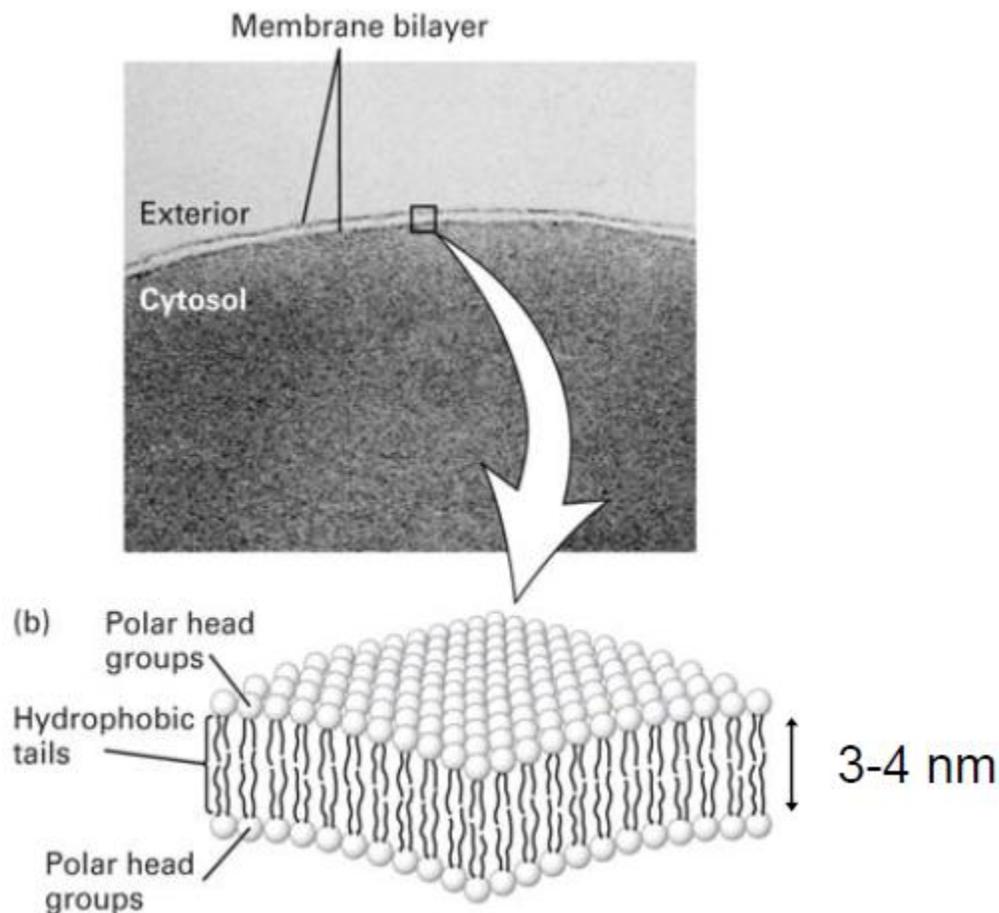
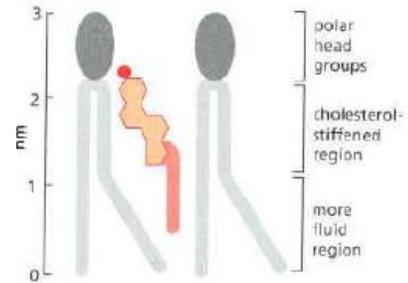
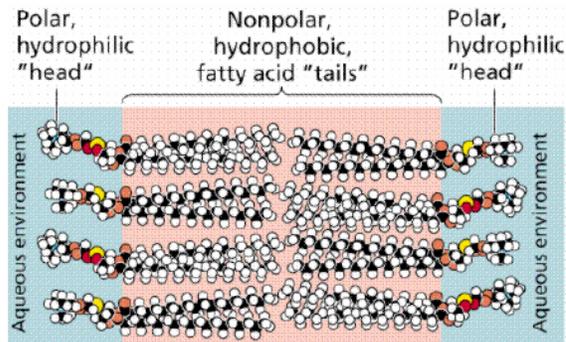


### Biofísica del transporte a través de la membrana plasmática

Sabemos que la **membrana plasmática** presenta una estructura llamada **bicapa lipídica**, esto es: una membrana delgada que forma una barrera relativamente impermeable al agua, hecha de dos capas de moléculas de lípidos. Los lípidos que la componen son, en orden de abundancia: **fosfolípidos**, **colesterol** y **glicolípidos**. Estos lípidos son **antipáticos**, es decir, poseen un extremo hidrófilo o **polar** (dibujado como esfera) y otro hidrófobo o **no polar** (dibujado como líneas zigzagueantes). La fluidez de la bicapa depende de su composición: así; una bicapa formada exclusivamente por **fosfolípidos saturados** (no poseen dobles enlaces), genera una estructura rígida. La presencia de **fosfolípidos insaturados** (poseen dobles enlaces) hacen que la membrana sea fluida. Otro elemento que modifica la fluidez de la bicapa lipídica, es la presencia de **colesterol**, muy abundante en las membranas de células animales, que sirve para brindar estabilidad mecánica de la membrana orientando su grupo OH hacia la porción polar de la bicapa y la estructura de sus anillos se coloca entre las cadenas de los fosfolípidos, aumentando la fluidez.

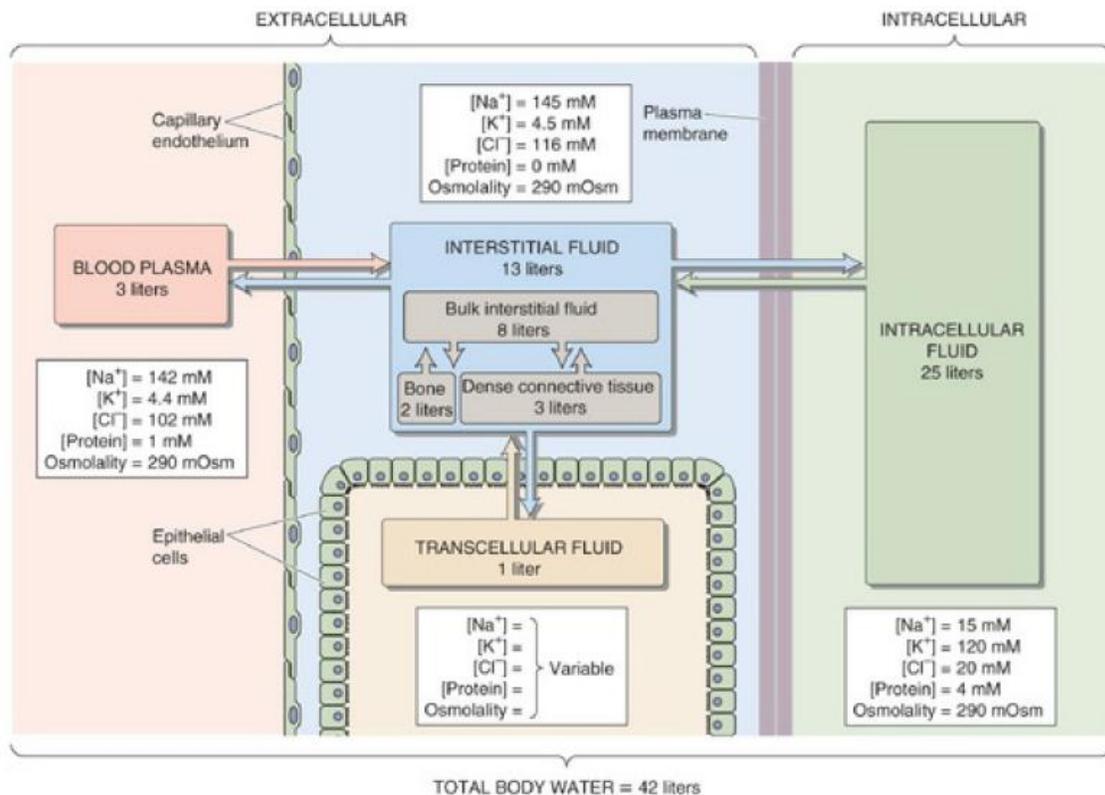




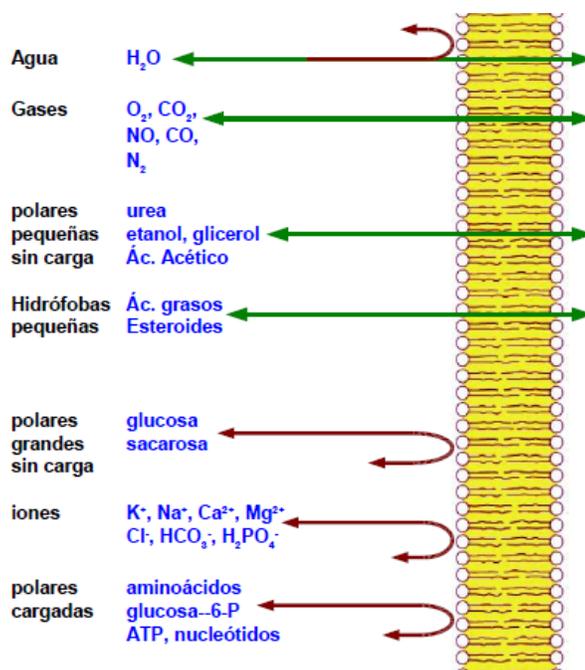
**Cholesterol in a lipid bilayer.**

Schematic drawing of a cholesterol molecule interacting with two phospholipid molecules in one monolayer of a lipid bilayer.

Una característica de las células y aún de los compartimientos intracelulares es la capacidad de reunir distintas moléculas e iones en concentraciones muchas veces muy diferentes a las del medio que las rodea. La mayoría de las sustancias que atraviesan las membranas plasmáticas son iones y pequeñas moléculas orgánicas, moléculas a las que denominaremos genéricamente **solutos**. Para lograr esta llamativa diferencia de concentración de los solutos las células disponen de distintos **mecanismos de transporte de solutos**, entendiéndose al transporte como la capacidad de mover selectivamente solutos a través de una membrana.



Para analizar los fenómenos de transporte de solutos, primero debemos analizar la distinta facilidad o dificultad de los distintos solutos para atravesar espontáneamente la bicapa lipídica:

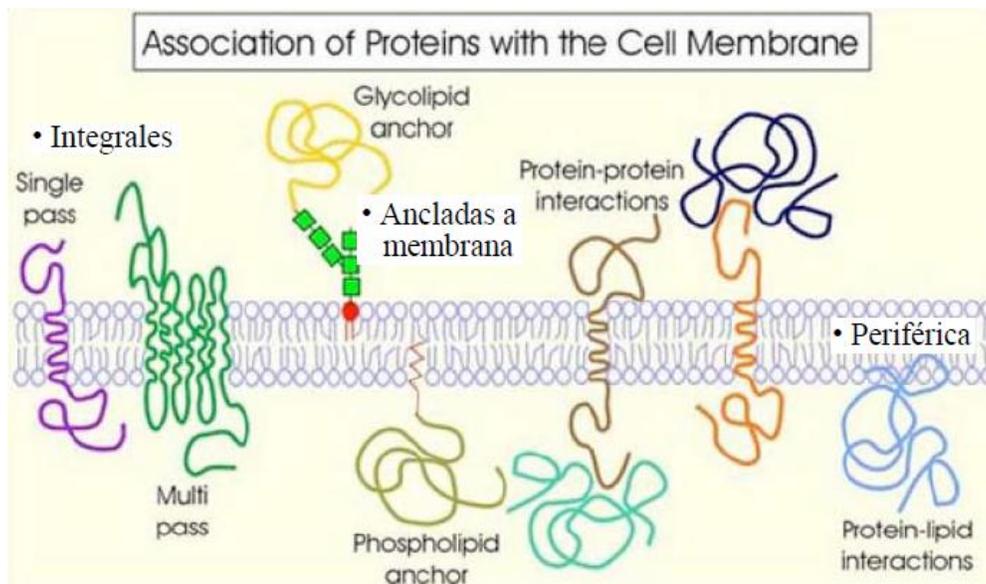


Vemos que sólo pueden atravesar la bicapa lipídica gases como O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, etc.; moléculas polares, pequeñas y sin carga como urea, etanol, etc.; y moléculas hidrófobas pequeñas como ácidos grasos y esteroides. El caso del agua es especial y lo desarrollaremos más abajo en este apunte. Y también vemos que moléculas grandes sin carga, como glucosa y sacarosa; y iones como Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, etc.; solutos que son importantísimos para el metabolismo celular. Y podemos preguntarnos ¿cómo logran ingresar a las células estos solutos importantísimos?

Aquí debemos agregar que en la bicapa lipídica existen proteínas que reciben distintas calificaciones:

- 1- Una **proteína intrínseca** de membrana es aquella que se halla embebida o atravesada en la bicapa lipídica; las proteínas intrínsecas presentan regiones hidrófobas, por las que se pueden asociar al interior de la membrana y regiones hidrófilas que se sitúan hacia el exterior, por consiguiente, son anfipáticas.
- 2- Las **proteínas periféricas o extrínsecas** no presentan regiones hidrófobas, por lo tanto no pueden entrar al interior de la membrana. Están en la cara interna de esta (en el interior celular).

