



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**TÍTULO:**

**ENFERMEDADES ASOCIADAS A MUTACIONES EN EL CANAL DE  
SODIO EPITELIAL (ENaC).**

**Autor: Almudena García Pérez**

**Tutor: Prof. Dr. Luis Rivera de los Arcos**

**Convocatoria: Junio/2017**

## RESUMEN

Los canales de sodio epiteliales (ENaC), también conocidos como canales de sodio sensibles a amilorida, son canales iónicos localizados en la membrana celular que permiten el transporte de sodio por difusión facilitada. Estos canales están ampliamente distribuidos, encontrándose entre otros órganos en pulmón, colón, riñón, endotelio vascular y placenta. El objetivo del presente trabajo es realizar una revisión bibliográfica de las implicaciones del ENaC en diversas patologías como fibrosis pulmonar, hipertensión, síndrome de Liddle, pseudoaldosteronismo primario, preeclampsia y cáncer. Es reseñable destacar que el ENaC también se ha podido relacionar con la degeneración neuronal(1), aunque hemos descartado estos estudios ya que han sido realizados en *C.elegans* y es difícil extrapolar sus resultados a neurodegeneración en otros organismos por las condiciones fisiológicas en las que se han obtenido, aunque se han descrito genes humanos homólogos a los *C. elegans* y que pertenecen a una nueva familia de canales de sodio relacionados con el ENaC(2)

## INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

### **Canales iónicos, qué son y para qué sirven**

Los canales iónicos son proteínas transmembrana que permiten el paso de iones a través de la membrana plasmática, de forma selectiva y a favor de gradiente electroquímico. Estos canales son responsables del mantenimiento del potencial de membrana, y participan en diversas vías de señalización implicadas en procesos de control del volumen celular, proliferación y apoptosis, entre otros(3).

La membrana lipídica es impermeable al paso de iones y moléculas polares, la permeabilidad es conferida por tres clases de proteínas de membrana: bombas, transportadores (carriers) y canales. Los canales proporcionan un poro a la membrana a través del cual pueden fluir los iones rápidamente en dirección termodinámica contraria. La acción de los canales ilustra el transporte pasivo o la difusión facilitada(2).

No se tuvo evidencia directa de la existencia de los canales iónicos hasta el desarrollo de la técnica de *patch-clamp*(4). Mediante este método es posible medir la conductancia de un solo canal iónico, así se pudo medir la actividad de una sola biomolécula en acción.

La capacidad de apertura y cierre del canal se conoce como “*gating*”. Es importante determinar el tiempo en que el canal se encuentra abierto y el tiempo en que está cerrado.

La probabilidad de apertura ( $P_0$ ) del canal viene definida por la fracción de tiempo que el canal está abierto. Se obtiene dividiendo la suma del tiempo abierto y el total de la medición. Una  $P_0$  de 0.5 indica que el canal está el 50% del tiempo en estado abierto(5).

La corriente derivada del paso de los iones a través del canal viene determinada por:  
1.- la concentración de iones a ambos lados de la membrana; 2.- el potencial de membrana y 3.- la permeabilidad del canal al ion.

1.-y 2.- Potencial electroquímico.

En una célula típica, la concentración de iones  $\text{Na}^+$  es 143 mM en el exterior de la célula y 14 mM en el interior celular. Sin embargo, el sodio no entra libremente en la célula ya que los iones cargados no pasan a través de la membrana hidrofóbica, sino que pasan a través de canales específicos (difusión facilitada y transporte pasivo)(2)

El “potencial de equilibrio de un ion” es aquel valor de potencial en que el gradiente eléctrico del ión equilibra al gradiente de concentración y, por tanto, el ion no se mueve. Se determina mediante la ecuación de Nerst:

$$E_x = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[X]_o}{[X]_i}$$

$E_x$ , es el potencial de equilibrio del ion (en voltios), R es la constante universal de los gases ideales (8.314 JK<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>), T es la temperatura absoluta (en grados Kelvin), z es la valencia del ion, y F es la constante de Faraday (96.500 C mol<sup>-1</sup>).  $[X]_o$  y  $[X]_i$  son las concentraciones exteriores e interiores del ion X, respectivamente(5).

### 3.-Permeabilidad

La permeabilidad que presente un canal a los iones depende de varios factores:

- Tamaño relativo del poro y del ion, los iones grandes tendrán un impedimento físico para entrar en canales iónicos pequeños.
- Discriminación por el tipo de iones que dejan entrar. Generalmente se asume que la selectividad de un canal reside en una región conocida como *filtro de selectividad*, una región de aminoácidos dispuestos de forma que permiten discriminar entre iones, facilitando la entrada de unos e impidiendo la de otros(5).

### Modulación de canales

Los canales iónicos pueden aumentar la  $P_0$  debido a cambios en el potencial de membrana; a este tipo de canales se les denomina *canales iónicos dependientes de voltaje*,

mientras que los que no se vean afectados por cambios en el potencial se denominan *canales iónicos independientes de voltaje*(5).

Por otro lado, se puede modular un canal mediante la unión de ligandos extracelulares o intracelulares (canal operado por receptor o por ligando). La unión del ligando a sitios específicos del canal produce un cambio conformacional que alostéricamente abre el poro. Muchos canales sufren un fenómeno de *desensibilización*: en presencia de una gran concentración de agonista el canal queda en un estado permanentemente cerrado a pesar de la presencia del ligando unido. Aunque la mayoría de ligandos producen la apertura del canal iónico, también hay casos en los que producen su cierre(5).

## OBJETIVOS

- Descripción de los canales de sodio y ENaC.
- Descripción de las patologías asociadas a mutaciones en el ENaC. Revisión de las implicaciones del ENaC en patologías: fibrosis pulmonar, hipertensión, síndrome de Liddle, pseudoaldosteronismo primario, preeclampsia y cancer.
- Revisión de la utilización de ENaC como posible diana terapéutica; efectividad de dichos tratamientos.

