de mutaciones para algunos de estos canales en un número considerable de enfermedades humanas (Gráficos 4 y 5).

- 2) CI de Cl⁻ dependientes de bs ligandos, como los receptores de ácido gamma-aminobutírico (GABA) y de glicina, en el sistema nervioso y células excitables (tanto en la MC presináptica como en la posináptica).
- 3) CI de Cl⁻ que pertenecen a la familia de las proteínas ABC, como la CFTR (por *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), que desempeña una verdadera función de canal de Cl⁻, además de actuar como transportador activo.

Canales de solutos orgánicos. Las porinas

Los CI mencionados hasta ahora intervienen en el pasaje de iones inorgánicos y son esenciales para los procesos de absorción transepitelial y secreción de sales, la regulación del volumen celular, el control del potencial de la MC; además, participan directamente en muchas vías de transducción (VT), permitiendo, por ejemplo, el ingreso de Ca⁺⁺.

Otro grupo fundamental de canales son los que se ocupan de los solutos orgánicos (OSC, por *organic solute channel*). Las principales funciones fisiológicas de los OSC son absorción de nutrientes, excreción de metabolitos de desecho, regulación del volumen y la osmolaridad mediante el transporte de osmolitos, y regulación del metabolismo mitocondrial. Los OSC participan del pasaje selectivo de solutos orgánicos iónicos y de los eléctricamente neutros. Las bacterias gramnegativas están rodeadas por una doble MC. La MC interna funciona como la MC de los eucariontes, con una permeabilidad selectiva debida a PT y CI, con especificidad por sus respectivas moléculas. La MC externa, por el contrario, actúa como un tamiz que deja pasar moléculas hidrofílicas de menos de 1 kDa. Este tamizado protege a la bacteria de las sales biliares, enzimas digestivas, antibióticos, moléculas de defensa de los epitelios (defensinas) y otras agresiones. El intercambio de nutrientes y desechos entre las dos MC y el citoplasma bacteriano se realiza a través de canales llamados porinas. Las porinas son el arquetipo de los OSC. Cabe recordar que en la mitocondria, que también tiene una doble MC, hay una porina: el canal aniónico dependiente del voltaje (VDAC, por *voltage-dependent anion channel*), con

propiedades similares a las porinas bacterianas. Además, se encuentran estructuras tipo porinas en los cloroplastos y los peroxisomas.

Las porinas se dividen en dos grupos por su especificidad y selectividad para la difusión de solutos: a) porinas que tienen una predilección general por solutos hidrofílicos y sólo tienen en cuenta su tamaño. Este grupo prácticamente no diferencia entre cationes y aniones. El diámetro de estos canales es de 1-3 nm; por ejemplo, la VDAC es una porina mitocondrial de difusión general, fundamental en el transporte de metabolitos, y en especial, de nucleótidos de adenina y sustratos aniónicos como el citrato y el succinato. Tienen, sin embargo, una diferencia con las porinas bacterianas: su dependencia del voltaje de la MC (a voltajes de -10 a +10 mV están abiertas y variaciones de 20 a 30 mV las cierran). Varias enzimas que utilizan esos sustratos y el ATP se encuentran ligadas a esta porina, como la hexosa quinasa, la glucoquinasa, la creatinquinasa y la glicerolquinasa. La VDAC desempeña un papel central en el flujo de esos metabolitos y en el control del metabolismo mitocondrial, así como en la apoptosis (véase Arch. arg. pediatr. 1999; (4)). b) Las porinas específicas poseen un sitio de fijación para ciertos solutos, como monosacáridos y disacáridos (LamB, ScrY), nucleósidos (TsX) y aniones (proteína P), todas porinas bacterianas.

Canales de solutos orgánicos sensibles al volumen

La regulación del volumen celular en respuesta a su aumento (tumefacción) es un proceso conocido como regulación de la disminución del volumen, mediado por el flujo hacia el exterior celular de Na⁺, K⁺, Cl⁻, aniones orgánicos y un grupo de solutos orgánicos eléctricamente neutros llamados osmolitos. En las células de los mamíferos, los osmolitos se dividen en tres clases: 1) polioles (sorbitol, mioinositol); 2) AA y sus derivados (taurina, prolina, alanina) y 3) las metilaminas (betaína, glicerofosforilcolina). Están presentes en muy altas concentraciones IC, y en todos los organismos vivos. Desempeñan un papel esencial en la osmorregulación celular y en su citoprotección. En todos los organismos, desde las bacterias hasta los humanos, el aumento del volumen celular en condiciones fisiológicas lleva en poco tiempo a un rápido flujo pasivo de pérdida de osmolitos. Estos mecanismos fueron caracterizados en muchos fenotipos celulares. Son independientes del Na⁺, no reciben transestimulación ni tienen sustratos inhibidores. Por lo tanto, son, canales y no PT. Un vasto número de experiencias indica que en las células de los vertebrados una proteína-canal

amplia y selectiva sirve de pasaje a la mayoría, si no a todos los osmolitos orgánicos. Esta proteína se denomina VSOAC (por *volumen-sensitive organic osmolyte/anion channel*), tendría un poro de 8-9 Å, con mayor preferencia por los solutos hidrofóbicos que por los hidrofílicos, con selectividad por los aniones y, en algunos fenotipos celulares, dependiente de voltaje. Este canal diferente de los CI dependientes del voltaje o ligados se abre o se cierra con un pequeño aumento/disminución del volumen celular. No se producen incrementos o disminuciones graduales como los anteriores. No se conocen los mecanismos íntimos de la activación y de este compartimiento (la concentración de ATP y sal podrían ser los activadores), pero en todo caso, la activación depende del número de moléculas de VSOAC por célula. Hasta el año 2000, sólo se conocían los OSM-9 en el *C. elegans* y el mec- en la *D. melanogaster*, los dos canales mecanosensibles –semejantes a los conocidos en bacterias– que miden la tensión de las MC. Hoy se conoce el VR-OAC (por *vanilloid receptor-related osmotically activated channel*), en los vertebrados. Perteneció a la familia de las TRP y se expresa en las neuronas sensoriales y las células de Merkel. Tiene 6 TM y se abre con la hipotonicidad.

Las acuaporinas

Debido a que el agua es el principal componente de todos los seres vivos, las capacidades de absorberla y secretarla son propiedades fundamentales. Las acuaporinas cumplen esa función. La primera acuaporina, AQP0 (por acuaporina 0) fue descubierta en 1991. En todo el reino animal y vegetal existen moléculas homólogas. Las 10 AQP (8 AQP humanas conocidas) se dividen en dos grupos: a) Las AQP ortodoxas, es decir las que son específicas y selectivas para el H₂O, e incluyen las AQP0, AQP1, AQP2, AQP4 y AQP5 y b) Las multifuncionales, las acuagliceroporinas que dejan pasar H₂O, glicerol y otros solutos, e incluyen las AQP3, AQP7 y la AQP9. Participan en numerosos procesos fisiológicos y en un número importante de patologías. Cuando la AQP1 fue descubierta en la MC del eritrocito, parecía formar parte de la proteína TM del grupo sanguíneo RH (hoy se sabe que esta proteína, la del gen D [Rh+], tiene 13 bucles TM y ninguna función de canal). Por el contrario, se comprobó la AQP1 era homóloga a la proteína MIP (por *major intrinsic protein*), que había sido descubierta en el cristalino y es una proteína TM. Como estaba presente tanto en la MC del eritrocito como en el epitelio renal (túbulo renal proximal [TP] y en el asa descendente [ADH]) y era permeable al agua, se la denominó CHIP28 (por *channel-like integral protein*, de 28 kDa). Finalmente, se

acunó el nombre de acuaporina y el Comité de Nomenclatura del Genoma Humano (HGNC) la designó AQP1, siendo la MIP la AQP 0 (Gráfico 6).

Canales iónicos paracelulares

Si los 900.000 nefrones de cada riñón humano son, en definitiva, un largo tubo que parte del glomérulo con una sola capa de células epiteliales, una al lado de la otra hasta llegar a la vejiga, a la que llevan la orina “final”, debe existir alguna razón evolutiva. En efecto, la sangre filtrada en los glomérulos ingresa la porción inicial de este túbulo, y a lo largo de su trayecto se reabsorben y secretan a través de esa monocapa epitelial todos los metabolitos (iones y solutos) necesarios para mantener una homeostasia normal. La reabsorción depende de dos vías: una transcelular (a través de los CI, las PT y las bombas iónicas); la otra paracelular, a través del espacio intercelular entre las células epiteliales.

La vía paracelular está regulada por las uniones estrechas (*tight junctions*), estructuras intercelulares que circunscriben (como una reja) toda la célula hacia su borde apical, uniéndola fuertemente con la misma estructura de dos células adyacentes. La unión estrecha está constituida por proteínas TM (en este caso son moléculas de adhesión) de la familia de las claudinas y de las ocludinas. Estas proteínas se unen por uniones no covalentes con las de las células adyacentes en dominios muy precisos, ocluyendo el espacio paracelular y creando una especie de lago entre el espacio luminal y el espacio de la membrana extracelular y/o tejido conectivo. La resistencia al pasaje de iones muestra dos tipos funcionales de uniones: estrechas, que ofrecen mayor resistencia y las que permiten pérdidas (*leaky*) que tienen menos resistencia. Existen muchas similitudes funcionales y estructurales entre estas estructuras y los canales iónicos. Por ejemplo: 1) ambos pueden ser bloqueados por iones pesados cargados positivamente; 2) ambos tienen poros del mismo diámetro; y 3) las uniones estrechas son selectivas para los cationes más que para los aniones, como el receptor de la acetilcolina. Una diferencia capital entre ellas es que las uniones estrechas son paralelas al plano y no atraviesan la MC, mientras que los canales iónicos siempre son perpendiculares a la MC y la atraviesan. En 1999 se identificó la secuencia del primer canal iónico paracelular, constituido por la proteína conocida como paracelina-1, miembro de la familia de las claudinas, y que es selectiva para el magnesio (Mg⁺⁺). Contrariamente a los otros iones, éste es reabsorbido mayoritariamente por esta vía en el riñón. Están ubicadas, en las uniones estrechas en el asa ascendente gruesa de Henle (TAL por *thick ascending limb*)

exclusivamente. Son selectivos también para el Ca^{++} . La mutación del gen de la paracelina-1, causa una anomalía hereditaria caracterizada por hipomagnesemia, hipermagnesuria e hipercalciuria hereditaria (un síndrome de pérdida de Mg^{++} y Ca^{++} con fallo renal). La proteína anómala o su falta de expresión provoca directamente la dificultad en la reabsorción del Mg^{++} por el riñón. Finalmente, cabe señalar que los diferentes miembros de la familia de las claudinas, así como los de las ocludinas, pueden formar canales (como lo sugieren los recientes estudios) con pares u oligómeros entre distintos miembros, abriendo un fantástico número de posibilidades a la regulación iónica no solamente en el riñón.