- 3- Las **proteínas ancladas** Se unen a la membrana a través de una molécula hidrofóbica que no es un aminoácido (ácido graso, lípido, etc.)



Las **proteínas de membrana intrínsecas** juegan un rol central en el transporte de solutos a través de la membrana plasmática.

**¿Qué son los poros, los canales y los transportadores que se encuentran en las membranas?**

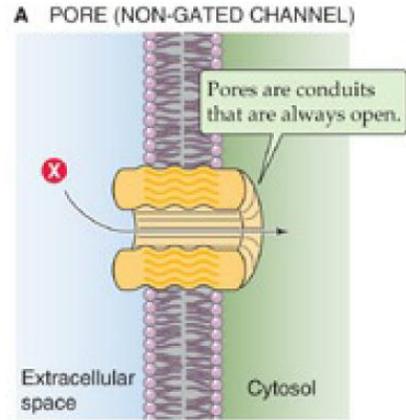
Debido a que la mayoría de los iones y solutos hidrofílicos de interés biológico tienen una pobre afinidad por la bicapa lipídica, la difusión simple y pasiva de estos solutos a través de la porción lipídica de la membrana es casi nula.

El transporte a través de la membrana plasmática generalmente requiere vías especializadas que permitan que estas sustancias particulares atraviesen la bicapa lipídica. En todos los casos conocidos tales vías se forman a partir de proteínas integrales de la membrana.

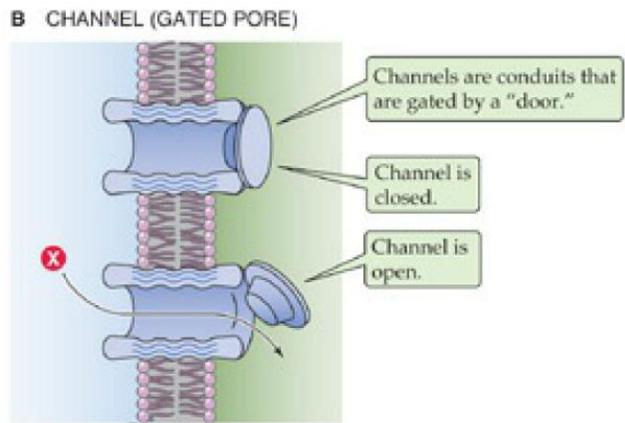
Se reconocen tres tipos de vías proteicas que permiten el paso de iones y sustancias hidrofílicas a través de la membrana:

**Algunas sustancias atraviesan la membrana a través de proteínas de membrana intrínsecas que pueden formar poros, canales o transportadores.**

- 1- Las proteínas de membrana pueden formar poros que están siempre abiertos: como ejemplos de estos **poros** se cuentan las **porinas** de la membrana externa de las mitocondrias y las **acuaporinas** que son canales para el paso del agua. *Esta clase de poros pueden equipararse, en una analogía con el mundo macroscópico, a tubos rectos en los que siempre se ve la luz del lado opuesto.* Lo esquematizamos en la figura de la derecha.

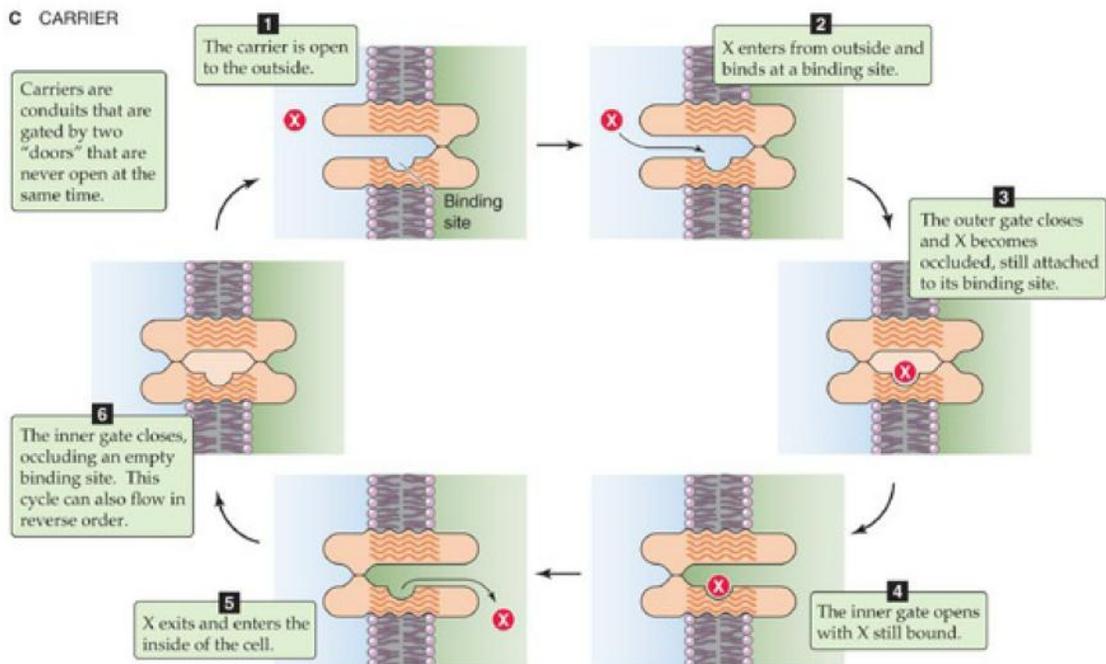


- 2- Las proteínas de membrana pueden formar **canales** que pueden estar, alternativamente, abiertos o cerrados, debido a que están equipados de una barrera móvil o compuerta: como ejemplos podemos incluir virtualmente a todos los **canales iónicos**, tales como los que permiten el paso de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{++}$  a través de la membrana. Visto así, un canal es como un



poro con compuerta y un poro es como un canal sin compuerta. *Esta clase de canales pueden equipararse, en una analogía con el mundo macroscópico, a tubos rectos con un obturador en un extremo, de modo que la luz del otro extremo sólo se ve si el obturador está abierto.* Lo esquematizamos en la figura de la derecha.

- 3- Las proteínas de membrana pueden formar **carriers** o **transportadores** conformando a un conducto que nunca ofrece una vía que está equipada al menos con dos válvulas que nunca están abiertas al mismo tiempo: Entre las dos compuertas hay un compartimiento que contiene uno o más sitios de unión para solutos. *Esta clase de transportadores puede equipararse, en una analogía con el mundo macroscópico, a tubos rectos con esclusas en ambos extremos y nunca permiten ver la luz del otro extremo debido a que nunca están abiertas ambas esclusas al mismo tiempo.* Lo esquematizamos en la figura siguiente.



### ¿Cómo están conformados los canales iónicos?

Los **canales iónicos** consisten en una o más subunidades polipeptídicas con segmentos en conformación alfa-hélice que van de un lado al otro de la membrana. Estos canales tienen **varios componentes** con diferentes funciones: El primer componente es una **compuerta** que determina si el canal se encuentra abierto o cerrado, siendo estos estados de apertura o cierre el reflejo de diferentes conformaciones de las proteínas de membrana. Un segundo componente funcional generalmente es uno o más **sensores**

**Los canales con compuertas, que alternativamente están abiertos o cerrados, permiten el pasaje pasivo de iones a través de la membrana**

que pueden responder a distintos tipos de señales: cambios de voltaje de la membrana, sistemas de segundo mensajeros que actúan en la cara citoplasmática de la proteína de membrana, o ligandos tales como agonistas neurohumorales que se unen a la cara extracelular de la proteína transmembrana. Un tercer componente funcional es un **"filtro selector"** que discrimina qué ion en particular ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ , etc.) tiene acceso al transportador o al canal.

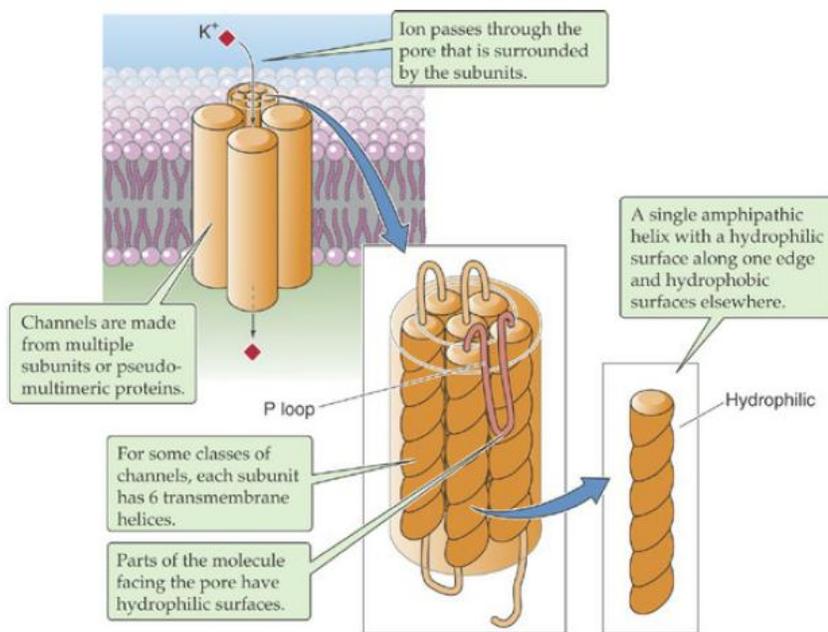
Cada vez que el canal asume la conformación abierta, provee una vía continua entre los dos lados de la membrana de modo que los iones pueden pasar a través de él por **difusión pasiva** hasta que el canal adopte la conformación cerrada nuevamente.

### ¿Cuáles son los principales canales iónicos?

**Canales de Na<sup>+</sup>:** Debido a que el gradiente electroquímico para el Na<sup>+</sup> tiende a mover a los iones Na<sup>+</sup> desde el exterior de la célula hacia el interior, un canal para Na<sup>+</sup> abierto actuará siempre como un conducto para el ingreso pasivo de Na<sup>+</sup> al interior de la célula. Un uso fisiológico de la entrada de Na<sup>+</sup> mediada por canales es la transmisión de información, tal como se estudiará cuando desarrollemos el tema *Potencial de acción en células excitables*, más adelante.

Otro uso fisiológico de los canales de Na<sup>+</sup> se descubre al estudiar ciertos segmentos de los túbulos renales y en el epitelio intestinal. En estos casos los canales de Na<sup>+</sup> (llamados **canales ENaC**, es decir *epithelial sodium channel*, o *canal de sodio epitelial*) se encuentran restringidos a la **cara apical** de las células de estos epitelios, donde permiten la entrada de sodio a la célula epitelial desde la luz del túbulo renal o desde el lumen intestinal. Este influjo pasivo es un paso clave en el movimiento de Na<sup>+</sup> a través de estos epitelios desde el lumen hacia la sangre.

**Canales de K<sup>+</sup>:** En el caso del K<sup>+</sup>, veremos que el potencial químico tiende a mover al K<sup>+</sup> hacia el exterior de la célula, mientras que el potencial eléctrico tiende a movilizarlo hacia el interior, de modo que generalmente el balance de ambas fuerzas determina una tendencia neta de salida desde el interior hacia el exterior celular. Prácticamente en todas las células los canales de K<sup>+</sup> juegan un rol importantísimo en la generación del **potencial de reposo** de las membranas plasmáticas, que es negativo del lado interior de la membrana.



**Canales de Ca<sup>++</sup>:** El potencial electroquímico siempre tiende a mover al catión Ca<sup>++</sup> hacia el interior de la célula; de modo que cuando los canales de Ca<sup>++</sup> están abiertos, este ion ingresa rápidamente a la célula, a favor de este gradiente electroquímico. Este movimiento de Ca<sup>++</sup> hacia el interior de

la célula juega un rol vital en la **señalización** transmembrana tanto en células excitables como en las no excitables, así como en la generación del **potencial de acción** de algunas células excitables.

**Canales de H<sup>+</sup>:** La membrana plasmática de muchos tipos celulares contienen canales de protones **Hv1** (*hydrogen voltaje gated channel, o canales de protones voltaje dependiente*). En condiciones normales, los H<sup>+</sup> tienden a ingresar a las células si los canales Hv1 se encuentran abiertos, sin embargo los canales Hv1 se encuentran cerrados y sólo se abren excepcionalmente en situaciones de despolarización o en casos de acidificación del citoplasma, es decir, en condiciones que tienden a lograr una salida del H<sup>+</sup>.

**Canales de Cl<sup>-</sup>:** La mayoría de las células contienen uno o más tipos de canales anión-selectivos a través de los cuales ocurre un pasaje pasivo y no acoplado de Cl<sup>-</sup>. En la mayoría de las células el potencial eléctrico fuerza la salida de Cl<sup>-</sup> de la célula, mientras que el potencial químico tiende a ingresar Cl<sup>-</sup> a la célula; el balance es tal que hay una ligera tendencia a la salida de Cl<sup>-</sup> hacia el exterior de la célula. En algunas células epiteliales con canales de Cl<sup>-</sup> en sus **membranas basolaterales**, el movimiento pasivo de Cl juega un rol en el **movimiento transepitelial** de Cl<sup>-</sup> desde el lumen hacia la sangre.

