

El volumen celular se regula por canales de agua - aquaporinas, proteínas integrales de la membrana celular

AC Dr. Guillermo Whitembury^a

Dr. Antonio M. Gutiérrez^a

Dra. Miriam Echevarría^b

Las aquaporinas (AQPs), proteínas integrales de la membrana celular (MIPs), son los (largamente buscados) canales o poros de agua¹, a través de los cuales el agua se mueve en una sola fila (fila india) atravesando la bicapa lipídica de la membrana celular para regular el volumen celular. Son tetrámeros de monómeros, todos funcionales de ~28kD de peso molecular. Los estudios de biofísica dan una imagen funcional y física del poro acuoso, por el cual pasan ~10¹³ moléculas de agua por segundo (velocidad miles de veces mayor que la de los canales iónicos). Por consiguiente, los poros acuosos son fundamentales en la regulación del volumen celular. La imagen biofísica del poro acuoso se confirma por la «real» obtenida recientemente de la secuencia de aminoácidos, estudios de cristalografía y otros avances de la era de la «clonación» de las AQPs. No cubrimos aquí los canales para-celulares (de un ancho de ~11Å) usados para el flujo de agua en epitelios «anchos» como el túbulo renal proximal y el intestino delgado [Pappenheimer 1989; Whitembury, Reuss 1992; Whitembury, Hill 2000].

ERA BIOFÍSICA

Introducción

Muchas de las ideas básicas sobre la estructura de la membrana plasmática se desarrollaron a comienzos de 1900. Overton y Collander establecieron que la permeabilidad de la membrana celular a diversas

substancias era proporcional a su lipo-solubilidad [Kleinzeller en Deamer, et al. 1999, pp. 1-22]. Luego vino la teoría del tamiz lipídico. Desde 1945, numerosos estudios experimentales ampliaron nuestro concepto del rol de los lípidos de la membrana y de las proteínas que están insertadas en ella; así en el modelo de Davson y Danielli algunas proteínas que atraviesan la membrana son poros polares [Davson 1989; Finkelstein 1987] que después han resultado ser canales iónicos y de agua.

La biofísica avanzó notablemente para conocer las vías acuosas, que son notables porque el agua da señal sólo: (a) por los cambios de volumen producidos por el movimiento neto de agua o (b) cuando se usan isótopos para marcar el agua; es difícil usar métodos para detectar (a) y (b) en células aisladas pequeñas.

El agua puede cruzar las membranas celulares o por solubilidad en su fase lipídica, o por canales especiales independientes (o por ambas vías). En la década de 1950, Pappenheimer y Koefoed-Johnsen, y Ussing [Pappenheimer 1989; Ussing 1989] encontraron como diferenciar entre esas posibilidades [Finkelstein 1987; Tosteson 1989]; y Solomon [1968, 1989] (siguiendo un dicho de Galileo²) inventó y desarrolló ingeniosos métodos de flujo detenido (stop-flow) y equipos con resolución temporal de milisegundos para medir las altas permeabilidades difusiva (P_d) y osmótica (P_{os}) al agua de la membrana celular de eritrocitos, para averiguar si esta última tenía o no poros acuosos.

Brevemente los investigadores mencionados notaron que:

1. En la ecuación de Pouiseuille para flujo hidrodinámico, la permeabilidad osmótica (p_{os}) al agua por canal, definida como el flujo neto de agua

a Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Apartado 21827, Caracas 1020-A, Venezuela.

b Laboratorio de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Fisiología y Hospital Universitario Virgen del Rocío, Universidad de Sevilla E. 41013 Sevilla, España.

¹ Usaremos indistintamente los términos canales o poros.

a través de un tubo cilíndrico, secundario a la aplicación de una diferencia de presión hidrostática u osmótica, es proporcional a la cuarta potencia del diámetro (d) de la luz de ese tubo (d^4).

- En la ecuación de difusión de Fick, la permeabilidad a la difusión de agua por canal (p_d), medida con marcadores de agua (permeabilidad isotópica, p^*), también a través de un tubo es proporcional al cuadrado del diámetro de su luz (d^2).
- De modo que al tomar la razón de permeabilidades p_{os}/p_d desaparecen varias incógnitas resultando la ecuación 1 (Ecu 1)³, que es mucho más simple:

$$p_{os}/p_d = [2 - (1 - \alpha)^2] Kd^2 + 1 \quad (\text{Ecu 1})$$

En Ecu 1 la razón de permeabilidades es proporcional a d^2 y se puede despejar y obtener d; en Ecu 1, $\alpha = \delta/d$; $K = RT/8\eta D_w V_w$; R es la constante de gases; T la temperatura absoluta; η la viscosidad del agua, D_w el coeficiente de difusión del agua, $\delta = 2.8\text{\AA}$ es el diámetro de una molécula de agua, V_w el volumen molar parcial del agua, y d el diámetro del tubo o cilindro, que en el caso de membranas biológicas se toma como el diámetro del poro equivalente [Solomon 1968, 1989]. Si la razón $p_{os}/p_d = 1.0$ no hay poros acuosos y si $p_{os}/p_d > 1.0$ sí los hay. Solomon y colaboradores encontraron razones p_{os}/p_d de ~ 3 ó más, mostrando que sí habían poros acuosos en la membrana de los eritrocitos⁴.

- Además, Solomon [1968, 1989] midió la dependencia de la temperatura de p_{os} y de p_d para calcular sus energías de activación aparente (E_a) (en eritrocitos). Encontraron que en ambas permeabilidades E_a era $\sim 4\text{kcal/mole}$, que es el valor que se obtiene para el movimiento de agua en solución libre. Esto indicaba muy poca interacción entre el interior del poro y las moléculas de agua que circulan por su interior, confirmando que poros acuosos perforan la membrana de los eritrocitos. La teoría predecía que altos valores de E_a ($\sim 10\text{kcal/mole}$) indicarían tanta interacción entre membrana

y agua que sugerirían que en estas circunstancias la agua cruzaría la membrana celular disolviéndose en la bicapa lipídica, y no por poros acuosos, como se analiza a continuación.