## METODOLOGÍA

La base del presente estudio es el libro “Ion Channel and Disease”(5).

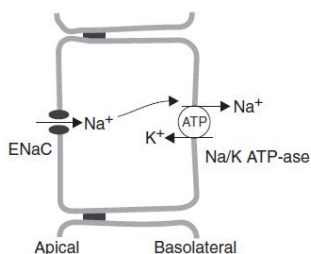
Se realizaron búsquedas bibliográficas en la base de PubMed (NCBI) con las palabras clave “channelopathies” “epithelial sodium channel”. y se consultaron revistas mediante PLOS (Public Library of Science), así como otras disponibles a través de la Biblioteca Nacional de Ciencias de la Salud o bien se solicitaron a los autores a través de la plataforma ResearchGate.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### **Canal de Na<sup>+</sup> epitelial sensible a amilorida (ENaC)**

El canal ENaC media el transporte de sodio a través de la membrana apical de las células epiteliales. Las células epiteliales están polarizadas y sus proteínas se distribuyen asimétricamente entre la zona apical y la basolateral de la membrana. El transporte de sodio a través del epitelio requiere de dos mecanismos de transporte: un canal que

introduce sodio en el interior de la célula (ENaC), que se localiza en la zona apical; y una bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa que se sitúa en la zona basolateral. La bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa se encarga de generar un gradiente de concentración en el interior de la célula que permita al  $\text{Na}^+$  entrar por difusión pasiva.



**Figura 1. Modelo de transporte epitelial de  $\text{Na}^+$ .** El transporte de  $\text{Na}^+$  a través del epitelio está mediado por la combinación de la actividad de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa basolateral y los canales ENaC en la membrana apical (5).

## 1. Propiedades básicas

Esta familia de canales se distinguen del resto por 1.- su sensibilidad a la amilorida, son bloqueados por bajas concentraciones de este fármaco; 2.- su sensibilidad al  $\text{Na}^+$ ; y 3.- su conductancia unitaria o “*single-channel conductance*”(6)

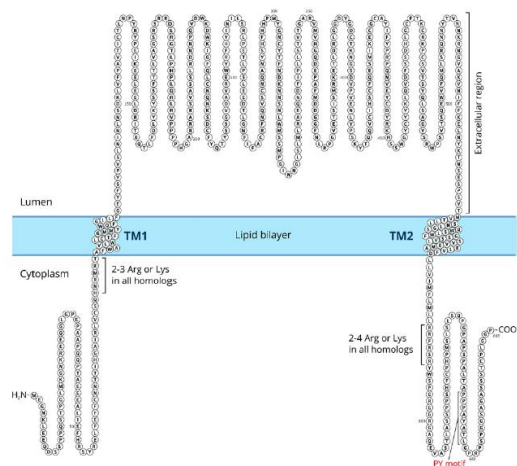
No presentan una marcada actividad voltaje dependiente, aunque sí que aumenta levemente su probabilidad de apertura con la hiperpolarización. ENaC puede ser modulado por hormonas, proteínas de unión a GTP, proteínas y metabolitos lipídicos(5).

### 1.1. ENaC y el sentido del gusto

Se ha detectado expresión de ENaC en el epitelio de la lengua y en las células receptoras del gusto (TCRs)(7,8). Estos estudios sugieren que ENaC en TRCs juega un papel esencial en el sistema del gusto para el sabor salado(7,9).

## 2. Estructura

El canal de sodio epitelial es un heterómero con tres subunidades homólogas generalmente:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ; aunque en algunas ocasiones presenta una subunidad  $\delta$ . Las gráficas de representación de la hidrofobicidad predicen que cada una de las diferentes subunidades de ENaC tiene dos dominios transmembrana (TM) unidos por un bucle de ~ 500 aminoácidos que contienen dominios ricos en cisteína, regiones susceptibles de glicosilación y regiones de unión a amilorida. Hay evidencias de que tanto la región amino como la carboxiterminal son intracelulares(5).



**Figura 2.** Ilustración esquemática de la localización transmembrana de una subunidad de ENaC(15).

Las subunidades ENaC tienen una topología similar, con una región extracelular conectada mediante dos dominios transmembrana (TM1 y TM2) (10)

En la región intracelular se encuentra el dominio PY, un elemento regulador que actúa reduciendo la  $P_0$  y aumenta la tasa de eliminación del canal de superficie de la membrana. El dominio PY es una región altamente conservada rica en prolina (PPPXY) localizada en el extremo C-terminal del ENaC. Además, está involucrada en la interacción con proteínas que regulan la actividad del ENaC.

La estequiometría de las subunidades ENaC aún no está definida definitivamente. Se han propuesto estequiometrías  $2\alpha:1\beta:1\gamma$  y  $3\alpha:3\beta:3\gamma$ . Estudios recientes mediante *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET) e inmunoblot concluyen que la estequiometría más probable es la segunda(11)

### 3. Bases genéticas para comprender las mutaciones que dan lugar a enfermedades

Las secuencias homólogas son aquellas similares entre sí por provenir de un mismo origen evolutivo. Esto incluye secuencias entre distintas especies, conocidas como ortólogas o copias múltiples de la secuencia en el genoma de una sola especie, llamadas parálogas y que pueden dar lugar a distintas isoformas.

Las tres subunidades que componen los canales ENaC  $\alpha$  (ó  $\delta$ ),  $\beta$  y  $\gamma$ , son esenciales para el correcto ensamblaje de los canales. Estos tres parálogos se encuentran muy conservados en todos los vertebrados. Este alto grado de conservación evolutiva proporciona evidencia de lo esencial de estos genes para el ensamblado heterotrimérico de estos canales(12-14).

