

El estudio de canales iónicos de membrana en células epiteliales de los túbulos renales.

Juan José Bolívar González, Gloria Reyes Guerrero
Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM

(Recibido, marzo 4, 1994; aceptado, mayo 31, 1994)

En la membrana plasmática de las células epiteliales, los canales iónicos juegan un papel importante en el mantenimiento del potencial de membrana, la regulación del volumen celular y el transporte transmembranal de electrólitos. Estas funciones, que son similares a las desempeñadas por los canales iónicos de una gran variedad de células no epiteliales, se encuentran aquí adaptadas a la especialización funcional de los epitelios, y, dentro de esta especialización, el papel más importante desempeñado por los canales iónicos es, sin duda, su participación en el transporte transepitelial de electrólitos¹⁻⁴. Dicha adaptación depende no sólo de las características propias de cada canal sino también de que estos canales muestran una distribución polarizada, por lo que los canales de la membrana apical (mucosa) son diferentes de los que son propios de la membrana basolateral (serosa).

Para ilustrar la importancia de la distribución asimétrica de los canales iónicos en el transporte iónico transepitelial, nos referiremos al mecanismo de transporte de Na^+ a través de la piel de rana (epitelio modelo de tipo renal). Este epitelio presenta un transporte neto de Na^+ en dirección mucosa a serosa, el cual genera un potencial eléctrico transepitelial negativo (lado mucoso respecto a seroso). A principios de siglo (1908), Galeotti explicó este potencial suponiendo que el epitelio es más permeable al Na^+ en la dirección mucosa a serosa que en la dirección opuesta⁵; lo que, al permitir un flujo de Na^+ mayor en la primera dirección que en la segunda, daría origen a dicho potencial. Medio siglo después (1958), Koefoed-Johnsen y Ussing⁶ propusieron el modelo de las dos barreras en serie (que es aún hoy el modelo básico para el transporte iónico transepitelial) en el que se postula (Fig. 1) que la membrana mucosa es selectivamente permeable al Na^+ mientras que la serosa lo es al K^+ , y que la bomba de Na^+/K^+ se

localiza exclusivamente en la membrana serosa. Según este modelo, la actividad de la bomba de Na^+/K^+ mantiene, en el medio intracelular (respecto al extracelular), una concentración de K^+ alta y una de Na^+ baja. En la membrana basolateral, la alta concentración intracelular de K^+ y la permeabilidad selectiva a K^+ hacen que éste tienda a salir de la célula y origine un potencial de membrana negativo (lado intracelular respecto a extracelular) que tiende al potencial de equilibrio de este ion (potencial de membrana en el que el ión deja de fluir en forma pasiva), el cual es dado por la ecuación de Nernst, que para una temperatura de 20°C puede ser escrita de la siguiente manera

$$E_{\text{K}^+} = -58 \text{ mV} \log ([\text{K}^+]_i / [\text{K}^+]_o) \text{ (ec.1)}$$

donde E_{K^+} es el potencial de equilibrio del K^+ y $[\text{K}^+]_i$ y $[\text{K}^+]_o$ son, respectivamente, la concentración intra y extracelular de K^+ . Además, la actividad electrogénica de la bomba (intercambio de 2 K^+ por 3 Na^+) también contribuye, aunque en forma modesta, a generar un potencial negativo en la membrana basolateral. En la membrana apical, la permeabilidad selectiva a Na^+ y el gradiente de concentración de Na^+ (que favorecen la entrada de este ion) ejercen una influencia capaz de generar un potencial de membrana positivo que tiende al potencial de equilibrio del Na^+ , que (a 20°C) es dado por

$$E_{\text{Na}^+} = +58 \text{ mV} \log ([\text{Na}^+]_o / [\text{Na}^+]_i) \text{ (ec.2)}$$

donde E_{Na^+} es el potencial de equilibrio del Na^+ y $[\text{Na}^+]_o$ y $[\text{Na}^+]_i$ son, respectivamente, la concentración extra e intracelular de Na^+ . Sin embargo, el potencial negativo en la membrana basolateral ejerce una influencia electrotrónica sobre la membrana apical que hace que su potencial tienda a ser negativo, por lo que la membrana apical adquiere un potencial significativamente más negativo que el