- Efectivamente, una década más tarde, Macey encontró que el reactivo de sulfidrilos (proteínicos), el mercurial pCMBS (para chloro-mercuri-benzene-sulphonic acid) inhibía, siempre en eritrocitos p_{os} y p_d al 10% de su valor original (sin pCMBS), al tiempo que la razón p_{os}/p_d bajaba de ~ 3 a ~ 1 ; mientras que E_a subía de ~ 4 a $\sim 10\text{kcal/mole}$ [Macey y Farmer 1970; Solomon 1989]. Así, Macey demostró: (a) que los poros acuosos de los eritrocitos son proteínas; (b) que pCMBS los «cierra»; y (c) que el $\sim 10\%$ de p_{os} y p_d que queda en presencia de pCMBS refleja el flujo de agua (restante) que atraviesa la parte de la membrana formada por la bicapa lipídica.
- La urea (con un diámetro molecular $\sim 5.4\text{\AA}$) no se mueve por el poro acuoso [Macey y Farmer 1970; Finkelstein 1987, 1993; Parisi 1983; Whittembury y col. 1984]. Por consiguiente, el d del poro acuoso tiene que ser menor que 5.4\AA . Si esto es así, en un poro tan angosto no hay sitio para que dos moléculas de agua (que ocupan 5.6\AA , porque $2\delta = 2 \times 2.8\text{\AA}$) puedan estar una al lado de la otra dentro del poro; donde sólo hay espacio para una «fila india» de moléculas de agua.

Ahora aclararemos porqué cuando d disminuye por debajo de 5.6\AA , p_{os}/p_d ya no indica el diámetro del poro. La línea azul en la Fig.1 es la línea teórica que resulta de graficar p_{os}/p_d o p_{os}/p^* en función de d. El símbolo \bullet representa la razón p_{os}/p_d para los canales de anfotericina B (Ampho B en la Fig.1) con $d = 8\text{\AA}$, y para los de nistatina [Finkelstein 1987, 1993]. Nótese que las razones de permeabilidad para nistatina y Ampho B caen en la línea teórica. Por consiguiente, para poros con este d, los valores de p_d (obtenidos con marcadores) representan fielmente el coeficiente de permeabilidad difusiva dentro del poro, (p_d) y d se puede obtener de p_{os}/p_d usando Ecu 1, como se ha usado para obtener las curvas teóricas de Fig. 1. Cuando $d < 5.6\text{\AA}$ ($<$ dos veces el diámetro del agua, δ), las moléculas de agua no pueden moverse libremente dentro del poro. En estas circunstancias, p^* subestima p_d ; y $(p_{os}/p_d) < (p_{os}/p^*)$ porque la actividad específica del isótopo del agua dentro del poro no representa la actividad específica de la solución libre. En otras palabras, si uno fuera a calcular d de (p_{os}/p^*) , uno obtendría un valor de d (en este caso $\sim 12\text{\AA}$) falsamente alto. Esto se ilustra como \blacktriangledown en la

² «Cuando haga experimentos, mida lo que se puede y haga medible lo que no se puede medir todavía».

³ En Ecu 1 se pueden usar permeabilidades por canal (p) o permeabilidades de toda la membrana (P), porque $P = p \times n$. Donde n es el número de canales por unidad de área de membrana; y n se cancela cuando se toma la razón de permeabilidades [Fig. 1].

⁴ Es sorprendente que estos conceptos de teorías de hidrodinámica macroscópicas se cumplan hasta «poros» tan pequeños en los que d es sólo un poquito mayor que el diámetro de una molécula de agua, σ [Solomon 1989; Finkelstein 1987].

Fig. 1. ▼ representa p_{os}/p^* para el bien estudiado poro de gramicidina A (Grami A en la Fig. 1). Dentro del poro de Grami A, que tiene $d=4\text{\AA}$ (medido con exactitud en modelos), la permeación de agua es en fila india [Finkelstein 1987, 1993], ▼ está por encima de la predicción teórica. Lo que se enfatiza con la línea interrumpida, que indica que p_{os}/p^* sobreestima p_{os}/p_d (porque p^* subestima p_d) [Finkelstein 1987, 1993].