El filtro de selectividad del canal ENaC, que le permite ser selectivo para los iones  $\text{Na}^+$ , está constituido por un motivo G/S-X-S que se encuentra en la región TM2. Además, en esta región TM2 hay tres residuos cargados que se encuentran conservados entre las especies, las mutaciones en estos residuos acídicos reducen la conductancia del canal y afectan a su selectividad(15).

## **ENaC en patologías pulmonares**

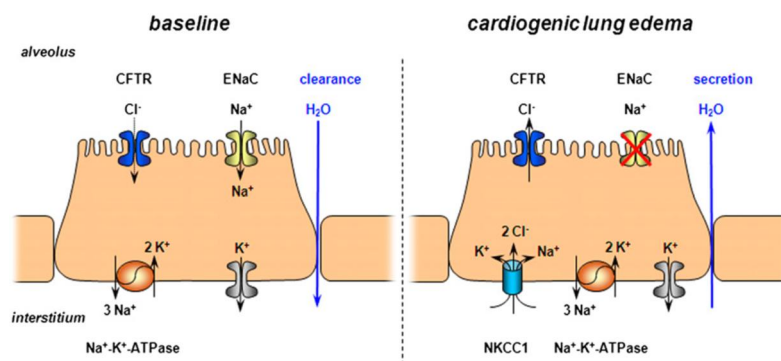
### **Edema cardiogénico pulmonar**

La secreción activa de iones a nivel del pulmón causa múltiples patologías, como el edema cardiogénico pulmonar que conlleva una acumulación de líquido en los pulmones. En esta patología, la activación de canales iónicos endoteliales mecanosensibles aumenta la permeabilidad vascular, lo que provoca una incapacidad de las células alveolares epiteliales para la limpieza de los espacios distales del exceso de fluido.

En el pulmón sano, el transporte activo de  $\text{Na}^+$  desde el alveolo al espacio intersticial a través del ENaC es la fuerza que induce el aclaramiento del fluido alveolar. Este proceso se ve favorecido por la salida basolateral de  $\text{Na}^+$  a través de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPasa}$ . Para mantener la electroneutralidad del sistema se debe producir una salida paracelular de  $\text{Cl}^-$  y agua.

Los mecanismos celulares del edema pulmonar conllevan la actuación de CFTR (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) que permite el paso bidireccional de  $\text{Cl}^-$  dependiendo del gradiente electroquímico. Otro transportador implicado en patologías pulmonares es el cotransportador  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  (NKCC1)(16).

El movimiento vectorial de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  crea un gradiente osmótico que provoca que el fluido de revestimiento alveolar se mueva pasivamente desde el espacio aéreo hacia el intersticial (Fig. 2), esto produce el aclaramiento del fluido alveolar. Este proceso es crucial para la reabsorción del edema alveolar, aumentando la permeabilidad del epitelio y permitiendo un intercambio gaseoso más eficiente(17)



**Figura 3.** Mecanismo propuesto para la formación del edema pulmonar.

Izquierda, pulmón sano: la entrada apical de Na<sup>+</sup> a través de ENaC y el intercambio de iones basolateral de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> - ATPasa produce el aclaramiento del fluido alveolar; el Cl<sup>-</sup> fluye para mantener la electroneutralidad.

Derecha, edema cardiogénico pulmonar: ENaC está inhibido, lo que genera un gradiente de Na<sup>+</sup> vía basolateral. Mediante NKCC1 Cl<sup>-</sup> entra, co-transportado con el Na<sup>+</sup>, y sale de la célula impulsado por el gradiente electroquímico a través de CFTR apical. La salida de Cl<sup>-</sup> produce una secreción activa de fluido (H<sub>2</sub>O) en el espacio alveolar que promueve la formación del edema.

*(Chloride transport-driven alveolar fluid secretion is a major contributor to cardiogenic lung edema) (16).*

### ENaC en las patologías pulmonares por defecto de líquido

La composición de iones regula los niveles de agua y el pH para el intercambio eficiente del líquido mucociliar. Se ha visto que disminuciones de la expresión de CFTR y ganancia de la función de ENaC generan mayor absorción de Na<sup>+</sup>, y consecuentemente producen deshidratación y defectos en el aclaramiento. Este fenotipo de bronquitis crónica puede verse en patologías como la fibrosis quística y en el trastorno pulmonar oclusivo crónico; favoreciendo la instauración de infecciones bacterianas, inflamación y, eventualmente, disminución de la función pulmonar(17).

En modelos de ratón, la inhibición de α-ENaC en el pulmón de adulto por ARN de silenciamiento (siARN), disminuye el aclaramiento basal de fluido. La eliminación por completo de α-ENaC mediante “Complete Knockout” (KO) es mortal, ya que los ratones no son capaces de limpiar el fluido pulmonar al nacer. Esto es debido a que se produce una significativa regulación positiva de ENaC en el dominio apical de las células del tejido epitelial del pulmón, aumenta el transporte de Na<sup>+</sup>, que es crítico para la reabsorción de fluido fetal y el establecimiento de un intercambio gaseoso óptimo en el pulmón.

Por otro lado, una sobreexpresión de las subunidades β-ENaC en modelos de ratón produce una patología parecida a la fibrosis quística debido a un exceso de absorción de fluido(17).

### Efectos del estrés oxidativo en la actividad de los canales de Na<sup>+</sup>

La relación entre glutatión (GSH) y glutatión disulfuro (GSSG) es un indicador de la capacidad de los pulmones para soportar oxidaciones. Algunos estudios demuestran que GSSG, forma oxidada del GSH, inhibe la actividad del ENaC en las células



alveolares; por tanto, el potencial redox del pulmón afecta directamente al equilibrio de fluidos a través de la modulación de la actividad de ENaC. Si se disminuyera la forma oxidada GSSG mediante antioxidantes se regularía el potencial redox, esto podría aplicarse en terapia, ya que dejarían de inhibirse los canales ENaC(17).