potencial de equilibrio del Na^+ (para que esto último ocurra es preciso que la permeabilidad a K^+ basolateral sea mucho mayor que la permeabilidad a Na^+ apical). La diferencia entre E_{Na^+} y el potencial de membrana apical proporciona la fuerza impulsora (diferencia de potencial que impulsa una corriente iónica) para que el Na^+ atraviese esta membrana (nótese la dependencia de la fuerza impulsora para el Na^+ con la permeabilidad basolateral a K^+). Así, en el modelo de las dos barreras en serie el Na^+ entra a la célula por la membrana apical, mediante un mecanismo pasivo, y sale de ella por la membrana basolateral, mediante el mecanismo activo de la bomba de Na^+/K^+ ; mientras que el K^+ recircula a través de la membrana basolateral, entrando mediante el mecanismo activo de la bomba y saliendo mediante un mecanismo pasivo. Los mecanismos pasivos de transporte responsables de la permeabilidad selectiva a Na^+ de la membrana apical y a K^+ de la membrana basolateral sólo pudieron ser identificados como canales iónicos a partir de 1977, año en el que Lindemann y cols demostraron, mediante análisis de ruido, la existencia de un canal selectivo a Na^+ en la membrana apical de la piel de rana^{7,8}.

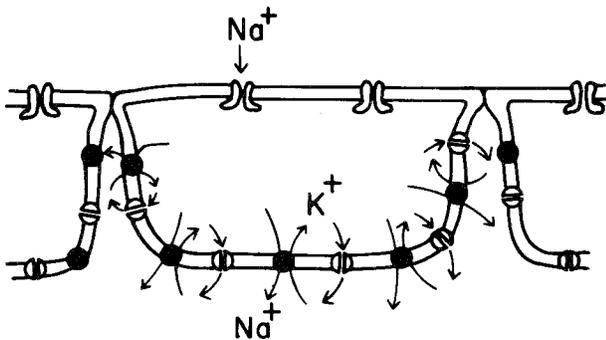


Fig. 1. Transporte transepitelial de sodio según el modelo de las dos barreras en serie. Explicación en el texto.

El estudio de canales iónicos en los epitelios renales es actualmente posible gracias al desarrollo de preparaciones *in vitro*, que conservan muchas de las principales características exhibidas por estos epitelios en su ubicación natural, y al empleo de avanzadas técnicas electrofisiológicas, cuyo uso ha proporcionado conocimientos de trascendental importancia en todas las áreas comprometidas con el transporte iónico a través de la membrana celular⁹⁻¹².

Cultivos celulares y otras preparaciones *in vitro* de células tubulares. Para el estudio de canales iónicos en células tubulares comúnmente se han empleado

tres tipos generales de preparaciones *in vitro*: el túbulo aislado, las células disociadas, y los cultivos celulares (Fig. 2). El túbulo aislado es indiscutiblemente la preparación que ofrece más ventajas en términos de que es la que mejor conserva las características funcionales del epitelio original; sin embargo, las dificultades que presentan su aislamiento y manejo han limitado su uso en los estudios sobre canales⁹. Las preparaciones de células disociadas son las más fáciles de obtener y manipular¹³, pero, por estar disociadas, estas células han perdido la polaridad ápico-basal de sus membranas, que es una de las características distintivas más importantes de la membrana de las células epiteliales^{14,15}. Los cultivos celulares, que representan el nivel intermedio tanto en las dificultades aludidas como en la conservación de las características funcionales originales, son sin duda el tipo de preparación más comúnmente empleado en los estudios sobre canales iónicos en células derivadas de los epitelios renales¹⁶. Sin embargo, conviene aclarar que los resultados obtenidos mediante el uso de cultivos celulares, lo mismo que los obtenidos en otras preparaciones *in vitro*, deben estar en concordancia con las observaciones realizadas en el órgano original. Con esto en mente cabe esperar que, con el empleo de cultivos primarios y gracias al continuo mejoramiento de las técnicas de cultivo, los resultados obtenidos mediante cultivos celulares constituyan una contribución valiosa para el conocimiento de los mecanismos de transporte iónico en los epitelios renales.

En términos generales, los cultivos de células epiteliales renales pueden ser agrupados en dos categorías: cultivos primarios y de líneas celulares. Un cultivo primario es el iniciado con células tomadas directamente de su ambiente natural; estas células son sometidas a un procedimiento de dispersión y, comúnmente, a otro de selección a fin de que la población del cultivo esté mayormente constituida por el tipo celular seleccionado. En estos cultivos, las células se dividen con lentitud y muestran un alto grado de conservación de las propiedades funcionales del epitelio original. Un cultivo de línea celular se inicia con células (de línea) que proceden de otras que han sido cultivadas durante muchas generaciones (celulares). Las células de estos cultivos han perdido varias de las características distintivas de las células en su ambiente natural, lo que hace casi imposible que las propiedades funcionales por ellas exhibidas puedan ser identificadas con certeza como las de un tipo particular de células tubulares¹⁶. A pesar de ello, los estudios en líneas celulares han proporcionado una información valiosa sobre las posibles características

de los canales iónicos de las células tubulares^{2,11,15,17,18}.