Patologías renales de los canales iónicos: Mecanismos moleculares

Cuando el correcto intercambio de agua y sal realizado permanentemente por el riñón falla por mutaciones de las moléculas intervinientes se produce hipertensión o hipotensión, así como retención o pérdida de líquidos y electrolitos en los espacios intracelular y extracelular. Por lo tanto, las patologías de los canales iónicos renales son indisociables de las patologías moleculares genéticas de las variaciones de la tensión arterial humana (TA) y los mecanismos moleculares hormonales que la regulan.

La hipertensión (HT) afecta a casi 25% de los seres humanos. En la gran mayoría, sus causas esenciales no se conocen. Se han realizado infinidad de estudios epidemiológicos que asociaron la edad, sexo, raza, masa corporal y dieta (ingestión de Na, K y Ca) con la HT. La fisiología de la tensión arterial es engañosamente simple, cuando se explica como la relación proporcional del flujo cardíaco y la resistencia periférica (ley de Ohm). En efecto, una gran variedad de sistemas polifacéticos con complejos intercambios entre sus moléculas influyen sobre la TA, como los barorreceptores que regulan los cambios agudos de la tensión en las paredes de los vasos; el péptido natriurético (PNA) secretado por el cerebro y el corazón en respuesta al aumento de la TA en esos órganos, el sistema renina-angiotensina-aldosterona y el sistema quinina-caliceína que influyen sobre el volumen, el tono vascular y la regulación de la pérdida de sal en el riñón; el sistema de los receptores adrenérgicos que influyen sobre la frecuencia, la contracción cardíaca y el tono vascular, y finalmente, moléculas producidas por los endotelios de los vasos, como el óxido nítrico (ON) que causa vasodilatación o la endotelina, que causa vasoconstricción. Todos estos sistemas actúan en forma sincronizada e integralmente ante cualquier variación metabólica localizada que se imponga –digestión, ejercicio, do-

lor, etc.– para mantener la perfusión necesaria en cada tejido. Pero, debido al hecho que experimentalmente la TA sólo se puede medir en el organismo vivo y a que ésta es el resultado integral de todos esos sistemas, sólo pueden realizarse estudios limitados en tiempo y de los sistemas individualmente. Como resultado de esto, aún no se sabe cuál es la causa primaria esencial de la HT, ni se puede predecir clínicamente quién va ser hipertenso; los tratamientos son empíricos y limitados a las HT ya establecidas, sin poder distinguir cuáles son respuestas adaptativas secundarias a problemas primarios moleculares. Concretamente, si no se estudian los genes conocidos hasta ahora y los que restan conocer, la HT continuará siendo “esencial” en más del 90% de los casos.

Debido a la imposibilidad para determinar las bases moleculares por los estudios clásicos, en los últimos 10 años se incrementaron los estudios epidemiológicos. Pero, aunque éstos establecieron claramente asociaciones genéticas en familias de hipertensos o entre gemelos monocigotas comparados con los dicigotas, sólo concluyeron que se trataba de situaciones multifactoriales o multigénicas, sin poder demostrar un gen o genes que explicaran la HT. Por el momento sólo los raros casos de HT o de hipotensión donde el déficit es monogénico esclarecen los mecanismos moleculares de la HT.

Formas de transmisión hereditaria de la HT.

Hasta julio de 2001 se habían identificado mutaciones en 8 genes que causan HT y en 9 que causan hipotensión, que se transmiten según las leyes mendelianas. Debido a la diversidad de sistemas mencionados que participan en la regulación de la TA, es sorprendente que los 17 genes mutados codifican proteínas que participan alterando al balance neto de la reabsorción de sal a nivel renal (*Gráfico 5*). En efecto, las mutaciones que incrementan la reabsorción de sal producen HT y las que la disminuyen causan hipotensión. Las moléculas del sistema que participan en la homeostasia de la sal y su relación con la TA son las siguientes:

En un día normal, los riñones filtran 170 litros de plasma, con un total de 23 moles de sal. Para mantener el nivel normal, con una dieta de 100 mEq de ClNa, el riñón debe reabsorber el 99,5% de la cantidad filtrada. Esto es realizado por un sistema integrado de canales iónicos y transportadores (*antiports* y *simports*), a lo largo del nefrón. El 60% se reabsorbe en el túbulo proximal (TP), esencialmente por la acción del *antiport* Na^+/H^+ ; 30% es reabsorbido en el asa gruesa ascendente de Henle (TAL) por el cotransportador *simport* $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$; 7% es retirado por el cotransportador *simport* Na^+/Cl^- en el túbulo

contorneado distal. El último 2% es reabsorbido por el ENaC, canal iónico de Na⁺ *uniport* en el túbulo colector cortical (TCC). Este último canal es el principal sitio donde se regula el nivel de sal. En efecto, una disminución de la sal en el TAL induce a la secreción de la enzima aspartil-proteasa (renina) que convierte el angiotensinógeno en angiotensina I (AI), que a su vez se convierte en el péptido hormonal angiotensina II (AII) por acción de la enzima convertasa (ECA, por enzima convertidora de angiotensina). Su ligando (un RCPG) en la capa glomerulosa suprarrenal produce la secreción de la aldosterona, cuyo receptor mineralocorticoide (RMNC), perteneciente a la superfamilia de los receptores de núcleo se expresa en las células principales del TCC e induce a la actividad de los genes del ENaC, incrementando la reabsorción de sal. El agua y la sal van juntas, para mantener la concentración de 140 mM de Na⁺ en el plasma. Así se establece el vínculo entre la relación de la reabsorción de sal y el volumen circulatorio en la fisiopatología de la HT. Se descubrieron mutaciones de las moléculas de este sistema en familias hipertensas o hipotensas, cuando esas mutaciones provocan aumento o disminución de la recuperación de sal en el nefrón.

Mutaciones que afectan el eje hormonal de los mineralocorticoides

El RMNC sólo es activado normalmente por la aldosterona e induce los genes del ENaC. Las enfermedades hereditarias descritas por fallas en la secreción de aldosterona o por estimulación anormal del RMNC por otros esteroides son las siguientes:

Hiperaldosteronismo remediable con gluco-corticoides (HARG). Es una enfermedad autosómica dominante (AD) con HT, niveles de aldosterona normales o elevados, con baja actividad de renina, hipocaliemia y alcalosis metabólica. La causa molecular de esta enfermedad es la aparición de un gen quimérico (por duplicación y entrecruzamiento anormales) entre el gen de la aldosterona sintetasa y el de la 11-beta-hidroxiilasa, separados por 45 kb en el cromosoma 8. El primero responde normalmente a la AII y el segundo, a la ACTH. El gen híbrido (que no existe en los organismos normales) queda bajo el comando de la ACTH ya que el promotor 5' es la parte de la 11-beta-hidroxiilasa, y su producto tiene la acción de la aldosterona. En consecuencia, a la secreción normal de cortisol inducida por la ACTH se agrega inexorablemente la secreción de aldosterona en la zona fascicular suprarrenal. Los glucocorticoides exógenos suprimen todas estas alteraciones, y previenen el hiperaldosteronismo al suprimir la secreción de ACTH.

Secreción defectuosa de aldosterona. Enfermedad autosómica recesiva (AR), en la que mutaciones en el gen de la aldosterona sintetasa producen síntomas opuestos al HARG. En efecto, hay hipotensión, hiponatremia con hipercaliemia y acidosis metabólica.

Deficiencia de 21-hidroxiilasa. También produce deficiencia en la secreción de aldosterona con síntomas similares, además de otras mutaciones endocrinas (Gráfico 5).

*Síndrome de exceso aparente de mineralocorticoides (EAM) (*218030).* Normalmente sólo la aldosterona se liga a su RN *in vivo*. Debido a que el cortisol circula en una concentración mucho más elevada y tiene también actividad *in vitro* sobre el mismo RMNC, su destrucción es un mecanismo fisiológico finamente regulado por la 11 β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSD) que cataboliza el cortisol a cortisona. Esta no es capaz de ligarse al receptor de mineralocorticoides (MNR), por lo que no tiene actividad tipo aldosterona. El defecto por mutación en esta enzima produce el EAM, con niveles de aldosterona normales o bajos, HT, hipocaliemia y alcalosis metabólica. La ingestión excesiva de ácido glicinarretínico del regaliz tiene acciones supresoras sobre la enzima HSD y puede provocar los mismos síntomas. Los mismos mecanismos que impiden la transformación del cortisol en cortisona por deficiencia de la HSD pueden explicar la HT en el síndrome de Cushing (adenomas de hipófisis, de glándulas suprarrenales o ambos) y en la enfermedad de resistencia a los glucocorticoides causada por defectos en el RGC. Cabe destacar que hay dos isomorfos de la enzima HSD y que mutaciones en el segundo de ellos producen un síndrome de EAM (tipo II) (*207765) que es AR, con niveles normales de cortisol y cortisona.

Mutaciones en el RMNC. HT exacerbada en el embarazo. En estos pacientes, una mutación de lisina por metionina (S810L, se escribe siempre primero el aminoácido normal, luego el número del codón y al final el aminoácido que lo reemplazó) en el RMNC hace que este receptor sea estimulado anormalmente por otros esteroides como la progesterona. Desde el momento en que aumenta unas 100 veces la concentración de esta hormona durante el embarazo, las mujeres portadoras de esta mutación presentan HT grave.

*Pseudohipoaldosteronismo Tipo I (PHAI), AD (*177735).* Existen dos formas de PHAI: el AD y el AR (véase más adelante). Los pacientes con PHAI AD presentan el defecto en la molécula del RMNC con disminución de la estimulación de los ENaC, que en el período neonatal necesita de los dos genes de RMNC para reabsorber la sal necesaria. Precisamen-

* Véase Glosario

te en ese periodo, los pacientes afectados presentan hipotensión grave a pesar de los elevados niveles de aldosterona, hipercaliemia y acidosis metabólica. Después del periodo neonatal y con un adecuado aporte suplementario de sal para corregir los síntomas, la enfermedad desaparece naturalmente en la pubertad. Un solo gen del RMNC es suficiente. Este es un claro ejemplo de que las acciones de cada molécula tienen un efecto cualitativo y según los estados, edades y necesidades fisiológicas son los efectos cuantitativos los que cuentan.