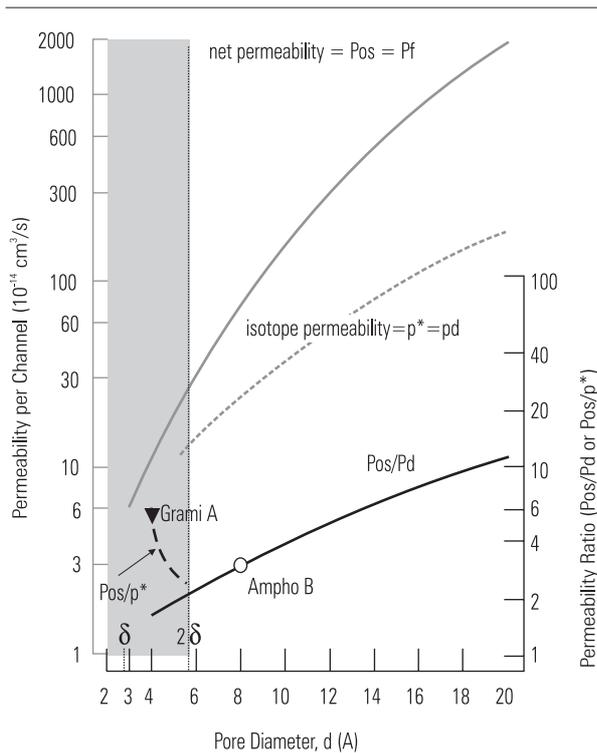


Fig. 1. Permeabilidades por canal (p) (ordenada izquierda, en rojo) vs. diámetro del poro (d). La línea roja continua es p_{os} (o p_f) del poro unitario vs. d en el rango de 2.8 a 20Å para un cilindro. La línea roja interrumpida es la permeabilidad difusiva del poro unitario (p_d) que es igual a la permeabilidad isotópica (p^*). Se detiene a $d=5.6\text{\AA}$ (línea vertical). La ordenada azul (a la derecha) es p_{os}/p_d o p_{os}/p^* dibujada vs. d como la línea azul continua. El área sombreada indica que cuando $d < 5.6\text{\AA}$, p_{os}/p_d y p_{os}/p^* difieren. ○ es p_{os}/p_d para los canales de anfotericina B (Ampho B) y nistatina (con $d=8\text{\AA}$), cuya razón de permeabilidades cae en la línea teórica. ▼ es p_{os}/p_d para el canal de gramicidina A (Grami A), a través del cual el agua se mueve en fila india [Finkelstein 1987]. La diferencia entre la línea azul interrumpida que une ▼ con la línea azul continua ilustra que $(p_{os}/p^*) > (p_{os}/p_d)$, porque p^* subestima p_d . En estos cálculos se usó Ecu 1 [modificado de Whittembury y Reuss 1992].

⁵ El Mersalil también inhibía P_{bos}^{pc} in vitro e in vivo, a dosis terapéuticas, sugiriendo que parte de la acción de los «viejos diuréticos mercuriales» pudiera deberse por su acción sobre P_{os}^{cb} [Whittembury y col. 1984].

Permeabilidad osmótica de la membrana peritubular (P_{os}^{cb}) del túbulo renal proximal de conejo (PST): experimentos de control, efecto del pCMBS, efecto de la temperatura, E_a

Hicimos observaciones, como las descritas para eritrocitos, en las células epiteliales del túbulo proximal recto del riñón de conejo, PST. Tuvimos que desarrollar un procesador de imágenes y métodos especiales para medir P_{os} y P_d ³ con resoluciones temporales de 50-60ms, y espaciales de 30nm. Para cada experimento, se disecó un PST del riñón de conejo y se le sostuvo con micropipetas en una cámara especial. Se cambiaba el baño (en 80ms) a una solución 30mOsm/l anisomótica. Seguimos los cambios en el volumen de la luz y de las células (en línea) con un procesador de imágenes de diseño original [Whittembury y col. 1986]. En los experimentos control P_{os}^{cb} era de $\sim 50-90 \times 10^{-4} \text{cm}^3/\text{s}$ por cm^2 de área de membrana basal por unidad en la diferencia de presión osmótica a través de la membrana, que decrecía a ~ 15 a 20% de esos valores en presencia de pCMBS. E_a (kcal/mol) era de ~ 3.2 (en los controles) y ~ 9.2 (en los túbulos tratados con pCMBS). Por consiguiente se concluyó que las membranas basolaterales de los PST estaban perforadas por poros acuosos proteínicos, que eran reversiblemente «cerrados» por pCMBS⁵, pues la acción de los mercuriales (pCMBS y Mersalil) se revertían con 5mM dithiothreitol (DTT) [Whittembury y col. 1984, 1986].

Permeabilidad difusiva de la membrana peritubular de PST, P_d . Razones P_{os}/P_d ³.

Para calcular P_d usamos resonancia magnética nuclear de protones en suspensiones de células y medidas del coeficiente de difusión de $^3\text{H}_2\text{O}$ en células empaquetadas de PST. Los resultados con ambos métodos coincidieron: 197 y 193im/s, respectivamente. Estos valores bajaron a 14im/s con pCMBS y se revirtieron con DTT. E_a fue ~ 2.9 (controles) y 9.0 (pCMBS). Las razones P_{os}/P_d en los controles fueron de ~ 15 , y bajaron a ~ 2.5 con pCMBS, indicando que el reactivo mercurial «cierra» los canales de agua [Echevarría y col. 1994; Whittembury y Reuss 1992]. De la razón P_{os}/P_d de 15 se obtiene un valor de $d \sim 24\text{\AA}$, que es un valor no real, incompatible con el hecho que las membranas de PST excluyen solutos como rafinosa, sucrosa y manitol, con diámetros moleculares mucho menores que 24Å. De acuerdo a lo previamente descrito, el poro acuoso de las membranas celulares de PST podría

ser de una sola fila. Esto se analizó directamente estudiando las propiedades de tamizado del poro de agua, con la interacción entre agua y solutos.

Interacciones agua-solutos: los coeficientes de reflexión (σ) a varios no-electrolitos indican que el agua debe moverse en una sola fila dentro del poro de agua

Con los métodos resumidos, PST que estaban en medio isoosmótico se sumergieron por 20s en un baño hiperosmótico por adición de los siguientes solutos, uno por vez: NaCl, KCl, rafinosa (R), sacarosa (S), manitol (M), glicerol (G), etilenglicol (E), urea (U), acetamida (A) y formamida (F). Los PST se «encogieron» osmométricamente en menos de 500ms con todos los solutos (excepto con F), y continuaron «encogidos» sin recobrar su volumen original. Se calculó el coeficiente de reflexión σ , que fue de 1.00 con todas las moléculas (excepto F). Con F el volumen de los PST casi no se redujo y rápidamente se recuperó a sus valores originales. Esto indicaba que el σ de F era menor que 1.00 (~ 0.62)⁶. Estos resultados indicaron que como G, E, U y A no permean el poro, dentro del poro o canal de agua solo hay sitio para que las moléculas de agua se muevan en una sola fila. Esto es, el diámetro del poro acuoso de la membrana del PST sería muy angosto para que las moléculas de agua ($d=2.8\text{Å}$) se adelanten unas a otras dentro de él [Parisi y Bourguet 1983].