### **Regulación colinérgica de los canales de Na<sup>+</sup>**

Los receptores muscarínicos (M2 y M3) de las células alveolares se activan por agonistas colinérgicos como carbacol y oxotremorina. Su estimulación produce una mayor expresión de ENaC. Esto se debe a que la activación de los receptores muscarínicos actúa sobre RhoA que a su vez actúa a nivel de citoesqueleto promoviendo el desplazamiento de ENaC a la membrana plasmática. Este efecto atenúa la hipersecreción que se da en patologías como en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) donde la regulación colinérgica es dominante en las vías aéreas, por lo que esta activación de ENaC estimula la reabsorción de Na<sup>+</sup> y agua en el espacio alveolar para compensarlo parcialmente(17).

### **Efectos del plasminógeno en canales de Na<sup>+</sup>**

La uroquinasa (uPA), es una serin-proteasa que convierte el plasminógeno en plasmina, desencadenando una cascada proteolítica que fomenta la fibrinólisis. La uPA se expresa en las vías aéreas y está implicada en la regulación de ENaC. Los ratones KO para uPA (-/-) muestran menor proporción de canales ENaC basales. Además, estos ratones KO tienen más del doble de peso de fluido alveolar que los ratones control. Si a estos ratones uPA (-/-) añadimos de forma externa uPA y plasminógeno veremos que los efectos se revierten parcialmente. Al parecer, uPA produce proteólisis de la cadena  $\gamma$  del ENaC y la regulación de la actividad de la bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa, esto produce un incremento en el líquido de la superficie de las vías aéreas, y la composición del fluido se ve alterada, exacerbando los daños pulmonares(17).

### **Efectos de las hormonas esteroideas en el aclaramiento del fluido alveolar**

Las diferencias de sexo pueden afectar a las patologías pulmonares. Algunas afecciones pulmonares, como la fibrosis quística, son más comunes y tienen mayor riesgo en pacientes mujeres que en hombres. Mediante un estudio del efecto del estradiol en células alveolares de rata se estableció que éste y no la progesterona aumenta la actividad del ENaC por un aumento de P<sub>0</sub> y un aumento también en el número de canales. Cuando

los niveles de estradiol son altos (“proestro”) los niveles de ENaC en la membrana plasmática son mayores ya que el estradiol actúa a través de un receptor de estrógenos acoplado a proteínas G promocionando la activación del canal de  $\text{Na}^+$ . En ratas hembra se ha visto que *Haemophilus influenzae* produce un estado constante de “diestro”, es decir, niveles bajos de estradiol. Se ha propuesto, a vista de los resultados, que los bajos niveles de estradiol en pacientes hembra que padecen H.influenza, reduce el aclaramiento del fluido alveolar(17).

### **Infecciones bacterianas y actividad ENaC**

La expresión de ENaC se ve aumentada por los glucocorticoides y disminuida por interleucina- $1\beta$ , interleucina-4, y factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ). Hubo ciertas discrepancias con respecto a los efectos del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ya que algunos estudios indicaban que producía inhibición de ENaC mientras que otros aseguraban que producía su activación. Finalmente se ha determinado que hay zonas de unión del receptor que inhiben al ENaC y dominios similares a lectina que activan al ENaC.

En las células de los alveolos epiteliales, un inductor de estrés celular, cicloheximida, y lipopolisacáridos de respuesta inflamatoria (LPS) presentes en la membrana externa de las bacterias Gram negativas, inhiben la expresión de  $\alpha$ -ENaC, disminuyendo los niveles de su mRNA. La actuación de estas dos moléculas se produce a través de las rutas metabólicas ERK y p38 MAPK. Los LPS inhiben al promotor de  $\alpha$ -ENaC, mientras que la cicloheximida actúa a través de efectos postranscripcionales. Los efectos de los LPS podían ser el resultado de una respuesta proinflamatoria, mientras que la respuesta a la cicloheximida es debida a una respuesta no específica que no involucra especies reactivas de oxígeno (ROS), pero que aparentemente afecta a las citocinas proinflamatorias. Una diferencia entre estos dos efectos está clara: la inhibición de cualquiera de las rutas metabólicas es suficiente para bloquear los efectos de la cicloheximida, mientras que es necesaria la inhibición simultánea de ambas rutas para bloquear los efectos de LPS(17).

### **Proteína cinasa C (PKC) y actividad de ENaC**

La proteína cinasa C regula la actividad de ENaC de tal forma que: la activación de PKC inhibe ENaC, y la inhibición de PKC aumenta la actividad del ENaC, aunque se

presentan variaciones dependiendo de las isoformas (PKC $\alpha$ , PKC $\delta$ , PKC $\zeta$ ...) y de las vías de señalización.

Se ha visto que algunas isoformas de PKC juegan un papel esencial en la inhibición del ENaC por el virus influenza. La infección de las células epiteliales de las vías respiratorias distales murinas produce una inhibición de la función ENaC que puede revertirse mediante el tratamiento con inhibidores de la PKC(17).