MUTACIONES QUE ALTERAN LAS MOLÉCULAS DE LOS CANALES IÓNICOS

*El síndrome de Liddle (*600760).* Este síndrome es AD, con comienzo temprano de HT, hipocaliemia y alcalosis metabólica, sin aumento de renina y bajos niveles de aldosterona. La causa molecular son mutaciones en las proteínas de las subunidades β y γ del ENaC, suprimidas en su segmento COOH terminal. El resultado es que los tetrámeros de ENaC (2 α , β y γ) no son suficientemente removidos de la MC y su número aumenta, por lo que se incrementa cuantitativamente la función de reabsorción de sal. La inhibición de la renovación de los ENaC se debería a un defecto de la endocitosis de las vesículas recubiertas por clatrasinas o a la carencia de una dominio-ligasa (necesaria para la ubiquitilación y degradación por el proteosoma) en las proteínas Nedd4-1 y Nedd4-2. Estas proteínas tienen un dominio WW (triptófano-triptófano) que se liga al dominio PPPXY de las subunidades β y γ del ENaC.

*Pseudohipoaldosteronismo Tipo I (PHAI) (AR) (*264350).* La pérdida de las funciones de cualquiera de las tres subunidades α , β y γ del ENaC causan esta enfermedad. Igual que en el PHAI AD hay hipotensión, hiponatremia, hipercaliemia y acidosis metabólica, a pesar de altos niveles de aldosterona en el periodo neonatal. Pero, a diferencia de la forma dominante, la forma recesiva nunca se cura espontáneamente. Aquí fallan las dos copias de los cromosomas 16 parentales. Si bien las ratitas que carecen de estos genes (*knockout*) también tienen insuficiencia respiratoria por la ausencia de estos canales en los alvéolos, en el hombre estos síntomas serían menos graves.

Síndromes de Gitelman y de Bartter. Son un grupo de enfermedades AR con hipotensión, hipocaliemia, alcalosis metabólica y otras manifestaciones diversas. Mutaciones en cuatro genes diferentes son la causa molecular de cuatro patologías diferentes con manifestaciones similares. Nuevamente, la pérdida de sal es la base en todos los casos. El síndrome de Gitelman es la pérdida de función del

cotransportador Cl^-/Na^+ sensible a las tiazidas en el túbulo contorneado distal (TCD). Los pacientes tienen TA menor que la normal, hipocaliemia y síntomas neuromusculares desde la pubertad, asociados a hipomagnesemia e hipocalciuria. La pérdida de sal en el TCD lleva a la activación del sistema renina-Aldo, que al activar al RMNC estimula la acción de los ENaC en el TCC para recuperar la sal perdida en el TCD, facilitando la salida de K^+ y H^+ . Esto demuestra que aun modestas pérdidas de sal causan descenso de la TA. La alteración de la homeostasia del Ca^{++} y el Mg^{++} muestra también la intensa regulación de estos iones por estos cotransportadores. Los enfermos heterocigotas compensan este desequilibrio con el aumento de la ingestión de sal y se mantienen asintomáticos.

Los síndromes de Bartter se distinguen del anterior por no presentar hipocalciuria y tener niveles normales de Mg^{++} . Los síndromes I, II y III de Bartter son causados por mutaciones en las moléculas encargadas de recuperar sal en el TAL. Los pacientes se presentan con hipotensión, hipocaliemia y alcalosis metabólica, con aumento de la reninemia y la aldosterona. Las mutaciones que implican la pérdida de función del cotransportador *symport* $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ son la causa del síndrome de Bartter tipo 1. La mutación del gen del canal de K^+ ATP, ROMK, es la causa del síndrome de Bartter tipo 2. La pérdida de sal por la mutación de esta proteína se produce porque normalmente en el TAL hay una alta concentración de Na^+ y Cl^- pero baja de K^+ , y, si al ser reabsorbido, el K^+ no puede recircular nuevamente hacia la orina, la relación Na^+/K^+ podría deteriorarse rápidamente y disminuir la actividad del cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$, disminuyendo la reabsorción de Cl^- y Na^+ . Normalmente la molécula ROMK en el TAL, rectifica la concentración de K^+ en la luz. Cuando falla, ocurre lo que mencionamos anteriormente y no hay una correcta reabsorción de sal en ese sector. El síndrome de Bartter tipo 3 es causado por la mutación que altera la proteína del canal iónico de Cl^- (CLCNKB). Se explica porque en esas mismas células la sal entra a través del cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$, el Na^+ ingresa al intersticio por la Na^+/K^+ ATPasa y el Cl^- , por el CL CN KB. Si este último no funciona, se genera un aumento de la concentración IC de Cl^- que bloquea la función del cotransportador, interfiriendo con la reabsorción neta de sal en ese nivel del nefrón (Gráfico 5).

El síndrome de Bartter tipo IV (602522) se caracteriza por las mismas alteraciones renales fenotípicas que los anteriores, pero agrega una deficiencia auditiva neurosensorial. El gen mutado es el BSND (por *Bartter Syndrome with Sensorineural*

* Véase Glosario

Deafness) que produce normalmente una proteína (se la bautizó *barttina*) que favorece específicamente la inserción en la MC basolateral de dos CI del cloro, CIC-Ka y CIC-Kb, pero no forma parte del canal iónico en sí mismo. Es una proteína de la MC con dos dominios TM sin función de canal iónico. Se la encuentra en la MC basolateral de los segmentos de los túbulos renales que expresan esos dos CIC y en las células marginales de la estria vascular del oído interno, donde están también esos dos CI del cloro. Es la primera proteína descubierta con función regulatoria de los CIC.

El síndrome de Gordon (145260) o pseudohipoparatiroidismo tipo II puede agregarse al grupo de enfermedades genéticas renales con HT. Este síndrome es AR y se presenta con HT, hipercalemia y acidosis tubular. El defecto genético está en los genes WNK1 y WNK4 (por *with No K=lisine*) que codifican una nueva familia de quinasas citoplasmáticas serina-treoninas. El defecto de esta molécula está en que en la proteína normal una cisteína reemplaza la lisina y afecta el sitio catalítico de estas enzimas. La WNK4 sólo se expresa en las células renales (en la *tight junctions*), pero la WNK1 se encuentra en colon, esófago, glándulas sudoríparas y en la MC basolateral de los epitelios de los canalículos biliares, pancreáticos y epidídimo además del riñón. Como estas enzimas (hay 18 genes WNK solamente presentes en los organismos multicelulares) participan en el flujo de los iones Cl, las mutaciones de estos genes producen enfermedades "WNK". Puesto que el flujo de iones Cl es el componente mayor en el defecto de la proteína CFRT en la enfermedad fibroquística del páncreas, los tejidos afectados son justamente aquellos donde también se expresa la WNK1. El aumento en la reabsorción de cloro es el resultado de las mutaciones en este tipo de quinasas, que desempeñarían un papel general en la regulación del flujo del ión Cl.

Las acuaporinas y sus patologías. Diabetes insípida

La importancia clínica de la AQP2 se constata en varias patologías de descompensación del balance hídrico. Así, las diabetes insípidas (DI), caracterizadas por la gran excreción de orina diluida, reconocen el defecto molecular en las vías que controlan la absorción y la excreción del agua. En las DI, el defecto primario puede estar: 1) en la hormona misma (mutaciones del gen prepro-AVP-neurohipofisina II); en este caso son de origen central (o hipotalámicas); 2) mutaciones en el gen del receptor de la AVP (constituyen el 90% de las DI nefrogénicas y hay unas 80

mutaciones comunicadas), que se encuentra en el cromosoma X: DI nefrogénica ligada al sexo. 3) Mutaciones en el gen de la AQP2 (hay cuatro mutaciones registradas en la proteína transductora del circuito acuoso), representan el 10% de las DI nefrogénicas y son autosómicas recesivas (aunque hay una forma autosómica dominante, donde el alelo normal produce una proteína anómala que coagrega con la del alelo normal, y no la deja expresar en la MC). Puede inducirse déficit de la AQP2 por tratamiento con litio en los síndromes maniacodepresivos (casi 1% de la población la padece), generando poliuria en estos pacientes. Al contrario, puede ocurrir una expresión excesiva de AQP2 en los síndromes con retención excesiva de agua (hiponatremia), como en la congestión pulmonar con edema en la insuficiencia cardíaca crónica, en la cirrosis y en la retención patológica de agua en el embarazo (*Gráfico 6*).

PARTE C

GLOSARIO

OMIM: En este capítulo comenzamos a poner algunos ejemplos de la numeración de OMIM en las enfermedades hereditarias. Las que no lo tienen pueden incentivar al lector interesado en buscarla en ese banco de datos.

El banco de datos de OMIM (por *Online Mendelian Inheritance in Man*) es un catálogo de los genes humanos y sus desórdenes genéticos heredados según las leyes de Mendel. Es decir que no figuran en este banco las debidas a mutaciones espontáneas o por aberraciones cromosómicas. Cuando una enfermedad va seguida por un número entre paréntesis, es porque hacemos referencia a este banco de datos, que es actualizado constantemente. Cada gen OMIM tiene un número con 6 dígitos donde el primero indica el modo de transmisión hereditaria. Así, 1---- (100000) es autosómica dominante; 2---- (200000) autosómica recesiva; 3---- (300000) ligada al cromosoma X o fenotipos; 4---- (400000) ligada al cromosoma Y o fenotipos; 5---- (500000) ligada al genoma mitocondrial o fenotipo; 6--- (600000) loci autosómicos o fenotipos. Cuando se trata de una variante alélica (mutaciones), al número de base se le agrega un punto al final y cuatro dígitos y se comienza con la enumeración del último; por ejemplo: el gen de la Pgy1/MDR tiene número 171050 y la variante alélica responsable de la resistencia a la colchicina es la 171050.0001. Cuando todo el número es precedido por un asterisco (*) es porque el gen de un locus está confirmado en su modo de transmisión y lo diferencia de otros genes del mismo locus. Un símbolo #

significa que el fenotipo puede ser causado por la mutación de cualquiera de 2 genes o más .