### ¿Cuáles son los principales transportadores o carriers?

Los sistemas de transporte mediado por **transportadores (carriers)** transfieren un amplio rango de iones y solutos orgánicos a través de la membrana plasmática. Cada transportador tiene una afinidad específica por unirse a uno o a un pequeño número de solutos, y los transporta a través de la bicapa lipídica.

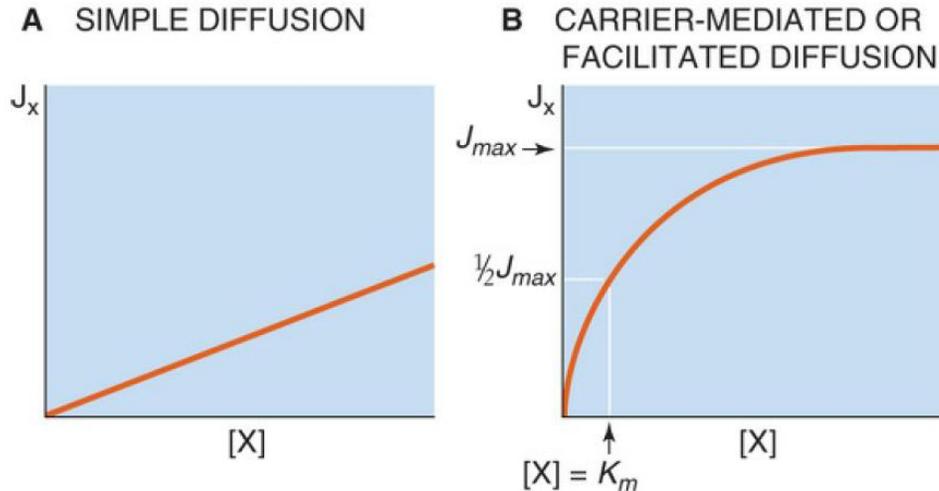
**Algunos transportadores facilitan la difusión pasiva de pequeños solutos, como la glucosa.**

El más simple de los transportes mediado por carriers es el que permite la difusión facilitada (**uniport**). Luego se encuentran, aumentando su complejidad, los sistemas de cotransporte (**simport**) y de intercambio (**antiport**).

Todos los transportadores que no hidrolizan ATP ni se acoplan a la cadena de transporte de electrones, son miembros de la llamada *superfamilia de transportadores de solutos (SLC, o solute carrier superfamily)*. Los miembros de una superfamilia de transportadores de solutos (SLC) pueden diferir en:

- 1- sus *mecanismos moleculares* (**uniport, simport o antiport**), en sus propiedades cinéticas (por diferencias de especificidad y afinidad a los distintos solutos),
- 2- en su *regulación* (por ejemplo, fosforilación),
- 3- en sus *sitios de "blanco" celular* (pueden presentarse en la membrana plasmática o en la membrana de organelas intracelulares) y
- 4- en los *tejidos* en los cuales se expresan (riñón, intestino, cerebro, etc.).

Los sistemas de transporte mediados por transportadores se comportan de acuerdo al esquema general de **cinética para la difusión facilitada**. Este mecanismo sólo puede mediar un transporte pasivo, a **favor del gradiente**, para "x".



En una membrana celular existe un **número fijo de transportadores disponibles** para transportar "x", más aún, cada transportador tiene un **límite de velocidad** para trabajar, de modo que es un **modelo saturable**; a diferencia de la **difusión simple**.

Si, por ejemplo se incrementase gradualmente la concentración extracelular de "x", la velocidad de ingreso a la célula de "x" eventualmente alcanzará un valor máximo ( $J_{max}$ ) una vez que todos los carriers se hayan unido con "x". Esta situación es muy diferente de la que existe en la difusión simple, en donde el soluto "x" puede atravesar la bicapa lipídica sin requerir el concurso de proteínas, de tal modo que no es un sistema saturable y se incrementa la velocidad de ingreso linealmente con el incremento de la concentración extracelular de "x", sin alcanzar nunca un valor máximo.

Lo dicho permite observar que el sistema de mediado por transportadores saturables puede describirse con las mismas **ecuaciones de Michaelis-Menten**<sup>1</sup> que se estudian en bioquímica para caracterizar las relaciones enzima-sustrato, hormona-receptor, y, justamente, soluto-carrier. Así podemos ver que la velocidad de flujo es la mitad de la velocidad de flujo máxima ( $\frac{1}{2} J_{max}$ ) cuando la concentración de "x" tiene un valor característico de cada sistema llamado  $K_m$  (que es, precisamente, la **constante de Michaelis-Menten** para ese sistema).

*El transporte por carriers se caracterizan porque aunque se aumente la concentración de soluto la velocidad no aumenta linealmente, aparece un efecto de saturación. La saturación se debe a que todos los centros activos del carrier están ocupados.*

<sup>1</sup> Al final de este apunte se agrega un anexo de lectura opcional (no obligatoria) titulado **CINÉTICA DE MICHAELIS – MENTEN**, para quienes deseen profundizar este tema.

De modo que la expresión de Michaelis-Menten:

$$V = \frac{[S] V_{\max}}{K_m + [S]}$$

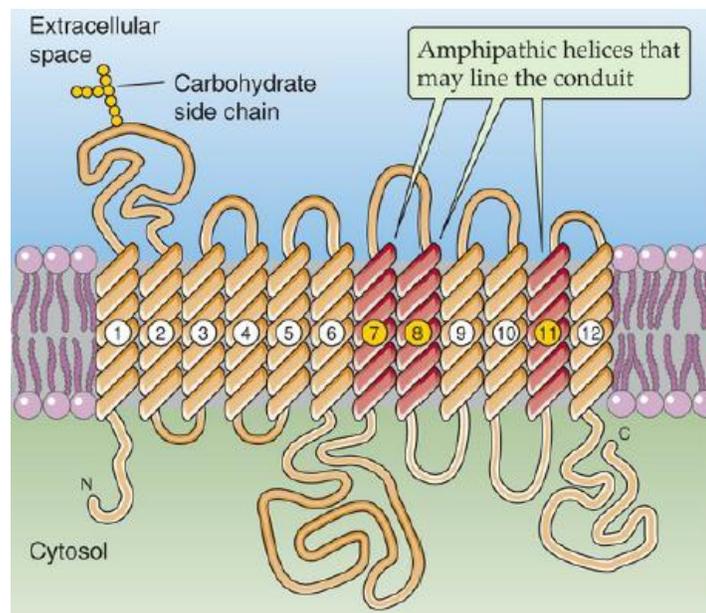
En el caso de transportadores puede anotarse así:

$$J_X = \frac{[X] J_{\max}}{K_m + [X]}$$

De este modo, dado que **K<sub>m</sub>** es la concentración del soluto "x" a la cual el flujo (**J<sub>x</sub>**) es la mitad del máximo (**J<sub>max</sub>**), podemos ver que a menor **K<sub>m</sub>**, mayor será la afinidad del transportador por el soluto "x".

### Transportador (carrier) de glucosa

Un ejemplo importante de proteína de membrana que media la difusión facilitada es el transportador de glucosa **GLUT1**, que es miembro de la familia SLC2. Las **GLUTs** presentan 12 segmentos transmembrana y varios bucles polipeptídicos hidrofílicos proyectados tanto a la cara intracelular como a la extracelular de la bicapa lipídica. Algunos de sus segmentos transmembrana (los señalados en la siguiente figura como 7, 8 y 11) conforman una vía que permite permear la bicapa lipídica a favor de pasaje de glucosa.



La familia SLC2 incluye 12 transportadores de hexosas (GLUTs) y mientras que la GLUT1 se expresa en la superficie celular, la GLUT4, en estado basal (en ausencia de **insulina**), predomina en las membranas de las vesículas intracelulares, como un reservorio de transportadores. La **insulina** incrementa la tasa de transporte de glucosa mediada por carriers reclutando la isoforma GLUT4 en la membrana plasmática desde el reservorio de las vesículas intracelulares.

Otros ejemplos de transportadores que median la difusión facilitada son los transportadores de urea (UT) que son miembros de la familia SLC14; y los transportadores de cationes orgánicos (OCT) que son miembros de la familia SLC22. Debido a que este último, el OCT, mueve cationes, es decir, partículas con carga positiva, es un ejemplo de transportador o carrier electrogénico.

### ¿Son estructuralmente diferentes los poros, los canales y los carriers?

No. Los poros, los canales iónicos y los transportadores o carriers tienen, todos ellos, múltiples segmentos transmembrana que generan la vía que permean la bicapa lipídica; **sin embargo poros canales y transportadores tienen propiedades cinéticas bien diferenciadas.**

**La estructura física de poros, canales y transportadores es bastante similar**

Los poros, tales como las **porinas**, están continuamente abiertos y permiten que un vasto número de partículas atraviesen la membrana.

**Los canales iónicos sufren transiciones conformacionales** entre los estados abierto y cerrado. Cuando se encuentran abiertos lo están tanto para los solutos intracelulares como para los extracelulares, simultáneamente; así, mientras el canal está abierto se permite que gran cantidad de iones crucen la membrana por cada evento de apertura. Debido a que el tiempo en que cada canal permanece abierto en cada evento de apertura no es siempre el mismo, el número de iones que atraviesan el canal no es un valor constante y fijo.

Los transportadores generan una vía permeable que virtualmente nunca se abre simultáneamente a ambos compartimientos (intracelular y extracelular); por lo tanto, mientras el evento fundamental para los canales es su apertura, **el evento fundamental de los transportadores o carriers es la realización del ciclo completo de cambios conformacionales**; y debido a que en los transportadores el número de sitios de unión a los solutos es limitado, cada ciclo de cambios conformacionales transporta un número discreto y fijo de partículas de soluto.

**El número de partículas por segundo que pueden moverse a través de la membrana es generalmente varias órdenes de magnitud menor para un solo carrier que para un solo canal.**

	<b>Poros</b>	<b>Canales</b>	<b>Transportadores</b>
Ejemplo	Acuaporinas (AQP1)	Canal de K <sup>+</sup>	Transportador de glucosa (GLUT1)
Conducto a través de la membrana	Siempre abierto	Abierto intermitentemente	Nunca abierto
Evento unitario	Ninguno (siempre abierto)	Apertura	Ciclo de cambios conformacionales
Partículas translocadas por "evento"	-	6.10 <sup>4</sup>	1 a 5
Partículas translocadas por segundo	Hasta 2.10 <sup>9</sup>	10 <sup>6</sup> a 10 <sup>8</sup> cuando está abierto	Entre 2.10 <sup>2</sup> y 5.10 <sup>4</sup>

Anteriormente se consignó que la difusión facilitada de glucosa, por ejemplo, ocurría pasivamente a favor del gradiente, sin embargo los transportadores o carriers también pueden mediar modos acoplados de transporte, como veremos más abajo.

### ¿Qué es el transporte activo primario?

El **transporte activo** es un proceso que puede transferir **en contra de un gradiente** a un soluto a través de una membrana.

En el transporte activo primario, la fuerza motriz necesaria para causar transferencia neta de un soluto "x" en contra de su gradiente electroquímico proviene de la variación de energía favorable que está **asociado con una reacción química exergónica**, tal como la hidrólisis de ATP.

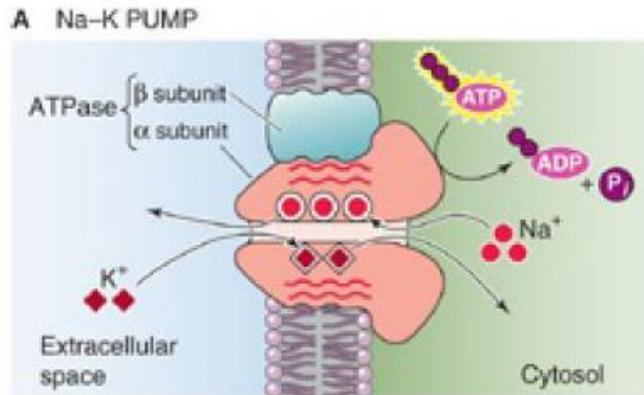
**La bomba Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup>, es el transportador activo primario más importante en las células animales, el cual usa la energía del ATP para la extrusión de Na<sup>+</sup>, sacándolo de interior de la célula, y para ingresar K a la célula; en ambos casos en contra de su gradiente químico.**

El  $\Delta G$  positivo de la transferencia del soluto "x" es compensado, con creces, con el  $\Delta G$  negativo de la hidrólisis del ATP.