Longitud del filtro de selectividad del poro de agua

Aproximamos una primera solución con las ecuaciones de «fila india» [Finkelstein 1987] en las que la razón P_{os}/P_d lleva al número de moléculas de agua $N=15-18$ en línea dentro de la parte angosta (filtro de selectividad) del poro. Una segunda solución surge de las ecuaciones de la teoría bi-modal de la osmosis [Hill 1995] que indican que el filtro de selectividad tendría 4-6 moléculas de agua en una longitud de unos 16-20Å [Whitttembury y col. 1997]. Esta predicción teórica ha sido confirmada por difracción de electrones y modelos [Agre 2004]. Obviamente, debe haber una parte ancha entre el angosto filtro de selectividad y el citosol, y otra hacia la

⁶ Pensando retrospectivamente, en el caso de F, con $\sigma \sim 0.62$, usamos en 1995 factores de corrección que nos llevaron a la conclusión errónea de que F también penetraba el poro acuoso, por lo que asignamos a d un valor de 4.2-4.7Å [Gutiérrez y col. 1995]. Estudios estructurales recientes de aquaporina-1 indican que d en la parte angosta del filtro de selectividad es muy poco mayor que los 2.8Å del diámetro δ de la molécula de agua [Agre 2004].

solución externa que baña la membrana [Whitttembury y col. 1997], modelo como el de un reloj de arena [Jung y col. 1994, referencia 12 en Agre 2004].

LA ERA DE LA CLONACIÓN Y LA BIOLOGÍA MOLECULAR

La revolución de las aquaporinas llegó por serendipia

Después de muchos años de evidencias biofísicas comprobando la presencia de canales proteínicos específicos responsables del movimiento de agua a través de la membrana celular, que se resumen arriba, en 1992 se hizo la identificación molecular del primer canal de agua, con el descubrimiento de la proteína llamada CHIP-28 [Preston y col., referencia 7 en Agre 2004], que es una proteína llamada ahora aquaporina-1 (AQP1). Peter Agre y su grupo, estudiando proteínas de la membrana de eritrocitos relacionadas con el grupo Rh, aislaron una proteína integral de membrana (en inglés MIP) con 28kDa de peso molecular, que siempre co-purificaba con la proteína-Rh de 32kDa que les interesaba. Identificaron los aminoácidos de algunas regiones y clonaron el cDNA del gen de una biblioteca de médula ósea. Tenían por consiguiente un gran conocimiento de esta proteína, incluyendo la subestructura de sus varias sub-unidades [Smith 1991, referencia 5 en Agre 2004], cuando haciendo la transcripción *in vitro* e inyectando su cRNA en ovocitos de *Xenopus* descubrieron, después de «shocks» hipoosmóticos en los ovocitos, que CHIP28 era realmente el canal de agua de la membrana celular [Agre 2004].

Las AQPs son miembros de la superfamilia MIP que funcionan como canales de agua especializados para facilitar el transporte de agua en las membranas celulares de animales, plantas, bacterias y hongos. En el hombre se han identificado hasta ahora 13 AQPs (de la 0 a la 12), que, por su estructura genómica se pueden dividir en cuatro grupos:

- 1) AQP0, 1, 2, 4, 5, 6
- 2) AQP3, 7, 9, 10
- 3) AQP8
- 4) AQP11, 12

Por su selectividad las AQPs pueden clasificarse en:

- 1) Las estrictamente selectivas al agua (AQP0, 1, 2, 4, 5, 8)
- 2) Las que también son permeables al glicerol (AQP3, 7, 9, 10) que se llaman aqua-glicero-porinas.

Estructura de las aquaporinas

Las AQP1 son proteínas pequeñas con pesos moleculares entre 26 y 35kDa. La secuencia primaria (Fig. 2) forma dos repeticiones en tándem, cada una de las cuales tiene tres dominios de α -hélices transmembranales (numerados de 1 a 6), conectados por cuatro asas (A, B, C, D), con sus terminales amino y carboxilo orientados hacia el citoplasma. Las asas B (citoplásmica) y D (extracelular) contienen un motivo Asn-Pro-Ala (NPA) que están conectados entre sí por el doblamiento dentro de la membrana de ambas asas, de modo tal que forman un solo poro acuoso transmembranal en cada sub-unidad (monómero) de AQP. La estructura que resulta es una constricción angosta que se abre más ampliamente a los lados extra e intracelular de la membrana y que se llama el «modelo en reloj de arena». En la membrana las AQP1 forman tetrámeros en los que cada sub-unidad contiene un canal de agua (Fig. 3). Este arreglo tetramérico da a cada monómero una conformación muy estable dentro de la membrana. La estructura tri-dimensional de la AQP1, determinada por criomicroscopía electrónica de cristales bidimensionales de AQP1 [Walz y col. 1997], confirmaron la organización básica propuesta para cada subunidad de AQP1 y la formación del complejo tetramérico en la membrana.

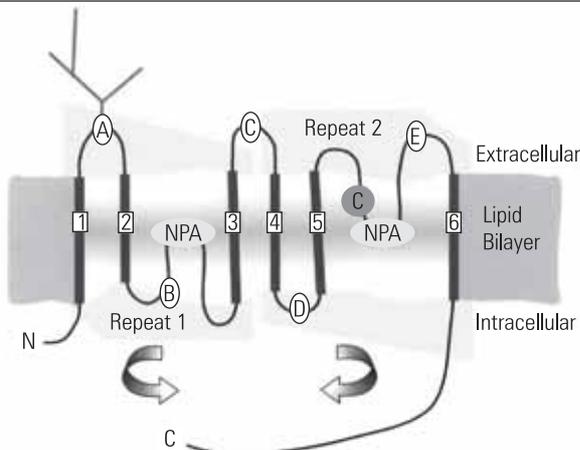


Fig. 2. Orientación en la membrana de una sub-unidad de AQP1 que se predice de su secuencia primaria de aminoácidos (esquema). La proteína tiene dos unidades que se repiten en tándem. Cada una tiene tres dominios que atraviesan la bicapa de la membrana (1, 2, 3, para la repetición 1; y 4, 5, 6, para la repetición 2). Estas unidades están una 180° en relación a la otra. Están unidas por cinco asas (A, B, C, D, E). Las asas B y E contienen los motivos conservados asparragina, prolina, alanina [Asn-Pro-Ala, NPA]. La cisteína 189 (C) controla la permeabilidad del poro cuando se bloquea con pCMBS y HgCl₂ [Agre 2004, ref. 11]. El asa A tiene un sitio de glicosilación (verde).