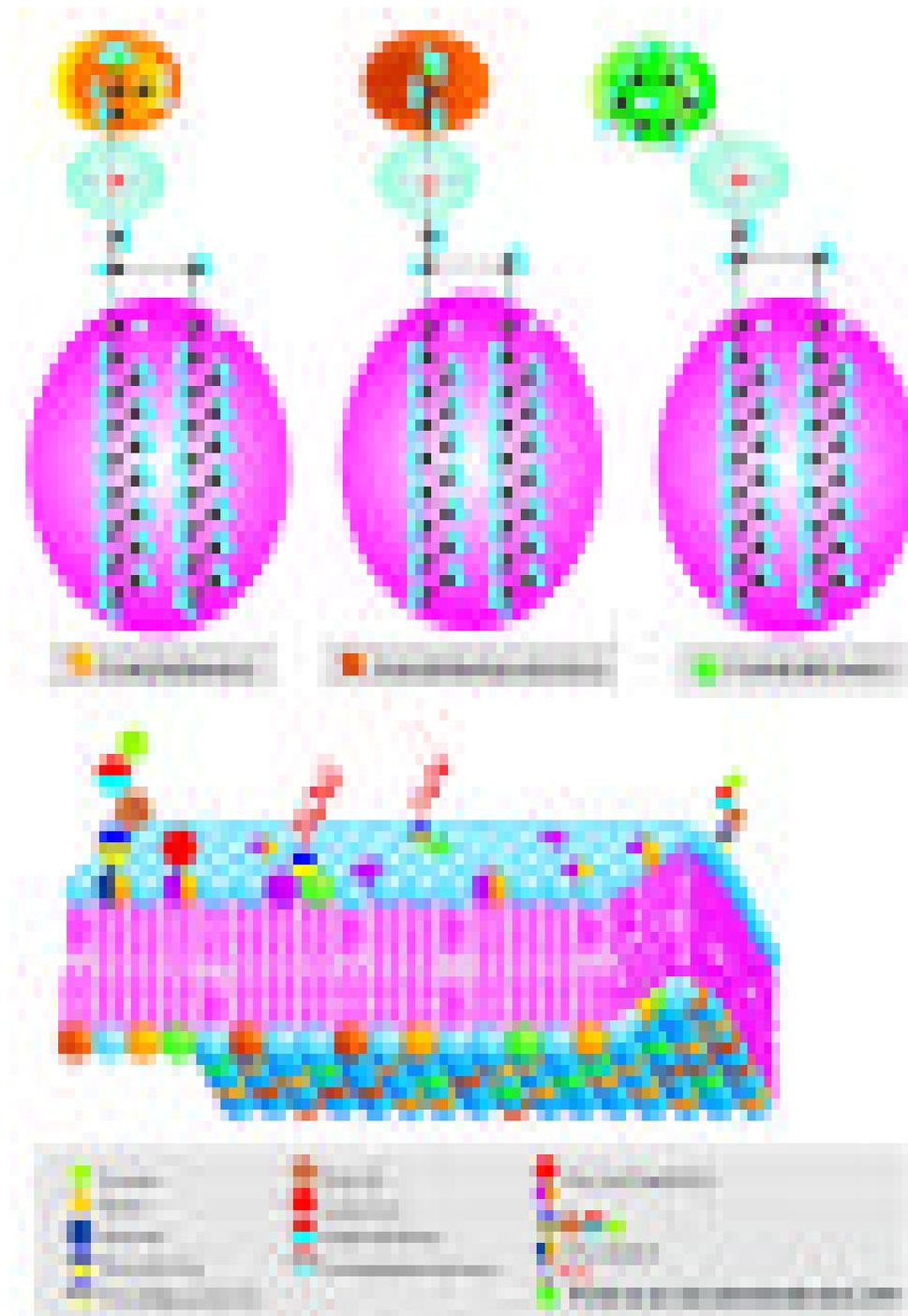
En www.ncbi.nlm.nih.gov/omim figuran todos los datos actualizados y los números de cada enfermedad y sus variantes.

ABREVIATURAS

A I, A II: angiotensina I, II.
 ACP: acuaporina.
 AD: autosómica dominante.
 ADAM: adhesión a metaloproteína.
 AR: autosómica recesiva.
 AVP: arginina-vasopresina (HAD).
 CCMP: conducto colector medular profundo.
 CFTR: regulador transmembrana de la fibrosis quística.
 CI: canal iónico.
 CIC: canales iónicos del cloro.
 CINS: canal iónico no selectivo.
 CLCNKB: canal iónico de Cl (alterado en Síndrome de Bartter).
 CPA: células presentadoras de antígenos.
 CSO: canales de solutos orgánicos.
 DBP: proteína que liga la vitamina D.
 DFP: difusión pasiva.
 DHP: dihidropiridina.
 DI: diabetes insípida.
 EAM: exceso aparente de mineralocorticoides.
 ECA: convertasa de la angiotensina I.
 EM: esfingomielina.
 ENaC: canal epitelial de Na.
 FC: fosfatidilcolina.
 FE: fosfatidiletanolamina.
 FI: fosfatidilinositol.
 FS: fosfatidilserina.
 FT: factores de transcripción.
 GEL: glucoesfingolípido.
 GPI: glucofosfatidilinositol.
 HGNC: Comité de Nomenclatura del Genoma Humano.
 HSD: 11- β , hidroxisteroide-dehidrogenasa.
 HT: hipertensión arterial.
 HVA: ídem por alto voltaje.
 IP3R: receptor del inositol trifosfato.
 K Ca: canal iónico de K dependiente del CA.
 Kir: canal de K⁺ rectificador hacia el interior de la célula (*inwardly rectifying*).
 Kv: canal de K⁺ dependiente de voltaje.
 LDL: lipoproteína de baja densidad.
 LE: lámina externa.
 LI: lámina interna.
 LVA: canales de Ca⁺⁺ activados por bajo voltaje.
 MA: moléculas adhesivas.

MC: membrana celular.
 ME: matriz extracelular.
 MIP: proteína intrínseca mayor.
 MSD: dominio transmembrana.
 NBD: dominio intracelular que liga nucleótidos.
 ORCC: canal iónico de Cl rectificador hacia afuera.
 PIP: proteína intrínseca de la membrana plasmática (AQP vegetal).
 PNA: péptido natriurético auricular.
 PRGF: factor de crecimiento relacionado con el plasminógeno.
 PT: proteínas de transporte.
 RCG: receptor de glucocorticoides.
 RCPG: receptor dependiente de la proteína G .
 RCT: receptor de linfocitos T.
 RE: reticuloendotelio.
 RFC: receptores de factores de crecimiento.
 RH: receptores hormonales.
 RiR: receptor de la rianodina.
 RMNC: receptor de mineralocorticoides.
 RN: receptor nuclear.
 RTF: receptor tirosina-fosfatasa.
 RTK: receptor tirosina-quinasa (insulina).
 SF: superfamilia.
 SI: sistema inmunitario.
 ST: señal de transmisión.
 SUR: receptor de la sulfonilurea.
 TA: tensión arterial.
 TAL: asa ascendente gruesa de Henle.
 TCC: túbulo colector cortical.
 TCD: túbulo contorneado distal.
 TDL: asa descendente de Henle.
 TIP: proteína intrínseca del tonoplasto (AQP vegetal).
 TP: túbulo proximal.
 TU: transportador de urea.
 VDAC: canal aniónico dependiente de voltaje.
 VROAC: canal receptor del vainilloide activado osmóticamente.
 VSOAC: canal de osmolitos orgánicos/aniones sensible al volumen.

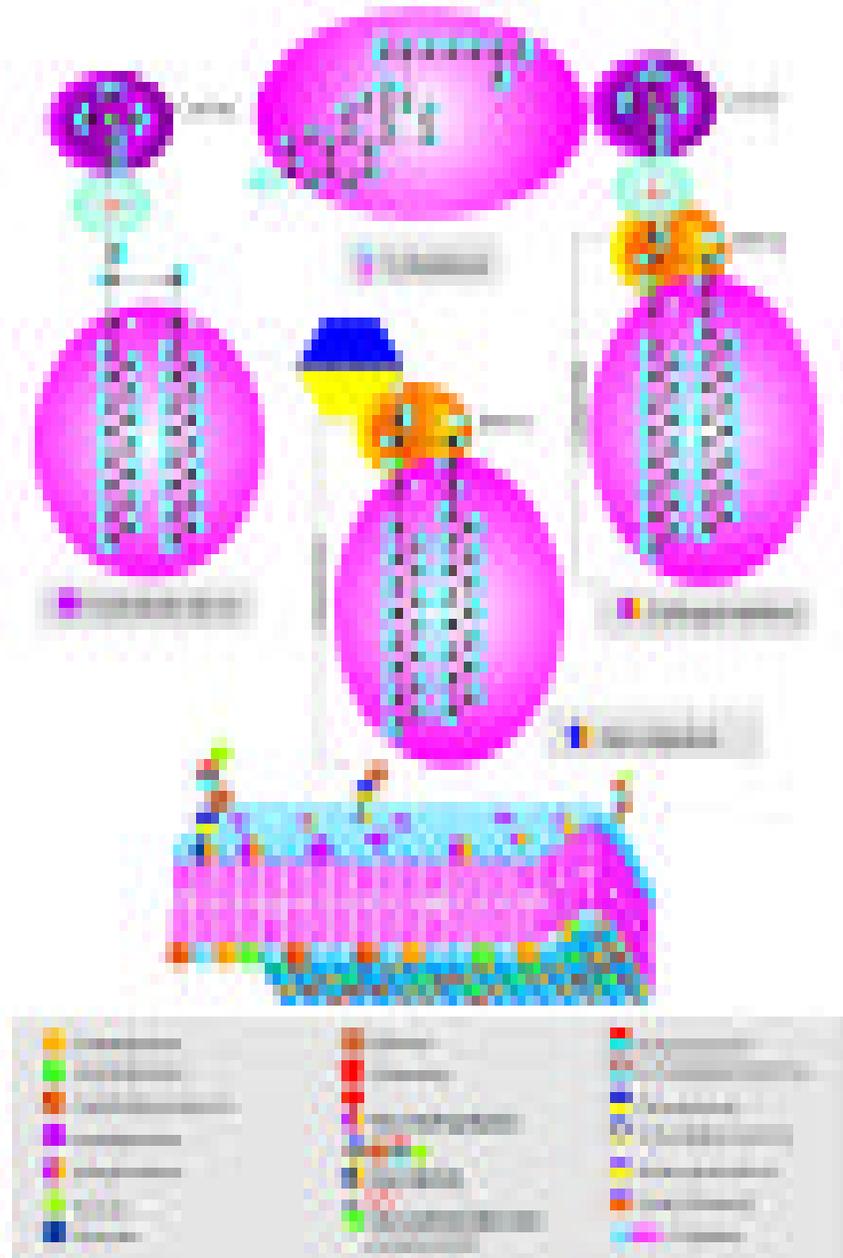
GRÁFICO 1. Estructura molecular de la lámina interna de la membrana celular



Los principales fosfolípidos de la lámina interna (LI) de la MC se representan con la disposición atómica (fórmula química) con un icono de color característico y que los representará en los esquemas de la MC. Asimismo, en cada fórmula también se señalan los dominios hidrófilos (celestes) y los dominios hidrófobos (rosados). En la representación esquemática de la MC, tanto en la LI como en la LE, la proporción de fosfolípidos, glucolípidos y colesterol son aproximadamente proporcionales a la realidad, para dar una idea tanto cualitativa como cuantitativa de cada uno de ellos. Así, los

fosfolípidos fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y el fosfatidilinositol (éste sólo está en la LI) se encuentran fundamentalmente en la LI, en tanto que la LE tiene glucolípidos, además de la fosfatidilcolina y la esfingomielin; estos dos últimos son los principales de la LE. Los cinco fosfolípidos representan la mitad de los lípidos de la MC, y la otra lo componen el colesterol (distribuidos uniformemente en ambas láminas, representado en celeste por una pequeña estructura hidrófila) y los glucolípidos.