Este sistema de transporte activo primario recibe el nombre de bomba; el caso más relevante es la **bomba de Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPasa**<sup>2</sup>

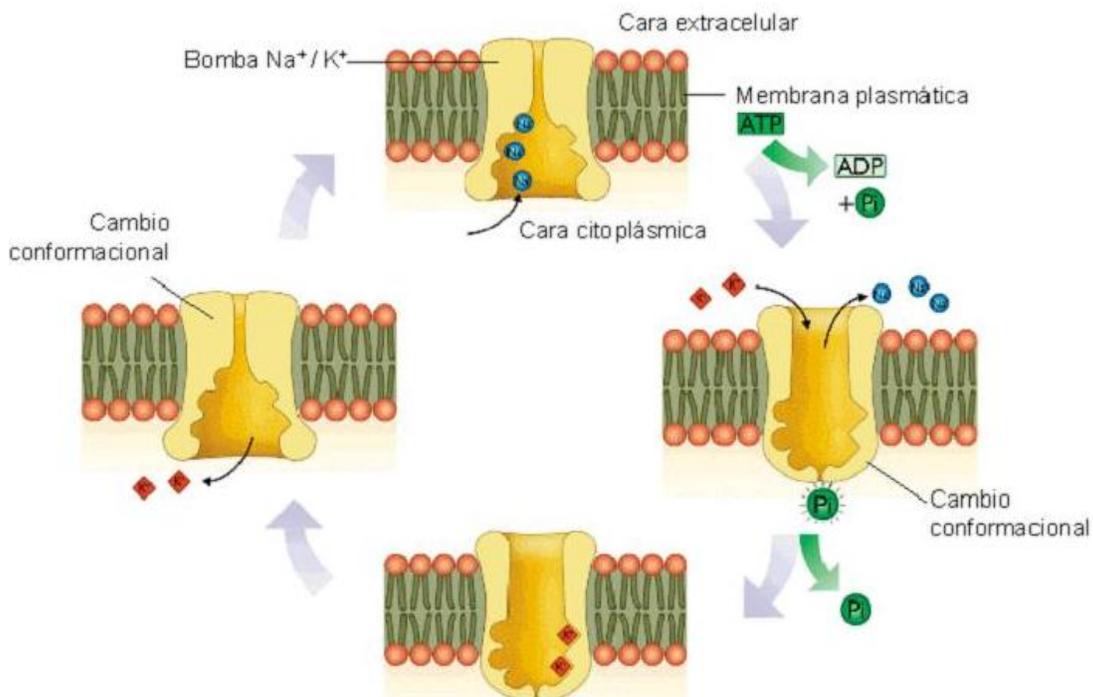
<sup>2</sup> Esta estructura funcional fue la primera enzima reconocida como una bomba de iones, descubrimiento por el cual el científico Jens C. Skou compartió el Premio Nobel de Química de 1997.

Esta bomba se localiza en la membrana plasmática y está conformada por dos subunidades llamadas  $\alpha$  y  $\beta$ . La subunidad  $\alpha$  posee 10 segmentos transmembrana y es la subunidad catalítica (es decir, la responsable de acelerar la hidrólisis del ATP) de esta bomba. La subunidad  $\beta$  contiene una sola región helicoidal transmembrana y no parece ser esencial para el transporte ni para la actividad ATPasa.



La enzima está glicosilada en su cara externa (como la mayoría de proteínas de membrana) y requiere de **magnesio** como cofactor para su funcionamiento (necesidad característica de las enzimas ATPasa). Se han descrito 4 isoformas para la subunidad  $\alpha$  y 2 isoformas para la subunidad  $\beta$ ; isoformas que se presentan en diferentes tejidos con diferentes propiedades cinéticas. Mirando al exterior la bomba de  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATP asa presenta múltiples lugares de unión de esteroides cardiotónicos, entre ellos la **ouabaina** y la **digitoxina** (digital), cuya importancia medica se considerará en la asignatura **Farmacología**.

En cada ciclo de funcionamiento de la bomba, se acopla la extrusión (salida desde el compartimiento intracelular hacia el extracelular) de 3 iones  $\text{Na}^+$  con la entrada de 2 iones  $\text{K}^+$ , y con la hidrólisis de una molécula de ATP



Aunque las células animales pueden tener otras bombas en sus membranas plasmáticas, la bomba de  $\text{Na}^+\text{K}^+$  es el único proceso de transporte activo primario para  $\text{Na}^+$ . La bomba  $\text{Na}^+\text{K}^+$  es también el mecanismo de transporte activo primario más importante para  $\text{K}^+$ . **En las células en todo el cuerpo, la bomba  $\text{Na}^+\text{K}^+$  es responsable de mantener una concentración intracelular de  $\text{Na}^+$  baja y una concentración intracelular de  $\text{K}^+$  alta, en relación con el medio extracelular.**

En la mayoría de las células epiteliales, la bomba  $\text{Na}^+\text{K}^+$  se limita a la parte **basolateral** de la célula.

Debido a que cada ciclo de la hidrólisis de una molécula de ATP se acopla a la extrusión de tres iones  $\text{Na}^+$  de la célula y la absorción de dos iones  $\text{K}^+$  la estequiometría de la bomba es, por ello, de tres  $\text{Na}^+$  a dos  $\text{K}^+$ , de modo que cada ciclo de la bomba está asociado con la extrusión neta de una carga positiva de la célula. Por eso se califica a esta bomba como **electrogénica**.

Al igual que el flujo de glucosa a través del transportador **GLUT1** es una función **saturable** dependiente de la concentración de glucosa, la tasa de transporte activo por **la bomba  $\text{Na}^+\text{K}^+$  también es una función saturable de las concentraciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$** . La velocidad de transporte **también es una función saturable de la concentración intracelular de ATP** y por lo tanto depende del estado metabólico de la célula. En las células con altas tasas de bomba  $\text{Na}^+\text{K}^+$ , como las células de los túbulos proximales renales, un tercio o más del metabolismo energético celular se dedica al suministro de ATP a la bomba  $\text{Na}^+\text{K}^+$ .

### ¿Hay otras bombas además de la bomba $\text{Na}^+\text{K}^+$ ?

Sí. Hay toda una familia de ATPasas tipo P (las cuales comparten una significativa similitud de secuencia con la subunidad  $\alpha$  de la bomba  $\text{Na}^+\text{K}^+$ ) incluye varias subfamilias. Aquí siguen algunos ejemplos:

**Además de la bomba  $\text{Na}^+\text{K}^+$ , existen otras ATPasas como por ejemplo la  $\text{H}^+\text{K}^+$  ATPasa y la bomba de  $\text{Ca}^{++}$**

**Bomba  $\text{H}^+\text{K}^+$ :** Además de la bomba  $\text{Na}^+\text{K}^+$ , son relativamente pocos los transportadores activos primarios que se encuentran en las membranas plasmáticas de las células animales. Por ejemplo en las células parietales del epitelio gástrico, se encuentra una bomba  $\text{H}^+\text{K}^+$  que bombea  $\text{H}^+$  a través de la cara apical de las células hacia el lumen del estómago. Existen bombas similares en el riñón y los intestinos. La bomba de  $\text{H}^+\text{K}^+$  media la extrusión activa de  $\text{H}^+$  y la captación de  $\text{K}^+$ , tomando energía de la hidrólisis de ATP, probablemente en la siguiente proporción: por cada dos iones  $\text{H}^+$  se movilizan dos iones  $\text{K}^+$  y se hidroliza una molécula de ATP. **Esta bomba no es electrogénica.**

**Bombas de  $\text{Ca}^{++}$ :** La mayoría, si no todas las células tienen un transportador activo primario en la membrana plasmática que extrae  $\text{Ca}^{++}$  de la célula. Estas bombas se abrevian **PMCA** (por "*plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase*") y al menos cuatro isoformas EPCP aparecen en la subfamilia  $\text{P}_{2\text{B}}$  de ATPasas de tipo P. Estas bombas intercambiar un  $\text{H}^+$  para una  $\text{Ca}^{++}$  por cada molécula de ATP que se hidroliza. También existen bombas de  $\text{Ca}^{++}$  en la membrana que rodea organelas intracelulares como el retículo sarcoplásmico en las células musculares y el retículo endoplásmico en otras

células, en los que juegan un papel en el secuestro de iones de  $\text{Ca}^{++}$  en los almacenes intracelulares. Los **SERCAs** (por “*sarcoplasmic and endoplasmic reticulum calcium ATPase*”) muestran otra estequiometría: parecen transportar dos  $\text{H}^+$  y dos iones de  $\text{Ca}^{++}$  por cada molécula de ATP hidrolizado. Los tres SERCAs conocidos, que forman parte de la subfamilia  $\text{P}_{2A}$  de las ATPasas de tipo P, se expresan en diferentes tipos de músculo.

**Otros tipos de bombas:** Entre las otras ATPasas de tipo P se encuentra la bomba denominada ATP7B que es una bomba de **cobre**. Este miembro de la subfamilia  $\text{P}_{1B}$  de ATPasas de tipo P está mutado en la **enfermedad de Wilson**<sup>3</sup>

### ¿Qué es el transporte activo secundario?

En el **transporte activo secundario**, la fuerza impulsora ya no es aportada por la hidrólisis del ATP sino que es proporcionada por el acoplamiento del movimiento en contra de su gradiente del soluto “x” (con  $\Delta G$  positivo), con el movimiento a favor del gradiente ( $\Delta G$  negativo, y en valor absoluto mayor que el  $\Delta G$  positivo de la movilización del soluto “x”) de uno o más de otros solutos para el que existe una diferencia de potencial electroquímico de energía favorable.

### ¿Qué son los cotrasportadores?

Al igual que las bombas o transportadores activos primarios, los **sistemas de transporte activo secundario** pueden mover un soluto en contra de su gradiente electroquímico, sin embargo, a diferencia de las bombas que toman energía de la hidrólisis de ATP, los transportadores activos secundarios toman energía mediante el acoplamiento entre el movimiento contra el gradiente de un soluto ( **$\Delta G$  positivo**) con el movimiento a favor del gradiente de otro soluto ( **$\Delta G$  negativo**).

**Cotrasportadores: una clase de transportadores activos secundarios que son generalmente accionados por la energía del gradiente de  $\text{Na}^+$  dirigido hacia dentro de la célula.**

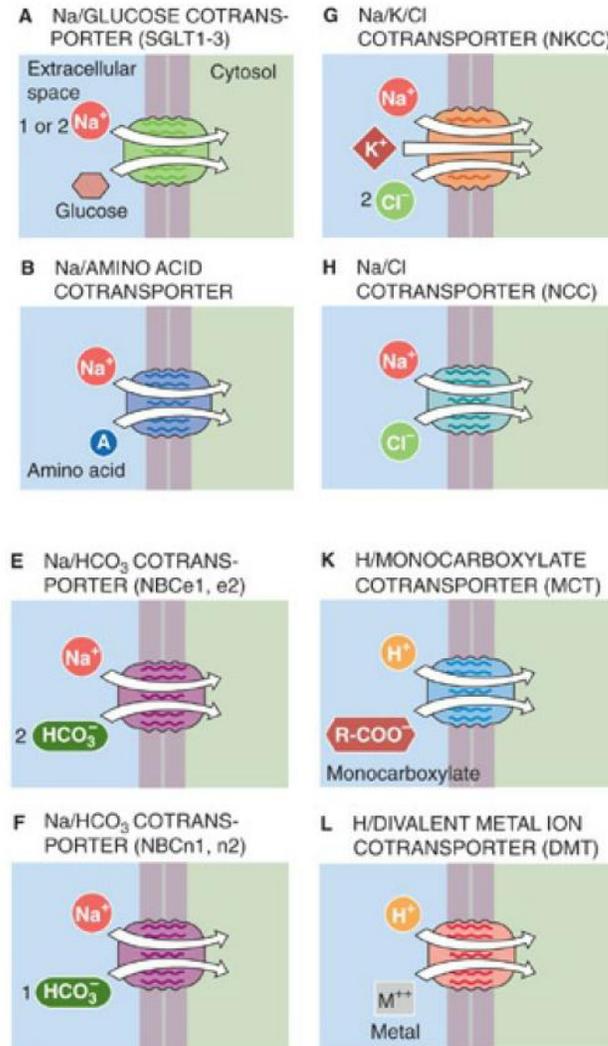
Las dos clases principales de transportadores activos secundarios son:

- 1- cotrasportadores (o **simporters**)
- 2- intercambiadores (o **antiporters**)

<sup>3</sup> La enfermedad de Wilson es un trastorno hereditario poco frecuente que hace que el cuerpo retenga cobre. Normalmente, el hígado libera el cobre que no necesita en la bilis, un líquido digestivo. En la enfermedad de Wilson eso no ocurre. El cobre se acumula en el hígado y daña el tejido hepático. Con el tiempo, el daño hace que el hígado libere el cobre directamente hacia el torrente sanguíneo. La sangre traslada el cobre por todo el cuerpo. El exceso de cobre puede dañar los riñones, el hígado, el cerebro y los ojos.

En este punto vamos a referirnos a los **cotrasportadores** o sistemas **simportadores**: Los cotrasportadores son proteínas de membrana intrínsecas que mueven al soluto que se mueve a favor de su potencial electroquímico (aquel soluto cuyo gradiente proporciona la energía, es decir, se moviliza con  $\Delta G$  negativa) y los solutos que se mueven en contra de su gradiente electroquímico (con  $\Delta G$  positivo) en la misma dirección.