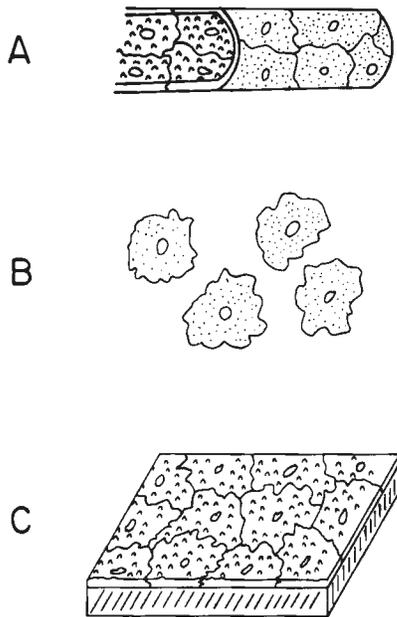


Fig. 2. Preparaciones *in vitro* usadas en la investigación sobre canales iónicos en los epitelios renales. A) túbulo aislado: a la izquierda, el túbulo ha sido seccionado para exponer la membrana apical de sus células; a la derecha, las células exponen su membrana basolateral. B) células disociadas: la membrana celular ha perdido su diferenciación en dominios apical y basolateral. C) cultivos celulares: las células crecen en monocapa sobre un substrato y exponen su membrana apical; la membrana basolateral puede quedar expuesta (no se muestra) si se despegó la monocapa de su substrato.

Canales iónicos y sus características distintivas. El transporte pasivo de iones a través de la membrana puede ocurrir a través de dos tipos de mecanismos: canales iónicos y acarreadores. En ambos casos, la molécula responsable del transporte es una proteína localizada a través de la bicapa lipídica de la membrana y la diferencia más relevante entre ambos tipos de mecanismos es dada por la magnitud del flujo iónico que transportan, ya que el flujo máximo teórico transportado por un acarreador es de diez mil iones por segundo, mientras que los canales iónicos comúnmente son capaces de transportar entre uno y cien millones de iones por segundo, flujo que es compatible con la existencia de un poro a través de la membrana^{10,19}.

En su forma más sencilla, un canal puede ser visualizado como una proteína de membrana con un poro en el centro por el que puede ocurrir un flujo iónico. La mayor o menor facilidad con la que los iones pueden fluir a través del poro define la permeabilidad del canal a estos iones. Un canal*

puede ser permeable a los iones de una sola sustancia, o de varias sustancias, e impermeable a las demás; si el canal es permeable a varias sustancias, su permeabilidad a cada una de ellas puede ser diferente; las propiedades de esta permeabilidad diferencial son típicas de cada canal y definen su selectividad iónica. La permeabilidad de un canal es un factor determinante de su conductancia, parámetro eléctrico dependiente de, pero no igual a, la permeabilidad^{10-12,19}. La conductancia de un canal es definida por la ley de Ohm y representa la relación entre la corriente iónica que lo atraviesa y el potencial eléctrico (fuerza impulsora) que impulsa esta corriente.

Casi todos los canales experimentan cambios conformacionales espontáneos; uno de estos cambios abre el canal; el cambio en sentido opuesto, lo cierra. Por lo que los canales fluctúan entre los estados abierto y cerrado (Fig. 3). Muchos canales presentan también un estado inactivado durante el cual el canal permanece cerrado todo el tiempo; al abandonar el estado inactivado, el canal vuelve a fluctuar entre sus estados abierto y cerrado (situación que a veces puede merecer el nombre de estado activado) y estas fluctuaciones cesan y reaparecen según el canal esté o no en estado inactivado. Los tiempos de permanencia en los diversos estados y la frecuencia de las transiciones entre los mismos son característicos de cada canal y definen las propiedades de compuerta, o cinética de apertura/cierre, de un tipo individual de canales^{20,21}.

En general, la cinética de apertura/cierre de un canal puede ser modificada por influencias reguladoras. De estas influencias, quizás, las más comunes son el potencial de membrana (voltaje) y el calcio libre intracelular; otras de ellas, quizás igual de comunes, aunque más difíciles de estudiar, son las ejercidas por sustancias químicas del tipo de las hormonas y segundos mensajeros. Además, algunos canales pueden ser influenciados por una diferencia de presión osmótica o hidrostática. Por otra parte, casi todos los canales pueden ser bloqueados por agentes farmacológicos o por iones no permeables, cada uno de los cuales afecta a un tipo específico de canal o a un número limitado de éstos¹⁰⁻¹².