GRÁFICO 2. Estructura molecular de la lámina externa de la membrana celular



Los constituyentes lipídicos fundamentales de las láminas de las MC animales son los fosfolípidos y el colesterol, organizados en una doble lámina lipídica hidrófoba (apolar y no iónica) en el interior (citoplasmático) e hidrófila (polar e iónica) en el exterior (luminal). El modelo biofísico del "mosaico fluido" de las MC acepta que estas láminas, LI y LE, sean siempre asimétricas en cuanto a la morfología y la composición de sus moléculas. Ambas tienen una faz interna y una externa, y hay un movimiento e intercambio muy lento de los lípidos entre ambas, que contrasta con su rápido movimiento lateral. En efecto, los fosfolípidos recién formados en el citoplasma se incorporan en el RE, siempre en la LE (citoplasmática), y gracias a unas enzimas específicas, las flipasas, pasan a la LI (luminal), todo esto en el RE. La fluidez

lateral de los lípidos es una de las características comunes entre la diversidad de MC de la naturaleza, que autoriza en el modelo de "mosaico fluido" el movimiento de todos sus componentes proteicos. Los lípidos se mueven lateralmente unas 100 veces más rápido que las proteínas, siendo la difusión de estas últimas suficiente y vital para su accionar fisiológico, ya que muchas moléculas proteicas, como enzimas, receptores de factores de crecimiento (RFC), receptores hormonales (RH) y receptores reguladores en general, sólo actúan cuando encuentran sus contrapartidas homólogas o heterólogas en la MC. Estos reencuentros y reacciones entre moléculas tan diversas son más rápidos que en el citoplasma (allí las moléculas están más dispersas) y esto se debe a la fluidez de la MC.

GRÁFICO 3. Histología molecular de la membrana celular

Los megadominios y microdominios están en equilibrio dinámico. Los *rafts* son conjuntos organizados de moléculas de colesterol, glucoesfingolípidos (GEL) y proteínas en ambas láminas [LE y LI] de la MC que no tienen una forma particular al microscopio óptico ni al electrónico. Su tamaño es de 70-300 nm y poseen unas 50-70 moléculas en total. Su distribución es asimétrica y heterogénea entre las dos láminas. Los *rafts* también se llaman DIGs (por *detergent insoluble glycolipid rich domains*), puesto que son insolubles al disecar las MC con detergentes. Fue así como se aislaron bioquímicamente. La principal función de los *rafts* (las cavéolas son una variación o forma particular de *rafts*) es servir como plataformas donde se concentran las moléculas de una determinada vía de señalización. Los *rafts* no permanecen estacionarios sino que se mueven lateralmente como pequeñas "balsas o islas" entre los megadominios "oceánicos" del resto de la MC. Los *rafts* tienen en su LE, además de las moléculas proteicas de los receptores donde comienza una vía de señalización, una concentración de proteínas unidas a glucofosfatidilinositol (GPI) y a su LI sobre todo moléculas de Ras o relacionadas con Ras.

La principal diferencia de las cavéolas con los *rafts* es su LI, donde se encuentra la proteína "caveolina", y las moléculas de "señalización": Src, proteínas G, PKC (fosfotirosina quinasa C) y Rho A (véase glosario). Las formas no bicapas (NB) son llamadas así porque las LE y la LI de este agrupamiento lipídico tienen fosfolípidos con regiones polares o hidrófilas de diferentes tamaños. En general los fosfolípidos con pequeñas cabezas polares y cadenas alifáticas cortas se encuentran en el extremo de un cono de protrusión, seudópodo o "un dedo de guante", y producen una fuerza lateral que hace que las láminas externas o internas se curven. Al mismo tiempo, alteran la conformación de las proteínas que se encuentran en estos dominios. Dos de los más claros ejemplos de estos microdominios se describen en la señalización de los TCR (sinapsis inmunológica) y en la propia sinapsis nerviosa y neuromuscular.



Finalmente, debemos decir que esta concepción actual de la MC, muestra que los lípidos participan de las vías de señalización y adherencia con la matriz extracelular (ME) y con otras células, en interacción con las proteínas. En efecto, los *rafts*, cavéolas y estructuras NB se identifican como agrupaciones específicas de proteínas y lípidos que participan en las regiones de adherencia con caderinas e integrinas y señalización de los mensajes extracelulares.

GRÁFICO 4. Las proteínas de la membrana celular. Los canales iónicos

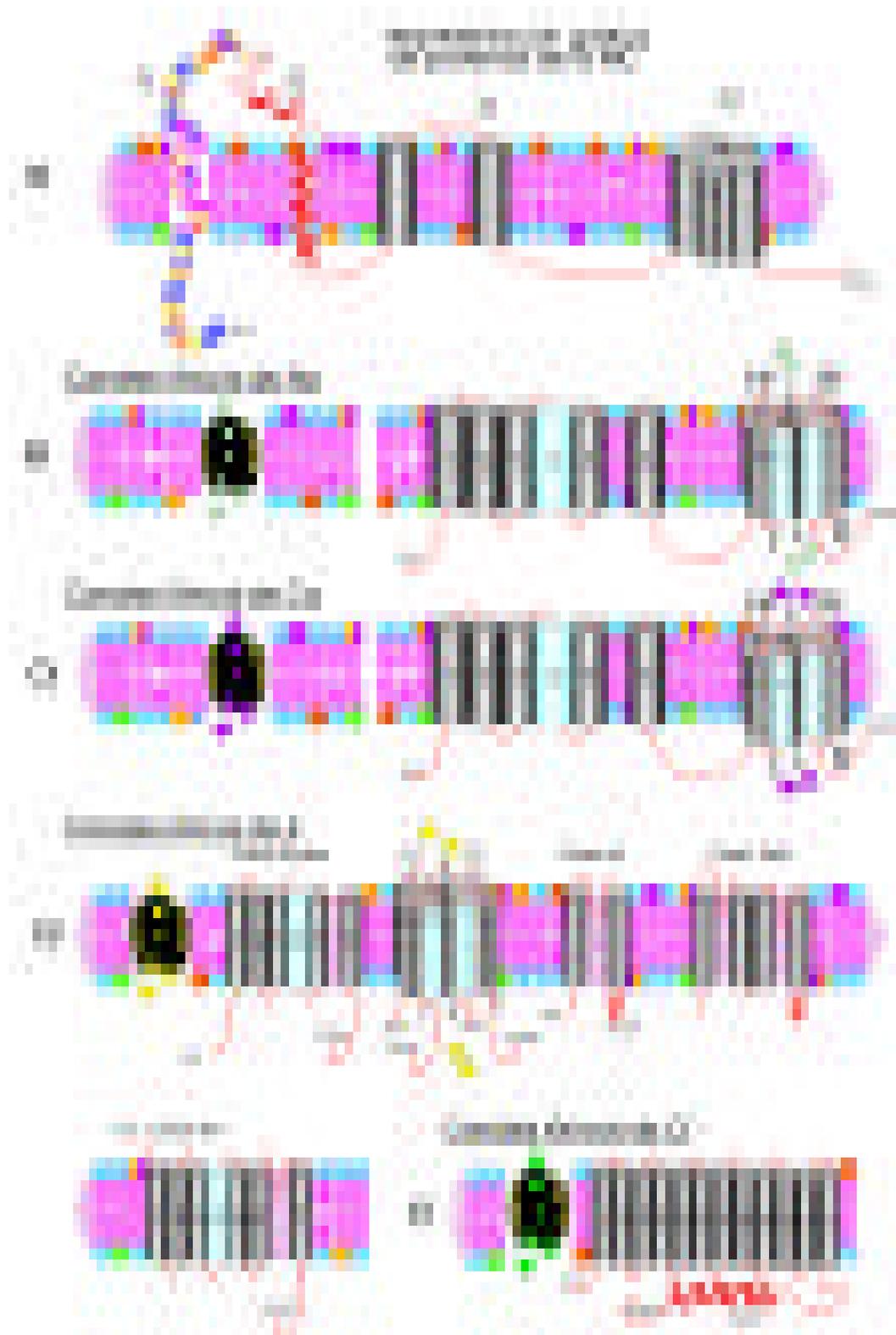


GRÁFICO 4. Las proteínas de la membrana celular. Los canales iónicos

B) Genética y estructura molecular de los CI de Na

a) CI de Na⁺ dependientes del voltaje. Estas glucoproteínas TM pertenecen, junto con los CI K⁺V y los CI de Ca²⁺V, a una gran familia de proteínas de estructura y funciones relacionadas. Las proteínas Na⁺V están constituidas por una sola proteína con cuatro grandes subunidades o dominios (I-IV) alfa, similares a las K⁺V, que tienen 6 bucles (S1-S6) TM cada una. El S1 es el bucle o segmento, que tiene el sensor del voltaje. Son proteínas politópicas y de tipo II y todos los dominios son seguidos por dominios intracelulares. Los dominios extracelulares, sobre todo el que liga S5 a S6, están N-glucosilados. En los CI Na⁺V del cerebro (a lo largo de los axones) hay dos subunidades TM beta 1 y 2, ligadas en forma no covalente y covalente, respectivamente, a la proteína principal. En las células esqueléticas sólo hay una subunidad beta 1 y no se conoce si la célula cardíaca tiene una.

b) CI de Na dependientes de ligando. Este grupo, el receptor (nicotínico) de la acetilcolina (el más estudiado es el del órgano eléctrico de la anguila *Torpedo californica*), es el prototipo de los CI dependientes de ligandos. Se encuentran en la MC de las células excitables posinápticas (por ejemplo, la célula muscular estriada, aunque también se encuentran en la MC presináptica). Este receptor consiste en cinco subunidades diferentes (2 beta, alfa, gamma y epsilon) que conforman un canal en la MC. Cada subunidad está compuesta por 4 bucles TM (en su mayoría compuestos de hélices alfa, ver *Glosario*), con un total de 20 en todo el receptor. Son proteínas TM politópicas de tipo I. El modelo muestra que cada uno de los cinco dominios colabora con un bucle TM para formar el poro del canal. Los dominios -sólo hay 2- que ligan la acetilcolina estarían en la subunidad alfa (véase CI de Ca).