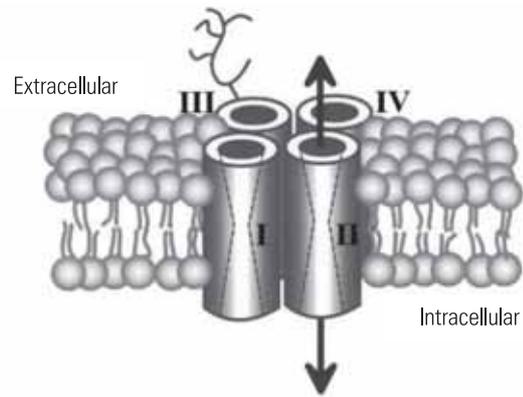


Fig. 3. Cuatro unidades de AQP1 (I, II, III, IV), cada es un poro de agua, se agrupan como un tetrámero.

Finalmente, la estructura atómica de AQP1 se ha determinado con resolución de 3.8Å (Murata y col. 2000, ref. 14 en Agre 2004). Esto ha permitido una correlación precisa entre aminoácidos específicos y la estructura tridimensional de la AQP1. Imágenes cristalográficas confirmaron que los seis dominios de α -hélices transmembranales forman un paquete de «mano derecha» en el cual la estabilidad se debe a los grandes ángulos de cruce de las hélices, por contactos locales entre los bordes de las hélices y surcos, y por interacciones entre sitios conservados (con glicinas) en los puntos de cruce. Estos estudios también confirmaron que las asas B y E son α -hélices cortas que se proyectan hacia el centro de los haces en un ángulo de 90° para formar la parte angosta del canal de agua (Fig. 4 y 5). Ambas asas interactúan por medio de los

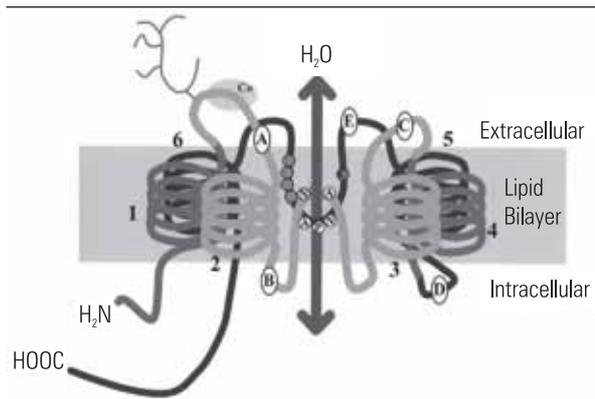


Fig. 4. Modelo en reloj de arena de la topología en la membrana de una sub-unidad de AQP1 (esquema). Co es la región relacionada con el grupo sanguíneo Rh; Co es el antígeno Colton [Smith y col. 1994, ref. 23 en Agre 2004]. Aminoácidos altamente conservados se marcan con círculos azules. C es la cisteína 189. Las asas B y E se doblan y sobrepone dentro de la bicapa lipídica para formar un solo poro acuoso.

dos tripletes NPA y se mantienen juntos por fuerzas de van der Waals entre las prolinas (P, Pro). Las dos asparraginas (N, Asp) convergen para delimitar parcialmente la parte más angosta del canal (~3Å). La superficie (cubierta) hidrofóbica dentro del poro adyacente a las dos Asn (76 del asa B y 192 del asa E) de los motivos NPA, está formada por Ile 60 (hélice 2), Phe 24 (hélice 1), Leu 149 (hélice 4) y Val 176 (hélice 5).

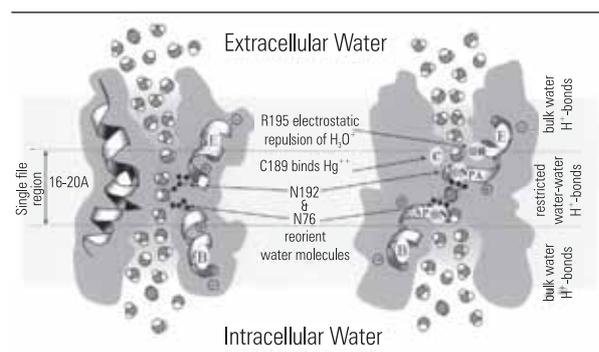


Fig. 5. Esquema de una sección sagital de una sub-unidad de AQP1 para ilustrar cómo pasan las moléculas de agua por su interior. Las partes anchas extra e intracelulares del poro están separadas por una región angosta de ~16-20Å de largo a través de la cual los dipolos de agua se mueven en fila india [Whitttembury y col. 1997]. En las partes anchas los dipolos de agua mantienen entre ellos sus enlaces H (e-H) usuales (no se muestran). En la región de la fila india los dipolos de agua interactúan con los aminoácidos. Esto impide la formación de e-H entre las moléculas de agua. Se piensa que la carga positiva fija de la arginina (R195) produce repulsión electrostática. Esto hace que los dipolos de agua se reorienten porque sus oxígenos forman e-H con las asparraginas N192 y N76 de los tripletes NPA. Otros aminoácidos restringen físicamente y rompiendo la cadena de protones (mecanismo Grotthus) impiden su flujo continuo que movería protones de un lado al otro del poro. Modificado de Agre 2004.

Bases moleculares de la selectividad de la AQP1

En general, las AQPs son impermeables a solutos cargados y a iones, incluyendo protones. Lo angosto del poro acuoso no es la única explicación de la selectividad de las AQPs. De acuerdo al modelo atómico de la AQP1, la selectividad de la constricción del poro está críticamente determinada por los residuos de las dos Asn (Asn 76 and Asn 192) cuyos grupos amido se proyectan hacia la luz del poro, y por el campo electrostático generado hacia el centro del poro por la orientación de las hélices B y E con sus terminales-C que miran hacia fuera del poro. Por consiguiente, cuando una molécula de agua se acerca al centro de la membrana, los átomos de oxígeno se orientan para

formar enlaces hidrógeno (e-H) con aquellos grupos amido, rompiendo entonces los e-H con las moléculas de agua vecinas, estableciendo mas bien, primero un e-H y luego dos e-H con los residuos Asn (Fig. 5). En la constricción del poro, la molécula de agua puede formar e-H sólo con el oxígeno, pero ni por medio de los átomos de H, ni con las paredes hidrofóbicas del poro. Como consecuencia, las moléculas de agua permean el poro, pero la ruptura de la continuidad de sus e-H impide la transferencia de protones por el interior del poro que es lo que ocurre normalmente en el agua libre en que los protones forman «un alambre de protones» descrito por Grotthus [Murata y col. 2000, ref. 14 en Agre 2004, Tajkhorshid y col. 2002, ref. 18 en Agre 2004].