### **Inhibición de ENaC y aumento de la hidratación alveolar**

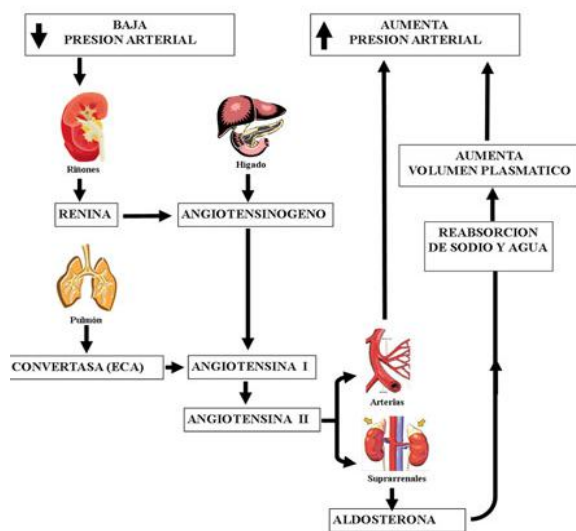
El humo del cigarro disminuye la función de CFTR y esto aumenta la actividad del ENaC. Se ha formulado la hipótesis de que la inhibición del ENaC podría utilizarse para rehidratar cultivos de las vías aéreas que han sido expuestos al humo del tabaco y, con ello, retomar un normal aclaramiento mucociliar. Para confirmar esta hipótesis, se empleó un inhibidor ENaC (componente A) con una larga vida media (más de 20 horas) en ratas con el fin de revertir el daño del humo de cigarro en las células del epitelio pulmonar. Los resultados demostraron que el pretratamiento con el componente A bloquea la inducción de deshidratación del líquido de revestimiento alveolar por el humo del cigarro en cultivos epiteliales bronquiales y que el incremento del peso de las vías aéreas se correlacionaba con un incremento del aclaramiento mucociliar in vivo.

A la vista de los resultados se ha evaluado el uso de inhibidores de ENaC para tratamiento de la bronquitis crónica, pero hay cierta preocupación al respecto ya que la amilorida, inhibidor reconocido, presenta un tiempo de actuación demasiado corto. Por otro lado, los inhibidores también podrían producir efectos adversos a nivel renal donde también hay presentes receptores ENaC. Es por ello que, hasta el día de hoy, no se ha evaluado el componente A como terapia(17).

### **Presión arterial y ENaC en células vasculares y de riñón**

La hipótesis de Guyton permite explicar la regulación de la presión arterial en base al equilibrio entre el tono vascular y el manejo de fluidos del riñón. Mediante este modelo podemos comprender el desarrollo de patologías como hipertensión e hipotensión en base a desequilibrios en la integración del tono vascular, la perfusión renal y la regulación de reabsorción de sodio renal.

Veremos, por tanto, el papel central de ENaC en el sistema vascular y epitelial para mantener la homeostasis. Los canales ENaC, expresados en el sistema vascular, son activados por un incremento de las concentraciones de  $\text{Na}^+$  externas, dando lugar a cambios en las propiedades mecánicas y funcionales de las células endoteliales(18)



Modificado de <http://fisiologiahumanajuan.blogspot.com.es/2013/03/rinon-regulacion-hormonal-de-volumne-de.html>

### Expresión de ENaC y regulación de su actividad en la nefrona distal

Los canales ENaC se encuentran ubicados en la membrana apical de las células epiteliales del túbulo colector y reabsorben entre un 3-5% del  $\text{Na}^+$  que procede del filtrado glomerular(18). La reabsorción de  $\text{Na}^+$  regula el volumen y la presión sanguínea(6). El balance  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  y la regulación de la presión sanguínea se logran a través de un control hormonal (aldosterona, ADH/vasopresina, angiotensina, insulina, bradicinina, endotelina, etc.) del transporte en la nefrona distal y el túbulo colector (19).

La hormona más importante en la regulación de ENaC es la aldosterona. Las células de la zona glomerular de la corteza adrenal secretan aldosterona -el mineralocorticoide más potente- en respuesta a angiotensina II o a un incremento de las concentraciones séricas de  $\text{K}^+$ . Además, como parte del sistema renina-angiotensina, la aldosterona produce una disminución del volumen circulatorio, lo que provoca un aumento de la actividad del ENaC(11,18). La aldosterona incrementa la expresión de la subunidad  $\alpha$ -ENaC mediante la producción de la isoforma 3 de *Ras* que potencia la expresión superficial de canales(19).

El papel de estos canales en el control de la presión sanguínea viene apoyado por estudios de mutaciones con ganancia de función -síndrome de Liddle- y mutaciones con

pérdida de función -pseudohipoaldosteronismo tipo I- y su asociación con incrementos y descensos de la presión arterial, respectivamente(19).

El síndrome de Liddle se produce como resultado de una mutación que origina la activación constitutiva del ENaC como veremos más adelante. Las mutaciones de inactivación conducen a pseudohipoaldosteronismo tipo I, caracterizado por pérdida de  $\text{Na}^+$  en orina, baja presión sanguínea, hipercalemia y acidosis metabólica(20).

La aldosterona produce sus efectos en el ENaC mediante la activación del receptor de mineralocorticoide (MR). El MR unido a aldosterona se trasloca al núcleo y modula la expresión génica (ARNm), por ello aumenta la expresión de ENaC. Las mutaciones que producen inactivación del MR producen pseudohipoaldosteronismo tipo I. (11,18).

### **Síndrome de Liddle**

En 1963, Liddle describió una extraña forma de hipertensión sensible a sal, presente en los miembros de una familia que se desarrollaba incluso antes de cumplir los veinte años y que se denominó síndrome de Liddle. Se caracteriza por un exceso de reabsorción de  $\text{Na}^+$  a nivel renal, a pesar de presentar bajos niveles de aldosterona. Como consecuencia los individuos desarrollan hipertensión, hipocalemia y acidosis metabólica.

El desorden se puede tratar mediante trasplante renal, o mediante tratamiento con amilorida o triamtereno, además de restringir el consumo de  $\text{Na}^+$  de la dieta (5).

El motivo más conservado de la región C-terminal del ENaC es el denominado PY, su secuencia consenso del motivo es PPPXYXXL, se localiza a 65-70 residuos después del extremo TM2 de las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . En las cadenas  $\delta$  de ENaC no se encuentran motivos PY conservados.

Este motivo PY es reconocido por el dominio WW de una E3 ubiquitin-proteína ligasa. La ubiquitinación del ENaC provoca su internalización y eventualmente su degradación(21).