Por último, cada tipo de canal sólo puede ser localizado en solo uno de los dominios membranales

* Los canales de cada tipo en particular poseen idénticas características distintivas, por lo que, en lo relacionado a éstas, el término canal designa a los canales de un mismo tipo.

(apical o basolateral) de un solo tipo celular de un epitelio en particular. Además, su número total en una membrana representa una característica adicional de gran importancia en el transporte iónico transepitelial^{15,22}.

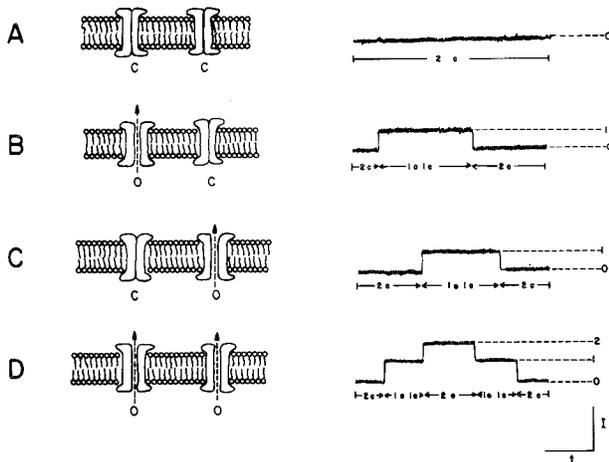


Fig. 3. Izquierda: representación hipotética de un parche de membrana que contiene dos canales iónicos de un mismo tipo, los cuales pueden estar cerrados (C) o abiertos (O), permitiendo, cuando están abiertos, un flujo (flecha) de corriente iónica. Derecha: esquemas idealizados de los registros que se obtendrían con la técnica de fijación en parche en las situaciones representadas a la izquierda. En A cuando ambos canales están cerrados (2c), la corriente registrada es igual a cero. En B y C, la apertura de un canal se registra como un salto brusco hacia un nuevo nivel de corriente (de 0 a 1), similar en ambos casos, el cual se mantiene mientras el canal permanece abierto (1o1c). En D, mientras un canal permanece abierto (1o1c), la apertura del otro canal se registra como un segundo salto, de igual amplitud que el primero, hacia un nuevo nivel de corriente (de 1 a 2), el cual se mantiene mientras ambos canales permanecen abiertos (2o).

Técnicas para el estudio de canales iónicos. En la actualidad las principales técnicas con las que los canales iónicos pueden ser estudiados, hasta el nivel de canal único, son: el análisis de ruido -o de fluctuación-, la reconstitución de canales en bicapas lipídicas y la fijación de voltaje en parches de membrana -fijación en parche o "patch clamp"^{8,10-12,15,22,24}.

Las tres técnicas mencionadas tienen en común el empleo de un método de fijación de voltaje a través de una membrana. Para comprender ésta es preciso considerar el comportamiento eléctrico básico de la membrana (Fig. 4). Una membrana puede ser representada mediante su circuito eléctrico equivalente consistente en una resistencia (R_m) y una capacitancia (C_m), conectadas en paralelo entre dos

medios conductores (soluciones electrolíticas). El potencial de membrana (V_m) resulta de una diferencia en el contenido de cargas a uno y otro lado del circuito. R_m representa a los elementos conductivos (canales iónicos) presentes en la membrana y es el resultado de la suma en paralelo de las resistencias de los canales individuales (la resistencia de un canal es la recíproca de su conductancia). C_m representa la capacidad de la membrana para mantener separada (por las propiedades aislantes de sus lípidos) una cantidad en exceso de cargas de un signo (no neutralizadas por cargas del signo opuesto) adosadas a uno de sus lados y la misma cantidad de cargas del otro signo adosadas al lado opuesto; por lo que las cargas a ambos lados se atraen eléctricamente y se inmovilizan entre sí. Nótese que la carga total de la membrana es igual a cero, que el desbalance de cargas sólo ocurre a través de la membrana y que C_m mantiene, pero no origina, este desbalance. Para que se genere una diferencia de cargas, y por lo tanto un V_m , debe ocurrir una corriente eléctrica a través de la membrana (I_m), la cual puede ser de dos tipos: corriente iónica (I_i), que involucra un flujo de cargas a través de la membrana, y corriente capacitiva (I_c), que involucra la adición a un lado de la membrana y la expulsión, del lado opuesto, de una cantidad de carga determinada por el V_m que se alcance y por C_m .