Las AQP1 serían permeables al CO₂. Células que expresan AQP1 [Cooper y col. 2002] muestran una velocidad de descenso del pH intracelular, significativamente más rápido, después que se burbujea la solución extracelular con CO₂, que cuando no hay CO₂ ó cuando se ha bloqueado la AQP1 con mercuriales. Estos experimentos indican que el transporte de CO₂ a través de la membrana plasmática es facilitado por la AQP1, aunque se necesitan aproximaciones más directas y fisiológicas para aclarar datos contradictorios y para quizás ampliar el posible papel de la AQP1 como un canal permeable a otras moléculas volátiles.

Distribución tisular y regulación de las AQPs

Las AQPs están distribuidas ampliamente y prácticamente en todos los tipos celulares del cuerpo humano, con pocas excepciones [Takata y col. 2004] (cuadro 1).

Frecuentemente hay más de una AQP en los órganos típicamente diseñados para transportar grandes volúmenes de agua como el riñón. La distribución de cada AQP es muy particular: algunas son ubicuas (AQP1, 3, 8 y 9), mientras otras se expresan sólo en un tejido (AQP0 y AQP2). En el cerebro hay tres AQPs (AQP1, 4 y 9) [Amiry-Moghaddam y Ottersen 2003, ref. 45 en Agre 2004]. La AQP1 se expresa en la membrana apical del epitelio del plexo coroideo, mientras que la AQP4 se expresa en la membrana basolateral de las células endocitiales, en los pies terminales de los astrocitos que rodean los capilares cerebrales y en las lamelas gliales de las regiones osmo-sensibles. Se conoce menos la distribución cerebral de la AQP9, pero recientemente se la ha encontrado expresada en neuronas.

Aquaporina	Distribución
AQP0	Ojo (cristalino).
AQP1	Eritrocitos, cerebro, riñón, traquea, corazón, placenta, útero, vejiga urinaria y uretra, vesícula biliar, testículo, pulmones, bronquios, conductos biliares, piel, endotelio vascular, ojo.
AQP2	Riñón (conducto colector).
AQP3	Riñón, tracto gastrointestinal, hígado, páncreas, bazo, próstata, ojo, glándulas sudoríparas y lacrimales, pulmón, eritrocitos, útero, vejiga urinaria, uretra.
AQP4	Cerebro, tracto gastrointestinal, riñón, médula ósea, pulmón, músculo esquelético, ojo, glándula lagrimal, oído.
AQP5	Glándula salivar, glándula lacrimal, pulmones, tracto gastrointestinal, ojo.
AQP6	Riñón.
AQP7	Espermatozoides, testículos, tejido adiposo, riñón, corazón, músculo esquelético, tracto gastrointestinal.
AQP8	Hígado, páncreas, testículo, placenta, útero, glándula salivar, intestino delgado, colon, vesícula biliar, corazón.
AQP9	Tejido adiposo, corazón, colon, leucocitos, hígado, cerebro, riñón, intestino delgado, pulmones, bazo, testículo, médula ósea.
AQP10	Intestino delgado.
AQP11	Riñón.
AQP12	Páncreas, ojo

Cuadro 1. Distribución tisular de las AQPs.

Las AQPs son proteínas integrales de la membrana celular, excepto las AQP6, 11 y 12 que están localizadas permanentemente en vesículas intracelulares. La permeabilidad al agua de las AQPs varía. Algunas son muy permeables como la AQP1 (3×10^9 moléculas de agua/s, por monómero), y otras poco permeables (AQP0), o son reguladas por hormonas y/o factores extracelulares como el pH. Algunas AQPs tienen secuencias de fosforilación conservadas para la proteína-kinasa A (AQP2, 5 y 9) o para la proteína-kinasa C (AQP4, 5 y 7) que probablemente regulan la apertura o la distribución sub-celular de estas proteínas. Por ejemplo, la permeabilidad al agua inducida por vasopresina depende estrictamente de la fosforilación de la Ser-256 de la AQP2. De otro lado, la concentración de protones regula la permeabilidad al agua y glicerol de AQP3 [Zeuthen y Klerke 1999, ref. 61 en Agre 2004] y la AQP6 se hace permeable a agua y cloruro por cambios de conformación que ocurren a $\text{pH} < 5.5$ [Yasui y col. 1999]. AQPs como las AQP1, 2, 5, y 8 pueden estar doblemente localizadas, pueden exhibir una localización

dual y bajo la acción de hormonas específicas se translocan entre vesículas intracelulares en las que están localizadas y la membrana apical, como ocurre con la AQP2 en las células principales de los túbulos renales colectores, que permanece en vesículas subapicales después de ser sintetizada. El alza de AMP cíclico inducido por la vasopresina, a través de receptores V2, dispara un mecanismo complejo que guía la fusión de las vesículas cargadas de AQP2 a la membrana apical, que entonces se vuelve permeable al agua [Nielsen y col. 1993, ref 21 en Agre 2004; Ford y col. 2005].