Las mutaciones en un aminoácido del motivo PY en la subunidad  $\beta$  o  $\gamma$ , o las truncaciones que conducen a la pérdida de este motivo, provocan el síndrome de Liddle. Esta mutación o delección del motivo PY reduce la ubiquitinación del ENaC y, por tanto su internalización, lo que hace que la expresión del ENaC esté aumentada en la membrana(22) y produzca un aumento del volumen de sangre y la presión sanguínea(23).

## **Expresión y regulación de los canales de Na<sup>+</sup> sensibles a amilorida en el tejido vascular**

Se considera que la respuesta a la concentración de Na<sup>+</sup> extracelular del ENaC es diferente a la de los canales de Na<sup>+</sup> que se expresan en las células endoteliales, por lo que se les denomina “EnNaC”. La expresión de EnNaC también aumenta a nivel endotelial en presencia de aldosterona. El mecanismo de acción del EnNaC y ENaC es diferente, como veremos a continuación, aunque no hay aún evidencias moleculares suficientes para concluir que son canales distintos.

### **Mecanismo de acción de EnNaC**

El EnNaC no juega un papel importante en el transporte neto de Na<sup>+</sup> a través de la pared vascular, sino que interviene más en el control de las propiedades mecánicas de las células endoteliales.

La rigidez endotelial mediada por un incremento de la actividad EnNaC parece estar relacionada con una interacción entre C-terminal de  $\alpha$ -EnNaC y F-actina del citoesqueleto de las células endoteliales. Se ha postulado que la interacción de EnNaC con F-actina y otras proteínas del citoesqueleto induce el desarrollo de una red que determina la rigidez mecánica de la membrana plasmática. En este contexto se ha visto que F-actina forma una especie de gel en el córtex celular endureciéndolo, mientras que G-actina forma una solución también en el córtex celular que lo suaviza. Un incremento de la actividad EnNaC en la membrana plasmática mejora el flujo de Na<sup>+</sup> al interior celular y éste parece estabilizar la F-actina a través de un fortalecimiento de los contactos entre las subunidades de la proteína.

La rigidez mecánica refleja el estado fisiológico del endotelio vascular. La actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) endotelial está estrechamente unida al estrés por cizallamiento (shear stress) ejercido por el flujo pulsátil de sangre. Se ha descrito que la liberación de óxido nítrico (NO) disminuye drásticamente cuando las células del endotelio se endurecen, siendo el descenso de la liberación de NO una señal de disfunción endotelial. El Na<sup>+</sup> que entra vía EnNaC influye a la actividad de la NOS y la producción de NO, posiblemente vía ruta metabólica PI3K/Akt.

La sensibilidad del endurecimiento del endotelio a pequeños cambios en la concentración extracelular de Na<sup>+</sup>, especialmente en presencia de aldosterona, y su

subsecuente amortiguación de la vasodilatación mediada por NO sugiere que los canales ENaC participan en la patogénesis de la hipertensión arterial en humanos.

### **Hipertensión asociada a ENaC**

Las concentraciones plasmáticas de  $\text{Na}^+$  están crónicamente aumentadas de 1-3mM en pacientes hipertensos o con aldosteronismo primario. Usando un microscopio de fuerzas atómicas (AFM) como nanosensor, se probaron las propiedades mecánicas de las células endoteliales en presencia de aldosterona y de los cambios agudos en la concentración extracelular de  $\text{Na}^+$  dentro de los rangos fisiológicos (135-145 mM)(5). Si las concentraciones de  $\text{Na}^+$  aumentan de 135 mM a 145 mM la rigidez del endotelio aumenta. Se vio, además, que la exposición a 150 mM de  $\text{Na}^+$  dobla la expresión de ENaC en la superficie del endotelio. Con esto se demostró que la actividad ENaC está controlada por un mecanismo “feed-forward”, presumiblemente por algún tipo de sensor extracelular de  $\text{Na}^+$ . Este fenómeno es el opuesto al que se observa en la nefrona, donde incrementos de la concentración de  $\text{Na}^+$  reducen la actividad de ENaC. Las propiedades electrofisiológicas de ENaC no han sido caracterizadas, lo que podría ser importante para definir su selectividad catiónica y la sensibilidad a amilorida en el estado activo.

El mecanismo subyacente por el que ENaC inducido por  $\text{Na}^+$  se inserta en la membrana no ha sido definido. La combinación de aldosterona y un aumento agudo de la concentración de  $\text{Na}^+$  en el ambiente de 135 a 145 mM parece desencadenar una inserción rápida en la membrana de complejos preformados de ENaC. Por analogía de la regulación de la expresión superficial de ENaC y su actividad, el aumento de la expresión de subunidades  $\alpha$ ENaC así como de otras proteínas como SGK1, GILZ1 inhibe la actividad de Nedd4. Al inhibir Nedd4, se inhibe la ubiquitinación de ENaC y con ello se puede aumentar la expresión superficial de complejos ENaC (19)

### **Farmacoterapia basada en ENaC**

Se han desarrollado análogos a la amilorida, antagonistas no-esteroides del receptor de mineralocorticoides, y se han realizado estudios para disminuir la dosis de bloqueantes del receptor de mineralocorticoides que bloquean e inhiben periféricamente ENaC extra-renal y los receptores de mineralocorticoides. La esperanza es conseguir que estos antagonistas actúen en el ENaC de manera específica en el riñón evitando los efectos adversos asociados a la inhibición de ENaC periférico.

Los estudios clínicos demuestran que la aldosterona y/o altos niveles de ingesta de sal son responsables del desarrollo de hipertensión arterial y de enfermedades cardiovasculares. La inhibición competitiva de los receptores de aldosterona por una espironolactona o eplerenona, bloqueando la entrada de  $\text{Na}^+$  en ENaC por amilorida, y datos recientes en modelos animales, apoyan la hipótesis de la implicación de ENaC en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares(19).