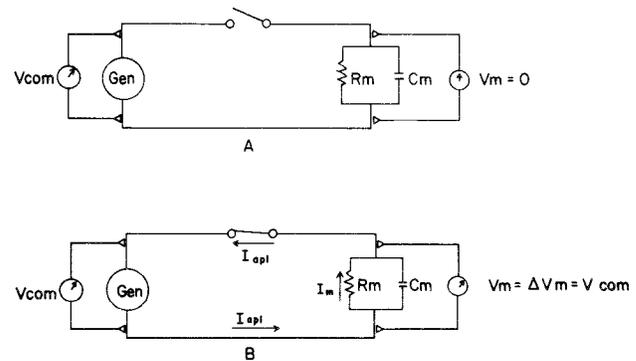


Fig. 4. Representación esquemática de la técnica de fijación de voltaje a través de una membrana. Derecha: circuito equivalente de membrana formado por una resistencia (R_m) y una capacitancia (C_m) a través de las cuales puede medirse un potencial de membrana (V_m). Izquierda: Generador de voltaje (Gen) entre cuyos polos puede medirse un potencial eléctrico (V_{com}). A) situación a circuito abierto: se considera que en ausencia de un flujo de corriente eléctrica V_m es igual a cero. B) situación a circuito cerrado: fluye una corriente eléctrica entre los polos del generador (I_{apl}) y a través de la membrana ($I_m = I_{apl}$) que induce un cambio en el potencial de membrana (ΔV_m) que hace que V_m se iguale a V_{com} .

Cuando una corriente iónica (I_i) fluye a través de R_m (canales de membrana) se genera un cambio en el potencial de membrana (ΔV_m) cuya magnitud (cuando ΔV_m adquiere un valor estable) es dada por la ley de Ohm, la cual puede expresarse como

$$\Delta V_m = I_i R_m = I_i / G_m \quad (\text{ec. 3})$$

donde G_m es la conductancia de la membrana (igual a la suma algebraica de las conductancias de todos sus canales). Esta I_i también origina una I_c , la cual ocurre en el tiempo en el que V_m está cambiando y desaparece cuando V_m alcanza un valor estable.

Por otra parte, si consideramos una membrana que separa dos soluciones electrolíticas, cada una de las cuales se encuentra en contacto eléctrico con uno de dos electrodos conectados a los polos opuestos de un generador de voltaje constante (Gen), cuando se hace fluir una corriente eléctrica entre los electrodos (I_{apl} , que fluye impulsada por una diferencia de potencial entre los polos del generador) se induce una I_m , de magnitud similar a la de la corriente aplicada, que genera, a su vez, un ΔV_m . Esta I_m consta, inicialmente, de un componente iónico y de un componente capacitivo, el último de los cuales desaparece cuando ΔV_m alcanza un valor estable, por lo que cuando esto ocurre se cumple que

$$I_{apl} = I_m = I_i \quad (\text{ec. 4})$$

e igualmente se cumple la relación descrita en la ecuación 3. Al cesar I_m , ΔV_m desaparece con una rapidez que es función de C_m .

La fijación de voltaje consiste, básicamente, en igualar la magnitud del potencial eléctrico a través de una membrana a la de un voltaje comando (V_{com}) establecido electrónicamente mediante un generador de voltaje. Para ello, supongamos que partimos de la situación ilustrada en la Fig. 4-A (con uno de los electrodos no conectado al generador -circuito abierto-) en la que V_m y V_{com} son diferentes (por simplicidad consideramos que $V_m = 0$ y $V_{com} > 0$) y que pasamos (cerrando el circuito) a la situación ilustrada en la Fig. 4-B (en la que $V_m = \Delta V_m = V_{com}$). Cuando se cierra el circuito, fluye una corriente eléctrica (I_{apl}) entre los polos del generador, cuya magnitud alcanza un valor estable cuando $V_m = V_{com}$. Al llegar a este punto se cumple que (ecuaciones 3 y 4)

$$V_{com} = V_m = \Delta V_m = I_m R_m = I_{apl} R_m \quad (\text{ec. 5})$$

y puesto que V_{com} , V_m , I_{apl} e I_m pueden ser medidas (esta última se mide indirectamente a partir de I_{apl}), R_m y G_m pueden calcularse a partir de las ecuaciones 3, 4 y 5. Por lo anterior, queda claro que el método de fijación de voltaje permite medir la intensidad de la corriente iónica que fluye a través de una membrana en presencia de un determinado potencial de membrana, el cual es fijado electrónicamente y puede ser manipulado con fines experimentales^{19, 25}.