**Cotrasportador  $\text{Na}^+$  glucosa:** Este cotrasportador, consignado con las siglas **SGLT**, se encuentra en la membrana **apical** de las células que revisten el túbulo proximal de los riñones y el intestino delgado. Los SGLT, que pertenecen a la familia SLC5, consisten en una sola subunidad, probablemente con 14 segmentos que atraviesan la membrana. Las isoformas de SGLT2 y SGLT3 mueven un ion  $\text{Na}^+$  con cada molécula de glucosa (es decir, la estequiometría de  $\text{Na}^+$  y glucosa es 1:1), mientras que la isoforma SGLT1 mueve dos iones  $\text{Na}^+$  por cada molécula de glucosa (estequiometría 2:1).



El ingreso de catión  $\text{Na}^+$  es la fuerza impulsora de cotransportadores de muchos solutos orgánicos, conformando una variedad de cotransportadores de  $\text{Na}^+$  presentes en el túbulo proximal y el intestino delgado.

### ¿Qué son los intercambiadores o antiporters?

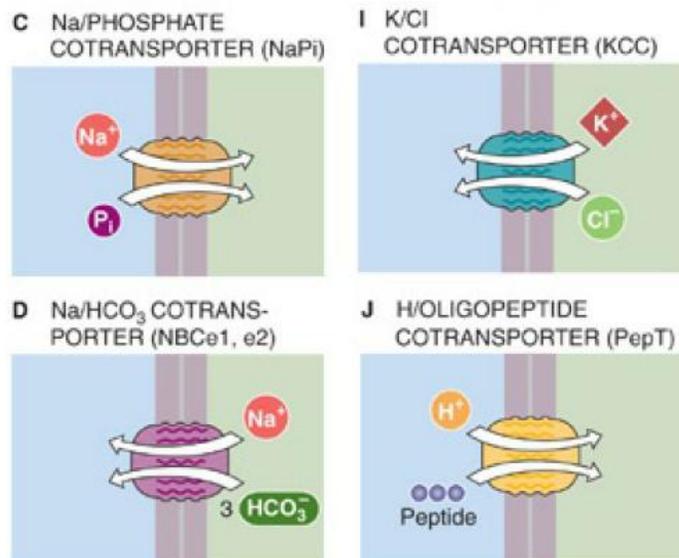
El otro grupo importante de transportadores activos secundarios son los **intercambiadores**, o **antiporters**.

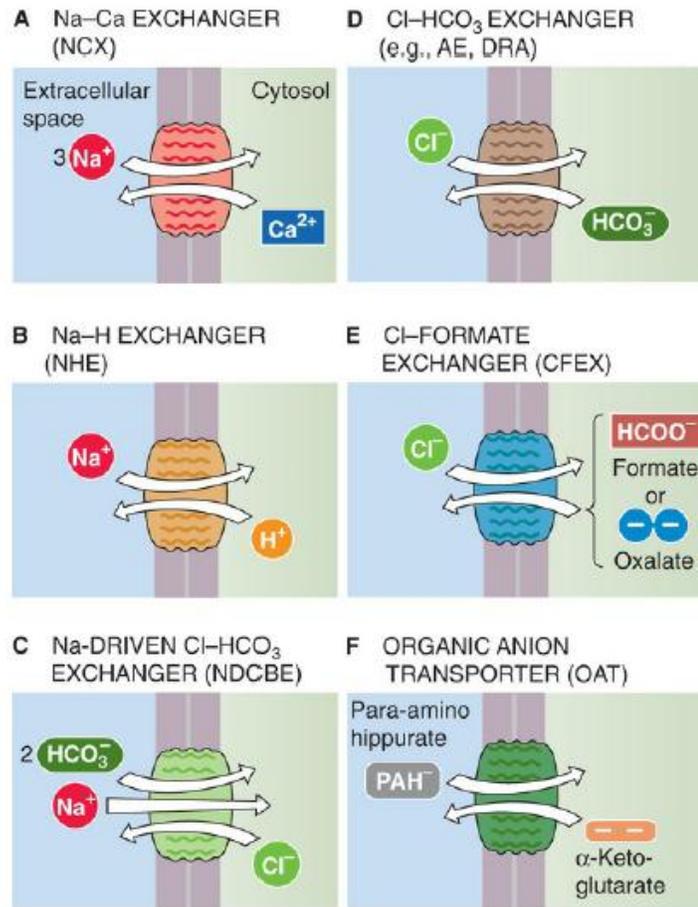
Los intercambiadores son proteínas de membrana intrínsecas que pueden mover uno o más solutos en una dirección en contra de su gradiente electroquímico ( $\Delta G$  positivo), y uno o más solutos a favor de su gradiente ( $\Delta G$  negativo), pero en direcciones opuestas.

**Intercambiadores, otra clase de transportadores activos secundarios, que intercambian solutos.**

En general, estos transportadores intercambian de cationes por cationes o intercambian aniones por aniones.

**Intercambiador (antiport) de  $\text{Na}^+\text{Ca}^{++}$ :** Los casi omnipresentes intercambiadores  $\text{Na}^+\text{Ca}^{++}$ , llamados **NCX**, pertenecen a la familia SLC8. Lo más probable es que funcionen intercambiando de tres iones  $\text{Na}^+$  por cada ion  $\text{Ca}^{++}$ , por lo tanto **NCX** es **electrogénico** y mueve carga neta positiva en la misma dirección del  $\text{Na}^+$ . Bajo la mayoría de circunstancias, el gradiente electroquímico  $\text{Na}^+$  es favorable para el ingreso a la célula a través de la membrana plasmática, y permite la extrusión en contra de su gradiente del  $\text{Ca}^{++}$  de la célula. Por lo tanto, este sistema de transporte ayuda a mantener la diferencia de gradiente electroquímico, dirigido hacia dentro de la célula, del catión  $\text{Ca}^{++}$ .





**Intercambiador (antiport) de Na<sup>+</sup>H<sup>+</sup>:** Los intercambiadores de Na<sup>+</sup>H<sup>+</sup> (**NHE**), que pertenecen a la familia SLC9, y presentan una estequiometría 1: 1 de intercambio de Na<sup>+</sup> extracelular contra H<sup>+</sup> intracelular, a través de la membrana plasmática; por lo tanto **no es electrogénica**. Uno o más de los nueve **NHE** conocidas están presentes en la membrana plasmática de casi todas las células en el cuerpo. A través de la operación del antiport NHE, el gradiente electroquímico Na<sup>+</sup> dirigido hacia dentro impulsa la extrusión contra se gradiente de H<sup>+</sup> de la célula y así aumenta el pH intracelular. El ubicuo **NHE1**, que está presente en las células no epiteliales, así como en la porción **basolateral** de las membranas de los epitelios, juega un papel importante en la regulación del pH. El antiport **NHE3** está presente en las membranas **apicales** de varios epitelios, donde juega un papel importante en la secreción de ácido o la absorción de Na<sup>+</sup>.

**Antiport Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>:** Un segundo antiport que involucra al Na<sup>+</sup> que es importante en la regulación del pH intracelular es el antiport **NDCBE** (*Na<sup>+</sup>-driven Cl-HCO<sub>3</sub> exchanger*), que es un miembro de la familia SLC4. Este intercambiador mueve un Na<sup>+</sup> y el equivalente de dos iones HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> en una dirección, mientras promueve el movimiento de un ion Cl<sup>-</sup> en la dirección opuesta. NDCBE utiliza el gradiente electroquímico Na<sup>+</sup> dirigido hacia el interior para conducir la entrada

cuesta arriba de  $\text{HCO}_3^-$  en la célula, y **no es electrogénico** porque se mueve en la dirección opuesta un  $\text{Cl}^-$ . Debido al ingreso de  $\text{HCO}_3^-$ , NDCBE ayuda a mantener un pH intracelular relativamente alcalino.

**Antiport  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ :** Un tercer grupo de intercambiadores que están implicados en la regulación ácido-base son los intercambiadores de  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ , que funcionan de forma independiente de  $\text{Na}^+$ . Estos pueden ser miembros de cualquiera de las familias SLC4 o SLC26.

Prácticamente todas las células en el cuerpo expresan uno de los tres antiports **electroneutros** SLC4 de  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ , también conocidos como intercambiadores de aniones AE1, AE2 y AE3 (AE viene de *anion exchangers*).

El antiport AE1 es importante para el transporte de  $\text{HCO}_3^-$  en las células rojas, eritrocitos, de la sangre que irriga el pulmón y en otras células de tejidos periféricos.

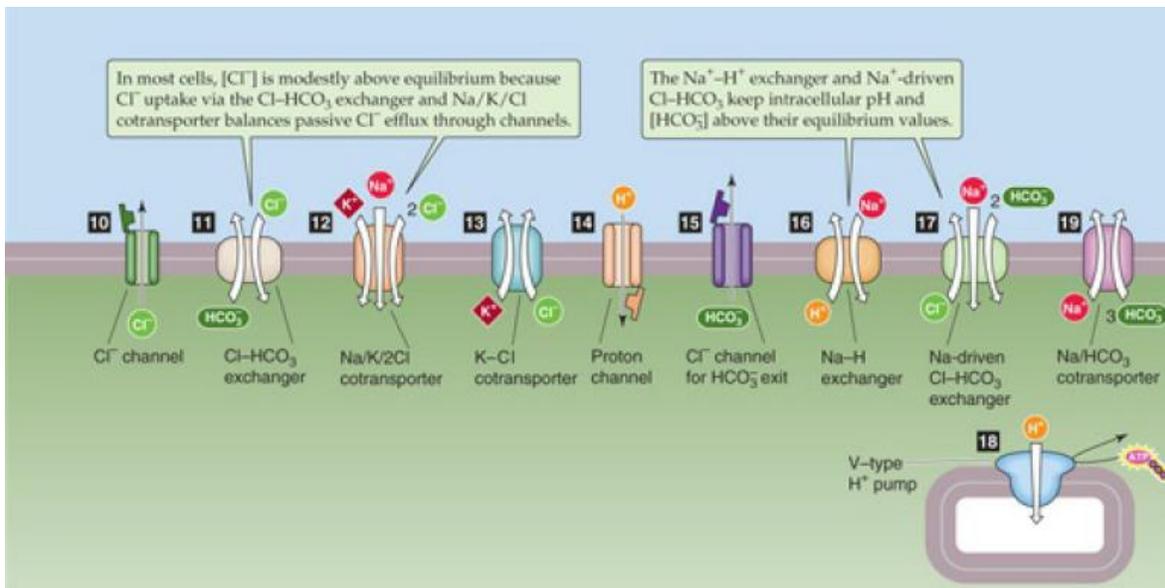
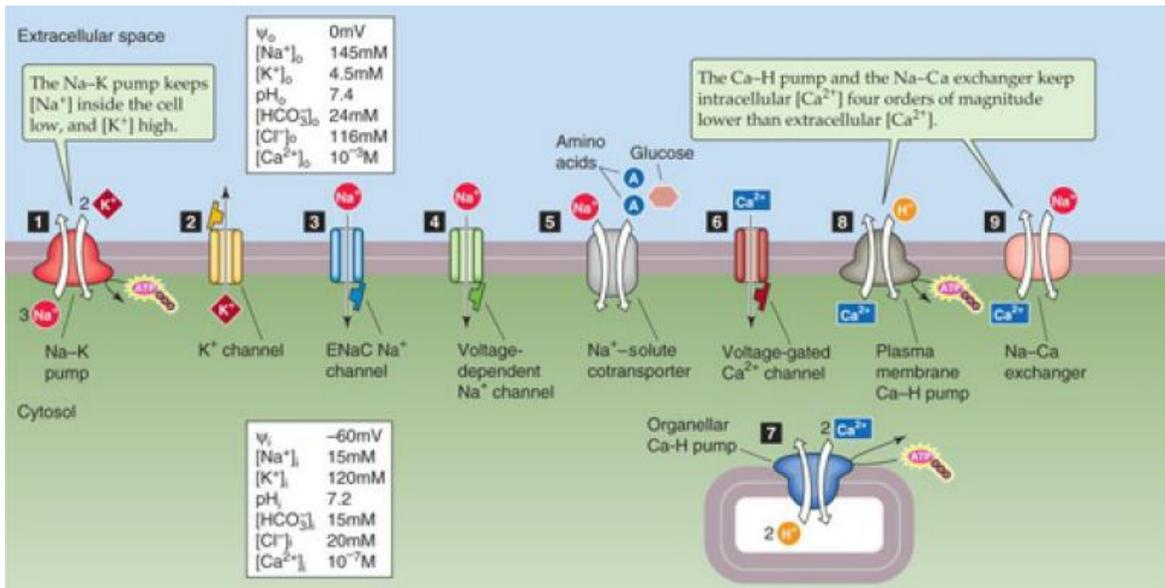
En otras células, donde el gradiente de  $\text{Cl}^-$  dirigido hacia dentro casi siempre conduce al  $\text{HCO}_3^-$  fuera de la célula, los antiports AE2 y AE3 juegan un papel importante en la regulación del pH intracelular por lo que tiende a acidificar la célula.

### **Finalmente: ¿Cómo se regula la concentración de solutos intracelulares?**

La siguiente figura ilustra las herramientas a disposición de una célula prototípica para el manejo de su composición intracelular. Las células en diferentes tejidos, e incluso diferentes tipos de células en un mismo tejido pueden tener diferentes complementos de canales y transportadores.