Agentes mercuriales como HgCl_2 o pCMBS inhiben la permeabilidad al agua de casi todas las AQPs que se conocen [Whittembury y col. 1984; Echevarría y col. 1993] por interacción con una cisteína localizada en el primer o segundo conjunto NPA del poro acuoso (Fig. 2). Sin embargo, la permeabilidad de la AQP4 no es afectada por los mercuriales; y la permeabilidad al agua de la AQP6 se aumenta cuando es expuesta al HgCl_2 . También se ha descrito regulación en la transcripción de la expresión de AQPs. En el riñón, la privación de agua aumenta el mRNA para AQP2, 3 y 4 [Murillo y col. 1999]. Un aumento crónico de vasopresina aumenta la regulación de la expresión del mRNA de AQP2 debido a la interacción directa del AMP cíclico con elementos que responden específicamente a su promotor. En el pulmón, tratamiento con corticoides inducen expresión de AQP1.

AQPs y patología

Muchas patologías están asociadas a alteraciones en alguna AQP. Gran variedad de enfermedades en el que el manejo que hace el organismo del agua es anormal están asociadas a mala función renal y en muchos casos, se ha demostrado que hay alteraciones en alguna AQP. Entre las diferentes formas de diabetes insípida nefrogénica heredada (NDI) hay una asociada a mutaciones de la AQP2 que hace que la AQP2 no funcione como canal de agua o que la AQP2 no pueda moverse hacia la membrana apical de las células del túbulo colector (de Mattia y col. 2005). Como consecuencia, en estos pacientes que tienen grandes poliurias, la respuesta a la vasopresina está críticamente limitada. Más aún, se conocen casos de NDI adquirida en los pacientes psiquiátricos que reciben tratamiento de litio, en casos de obstrucción ureteral bilateral, en hipercalcemia crónica, en hipokalemia, en los que toman agua compulsivamente, en insuficiencia renal crónica o en la NDI inducida por la edad. En modelos animales de

estos casos hay una expresión reducida de AQP2 en los túbulos colectores. Por el contrario, se observa expresión aumentada de AQP2 en casos de secreción inapropiada de hormona antidiurética (SIADH), en insuficiencia cardíaca congestiva y durante el embarazo (Nielsen y col. 2002). En el ojo, donde el transporte de líquidos es tan importante, hay varias AQPs. El mantenimiento de la presión intraocular (AQP1 y 4), de la transparencia de la cornea y del cristalino (AQP0, 1, y 5), la traducción de la señal visual (AQP4), la formación de lágrimas y la función de la barrera conjuntival (AQP3 y 5), requieren la expresión apropiada y la función adecuada de estas AQPs. Por ejemplo, mutaciones de la AQP0 están relacionadas con formación de cataratas. Se conoce un papel importante del metabolismo del glicerol en las AQP3 y AQP7. En ratones a los que se induce que no tengan AQP7, se observa gran acumulación de grasa y grandes adipocitos en comparación con las cepas normales. Estos experimentos dan base para investigar si la «sobre-regulación» (upregulation) de AQP7 puede utilizarse como terapia en algunas formas de obesidad. En accidentes vasculares cerebrales, tumores cerebrales, traumatismos, infecciones virales y algunas enfermedades acompañadas de inflamación cerebral, el edema cerebral es causa importante de mortalidad. Estudios con ratones sin AQP4 (AQP4-knockout) (Verkman 2005) muestran convincentemente que la AQP4 es fundamental en la entrada o salida de agua del cerebro. Por consiguiente, el conocimiento de la regulación de la función o expresión de AQP4 puede ayudar a controlar el edema cerebral. Además, se ha mostrado que la membrana de los pies terminales de los astrocitos participa en la eliminación del K^+ del espacio sináptico después de intensa actividad neuronal. Modelos animales con distribución alterada de la AQP4 en sus astrocitos muestran incremento en la severidad de sus crisis epilépticas, sugiriendo que la AQP4 puede jugar papel importante en patologías asociadas con alteraciones en la homeostasis de los iones en el cerebro.

Agradecimientos

A Choclo Monge, gran maestro y amigo. Es un gran placer agradecer a los señores Luis F. Álvarez y Mardonio Díaz por su experta ayuda. Este trabajo fue apoyado en parte por donativos del Instituto de Salud Carlos III PI 030296 y Junta de Andalucía, 68/04 a ME y de CONICIT, (FONACIT) y Fundación Polar a GW y AMG.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agre, P. Aquaporin Water Channels (Noble Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* 43: 4278-4290, 2004
2. Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP. The molecular basis of water transport in the brain. *Nature Reviews* 4: 991-1001, 2003.
3. Cooper GJ, Zhou Y, Bouyer P, Grichtchenko II, Boron WF. Transport of volatile solutes through AQP1. *J. Physiol* 542: 17-29, 2002.
4. Davson H. Biological Membranes as Selective Barriers to Diffusion of Molecules, en Tosteson DC, editor. *Membrane Transport: People and Ideas*. American Physiological Society, Bethesda Maryland, 1989. pp15-49.
5. Deamer DW, Kleinzeller A, Fambrough DM. Membrane Permeability, 100 years since Ernest Overton. *Current topics in Membranes*. Academic Press, N York. 48: 423pp, 1999.
6. De Mattia F, Savelkoul PJ, Kamsteeg EJ, Konings IB, van der Sluijs P, Mallmann R, Oksche A, Deen PM. Lack of arginine vasopressin-induced phosphorylation of aquaporin-2 mutant AQP2-R254L explain dominant nephrogenic diabetes insipidus. *J. Am. Soc. Nephrol* 16: 2872-2880, 2005.
7. Echevarría M, Gonzalez E, Gutiérrez A, Whittembury G. Water and urea diffusive permeabilities in isolated proximal tubule cells. *Am. J. Physiol.* 267: F709 F715, 1994.
8. Echevarría M, Frindt G, Preston G, Milovanovic S, Agre P, Fischbarg J, Windhager EE. Expression of multiple water channel activities in *Xenopus* oocytes injected with mRNA from rat kidney. *J. Gen. Physiol*, 101: 827- 841, 1993.
9. Echevarría, M., Ilundáin, A.A., Aquaporins. *J. Physiol. Biochem.* 54: 107-118, 1998.
10. Finkelstein A. *Water Movement Through Lipid Bilayers, Pores and Plasma Membranes. Theory and Reality*. New York, John Wiley and Sons, 1987.
11. Finkelstein A. The water permeability on narrow pores, en: *Isotonic Transport in Leaky Epithelia*, H.H. Ussing, J. Fischbarg, O. Sten-Knudsen, E.H. Larsen EH, N.J. Willumsen, J. Hess-Thaysen, editores. Alfred Benzon Symposium No 34, Copenhagen: Munksgaard, pp. 487-503, 1993.
12. Ford P, Rivarola V, Chara O, Blot-Chabaud M, Cluzeaud F, Farman N, Parisi M, Capurro C. Volume regulation in cortical collecting duct cells: role of AQP2. *Biology of the cell.* 97: 687-697, 2005.
13. Gutiérrez AM, González E, Echevarría M, Hernández CS, Whittembury G. «The proximal straight tubule (PST) basolateral cell membrane water channel; Selectivity characteristics.» *Journal Membrane Biol*, 143: 189-97, 1995.
14. Hill AE. Osmotic flow in membrane pores. *Int. Rev. Cytology* 163: 1-42, 1995.
15. Macey RI, Farmer REL. Inhibition of water and solute permeability in human red cells. *Biochimica et Biophysica Acta.* 211: 104-106, 1970.
16. Murillo-Carretero M, Ilundáin AA, Echevarría M. Regulation of aquaporins mRNA expression in rat kidney by water intake. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10: 696-703, 1999
17. Nielsen S, Digiovanni SR, Christensen EI, Knepper MA, Harris HW. Cellular and subcellular immunolocalization of vasopressin-regulated water channel in rat kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11663-11667, 1993