### **Preeclampsia**

La preeclampsia se caracteriza por el desarrollo de hipertensión a las 20 semanas de gestación. Es una patología severa que compromete la salud materna y fetal. Se sabe que la placenta juega un papel central en el desarrollo de esta patología.

Una pobre placentación puede resultar en una insuficiente diferenciación e invasión de las células trofoblásticas de la placenta; lo que impedirá la remodelación de la espiral arterial, resultando en una restricción sanguínea y una hipoxia de la placenta materna.

El ENaC se expresa en las células trofoblásticas de la placenta. Estudios recientes demuestran una reducción en la expresión de ENaC en las placentas a término con preeclampsia comparadas con las de embarazos normales. La inhibición o la disminución de la expresión de la subunidad  $\alpha$ -ENaC se ha visto que inhibe la migración de células BeWo, (una línea celular trofoblástica), lo que destaca el papel de ENaC en la migración de las células trofoblásticas y la placentación.

La invasión de la placenta en el endometrio es superficial en las pacientes con preeclampsia comparado con las pacientes con un embarazo normal. En estas pacientes la invasión trofoblástica de las arterias del útero se detiene en el límite decidual y miometrial; lo que provoca que la perfusión de la placenta sea deficitaria. La invasión fisiológica de las células trofoblásticas es similar a la del desarrollo de tumores celulares, habiéndose descrito que los iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Cl}^-$  están involucrados en el desarrollo de tumores celulares y en la diferenciación.

Por otro lado, se ha demostrado que, si se utilizan pequeños fragmentos de ARN para bloquear la expresión de ENaC, se puede inhibir la capacidad de invasión de la línea de células trofoblásticas, lo que demuestra que ENaC compromete la invasión trofoblástica de las arterias uterinas en condiciones patológicas, siendo importante en el desarrollo de la preeclampsia.



Además, se ha encontrado que sólo la subunidad  $\beta$  de ENaC está expresada en placentas a buen término, mientras que en placentas con preeclampsia su expresión está reducida.

Durante el primer término, la placenta y las células trofoblásticas presentan gran cantidad de subunidad  $\alpha$ , en lugar de  $\beta$ . No se sabe si la preeclampsia produce el descenso de la subunidad  $\beta$  o si es el descenso de la subunidad  $\beta$  lo que ocasiona la preeclampsia. Igualmente, el cambio dinámico de la expresión de las subunidades ENaC y el papel de las subunidades ENaC en la invasión trofoblástica indican que los canales ENaC desarrollan un papel central en el desarrollo de esta patología(24).

## **Cáncer**

El 90% de los cánceres humanos es producido por el desarrollo anormal de las funciones de las células epiteliales. Por lo tanto, el ENaC expresado en las células epiteliales tendrá relación directa con la carcinogénesis. Las cuatro subunidades ENaC están codificadas por los genes *Scnn1*, implicados en la oncogénesis. Últimamente se han intentado establecer relaciones entre ENaC en cáncer.

### **$\alpha$ -ENaC**

Diversos estudios vieron un incremento de la conductancia de  $\text{Na}^+$  en células con carcinoma hepatocelular HepG2 bajo diferentes niveles de estrés *hipertónico*. Se vio que se podía disminuir este aumento de la conductancia mediante el empleo de fármacos como flufenamato y amilorida, y que estos fármacos producirían una disminución en la proliferación celular del HepG2(25).

Al igual que con estos dos fármacos, se comprobó que utilizando pequeños fragmentos de ARN de interferencia se puede actuar de la misma manera sobre ENaC reduciendo el estrés hipertónico producido por las corrientes de  $\text{Na}^+$ (25).

Análisis FACS (Fluorescence-activated cell sorting) muestran que silenciando  $\alpha$ -ENaC se inhibe la proliferación celular a la par que aumenta la fase G2/M y disminuye la fase G1 del ciclo celular, por lo que aumenta la apoptosis.

La subunidad  $\alpha$ -ENaC, además de intervenir en la proliferación celular y la apoptosis, está involucrada en la migración celular del cáncer. Pese a que su expresión está notablemente elevada en las regiones limitantes de las heridas,

parece no guardar relación directa con la migración celular en la cicatrización. Si inhibimos  $\alpha$ -ENaC, con amilorida o con oligonucleótidos “no-sense”, se podrían revertir los efectos de la migración inducida por aldosterona, que este estudio pretendía simular a la que se produce en lesiones cancerosas. (25).

### $\delta$ -ENaC

Se ha descrito que  $\delta$ -ENaC puede guardar relación con el desarrollo de melanoma. Se ha localizado en células humanas G-361 usando la transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y técnicas de hibridación celular “in situ”. La expresión de  $\delta$ -ENaC ha sido documentada usando inmunocitoquímica en células de melanoma humano. Por lo que se podría considerar diana terapéutica en el tratamiento del melanoma (25)

## CONCLUSIONES

1. Aunque la función principal del ENaC es conocida: permitir el paso de  $\text{Na}^+$ ; la estructura completa del canal se desconoce, y los estudios sobre él se basan en homologías. Tanto es así que no se puede saber si el canal ENaC y EnNaC es el mismo, pese a su claras diferencias funcionales.
2. El ENaC, al ser un parólogo muy conservado en vertebrados, permite su estudio en diversos modelos: murino, *Xenopus laevis*, humano...
3. Las modificaciones que sufre el ENaC en las patologías pueden ser:
  - a. Mutaciones directas de las proteínas del canal.
  - b. Mutaciones que afectan a la actividad. Como el ENaC es un canal siempre activo cualquier mutación en su expresión afectará a la actividad neta y por tanto a la patología.
4. Los estudios de las mutaciones en el ENaC han permitido relacionarlo con diversas patologías, pese al desconocimiento completo de su estructura.
5. La ubicuidad del canal dificulta su utilidad como diana terapéutica, ya que la relación beneficio/riesgo se ve disminuida por su acción en otros tejidos (p. ej. nefrotoxicidad).
6. Se está intentando relacionar ENaC con cáncer pese que a los estudios presentados no son muy concluyentes.