Las células epiteliales y las neuronas pueden segregar canales y transportadores específicos que se suman a los preexistentes en la membrana, para diferentes partes de la célula.

Por ejemplo, puede observarse que la cara **apical** de la membrana puede tener distintos canales y transportadores respecto de la cara **basolateral** de la membrana de una misma célula; o en una *neurona* podemos encontrar distintos canales y transportadores en su *axón*, respecto de su *soma* y respecto de sus *dendritas*. Por lo tanto, las diferentes células pueden tener composiciones iónicas intracelulares algo diferentes.



Los gradientes más sorprendentes e importantes a través de la membrana celular son aquellos para  $Na^+$  y  $K^+$ .

El sodio es el catión predominante en líquido extracelular, donde está presente a una concentración aproximada de 145 mM, o 145 mEq/l. El catión  $Na^+$  es relativamente excluido del espacio intracelular, donde está presente en sólo una fracción de la

**La bomba  $Na^+K^+$  mantiene la concentración intracelular de  $Na^+$  baja dentro de la célula y la concentración de  $K^+$  alta**

concentración extracelular. Este gradiente de  $\text{Na}^+$  se mantiene principalmente por extrusión activa de  $\text{Na}^+$  de la célula por la bomba  $\text{Na}^+\text{K}^+$ . En contraste, el potasio está presente a una concentración de sólo aproximadamente 4,5 mM, o 4,5 mEq/l, en el compartimiento extracelular, pero es el catión predominante en el espacio intracelular, donde se acumula entre 25 a 30 veces por encima de la concentración fuera de la célula. Una vez más, este gradiente es el resultado directo de la captación por transporte activo primario de  $\text{K}^+$  en la célula por la bomba  $\text{Na}^+\text{K}^+$ .

Cuando la bomba  $\text{Na}^+\text{K}^+$  se inhibe por ejemplo con el fármaco con **ouabaína** (un *glucósido cardíaco*), la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$  se eleva y la de  $\text{K}^+$  cae.

Además de generar gradientes de concentración de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , la bomba  $\text{Na}^+\text{K}^+$  desempeña un papel importante en la generación del potencial de membrana, manteniendo el interior negativo respecto del exterior positivo, en un valor cercano a los 60 mV en una célula típica (aunque ese valor puede variar en en cada tipo celular). La bomba  $\text{Na}^+\text{K}^+$  a cabo esta tarea de dos maneras:

- 1- En primer lugar, debido a que la bomba  $\text{Na}^+\text{K}^+$  transporta tres iones  $\text{Na}^+$  fuera de la célula por cada dos iones  $\text{K}^+$  que ingresa, **la bomba es en sí electrogénica**. Sin embargo, la corriente de la bomba en sí no es la única causa del voltaje negativo en el interior celular.
- 2- En segundo lugar hay que considerar que el  $\text{K}^+$  que se acumula en el interior de la célula por la acción de la bomba  $\text{Na}^+\text{K}^+$  crea un gradiente de concentración que favorece la salida de  $\text{K}^+$  de la célula a través de canales de  $\text{K}^+$ , y la salida de  $\text{K}^+$  fuera de la célula deja atrás aniones con sus cargas negativas no compensadas, contribuyendo a mantener un potencial negativo en el interior de las células. *Este factor puede evidenciarse cuando experimentalmente se bloquean los canales de  $\text{K}^+$  con inhibidores específicos, y el voltaje de la membrana se vuelve considerablemente menos negativo.*

El voltaje de la membrana plasmática, negativo en el interior, en concurrencia con el gran gradiente de concentración de  $\text{Na}^+$  determina un importante gradiente electroquímico que tiende a que el  $\text{Na}^+$  ingrese a la célula pasivamente. La célula aprovecha la energía asociada a tan importante gradiente para acoplar la entrada pasiva de  $\text{Na}^+$  para tres propósitos principales:

- 1- Desarrollar **potenciales de acción** para transmitir información;
- 2- Permitir el **transporte transepitelial** de  $\text{Na}^+$  en epitelios polarizados de tal modo que en sus membranas basales tienen bombas de  $\text{Na}^+\text{K}^+$  y sus membranas apicales tienen canales de  $\text{Na}^+$ ;
- 3- La utilización (en casi todas las células del cuerpo) del gradiente electroquímico de  $\text{Na}^+$  a través de la membrana plasmática para impulsar el **transporte activo secundario** de nutrientes e iones con transportadores del tipo **simport** y del tipo **antiport**.

### ¿Cómo se regula la concentración de $\text{Ca}^{++}$ ?

Considerando que la concentración de  $\text{Ca}^{++}$  en el espacio extracelular es aproximadamente de  $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$ , que en el compartimiento intracelular es de aproximadamente  $1 \cdot 10^{-7} \text{M}$ , verificamos que **existe un gradiente de concentración del orden de  $10^4$  veces.**

Debido a que el voltaje de la membrana plasmática mantiene el interior negativo y a que existe este gran gradiente químico para el  $\text{Ca}^{++}$ , el gradiente electroquímico dirigido hacia el interior de la célula a través de la membrana plasmática *es enorme, mucho más grande que la de cualquier otro ion.*

**La bomba de  $\text{Ca}^{++}$  y el antiport  $\text{Na}^+ \text{Ca}^{++}$  mantienen la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{++}$  cuatro órdenes de magnitud más baja que su concentración extracelular.**

Muchas células tienen una variedad de canales de  $\text{Ca}^{++}$  a través del cual el  $\text{Ca}^{++}$  puede entrar en la célula. En general, los canales de  $\text{Ca}^{++}$  se mantienen cerrados y se abren por cambios de voltaje (**canales voltaje dependientes**) o por agentes humorales (**canales activados por ligandos**), de tal modo que la rápida entrada de  $\text{Ca}^{++}$  en la célula se produce sólo en ráfagas cortas.

Sin embargo, dada la existencia de vías de ingreso pasivas de  $\text{Ca}^{++}$  en las células, podemos preguntarnos cuáles son los mecanismos de transporte que mantienen la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{++}$  baja y, por lo tanto, mantienen un enorme gradiente electroquímico para este catión.

Como respuesta reconocemos estos factores:

- 1- **Bombas de  $\text{Ca}^{++}$  ATPasa** en las membranas de organelas como el **retículo sarcoplásmico** y **retículo endoplásmico**. Estas bombas secuestran activamente el  $\text{Ca}^{++}$  del citosol en compartimientos intracelulares y luego el  $\text{Ca}^{++}$  pueden ser liberado al citoplasma en ráfagas como parte de un proceso de transducción de señal en respuesta a la despolarización de membrana o agentes humorales. Este mecanismo, por supuesto, muestra un límite en cuanto a la cantidad de  $\text{Ca}^{++}$  que se puede almacenar en la célula.
- 2- **Bombas (EPCP) de las membranas plasmáticas:** En la mayoría de las células juega un papel importante en la extrusión de  $\text{Ca}^{++}$  de la célula. Parecería que el aumento de los niveles de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular estimularían la bomba de  $\text{Ca}^{++}$  a sacar hacia el exterior  $\text{Ca}^{++}$  y de esta manera vuelven los niveles de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular a la normalidad. Aunque se ha comprobado que en realidad el propio  $\text{Ca}^{++}$  se muestra incapaz de ejercer este tipo de control de retroalimentación, porque tiene una la bomba muestra un alto Km para  $\text{Ca}^{++}$  intracelular. Sin embargo, cuando la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{++}$  se eleva, el  $\text{Ca}^{++}$  se une a una proteína conocida como **calmodulina** que tiene una alta afinidad por  $\text{Ca}^{++}$ . El **complejo** recién formado  **$\text{Ca}^{++}$ Calmodulina** se une a la bomba de  $\text{Ca}^{++}$  con un reducido valor de Km y se activa la bomba a concentraciones fisiológicas de  $\text{Ca}^{++}$ , y por lo tanto se activa la extrusión de este ion. Cuando cae la concentración de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular, disminuye también el nivel del **complejo calcio-calmodulina** y la bomba se inactiva nuevamente.

- 3- **Antiport  $\text{Na}^+\text{Ca}^{++}$  (NCX, o NaCa Exchanger) en la membrana plasmática:** Este mecanismo de transporte desempeña un papel clave en la extrusión de  $\text{Ca}^{++}$  sólo cuando la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{++}$  se eleva sustancialmente por encima de los niveles normales. Por lo tanto, **NCX** es especialmente importante en el restablecimiento de los niveles de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular cuando se producen grandes flujos de  $\text{Ca}^{++}$ , por ejemplo durante potenciales de acción en células excitables como las del músculo cardíaco.

### ¿Cómo se regula la concentración de $\text{Cl}^-$ ?

La concentración de  $\text{Cl}^-$  en todas las células está por debajo de la concentración de  $\text{Cl}^-$  en el espacio extracelular. Prácticamente todas las células tienen canales a través del cual puede penetrar  $\text{Cl}^-$  pasivamente. En una célula típica con un voltaje de la membrana de 60 mV en el interior negativo, la concentración de  $\text{Cl}^-$  intracelular debería ser una décima parte de la concentración extracelular si este anión se distribuyera de forma pasiva a través de la membrana plasmática. Tal es el caso para el músculo esquelético.

**En la mayoría de las células, la concentración de  $\text{Cl}^-$  se encuentra ligeramente por encima del equilibrio debido a la absorción de  $\text{Cl}^-$  por el intercambiador antiport de  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  y del balance que resulta de la acción de los cotransportes simport de  $\text{Na}^+\text{Cl}^-$  y de  $\text{K}^+\text{Cl}^-$ , y del flujo de salida pasiva de  $\text{Cl}^-$  a través de canales.**

Sin embargo, para la mayoría de tipos de células, la concentración de  $\text{Cl}^-$  intracelular es aproximadamente dos veces más alta que la esperable para la distribución pasiva, lo que indica la presencia de vías de transporte que median la captación activa de  $\text{Cl}^-$  en la célula.

Probablemente, la vía más común para la absorción de  $\text{Cl}^-$  es el **intercambiador de  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$** .

Debido a que la concentración de  $\text{HCO}_3^-$  intracelular es varias veces mayor que si se distribuyera de forma pasiva a través de la membrana celular, la diferencia de energía potencial electroquímica dirigida hacia el exterior de  $\text{HCO}_3^-$  puede actuar como una fuerza impulsora para la entrada de  $\text{Cl}^-$  en contra de su gradiente.

Otra vía que puede mediar el transporte  $\text{Cl}^-$  en contra de su gradiente en la célula es el **simport con  $\text{Na}^+$** , que es estimulado por la baja concentración de  $\text{Cl}^-$  intracelular. Ahora bien, dada la presencia de estas vías de transporte que median la absorción de  $\text{Cl}^-$ , ¿por qué esta es sólo 2 veces superior a la prevista para la distribución pasiva, y no mucho más?

La respuesta es que existe un flujo de salida de  $\text{Cl}^-$ , pasivamente, a través de los **canales** específicos para  $\text{Cl}^-$  en la membrana plasmática; flujo que se opone a los mecanismos de captación de  $\text{Cl}^-$ .

Otro factor que tiende a mantener bajos  $\text{Cl}^-$  en algunas células es el **simport  $\text{K}^+\text{Cl}^-$**  impulsado por la salida de  $\text{K}^+$  a favor de su gradiente, que tiende a mover  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  fuera de las células. Por lo tanto, el

$K^+$  es responsable del flujo de salida de  $Cl^-$  tanto mediante la generación de un potencial de membrana negativo en el interior de la célula a través de canales, como por el *simport*.

### ¿Cómo se regula la concentración de protones (y por lo tanto el pH) intracelular?

El protón o catión  $H^+$ , el anión  $HCO_3^-$  y el  $CO_2$ , dentro de un compartimiento particular, están generalmente en equilibrio entre sí.

El pH extracelular es normalmente cercano a 7,4, la concentración extracelular de  $HCO_3^-$  es de 24 mM, y la presión parcial de  $CO_2$  ( $PCO_2$ ) es aproximadamente de 40 mmHg.

**El intercambiador antiport  $Na^+H^+$  y el transportador *simport*  $Na^+HCO_3^-$  colaboran en el mantenimiento del pH intracelular y de la concentración de  $HCO_3^-$  por encima de sus valores de equilibrio.**

En una célula típica, pH intracelular es normalmente cercano a 7,2. Debido a que la  $PCO_2$  suele ser la misma a ambos lados de la membrana celular, la concentración intracelular de  $HCO_3^-$  puede calcularse en aproximadamente 15 mM.

A pesar de que el líquido intracelular es ligeramente más ácido que el extracelular, el pH intracelular es en realidad mucho más alcalino de lo que sería si  $H^+$  y  $HCO_3^-$  se distribuyeron de forma pasiva a través de la membrana celular. El  $H^+$  puede entrar en la célula de forma pasiva y el  $HCO_3^-$  puede salir de la célula de forma pasiva, aunque ambos procesos se producen a una velocidad bastante baja. Debido a que para el voltaje de la membrana de unos -60 mV se corresponde (*por la ecuación de Nernst*<sup>4</sup>) con un gradiente de concentración de 10 veces para un ion monovalente, uno esperaría que la concentración del catión  $H^+$  fuese 10 veces mayor dentro de la célula que en el compartimiento extracelular. Del mismo modo, cabría esperar que la concentración de  $HCO_3^-$  fuese sólo una décima parte de la concentración extracelular. Pero la observación de que el pH intracelular y la concentración de  $HCO_3^-$  intracelular se mantienen en valores mayores de lo previsto para una distribución pasiva a través de la membrana plasmática, nos indica que en las células debe existir algún mecanismo que logre extraer activamente el catión  $H^+$  o ingresar activamente el anión  $HCO_3^-$ .