En la técnica de análisis de ruido, la fijación de voltaje se realiza a través de un epitelio íntegro (a través de las membranas apical y basolateral conectadas en serie y estando esta conexión en serie, conectada, a su vez, en paralelo, con la resistencia de la unión estrecha), por lo que la corriente iónica que se mide es la que fluye a través de todo el epitelio (corriente de cortocircuito, I_{sc}). A primera vista, resulta difícil darse cuenta de cómo midiendo la I_{sc} puede obtenerse información sobre la corriente iónica que fluye a través de los canales individuales. Esta información se obtiene a partir del ruido presente en los registros de I_{sc} . Dicho ruido se compone de pequeñas fluctuaciones en el nivel de la corriente que se registra y parte de estas fluctuaciones son debidas a la apertura y cierre de canales iónicos. Mediante un elaborado análisis matemático, las fluctuaciones debidas a la apertura y cierre de canales iónicos pueden ser separadas de las fluctuaciones de otros orígenes y mediante su análisis se obtiene información sobre la amplitud de las corrientes de canal único y sobre la cinética de apertura y cierre de los canales. El empleo del análisis de ruido se ha visto limitado no sólo por la complejidad requerida para el análisis de las mediciones realizadas, sino también debido a que, en general, sólo es útil para estudiar los epitelios de tipo hermético ("tight"), que son aquéllos con elevada resistencia eléctrica transepitelial^{8, 22}.

La reconstitución en bicapas lipídicas requiere del aislamiento de vesículas de membrana celular que contengan canales iónicos; estas vesículas se fusionan con bicapas lipídicas artificiales con lo que se logra incorporar sus canales en la bicapa. Debido a que el origen de las vesículas es incierto, la identificación de sus canales se basa en el conocimiento previo de algunas de sus propiedades que debieron, con anterioridad, haberse identificado con otra técnica. Aquí, la fijación de voltaje se realiza a través de la bicapa lipídica y la corriente que se registra es la que fluye a través de los pocos canales iónicos incorporados a la bicapa, por lo que los registros eléctricos que se obtienen con esta técnica son muy similares a los obtenidos con la fijación en parche¹⁵.

La fijación en parche es, con mucho, la técnica que más ha contribuido a impulsar el estudio de canales iónicos en células de los epitelios renales. Esta técnica permite estudiar un canal iónico en su ambiente natural de la membrana celular o, bien, arrancarlo mecánicamente de ella (como en un bocado) incluido en un parche de membrana, cuya orientación puede determinarse a voluntad. Permite, además, el estudio tanto de canales únicos como de la población total de canales en la membrana celular^{10-12,23,24}.

La técnica de la fijación en parche. Esta técnica utiliza micropipetas de vidrio con puntas (1 a 2 μm de diámetro) de bordes romos. El interior de la micropipeta se llena con una solución salina (generalmente isotónica) y se pone en contacto eléctrico, a través de un electrodo, con un sistema de amplificación/fijación de voltaje (generador de voltaje); el circuito eléctrico se cierra mediante un electrodo en contacto con el baño. Mediante un micromanipulador, la punta de la micropipeta se acerca a la célula hasta hacer contacto con la membrana y succionando esta última se logra adherir un parche de membrana a los bordes de la punta de la micropipeta (Fig. 5); el procedimiento puede: detenerse en este punto para estudiar los canales presentes en el parche de membrana (configuración "in situ" o "cell attached"); continuarse mediante un retroceso de la micropipeta, con lo que se arranca el parche de membrana (a manera de un bocado), el cual queda con la superficie intracelular en contacto con el baño (configuración lado interno hacia afuera o "inside-out"); o continuarse rompiendo (generalmente por succión) la parte del parche no adherida a los bordes de la micropipeta, con lo que la solución de llenado de ésta queda en contacto con el (y sustituye al) medio intracelular (configuración célula completa o "whole cell"). A partir de esta última configuración puede retrocederse lentamente la micropipeta, lo que, al estirar la membrana por su parte adherida a la punta, induce la formación de un puente tubular de membrana que, posteriormente, se rompe y resella en forma espontánea, obteniéndose, de esta manera, otro parche de membrana adherido a la punta de la micropipeta pero con su superficie extracelular en contacto con el baño (configuración lado externo hacia afuera o "outside-out").