18. Pappenheimer JR. Flow and Diffusion Through Biological Membranes, en Tosteson DC, editor. Membrane Transport: People and Ideas. American Physiological Society, Bethesda Maryland, 1989, pp 363-389.
19. Pappenheimer JR, Madara JL. Role of active transport in regulation of junctional permeability and paracellular absorption of nutrients by intestinal epithelia, en Isotonic Transport in Leaky Epithelia, H.H.Ussing, J. Fischbarg, O. Sten-Knudsen, E.H. Larsen EH, N.J. Willumsen, J. Hess-Thaysen, editores. Alfred Benzon Symposium No 34, Copenhagen: Munksgaard, pp. 221-232, 1993.
20. Parisi M, Bourguet J. The single file hypothesis and the water channels induced by antidiuretic hormone. *J Membrane Biol.*, 71: 189-193, 1983.
21. Preston GM, Piazza-Carrol P, Guggino WB, and Agre P. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 256: 385-387, 1992.
22. Solomon, AK. Characterization of biological membranes by equivalent pores. *J Gen. Physiol.* 51: 335s-364s, 1968.
23. Solomon AK. Transport Pathways: Water movement Across Cell Membranes, en Tosteson DC, editor. Membrane Transport: People and Ideas. American Physiological Society, Bethesda Maryland, 1989, pp 125-153.
24. Tajkhorshid E, Nollert P, Jensen Mø, Miercke LJW, O'Connell J, Stroud RM, and Shulten K. Control of the selectivity of aquaporin water channel family by global orientational tuning. *Science* 296: 525-530, 2002.
25. Takata, K, Matsuzaki T, Tajika Y. Aquaporins: water channel proteins of the cell membrane. *Prog Histochem Cytochem.* 39: 1-83, 2004.
26. Tosteson DC, editor. Membrane Transport: People and Ideas. American Physiological Society, Bethesda Maryland, 1989.
27. Ussing HH. Epithelial Transport: Frog Skin as a Model System, en Tosteson DC, editor. Membrane Transport: People and Ideas. American Physiological Society, Bethesda Maryland, 1989, pp 337-362.
28. Verkman, AS. Novel roles of aquaporins revealed by phenotype analysis of knockout mice. *Rev. Physiol Biochem Pharmacol.* 2005. August 10. E-pub ahead of print.
29. Walz T, Hirai T, Murata K, Heymann BJ, Mitsuoka K, Fujiyoshi Y, Smith BL, Agre P, and Engel A. The three-dimensional structure of aquaporin-1. *Nature* 387: 624-627, 1997.
30. Whittembury G, Carpi-Medina P, González E, Linares H. Effect of parachloromercury-benzene-sulfonic acid and temperature on cell water osmotic permeability of proximal straight tubules. *Biochim. Biophys. Acta* 775: 365-373, 1984.
31. Whittembury G, Gonzalez E, Gutierrez AM, Echevarria M & Hernandez CS. Length of the selectivity filter of Aquaporin-1. *Biology of the Cell* 89: 299-306, 1997
32. Whittembury G, Hill AE, Coupled transport of water and solutes across epithelia. En, *The Kidney, Physiology and Pathophysiology*, 3rd edition, (D. Seldin, G. Giebisch, editors.) New York: Lippincott Williams & Wilkins, Chapter 14, pp 341-362. 2000.
33. Whittembury G, Lindemann B, Carpi-Medina P, González E, Linares H. Continuous measurements of cell volume changes in single kidney tubules. *Kidney International*, 30:187-191, 1986.
34. Whittembury G, Reuss L.. «Mechanisms of coupling of solute and solvent transport in epithelia». En: *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*, 2nd edition, (D. Seldin, G. Giebisch editors.) New York: Raven Press, Chapter 11, pp.: 317-60. 1992.
35. Yasui M, Hazama A, Kwon TH, Nielsen S, Guggino WB, Agre P. Rapid gating and anion permeability of an intracellular aquaporin. *Nature* 402: 184-187, 1999.
36. Zeuthen T, Klaerke DA. Transport of water and glycerol in aquaporin 3 is gated by H⁺. *J. Biol. Chem* 274: 21631-21636, 1999.

Correspondencia: Académico Correspondiente Dr. Guillermo Whittembury
Instituto Venezolano de Investigación Científicas (IVIC), Apartado 21827,
Caracas 1020-A, Venezuela
Correo electrónico: gwhitt@ivic.ve