El transporte de ácido (cationes  $H^+$ ) fuera de la célula o de la base ( $HCO_3^-$ ) en la célula se denomina colectivamente *extrusión de ácido*. **En la mayoría de las células, las *extrusoras de ácido* son transportadores activos secundarios que toman energía del gradiente electroquímico del catión  $Na^+$ .**

Las *extrusoras de ácidos* más importantes son el intercambiador **antiport  $Na^+H^+$**  y el **transportador de  $Na^+/Cl^-/HCO_3^-$** , así como el ***simport*  $Na^+HCO_3^-$** . Estos sistemas de transporte son generalmente

<sup>4</sup> Como se desarrollará más adelante en este curso de Biofísica, el potencial de equilibrio de Nernst, relaciona la diferencia de potencial a ambos lados de una membrana biológica en el equilibrio con las concentraciones de los iones del medio externo e interno.

sensibles a los cambios en pH intracelular; son estimulados cuando la célula se acidifica y se inhiben cuando se alcaliniza la célula. Por lo tanto, estos transportadores mantienen pH intracelular en un rango que es óptimo para el funcionamiento celular.

### ¿Cómo se regula el transporte de agua y el volumen celular?

*El transporte de agua a través de membranas biológicas es siempre pasivo.* No se han descrito nunca bombas de agua.

**El transporte de agua es impulsado por las diferencias de presión osmótica e hidrostáticas a través de membranas**

En cierta medida, muy modesta, las moléculas de agua en forma individual pueden disolverse en la bicapa lipídica y por lo tanto moverse a través de las membranas celulares por difusión simple a una velocidad muy baja. Por lo tanto, no es sorprendente que las membranas plasmáticas de muchos tipos de células se encuentren **canales** para el agua, llamados **acuaporinas**, que sirven como conductos **pasivos** para el transporte de agua a velocidades apreciables. La presencia de las **acuaporinas** aumenta en gran medida la permeabilidad al agua de la membrana. En algunas células, tales como eritrocitos o el túbulo proximal renal, **AQP1** siempre está presente en la membrana. En las células de los conductos colectores del riñón se regula la permeabilidad de sus membranas apicales al H<sub>2</sub>O mediante la inserción de los canales de agua **AQP2** dependiendo del control hormonal de la **vasopresina**.

El transporte de agua a través de una membrana es siempre una función lineal **no saturable** de su fuerza motriz neta. La dirección de transporte pasivo neto de un soluto no cargado es siempre “hacia abajo” o a favor del gradiente en virtud de su diferencia de energía potencial químico. Para el **agua**, debemos tener en cuenta **dos fuerzas impulsoras pasivas**.

- 1- La primera es la **diferencia de potencial químico**, que depende de la diferencia en la concentración de agua en los dos lados de la membrana.
- 2- La segunda es la diferencia de energía que resulta de la **diferencia de presión hidrostática** a través de la membrana. Por lo tanto, la diferencia de energía neta a través de la membrana es la suma de las diferencias de potencial de energía química y de presión hidrostática:

$$\Delta\mu_{\text{H}_2\text{O},\text{total}} = \Delta\mu_{\text{H}_2\text{O}} + \Delta\mu_{\text{H}_2\text{O},\text{pressure}}$$

$$\underbrace{\Delta\mu_{\text{H}_2\text{O},\text{total}}}_{\text{Total energy difference}} = \underbrace{RT \ln \frac{[\text{H}_2\text{O}]_i}{[\text{H}_2\text{O}]_o}}_{\text{Chemical part}} + \underbrace{\bar{V}_W (P_i - P_o)}_{\text{Pressure part}}$$

En donde **P** es la presión hidrostática y **V<sub>w</sub>** es el *volumen molar parcial del agua* (es decir, el volumen ocupado por 1 mol de agua).

Debido a que el producto de la presión y el volumen es **trabajo**, el segundo término de la ecuación es trabajo por cada mol.

Tratar con concentraciones de agua es engorroso e impreciso debido a que la concentración de agua es muy alta (aproximadamente 56M) y no cambia sustancialmente en las soluciones diluidas que son las que nos interesan; por lo tanto, *es más práctico para trabajar con la inversa de la concentración de agua* es decir, la **concentración de solutos osmóticamente activos**, o la **osmolalidad**.

Las unidades de la osmolalidad son osmoles por kilogramo de agua, u OSM. En soluciones diluidas, el gradiente de H<sub>2</sub>O a través de la membrana de la célula es aproximadamente proporcional a la diferencia de osmolalidades través de la membrana:

$$\ln \frac{[\text{H}_2\text{O}]_i}{[\text{H}_2\text{O}]_o} \cong \bar{V}_W (\text{Osm}_o - \text{Osm}_i)$$

La osmolalidad es la concentración total de todos los solutos osmóticamente activos en el compartimiento indicado. Sustituyendo las ecuaciones se genera una expresión más útil para la **diferencia de energía total a través de la membrana**:

$$\underbrace{\frac{\Delta\mu_{\text{H}_2\text{O},\text{total}}}{\text{mole}}}_{\text{Energy}} \cong \underbrace{\bar{V}_W}_{\text{Volume}} \underbrace{[RT(\text{Osm}_o - \text{Osm}_i) + (P_i - P_o)]}_{\text{Pressure}}$$

En esta ecuación, los términos dentro de los corchetes tienen las unidades de **presión** (fuerza/área) y por lo tanto describen la fuerza motriz para el movimiento de agua desde el interior hacia el exterior de la célula. **Esta fuerza de conducción determina el flujo de agua a través de la membrana**:

$$J_V = L_p [RT(\text{Osm}_o - \text{Osm}_i) + (P_i - P_o)]$$

$J_v$  es positivo cuando el agua fluye fuera de la célula y tiene las unidades de  $\text{litros} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

La constante de proporcionalidad  $L_p$  es la **conductividad hidráulica**. El agua está en equilibrio a través de la membrana cuando la fuerza motriz neta para el transporte de agua es nula, es decir cuando  $\Delta\mu_{\text{H}_2\text{O}}$  vale cero, y en ese caso podemos igualar:

$$RT(\text{Osm}_i - \text{Osm}_o) = (P_i - P_o)$$

$$\underbrace{(\pi_i - \pi_o)}_{\substack{\text{Osmotic} \\ \text{pressure difference} \\ \Delta\pi}} = \underbrace{(P_i - P_o)}_{\substack{\text{Hydrostatic pressure} \\ \text{difference} \\ \Delta P}}$$

El término de la izquierda se refiere como la diferencia de presión osmótica ( $\Delta\pi$ ). Por lo tanto, **en el equilibrio, la diferencia de presión osmótica es igual a la diferencia de presión hidrostática ( $\Delta P$ ).**

Una diferencia de presión osmótica de 1 mosm/kg  $\text{H}_2\text{O}$  (o 1 mOsm) es equivalente a una diferencia de presión hidrostática de 19,3 mmHg a la temperatura corporal normal.

Las membranas plasmáticas de las células animales no son tan rígidas (a diferencia de las paredes de las células vegetales) y no pueden tolerar ninguna diferencia significativa de la presión hidrostática sin deformarse. Por lo tanto, **la diferencia de presión hidrostática a través de una membrana celular es prácticamente siempre cerca de cero y por lo tanto no es una fuerza impulsora significativa para el transporte de agua.**

**El movimiento del agua dentro y fuera de las células es impulsado por sólo gradientes osmóticos**, es decir, por las diferencias en la osmolalidad través de la membrana. Por ejemplo, si la osmolalidad es mayor fuera de la célula que en el interior, el agua fluirá fuera de la célula y la célula se encogerá. Tal movimiento del agua impulsada por gradientes osmóticos se llama ósmosis.

El agua está en equilibrio a través de las membranas celulares sólo cuando la osmolalidad dentro y fuera de la célula es el mismo.

Diferencias de presión hidrostática son una importante fuerza motriz para la conducción de fluidos a cabo a través de las paredes de los capilares. Solutos pequeños penetran libremente a través de la mayoría de los capilares. Por lo tanto, cualquier diferencia en la presión osmótica como resultado de estos pequeños solutos no ejerce una fuerza motriz para el flujo de agua a través de ese capilar. La situación es muy diferente para las proteínas del plasma, que son demasiado

grandes para penetrar en la pared capilar libremente. Como resultado, la presencia de una mayor concentración de proteínas del plasma en el compartimiento intravascular que en el líquido intersticial establece una diferencia de presión osmótica que tiende a tirar de fluido de nuevo en el capilar. Esta diferencia se denomina presión osmótica coloidal o **presión oncótica**.

Volveremos sobre esto cuando tratemos el tema Equilibrio de Donnan<sup>5</sup>.

### ¿Hay otras formas de intercambio de sustancias entre la célula y el exterior?

Sí, quedan pendiente de análisis los procesos de endocitosis y exocitosis, pero se estudiarán en otras asignaturas.

## EJERCICIO MODELO

**Ejercicio:** Las estimaciones actuales indican que en su funcionamiento la bomba de Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPasa bombea al interior de la célula aproximadamente dos iones K<sup>+</sup> y al exterior tres iones Na<sup>+</sup> por cada molécula de ATP hidrolizado. ¿Es razonable este cálculo desde el punto de vista termodinámico?

Resolución: Para responder a esta cuestión corresponde calcular, por un lado, la energía libre necesaria para tomar 3 moles de Na<sup>+</sup> desde el compartimiento en que está con una concentración 10mM y llevarlos al compartimiento en donde está con una concentración de 140 mM (es decir, en contra de su gradiente químico); y por otro lado la energía libre necesaria para tomar 2 moles de K<sup>+</sup> desde el compartimiento en que está a una concentración de 5mM y llevarlos al compartimiento en que está a una concentración de 100mM, a 37°C. Debemos tener en cuenta el potencial de membrana que es de aproximadamente de 0.07 voltios (70 mV). Sabemos que el interior de la membrana es más negativo que el exterior, por lo que este potencial se opone al flujo de cargas positivas hacia el exterior de la célula.

Entonces, por cada mol de Na<sup>+</sup>, tenemos

$$\Delta G = n.R.T \ln (\text{concentración destino}/\text{concentración origen}) - z.F.\Delta\text{Voltaje}$$

Para el Na<sup>+</sup>

$$\Delta G = [3 \text{ moles} \times 8.31 \text{ J/k.mol} \times 310\text{K} \times \ln (140/10)] - [1 \times 96500 \text{ J/volt.mol} \times 0.07 \text{ volt}]$$

$$\Delta G = 20395,42 - 6755 = 13640,42 \text{ J} = \mathbf{13,64 \text{ kJ}}$$

<sup>5</sup> Como se estudiará oportunamente, el equilibrio de Gibbs - Donnan es el equilibrio que se produce entre los iones que pueden atravesar la membrana y los que no son capaces de hacerlo. Las composiciones en el equilibrio se ven determinadas tanto por las concentraciones de los iones como por sus cargas.

Para  $K^+$

$$\Delta G = [2 \text{ moles} \times 8.31 \text{ J/k.mol} \times 310\text{K} \times \ln(100/5)] - [1 \times 965000 \text{ J/volt.mol} \times (-0.07 \text{ volt})]$$

$$\Delta G = 15434,61 + 6755 = 22189,61 \text{ J} = \mathbf{22,19 \text{ kJ}}$$

$$\Delta G_{\text{movimiento de ambos cationes}} = 13640,42 + 22189,61 = 35830,03 \text{ J} = \mathbf{35,83 \text{ kJ}}$$

En las condiciones intracelulares el  $\Delta G$  de la hidrólisis de 1 mol de ATP es de -51,8 kJ, de manera que el balance total es

$$\Delta G_{\text{total}} = 13,64\text{kJ} + 22,18 \text{ kJ} - 51,8 \text{ kJ} = \mathbf{-15,98 \text{ kJ}}$$

De manera que la hidrólisis de ATP basta para mantener estos gradientes de concentración en la estequiometría de transporte observada, lo que significa que la bomba es muy eficaz.

A pesar del transporte en contra de gradientes fuertes, la bomba  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPasa no transgrede los principios de la termodinámica.

La única exigencia es que la hidrólisis del ATP y el transporte estén acoplados.