La SF de los Mec-ENaC, son glucoproteínas (N-glucosiladas) con una estructura diferente a las anteriores, y forman un canal al reunir cuatro subunidades -2 alfa, 1 beta y 1 gamma- probablemente en forma tetramérica. Esta es la forma más frecuente, aunque otras asociaciones entre las subunidades pueden constituir canales funcionales. Cada una de ellas tiene dos bucles TM, (M1 y M2) y un largo segmento extracelular. Son proteínas oligotópicas y de tipo II. Tanto el dominio extracelular como el intracelular (los segmentos aminoterminales y carboxiterminales son más pequeños) conservan secuencias homólogas en toda la filogenia de esta SF. Esas regiones sugieren que tienen una participación directa en la especificidad del comportamiento biológico de estos canales. También están muy conservadas las secuencias del M2 y un corto segmento extracelular que lo precede, y, en menor medida, la del M1. Numerosas evidencias indican que los dominios extracelulares e intracelulares cumplen funciones de regulación, como detección de la concentración de Na⁺ en la luz ("sensor del Na⁺") o en el citoplasma. A esta SF pertenecen las proteínas mecanosensitivas y degenerinas (mec-4, mec10, deg-1 respectivamente), cuyos genes fueron descubiertos primero en el *C. elegans* como el gen de la unc-105, cuyo homólogo se expresa en el músculo estriado. La búsqueda de proteínas homólogas hizo que se descubrieran en el cerebro humano las BNaC1-BNaC2 (por *brain Na channel*), las ASIC (por *acid-sensing-ion channel*) y DRASIC (por *dorsal root acid-sensing-ion channel*). Las proteínas ASIC y DRASIC son dependientes del H, se encuentran en las células nocisensitivas y se abren durante el proceso de acidificación que produce el dolor en el medio

extracelular. Así serían los canales iónicos de tipo ASIC en las células gustativas de la lengua, donde son sensores en la transducción del gusto agrio y ácido. Finalmente, menos homóloga en sus estructuras moleculares, pero de la misma SF, es la FaNaCh, un canal dependiente de los péptidos. En efecto, el péptido, Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ (FMRFamida), descubierto primero en los moluscos, es el ligando de estas proteínas, con complejas y variadas funciones en el músculo cardíaco, el cerebro y el tracto gastrointestinal de los vertebrados. Sería un antagonista opioideo endógeno.

C) Genética y estructura molecular de los canales iónicos de calcio

a) Los VDCC, como otros CI dependientes del voltaje, tienen diferentes subunidades transcritas por distintos genes y a su vez, pueden tener cortes y empalmes (*splicing*) alternativos, generando diferentes proteínas a partir del mismo gen. Tienen cinco subunidades diferentes: alfa 1, alfa 2, beta, gamma y delta. La subunidad gamma sólo se encuentra en los VDCC del músculo esquelético. Las subunidades alfa 2 y delta forman un solo componente molecular (están ligadas covalentemente por puentes disulfuro). Los VDCC del cerebro tienen las subunidades alfa 1, alfa 2, delta y beta. La subunidad alfa 1, es la que forma el poro y es codificada por siete genes: A, B, C, D, E, G y S. Este último codifica la subunidad alfa 1 del músculo estriado. Los seis genes restantes pueden producir alternativamente hasta 18 proteínas distintas de alfa 1 en el cerebro. La subunidad beta, ubicada en el citoplasma, regula la inactivación del canal. Es producida por cuatro genes: 1, 2, 3 y 4, que, por el proceso de corte y empalme, producen ocho productos beta diferentes. Las subunidades alfa 2 y delta podrían ser productos de un mismo gen, que además, tiene cambios postranscripcionales y participarían en la regulación de la secreción. Estos múltiples productos proteicos, forman y explican las decenas de VDCC, al combinarse entre ellos.

Aun cuando hasta el presente ningún VDCC ha sido cristalizado, la estructura hipotética está también constituida por cuatro dominios, como los VDNaC y VDKC, con una sola proteína alfa 1 y con 6 bucles TM cada uno. Las proteínas gamma y alfa-delta tienen 4 y 3 bucles TM respectivamente y no se ligan covalentemente con la alfa 1. La beta es enteramente IC.

b) Los CI RiR, son homotetrámeros IC compuestos por subunidades topológicamente similares; en la región COOH-terminal, en el lado citoplasmático, tienen un dominio altamente conservado que forma el poro para el Ca²⁺. No se conoce con exactitud la región de unión a la rianodina (es un alcaloide vegetal de la *Ryania speciosa*, que tiene alta afinidad por el receptor). La porción NH₂ terminal es muy larga (*foot region*). También se encuentran del lado citoplasmático y forma una especie de hoja de trebol. Según este modelo, la región tendría de 4 a 10 bucles TM por subunidad, o sea, 16 o 40 por tetrámero de RyR.

D) Genética y estructura molecular de los CI de K

a) Los CI de K dependientes del voltaje son proteínas TM compuestas de subunidades alfa, bucles que forman el poro del canal, asociados algunas veces a subunidades beta citoplasmáticas. Este grupo está compuesto por dos grandes superfamilias (SF de genes-proteínas): la Kv (por K *voltage-activated*) y la Kir (por K *inwardly, rectifying*). La SF Kv está constituida (hasta ahora) por nueve subfamilias, Kv1- Kv9. Cuando se indica un segundo número, este indica el canal específico de esa subfamilia, por ej. Kv1.1 a Kv1.12. Cada

subunidad alfa contiene seis segmentos hidrofóbicos S1-S6- que atraviesan la MC en 6 bucles de hélices alfa. Entre los bucles S5-S6 existe el dominio H5 o P, que forma parte del poro; el bucle S4 es el dominio del sensor del voltaje. Las subunidades alfa pueden formar heterocomplejos proteicos con subunidades de distintos miembros de la misma subfamilia y no con otra. Todavía no se ha cristalizado ningún canal de esta SF, pero las modelizaciones muestran que está formado por un tetrámero de cuatro subunidades alfa. La SF de Kir, que incluye fundamentalmente los CI de secreción de K en los túbulos distales del nefrón, (véase más adelante), tiene como característica biológica su escasa dependencia del voltaje, lo que facilita el movimiento del K⁺ hacia el interior de la célula más que hacia el exterior. Este transporte preferencial en un sentido se denomina rectificación. La SF de Kir está constituida por siete subfamilias, -Kir 1,0 -Kir 7,0- que siguen la misma nomenclatura que la SF de Kv. La diferencia estructural con esta última es que las proteínas Kir, tienen subunidades alfa de solamente 2 bucles transmembranarios (llamados M1 y M2) y carecen de un dominio sensor del voltaje, como el S4 de las Kv. La primera estructura cristalizada de una proteína con dos bucles TM es la del ROMK.

- b)** Los CI de K dependientes del calcio (KCa), codificados por los genes Slo (por *slow-poke* de la *Drosophila*) y su equivalente humano, el hbr1, que genera la proteína BK (*big conductance*) en las células ciliadas del oído interno conservan muchas de las características estructurales de los CI dependientes del voltaje. En efecto, el gen codifica una proteína con 7 bucles TM, con regiones de homología -sobre todo los bucles equivalentes a S4-, y la región H5 de los CI dependientes del voltaje. Esto ubica las proteínas KCa, en la SF de los CI del K⁺, del Na⁺ y del Ca⁺⁺ dependientes del voltaje y los CI dependientes segundo mensajero.
- c)** La estructura genética molecular de los CI K dependientes del ligando es la de los receptores de la acetilcolina (ligando).
- d)** Los CI K (ATP) desempeñan un papel muy importante en muchas funciones celulares al acoplar la energía del metabolismo celular a la energía eléctrica de la célula. Primero fueron descubiertos en los miocitos cardíacos y luego, en muchos otros tejidos, incluidas las células beta del páncreas (donde determinan la secreción de insulina), las células musculares lisas y estriadas, las células renales y la mitocondria. Su estructura molecular es un heteromultímero de dos proteínas de orígenes completamente diferentes. Son dos tetrámeros: uno, de una subfamilia de la SF de las Kir, la Kir 6.0, y otro, de receptores de la sulfonilurea (RSU), que pertenecen a la gran SF de las proteínas ABC. Ya conocemos la estructura de la proteína Kir, en tanto que el RSU es una proteína politópica TM de 13 pasajes y de tipo I, con el dominio de unión al ATP intracelular. Los tetrámeros de ambas proteínas forman dos círculos concéntricos, donde el interior está formado por las cuatro subunidades Kir y el círculo exterior, por cuatro subunidades de RSU.
- e)** Los CI K dependientes de la estimulación por estiramiento, tienen mayor importancia en la regulación del volumen celular.