Independientemente de la configuración elegida, mediante el amplificador/fijador de voltaje, que se encuentra eléctricamente conectado con la solución de llenado de la micropipeta y con la solución de baño, el potencial eléctrico a través de la membrana (del parche o de toda la célula) puede fijarse a voluntad, lo

que induce una corriente iónica a través de los canales, la cual puede ser detectada, medida y caracterizada^{10,12,20}.

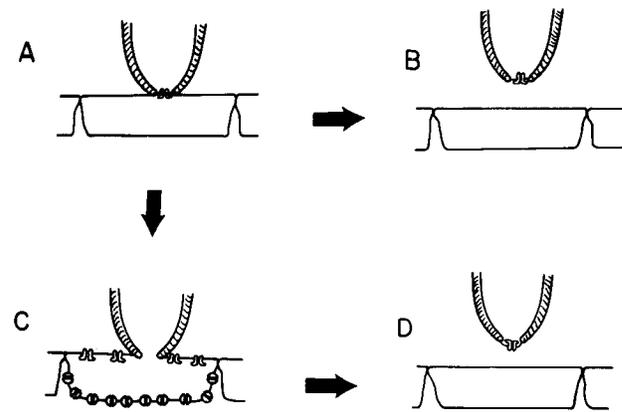


Fig. 5. Las cuatro configuraciones básicas de la técnica de fijación en parche: A) "in situ", B) lado interno hacia afuera, C) célula completa y D) lado externo hacia afuera. Los canales representados son los que, por su ubicación, pueden ser estudiados en las diferentes configuraciones.; así, en A, B y D se representan (mediante un único canal) los canales presentes en un parche de membrana, mientras que en C están representados todos los canales de la membrana celular. La flecha indica la posibilidad de pasar de una configuración a otra.

La fijación en parche, en sus diferentes configuraciones, permite la determinación de todas las características distintivas de los canales iónicos. En términos generales, esta técnica maneja tres tipos de variables (independientes) sujetas a la voluntad del experimentador, que podemos clasificar en: variables mecánicas (tipo de membrana: apical, basolateral o ambas; y configuración elegida); ambientales (composición de las soluciones en la micropipeta y baño, presión y temperatura); y eléctricas (magnitud del potencial a través de la membrana). Al manipular los dos últimos tipos de variables, se provocan cambios en las dos variables (dependientes) que dependen de las propiedades individuales de los canales (corriente eléctrica que fluye por cada canal -corriente unitaria- y cinética de apertura/cierre de los canales), con lo que se obtiene información sobre la conductancia de los canales y sobre las influencias que regulan su cinética de apertura/cierre; y al elegir entre las variables del primer tipo se obtiene información sobre el dominio membranar -apical o basolateral- donde se localiza el canal, sobre el número de canales presentes, o sobre si una determinada substancia reguladora ejerce su acción desde el lado intra o extracelular del canal^{10-12,23}.

A fin de dar un ejemplo sencillo sobre la manera de estudiar los canales iónicos con la técnica de fijación en parche, imaginemos que hemos aislado un parche de membrana del resto de la membrana celular (configuración lado interno, o lado externo, hacia afuera, Fig. 5-B o D), y que este parche contiene dos canales iónicos similares (como el parche ilustrado en la Fig. 3). Aquí el potencial de membrana es igual al potencial de fijación ($V_m = V_{com}$) y la corriente registrada es la corriente iónica que fluye a través de los canales abiertos. Los registros de corriente obtenidos de este parche tendrán tres niveles claramente identificables (correspondientes a 0, 1 y 2 canales abiertos), con lo que podemos asegurar que el parche posee sólo dos canales, y si el nivel de corriente en la situación con 2 canales abiertos es el doble del correspondiente a la situación con un canal abierto podemos asegurar que se trata de dos canales idénticos. Si la conductancia del canal no cambia con el voltaje y si las soluciones a ambos lados del parche son idénticas, la amplitud de la corriente unitaria (I_{ch}) variará con V_{com} y V_m según la ley de Ohm

$$V_{com} = V_m = I_{ch} / G_{ch} \quad (\text{ec. 6})$$

donde G_{ch} es la conductancia del canal, que puede ser así calculada. Si el canal es selectivamente permeable a un catión, I_{ch} (y el flujo iónico) será entrante cuando V_m sea negativo (lado intracelular respecto a extracelular), saliente cuando éste sea positivo y nula cuando V_m sea cero (potencial de inversión de I_{ch}). A fin de identificar el catión al cual el canal es permeable, podemos substituir parcialmente a un catión sospechoso en una de las dos soluciones en contacto con el parche. Si después de esto el potencial de inversión de I_{ch} cambia para hacerse igual al potencial de equilibrio de este catión (el cual es dado por la ecuación de Nernst) podemos asegurar que el canal es selectivamente permeable a este catión. Por último, si estudiamos los tiempos en los que el canal permanece abierto o cerrado, podemos obtener una caracterización de la cinética de apertura/cierre del canal; y si estos estudios los hacemos en diferentes condiciones (de V_m o de presencia o ausencia de determinadas sustancias reguladoras) podemos obtener información sobre las influencias que regulan la cinética de apertura/cierre del canal^{10,11,12,17,20,23}.