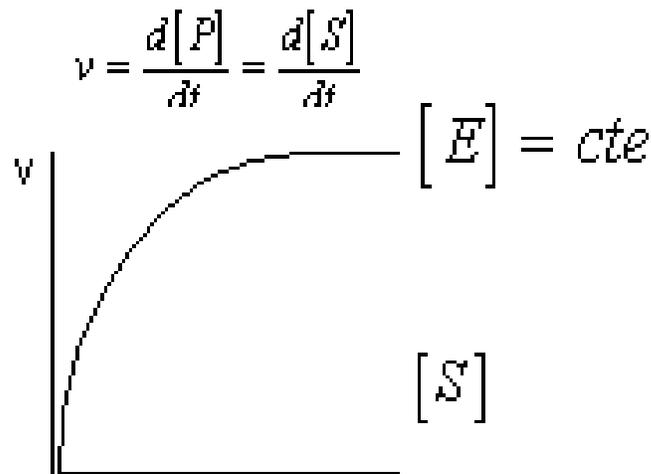
### BIBLIOGRAFÍA

- Medical Physiology - A Cellular and Molecular Approach - UPDATED SECOND EDITION - Walter F. Boron, MD, PhD - Emile L. Boulpaep, MD - ISBN: 978-0-8089-2449-4 – Ed Elsevier
- Manual de Fisiología y Biofísica - Ricardo Montoreano – Edición digital

## Anexo de lectura opcional

### CINÉTICA DE MICHAELIS – MENTEN

Las reacciones enzimáticas se caracterizan porque aunque se aumente la concentración de sustrato la velocidad no aumenta linealmente, aparece un efecto de saturación. La saturación se debe a que todos los centros activos están ocupados. La velocidad depende de la cantidad de enzima con sustrato suficiente. Consideraremos sólo la velocidad inicial de las reacciones para cada concentración de sustrato cuando se construya una gráfica, evitando el error introducido por el deterioro del enzima. Como en el primer momento no hay producto no consideraremos la reacción contraria.



La velocidad depende de una constante de velocidad  $K$  y de su inversa:

$K_1$   $K_2$

$E + S \leftrightarrow ES \leftrightarrow E + P$

$K_{-1}$   $K_{-2}$

El paso limitante en la velocidad es  $K_2$ , por lo tanto la expresión de la velocidad será:

$v = K_2 \cdot [S]$

Donde  $K_2$  también recibe el nombre de  $K_{CAT}$ . La concentración de enzima será mucho menor que la de sustrato porque no se consume.

Los enzimas que siguen esta cinética se dice que siguen la cinética de Michaelis - Menten.

Al aumentar la concentración de enzima la gráfica es igual pero por arriba.

### ECUACIÓN DE VELOCIDAD DE MICHAELIS - MENTEN

La concentración de sustrato libre será prácticamente la concentración inicial porque la cantidad de enzima es muy pequeña. Haremos las siguientes consideraciones:

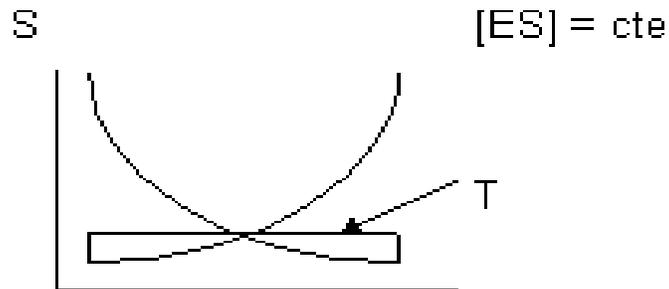
- $S_0 = [S] + [SE]$  donde  $[SE]$  puede despreciarse.
- $E_T = [E] + [ES]$
- $[E] \neq E_T$
- la velocidad de transformación de sustrato en producto está limitada por  $K_2$

$$v_0 = K_{CAT} \cdot [ES]$$

- Hipótesis del estado estacionario: como la concentración de enzima es muy pequeña y la concentración de sustrato muy grande en el primer momento se llega a una concentración de complejo enzima - sustrato que es constante para toda la reacción.

$$\frac{d[S]}{dt} = v = \frac{d[P]}{dt}$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = cte$$



- El enzima siempre tiene moléculas de sustrato en su centro activo de manera que la concentración de enzima - sustrato será prácticamente constante por lo que:  
velocidad de formación = velocidad de descomposición

$$K_1 \cdot [E] \cdot [S] = K_{-1} \cdot [ES] + K_{CAT} \cdot [ES]$$

$$[ES] \cdot (K + K_{CAT})$$

$$[ES] = \frac{K_1 \cdot [E] \cdot [S]}{K_{-1} + K_{CAT}} = \frac{[E] \cdot [S]}{K_{-1} + K_{CAT} / K_1}$$

A la relación entre constantes se le denomina constante de Michaelis - Menten:

$$K_m = (K_{-1} + K_{CAT}) / K_1$$

En lugar de ponerlo en función de enzima libre lo ponemos en función de complejo enzima - sustrato:

$$[E] = [E_T] - [ES] \Rightarrow [ES] = \frac{([E_T] - [ES]) \cdot [S]}{K_m} = \frac{[E_T] \cdot [S] - [ES] \cdot [S]}{K_m}$$

$$K_m \cdot [ES] = [E] \cdot [S] - [ES] \cdot [S] \Rightarrow [ES](K_m + [S]) = [E] \cdot [S]$$

$$v_0 = K_{cat} \cdot [ES] = K_{cat} \cdot [E_T] \cdot [S] / (K_m + [S]) = \text{considerando que } [ES] = [E_T] \Rightarrow K_{cat} = [E_T] = V$$

Esto es válido para cuando todo el enzima esté formando complejo enzima - sustrato y si el enzima sigue la cinética de Michaelis - Menten.

$$v_0 = V \cdot [S] / (K_m + [S])$$

- Si la concentración de sustrato es muy pequeña podemos despreciarla en el denominador.

$$v_0 = V \cdot [S] / K_m$$

La velocidad crece proporcionalmente a la concentración de sustrato, es de orden 1 respecto a el sustrato.

- Si la concentración de sustrato es grande,  $K_m$  es despreciable:

$$V = v_0$$

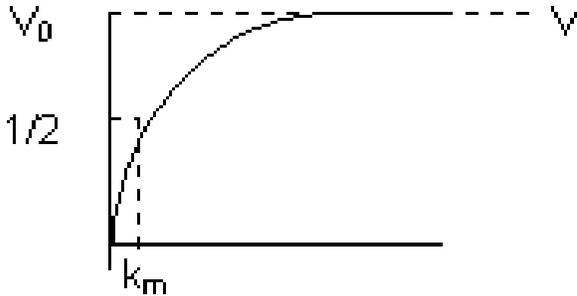
La velocidad es independiente respecto a la concentración de sustrato. Es lo que ocurre en el tramo final de la gráfica que tiende asintóticamente a  $V$ . Es la ecuación de una hipérbola.

El enzima presenta saturación de velocidad respecto a la concentración de sustrato. El enzima no seguirá la cinética de Michaelis - Menten si tiene cooperatividad en la unión del sustrato por lo que la curva será sigmoidea. La  $V$  será igual y la saturación dependerá e la concentración de enzima. La saturación se alcanza para determinada concentración de enzima, si la concentración de enzima es el doble la velocidad será el doble. La velocidad y  $v$  son dos formas de expresar la actividad de una proteína.

### SIGNIFICADO DE LOS PARÁMETROS

**$K_m$** : Relación entre las constantes cinéticas. Caracteriza la interacción del enzima con su sustrato, aunque no depende de sus concentraciones. El valor fisiológico de  $K_m$  va desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-7}$  M. Tiene unidades de concentración. Se puede calcular gráficamente su valor:

$$v_0 = V/2 = V \cdot [S] / (K_m + [S]) \rightarrow K_m = [S]$$



$K_m$  tiene el mismo valor que la concentración de sustrato.

Se suele relacionar con otras constantes:

- Si  $K_{cat}$  es mucho más pequeña que  $K_{-1}$ ,  $K_{cat}$  es despreciable en el numerador:

$$K_m = K_{-1} / K_1 = 1 / K_{afinidad}$$

Por lo tanto  $K_m$  es una medida inversa de la afinidad del enzima por el sustrato. Al aumentar  $K_m$ ,  $K_{afinidad}$  baja.

**$K_{cat}$** : constante catalítica. Es la capacidad del enzima para llevar a cabo la transformación. Recibe también el nombre de número de recambios, cantidad máxima de moléculas transformadas por unidad de tiempo (sustrato, producto) por molécula de enzima o por número de sitios activos. Siempre en condiciones de saturación de manera que la cantidad de sustrato no sea limitante. Se mide en  $s^{-1}$ . El número de recambios se calcula fácilmente:

$$K_{cat} = V / [E_T]$$

$K_{CAT} / K_M$ : establecer eficacia catalítica del enzima. En las células para enzimas de Michaelis - Menten la concentración de sustrato es mucho más pequeña que  $K_m$ , como mucho son iguales. Si la concentración de sustrato es mucho menor la velocidad cambia mucho para intervalos de concentración de sustrato pequeños. Podemos despreciar en el denominador:

$$v_0 = V \cdot [S] / K = (K_{cat} / K_m) \cdot [E] \cdot [S]$$

donde  $K_{CAT} / K_M$  es la constante de un proceso que depende de las concentraciones de enzima y sustrato (es como si fuera su constante de velocidad). Tiene un límite superior en  $K_1$ . Ello significa que la reacción más rápida depende de  $K_1$  y ésta de la unión de enzima y sustrato. Los enzimas con cinética más rápida son los de difusión de enzima - sustrato más alta, que es la rapidez con la que el sustrato llega al sitio activo. Cada vez que un sustrato llega a un sitio se transforma, por lo que la velocidad depende de lo rápido que llega el sustrato al sitio.

$$\lim_{K_{cat} \rightarrow 0} \frac{K_{cat}}{K_m + K_{cat}} = \frac{K_1 \cdot K_{cat}}{\frac{K_1}{K_{cat}} + K_{cat}} = K_1$$

Por ello  $K_{CAT} = \infty$ . Para el enzima más rápido la velocidad depende sólo de  $K_1$ . Los enzimas con  $K_{cat}/K_m = K_1$  son los más rápidos posible y se dice que han alcanzado la perfección cinética.

$K_{cat}/K_m$  es el criterio de especificidad (grado de discriminación) que no depende de  $K_m$  sino de  $K_{cat}/K_m$  que permite distinguir entre dos sustratos con los que puede actuar.

$$E + A \xrightarrow{EA} dP \quad V_A$$

$$E + B \xrightarrow{EB} dp \quad V_B$$

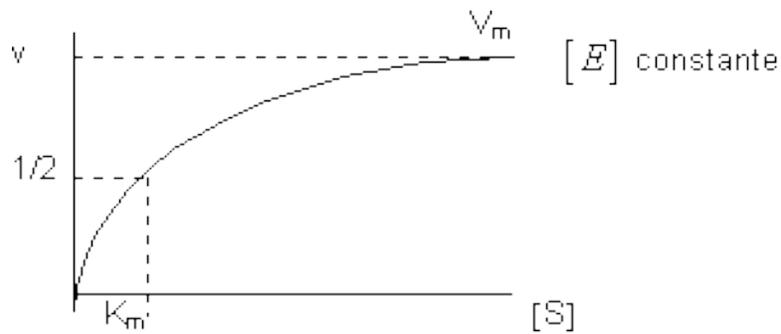
Si el enzima es más específico por A entonces  $V_A > V_B$ ,  $V_A/V_B > 1$  prefiere A.. Si se ponen en concentraciones iguales siendo la concentración de enzima constante:

$$V_A = K_{cat}^A / K_m^A \cdot [E] \cdot [A]$$

$$V_B = K_{cat}^B / K_m^B \cdot [E] \cdot [B]$$

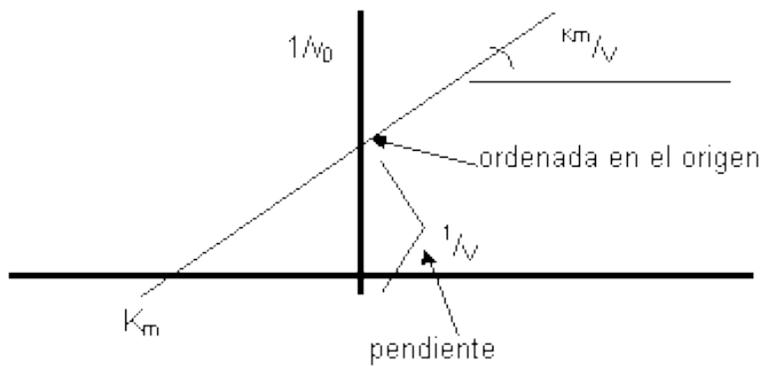
$$V_A/V_B = (K_{cat}^A / K_m^A) / (K_{cat}^B / K_m^B)$$

Cálculo gráfico.



Transformamos la ecuación en la de los dobles inversos con lo que sale la ecuación de una recta, calculando sólo algunos puntos se puede obtener:

$$1/v_0 = (K_m + [S]) / (V \cdot [S]) = (K_m/V) \cdot (1/[S]) + (1/V)$$



**Editor del anexo de lectura opcional "CINÉTICA DE MICHAELIS – MENTEN"**

Fiscanet®

[http://www.fiscanet.com.ar/quimica/bioquimica/ap05\\_enzimas.php](http://www.fiscanet.com.ar/quimica/bioquimica/ap05_enzimas.php)