## BIBLIOGRAFIA

1. Hamill OP, Jr DWM. A supramolecular complex underlying touch sensitivity. *Trends Neurosci.* 1996;19(7):258–61.
2. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry.* Basingstoke: W.H. Freeman; 2012.
3. Vicente García R. El canal de potasio Kv1.3. papel fisiológico y biología del complejo funcional. [Barcelona]: Universidad de Barcelona; 2005.
4. Neher E, Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature.* 1976 Apr 29;260(5554):799–802.
5. Frances M. Ashcroft. *Ion Channels and disease. Channelopathies* [Internet]. Academic Press; 1999. 481 p. (ELSEVIER). Available from: <https://www.elsevier.com/books/ion-channels-and-disease/ashcroft/978-0-12-065310-2>
6. Eaton DC, Becchetti A, Ma H, Ling BN. Renal sodium channels: Regulation and single channel properties. *Kidney Int.* 1995;48(4):941–9.
7. Chandrashekar J, Kuhn C, Oka Y, Yarmolinsky DA, Hummler E, Ryba NJP, et al. The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature.* 2010 Mar 11;464(7286):297–301.
8. Kretz O, Barbry P, Bock R, Lindemann B. Differential expression of RNA and protein of the three pore-forming subunits of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel in taste buds of the rat. *J Histochem Cytochem.* 1999;47(1):51–64.
9. Oka Y, Butnaru M, von Buchholtz L, Ryba NJP, Zuker CS. High salt recruits aversive taste pathways. *Nature.* 2013 Feb 13;494(7438):472–5.
10. Abi-Antoun T, Shi S, Tolino LA, Kleyman TR, Carattino MD. Second transmembrane domain modulates epithelial sodium channel gating in response to shear stress. *AJP Ren Physiol.* 2011 May 1;300(5):F1089–95.
11. Staruschenko A, Medina JL, Patel P, Shapiro MS, Booth RE, Stockand JD. Fluorescence Resonance Energy Transfer Analysis of Subunit Stoichiometry of the Epithelial Na<sup>+</sup> Channel. *J Biol Chem.* 2004 Jun 25;279(26):27729–34.
12. Edelheit O, Ben-Shahar R, Dascal N, Hanukoglu A, Hanukoglu I. Conserved charged residues at the surface and interface of epithelial sodium channel subunits - roles in cell surface expression and the sodium self-inhibition response. *FEBS J.* 2014 Apr;281(8):2097–111.
13. Kashlan OB, Kleyman TR. ENaC structure and function in the wake of a resolved structure of a family member. *AJP Ren Physiol.* 2011 Oct 1;301(4):F684–96.
14. Stockand JD, Staruschenko A, Pochynyuk O, Booth RE, Silverthorn DU. Insight toward epithelial Na<sup>+</sup> channel mechanism revealed by the acid-sensing ion channel 1 structure. *IUBMB Life.* 2008 Sep;60(9):620–8.

15. Hanukoglu I, Hanukoglu A. Epithelial sodium channel (ENaC) family: Phylogeny, structure–function, tissue distribution, and associated inherited diseases. *Gene*. 2016 Apr;579(2):95–132.
16. Solymosi EA, Kaestle-Gembardt SM, Vadasz I, Wang L, Neye N, Chupin CJA, et al. Chloride transport-driven alveolar fluid secretion is a major contributor to cardiogenic lung edema. *Proc Natl Acad Sci*. 2013 Jun 18;110(25):E2308–16.
17. Matalon S, Bartoszewski R, Collawn JF. Role of epithelial sodium channels in the regulation of lung fluid homeostasis. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2015 Dec 1;309(11):L1229.
18. Esteva-Font C, Balcells RT, Fernández-Llama P. Transportadores de sodio y aquaporinas: ¿ futuros biomarcadores renales? *Med Clínica*. 2007;129(11):433–437.
19. Warnock DG, Kusche-Vihrog K, Tarjus A, Sheng S, Oberleithner H, Kleyman TR, et al. Blood pressure and amiloride-sensitive sodium channels in vascular and renal cells. *Nat Rev Nephrol*. 2014 Jan 14;10(3):146–57.
20. Rosa DA de la, Navarro-González JF, Giraldez T. ENaC modulators and renal disease. *Curr Mol Pharmacol*. 2013;6(1):35–43.
21. Rotin D, Staub O. Role of the ubiquitin system in regulating ion transport. *Pflüg Arch - Eur J Physiol*. 2011 Jan;461(1):1–21.
22. Lu C, Pribanic S, Debonneville A, Jiang C, Rotin D. The PY Motif of ENaC, Mutated in Liddle Syndrome, Regulates Channel Internalization, Sorting and Mobilization from Subapical Pool. *Traffic*. 2007 Sep;8(9):1246–64.
23. Rotin D. Role of the UPS in Liddle syndrome. *BMC Biochem*. 2008;9(Suppl 1):S5.
24. Wang S, He G, Yang Y, Liu Y, Diao R, Sheng K, et al. Reduced Expression of Enac in Placenta Tissues of Patients with Severe Preeclampsia Is Related to Compromised Trophoblastic Cell Migration and Invasion during Pregnancy. Wang H, editor. *PLoS ONE*. 2013 Aug 19;8(8):e72153.
25. Liu C, Zhu L-L, Xu S-G, Ji H-L, Li X-M. ENaC/DEG in Tumor Development and Progression. *J Cancer*. 2016;7(13):1888–91.