E) Genética y estructura molecular de los canales iónicos de Cl

- a)** Los diferentes miembros de la familia CIC se clasifican en tres subfamilias, en función de sus homologías y el grado de divergencia evolutiva de los genes que las producen. (Este es, en general, el criterio que se adopta para clasificar todas las SF, familias y subfamilias de proteínas). Una primera subfamilia está formada por CIC-1, CIC-2, CIC-Ka y el CIC-Kb. La segunda está constituida por CIC-3, CIC-4 y el CIC-5, con 80% de homología a nivel proteico con la primera. La tercera está formada por los CIC-6 y CIC-7. Todavía no hay acuerdo sobre un modelo definitivo de estas proteínas TM. Se acepta que los CIC son dímeros, cada uno de cuyas dos subunidades forma un canal, haciendo una suerte de estructura llamada en "canal doble". Cada subunidad está compuesta por 13 regiones hidrofóbicas (D1-D13), pero sólo 11 de ellas son bucles de alfa hélices TM. El segmento D4 estaría en el lado exterior y el D13 sería intracelular. La subunidad, es una proteína politópica de tipo II.
- b)** Los receptores del GABA y la glicina son muy similares y de igual constitución -con 5 subunidades con fuerte homología entre ellas- que el receptor de la acetilcolina. A diferencia de este último, son proteínas politópicas, pero las extremidades amino (NH₂) y carboxi (COOH) se encuentran del lado extracelular. Se encuentran sobre todo en la MC posináptica, aunque también en las MC presinápticas.
- c)** La CFTR es un miembro del dominio fijador de ATP, de la SF de las proteínas transportadoras ABC. Está presente en diferentes fenotipos, como el epitelio respiratorio e intestinal, conductos biliares, ácinos del páncreas, epitelios genitales masculino y femenino, glándulas salivales y sudoríparas. A pesar de tener la estructura molecular de este tipo de proteínas, tiene también la característica de comportarse funcionalmente como un canal iónico de cloro. Es la única proteína de esta SF con estas características. Al igual que otros miembros de esta SF, como la mdr-1 y RSU, también puede regular otras proteínas. En el caso de la CFTR, son varias las funciones que ejerce sobre otras proteínas: 1) El CI del cloro (ORCC, por *outwardly rectifying chloride channel*, cuyo gen produce una proteína de estructura aún desconocida) es activado positivamente, generando secreción de Cl⁻. 2) Regula negativamente la absorción de Na⁺ del ENaC. 3) Regula la acidificación de organelas, como las vesículas del apartado de Golgi. 4) Regula el tráfico de esas vesículas. 5) Regula los canales de K de la subfamilia Kir, como el ROMK en la MC basolateral. 6) Secreta también el ATP fuera de la célula estimulando una molécula TM transportadora de ATP. Ubicada predominantemente en la MC apical, la CFTR está compuesta por cinco dominios: 2 dominios TM (MSD, por *membrane spanned domain*), cada uno compuesto de 6 bucles (llamados M1 a M12), 2 dominios (NBD) intracelulares que ligan nucleótidos y un dominio regulatorio (R), también intracelular. Los MSD, especialmente los segmentos M5 y M6, forman el poro del canal, los NBD hidrolizan el ATP que regula la apertura ("*gating*") del canal, y la fosforilación del dominio R, la actividad global de la CFTR.

GRÁFICO 5. *Patologías de los canales iónicos. Nefrología molecular*

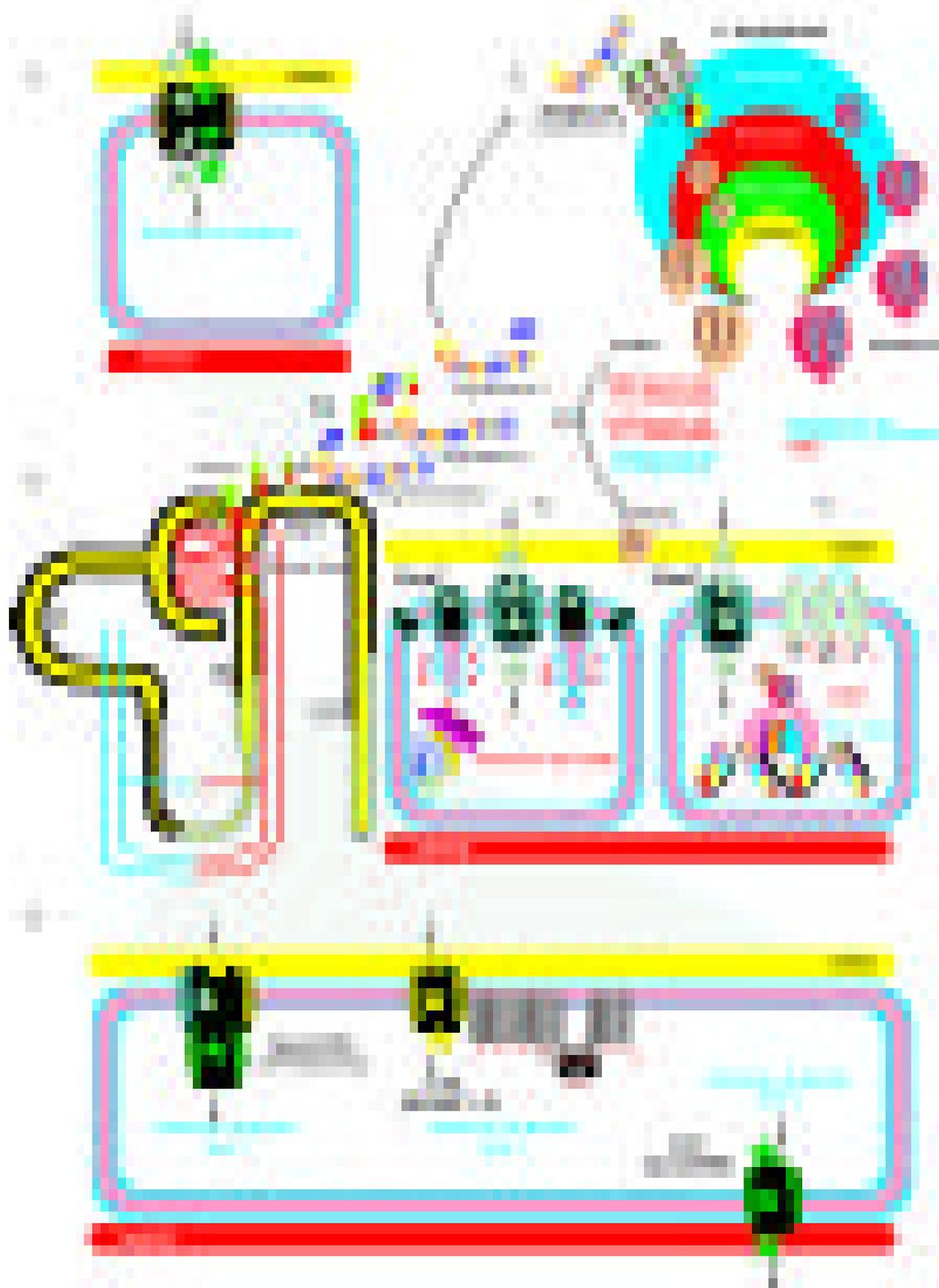


GRÁFICO 6. *Patologías de los canales iónicos. Nefrología molecular*

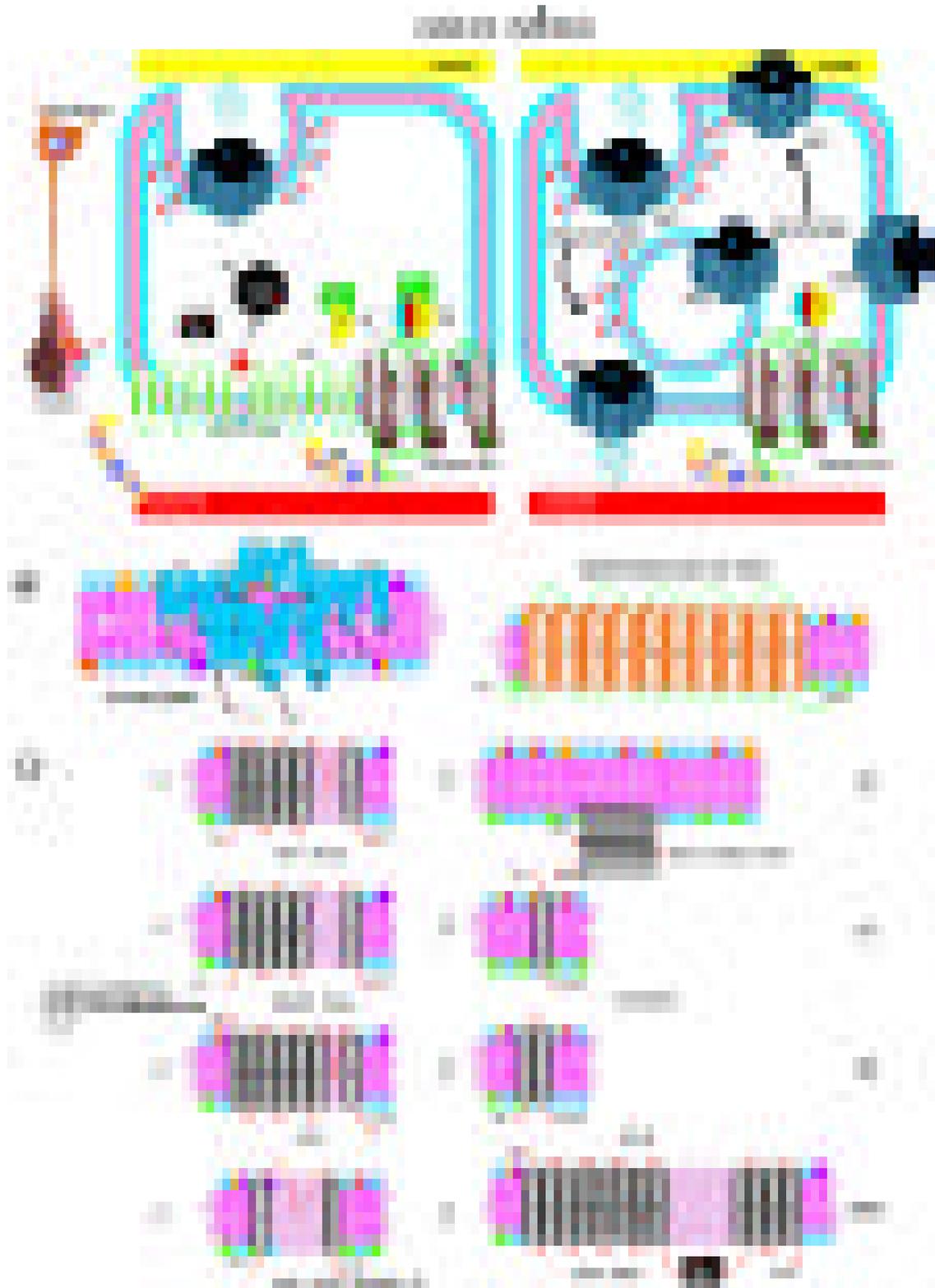


GRÁFICO 5. *Patologías de los canales iónicos. Nefrología molecular*

En este Gráfico los nombres de las enfermedades (en rojo) tienen en común la HT y las escritas en azul, hipertensión. Siempre mostramos las funciones normales de las proteínas que figuran y las patologías con deficiencia o aumento en su función explicadas en el texto. 1) Proyección de las células del TCD y el cotransportador Na⁺/Cl⁻ que, cuando no funciona, produce el síndrome de Gitelman. 2) La producción de aldosterona y de cortisol por la glándula suprarrenal. Todos los símbolos están nominados en el mismo Gráfico. 3) Esquema del nefrón con sus principales fragmentos que participan en la reabsorción de sal. 4) Proyección de las células del TCC, donde un defecto en los endosomas con clatrina aumenta el número y la persistencia de los canales ENaC. El síndrome de Liddle se genera por un "aumento de la función" de ese canal. 5) Aquí figura la estructura del ENaC y los nombres de las patologías que estimulan anormalmente el RMNC (como el cortisol no transformado en cortisona, como ocurre normalmente), los defectos en más o en menos de la secreción de aldosterona o el defecto por mutación del RMNC. 6) Los síndromes de Bartter y los respectivos canales afectados en cada tipo.