Referencias

- Palmer LG. Ion selectivity of epithelial Na channels. *J Membrane Biol* 1987;96:97-106.
- Palmer LG. Epithelial Na channels: Function and diversity *Ann Rev Physiol* 1992;54:51-66.
- Lang F, Rehwald W. Potassium channels in renal epithelial transport regulation. *Physiol Rev* 1992;72:1-32.
- Wang W, Sackin H, Giebisch G. Renal potassium channels and their regulation. *Ann Rev Physiol* 1992;54:81-96.
- Galeotti G. Ricerche di elettrofisiologia secondo i criteri dell'elettrochimica. *Z Allg Physiol* 1907;6:99.
- Koefoed-Johnsen V, Ussing HH. The nature of the frog skin potential. *Acta Physiol Scand* 1958;42:298-308.
- Lindemann B, Van Driessche W. Sodium specific membrane channels of frog skin are pores: Current fluctuations reveal high turn over. *Science* 1977;195:292-4.
- Lindemann B. The beginning of fluctuation analysis of epithelial ion transport. *J Membr Biol* 1980; 54:1-11
- Morel F. Methods in kidney physiology: Past, present and future. *Ann Rev Physiol* 1992; 54:1-9.
- Cerejido M, Balda MS, Ponce A, Bolívar JJ. Molecular and physiological properties of plasma membranes: The role of ion channels. In: *Cell Function and Disease*. LE Canedo, LE Todd, L. Packer, J Jaz, eds. Nueva York Plenum, Press, 1989;93-107.
- Lewis SA, Donaldson PJ. Patch clamp of cation channels. *Curr Topics Memb Transport* 1990;37:215-46.
- Hamill, OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ: Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 1981;391:85-100.
- Zeidel ML, Jabs K, Kikeri D, Silva P. Kinins inhibit conductive sodium uptake by rabbit inner medullary collecting duct cells. *Am J Physiol* 1990; 258 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 27): F1584-F1591.
- Contreras RG, Avila G, Gutiérrez C y cols. Repolarization of Na^+K^+ pumps during establishment of epithelial monolayers. *Am J Physiol (Cell Physiol. 26)* 1989;247:896-905 .
- Palmer LG. Renal ion channels. In: *Handbook of Physiol Sect.8, Renal Physiol*. E Windhager, ed. Oxford University Press, 1992;715-38.

16. Handler JS, Burg MB. Application of tissue culture techniques to study renal tubular epithelia. In: Handbook of Physiol. Sect.8, Renal Physiol. E Windhager, ed. Oxford University Press 1992;385-8.
17. Bolívar JJ, Cerejido M. Voltage and Ca^{2+} -activated K^{+} channel in cultured epithelial cells (MDCK) *J Membrane Biol* 1987;97:43-51.
18. Ponce A, Bolívar JJ, Vega J, Cerejido M. Synthesis of plasma membrane and potassium channels in epithelial (MDCK) cells. *Cell Physiol Biochem* 1991;1:195-204.
19. Hille B. Ionic Channels of Excitable Membranes. 2nd ed. Sinauer Associates Inc. 1992.
20. Colquhoun D, Hawkes AG. The principles of the stochastic interpretation of ion-channel mechanisms. In: Single-channel recording. B Sakmann, E. Neher, eds. Nueva York, Pleum Press 1983;135-75.
21. Läger P.: Conformational transitions of ionic channels. In: Single-channel recording. B Sakmann, E Neher, eds. Plenum 1983;177-89.
22. Lindemann B. Fluctuation analysis of sodium channels in epithelia. *Ann Rev Physiol* 1984;46:497-515.
23. Neher E, Sakmann B Steinbach JH. The extracellular patch clamp: A method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflügers Arch* 1978;375:219-26.
24. Marty A, Neher E. Tight-seal whole-cell recording. In: Single-channel recording. B Sakmann, E Neher, eds. Nueva York, Plenum Press 1983;177-22.
25. Aidley DJ. The physiology of excitable cells. Third ed. Cambridge University Press, 1989.