GRÁFICO 6. *Patologías de los canales iónicos. Nefrología molecular*

A) Desde la secreción de la arginina vasopresina (AVP) –después de la sensibilización de los osmorreceptores y barrorreceptores del hipotálamo- por la neurohipofisis hasta la estimulación de su receptor en las células renales del túbulo colector se han graficado partiendo desde la izquierda. Mostramos también la primeras etapas de la vía de estimulación de ese RCPG. Luego de recibir su ligando [la AVP (primer mensajero)], la proteína G se disocia y su fracción α estimula a la adenilciclase (la que tiene dos grandes segmentos de 6 dominios TM) que generará el cAMP, que a su vez estimulará a la PKA (por *protein kinase A*) (no mostrada en la figura). Esta seguirá estimulando la vía que lleva al gen de las acuaporinas 2 y hará aumentar su ciclo de expresión (exocitosis) y reabsorción (endocitosis) en la MC. También se ven las acuaporinas 3 y 4 en la parte basolateral de la MC de la célula epitelial renal. Estas serían constitucionales y no necesitarían de la acción de la neurofisiología. La alteración de algunas de esas proteínas es la causa de las diabetes insípidas hipofisarias y nefrogénicas explicadas en el texto.

B) Los complejos homotetraméricos de las acuaporinas en la MC. La AQP1 fue cristalizada en parte, pero su estructura real se conoció con la criomicroscopía electrónica. Todas las otras acuaporinas tienen similares estructuras tridimensionales. Este es el de un tetrámero y cada subunidad está compuesta por 6 bucles TM y dos ansas (*loops*) B en el citoplasma, entre los bucles TM 2 y 3. El ansa E, extracelular, se encuentra entre los bucles TM 5 y 6. Los dominios B (hemiporo-1) y E (hemiporo-2) portan los aminoácidos Asn-Pro-Ala, (NPA). Estos dominios NPA forma cuatro poros independientes (el "hourglass") dentro del tetrámero.

La distribución tisular es la siguiente:

Grupo a) La AQP1 está en el epitelio renal en la MC apical (ribete en cepillo) y basolateral. Ella sola, debido al gran número de moléculas, podría reabsorber los 150 litros de agua que los glomérulos filtran diariamente. Se la encuentra también en los endotelios capilares peribronquiales, en el plexo coroideo, en

varios tejidos del ojo y en el epitelio hepatobiliar. Aunque la AQP1 parecería ser esencial, existen seres humanos que carecen de expresión de esta proteína, son las personas que no tienen el grupo sanguíneo menor Co (por Colton) –que en realidad es parte de la proteína AQP1- y que, sorprendentemente, no presentan fenotipo alguno de enfermedad. Los ratones KO toleran el defecto hasta que están privados de agua, cuando se descompensan. La AQP2, que es regulada por la vasopresina, se expresa sólo en las células principales del conducto colector de la médula interna (IMCD, por *inner medule collecting duct*). La AQP2 no se encuentra constitutivamente sobre la MC apical, sino que su expresión es regulada por la vasopresina, que a través de su receptor en la MC basolateral, induce al cAMP, y éste induce al gen de la AQP2. Los tetrámeros que se forman en el borde citoplasmático de la MC (vesículas de exocitosis) se fusionan en la MC mientras están estimuladas. Cuando desaparece el estímulo vuelven al citoplasma por un mecanismo de endocitosis, donde son probablemente degradadas en los proteosomas (*shuttle*). En la evolución, el riñón alcanzó más precozmente el perfeccionamiento actual que el sistema nervioso. Este último utiliza vesículas presinápticas para transmitir la información entre las células excitables, que se fusionan del mismo modo con la MC del pie del axón para ser excretadas. Es más, una serie de proteínas que participan en la exocitosis presináptica, están presentes en las células renales.

Las AQP0 y 6 presentan como particularidad una permeabilidad por el agua de un orden de magnitud más bajo que la AQP1. La AQP0 se expresa exclusivamente en las fibras de los ligamentos del cristalino, donde desempeña un papel en la circulación del agua. Un defecto congénito autosómico dominante de su gen, en los ratones, causa el fenotipo del "cat mice", cuya característica son las cataratas congénitas. La AQP6 se expresa en las células intercalares del túbulo colector del nefrón, en las MC de vesículas de IC. La AQP4 predomina en los tejidos del cerebro, donde se expresa en la MC de los astrocitos que está en contacto con los endotelios vasculares. Desempeñaría un papel mayor en el transporte del agua en el edema cerebral. También está presente en las células gliales que se encuentran en contacto con las neuronas neurosecretorias de la vasopresina, donde funcionaría como un osmorreceptor. A diferencia de las otras acuaporinas, no es sensible al mercurio. La AQP5 se encontró primero en las células secretorias de las glándulas salivales; también se encuentra en las glándulas lagrimales y en los neumocitos alveolares de tipo 1 (que derivan de las células del epitelio tipo 2 que secretan los surfactantes, pero que carecen de AQP5). Esta ubicación hace pensar que desempeña un papel en la secreción de saliva, lágrimas y en la humidificación del aire alveolar. La AQP8 está presente en el testículo, colon, páncreas, hígado y en otros tejidos, y todavía se sabe poco sobre su papel funcional.

Grupo b) Las acuagliceroporinas son multifuncionales, permeables al agua, glicerol y otras moléculas como la urea. La AQP3, como las otras de este subgrupo, tiene diferencias estructurales, con un motivo GLYY (Gli, Leu, Tir, Tir) en el ansa C y un motivo aspartato NPARD (Asn, Pro, Ala, Arg, Asp) cerca del segundo dominio NPA, que hacen a la diferencia de moléculas que dejan pasar. Aunque la actividad funcional de la AQP3 no se conoce totalmente, su expresión en la MC basolateral del epitelio del tubo colector la ubican en el circuito acuoso, regulado por la AVP. Muchos otros fenotipos celulares la expresan en menor cantidad, especialmente en el epitelio nasofaríngeo, donde se sospecha su papel en las secreciones de la mucosa, como en las rinitis alérgicas. Su presencia en la MC del glóbulo rojo puede facilitar el uso del glicerol para la criopreservación de los hematíes. La AQP7 está presente en la

MC del esperma (donde el glicerol sirve para criopreservarlos), y en los adipocitos, donde sugiere exportación del glicerol durante la lipólisis. Una forma alternativa de ésta, es la AQP7L (así llamada por ahora por el HGNC). La AQP9 fue encontrada en los leucocitos, donde permite el pasaje del agua y de la urea, pero no del glicerol. No se conoce demasiado sobre su papel funcional real.

Los órganos como el riñón, vías aéreas, ojos y cerebro, tienen tejidos con diferentes y complejas expresiones de las acuaporinas. Muchos datos indican que esos complejos funcionan con las mismas vías acuosas. Finalmente, presentes en todo el reino viviente, podemos mencionar las acuaporinas vegetales, las dos principales: PIP (por *plasma membrane intrinsic protein*) en la MC, donde regula la absorción y la excreción del agua y las TIP (por *tonoplast intrinsic protein*) ubicadas en las vacuolas, regulan la turgencia celular. Estudiadas en la *Arabidopsis thaliana* (donde se describieron más de 23 AQPs) una de ellas, la gamma TIP, es la primera AQP introducida en la MC

del oocito del *Xenopus* donde se reveló la homóloga de la AQP1 animal). Los dos subgrupos de AQP, están presentes en todas las bacterias, tanto eubacterias como arqueobacterias.

Ultraestructura del transportador de la urea (TU que no es un CI) con 10 dominios TM. Se encuentra en la rama delgada descendente del asa de Henle y en el TCC. Hay un solo gen con cortes y empalmes alternativos que induce la síntesis de dos UT1 y UT2. Este gen también es estimulado por la secreción de AVP. Junto con la reabsorción de Na y agua, la reabsorción de urea constituye el mecanismo fundamental de la concentración de orina.

C) Los CI de K son heterocomplejos de proteínas (subunidades α y β). A pesar de que se conocen hasta ahora unos 60 genes diferentes de subunidades α y β sólo forman tres subfamilias estructurales diferentes: Shaker, Kir y TWIK. En el Gráfico ponemos, a la derecha de cada proteína las subunidades que facilitan su expresión en la MC o modifican las propiedades biofísicas y farmacológicas de los CI de K.

BIBLIOGRAFÍA

- Bichet DG. Nephrogenic diabetes insipidus. *Am J Med* 1998; 105:432-442.
- Jameson JL. Principles of Molecular Medicine. London: Human Press Inc, 1998.
- Lifton RP, Gharavi AG, David SG. Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell* 2001; 104: 545-556.
- Lasage F, Barhanin J, Maneton P. Le transport du potassium: aspects moléculaires et pathologiques. *Médecine/Sciences* 2000; 16: 663-673.
- Davies K. After the genome: DNA and human disease. *Cell* 2001;104:465-467.
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The calcium entry pas de deux. *Science* 2000; 287:1604-1605.
- Zhou M, Morais-Cabral J, Mann S, MacKinnon. Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature* 2001; 411:657-661.
- Koolman J, Rohm. *Biochimie. Médecine-Sciences Flammarion*. 1997.
- Pelmont J. Enzymes. Catalyseurs du monde vivant. Collection Grenoble Sciences. 1995.
- Foskett JK. CIC and CFRT Chloride Channel Gating. *Annu Rev Physiol* 1998; 60:689-717.
- Meir A, Ginsburg S, Butkevich A, Kachalsky SG, Kaiserman I, Ahdut R, Dermigoren S, Rahamimoff R. Ion channels in presynaptic nerve terminals and contpapel of transmitter release. *Physiol Rev* 1999; 79:1019-1070.
- Catterall WA. Structure and function of voltaje-gated ion channels. *Ann Rev Biochem* 1995; 64:493-531.
- Garty H, Palmer LG. Epithelial sodium channels: Function, structure, and regulation. *Physiol Rev* 1997; 77:359-388.
- Borgnia M, Nielsen S, Engel A, Agre P. Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. *Ann Rev Biochem* 1999; 68:425-458.
- Repetto HA. El aporte de la biología molecular al conocimiento de la hipertensión arterial genética. Editorial. *Medicina (Buenos Aires)* 1999; 59: 109-110.