



“CLONAMIENTO Y EXPRESIÓN DEL CANAL DE CLORURO CIC-5 EN EPITELIO INTESTINAL DE COBAYO.”

**ISABEL MARGARITA CORNEJO ARANEDA
TECNÓLOGO MÉDICO**

RESUMEN

Los canales de cloruro están presentes en la membrana celular de todas las células y en organelos intracelulares cumpliendo diferentes funciones. Algunos de estos canales han sido identificados molecularmente siendo la familia de canales de cloruro activados por voltaje o C1C la más numerosa. Hasta ahora, se han identificado 9 miembros de esta familia en mamíferos, estando establecida la función solamente para algunos de ellos. Además, mutaciones en algunos de estos canales han revelado ser causa de patologías humanas. Es así, como la enfermedad de Dent, caracterizada por proteinuria de bajo peso molecular y nefrolitiasis hipercalcémica, es causada por mutaciones en el gen que codifica para el canal C1C-5. Estos hallazgos, previos al conocimiento de la función de este canal, han despertado gran interés en dilucidar los mecanismos por los que alteraciones en un canal de cloruro pueden generar un fenotipo caracterizado por proteinuria e hipercalcemia. Estudios de la presencia del RNA mensajero y de la proteína en diferentes especies coinciden en que la mayor expresión de C1C-5 ocurre en el riñón. En las células del túbulo proximal del nefrón C1C-5 se ubica intracelularmente en la membrana de vesículas endocíticas tempranas, colocalizando con la bomba protón ATPasa vacuolar. De esta manera, el funcionamiento adecuado de este canal aniónico es necesario para lograr la acidificación intravesicular óptima requerida para la reabsorción de proteínas. Mutaciones en el gen que codifica a C1C-5, han demostrado causar ausencia o déficit en la actividad del canal, lo cual origina una falla en la disipación de cargas en las vesículas alterando la acidificación

intravesicular y por ende la reabsorción de proteínas generando así proteinuria. Sin embargo, los mecanismos que llevan a la hipercalcemia en esta enfermedad son menos conocidos. Una hipótesis plantea que los cambios en el metabolismo del calcio son secundarios al trastorno de la endocitosis en el túbulo proximal. Alternativamente se ha sugerido que la hipercalcemia sería secundaria a un aumento en la absorción intestinal de calcio. Considerando que el riñón no es el único órgano que participa en el metabolismo de proteínas y de calcio, se estudió la expresión del RNA mensajero de C1C-5 en el intestino delgado, órgano esencial en la absorción de ambos nutrientes desde la dieta. Además, existen antecedentes de que en el epitelio intestinal ocurre transporte vesicular tanto de proteínas como de calcio, lo cual hace más interesante estudiar la expresión de este canal en este órgano para posteriormente determinar cuál sería el papel fisiológico de C1C-5 en este tejido epitelial. En esta tesis se describe el clonamiento por homología del canal C1C-5 desde epitelio intestinal de cobayo mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la distribución de su RNA mensajero en duodeno, yeyuno e ileon de cobayo. Para el clonamiento se utilizaron partidores apropiados con los que se obtuvo una secuencia parcial de 1144 pares de bases y los extremos 5 y 3 prima se obtuvieron mediante la técnica de amplificación rápida de los extremos de cDNA (RACE). Finalmente con partidores específicos diseñados a partir de las regiones 5 y 3 prima no traducidas se amplificó DNA complementario (cDNA), mediante la reacción de transcripción reversa del RNA obtenido del epitelio duodenal. Como resultado del clonamiento se obtuvo un cDNA cuya secuencia predice una proteína de 746 aminoácidos con un mínimo de un 95% de identidad con sus homólogos de otras especies. El análisis de hidrofobicidad de la secuencia aminoacídica, predice 10 a 12 dominios de transmembrana los cuales son comunes en todos los miembros de la familia C1C. Se detectaron sitios putativos de glicosilación y fosforilación por PKA y PKC que también han sido descritos en su homólogo de rata. La presencia del RNA mensajero en epitelio intestinal se estudió mediante transcripción reversa seguida de PCR (RT-PCR), Northern blot e Hibridación in situ. Mediante RT-PCR se estableció la presencia del transcrito en las 3 porciones estudiadas. Mediante el análisis de Northern blot además de comprobar lo anterior, se estableció el tamaño del principal transcrito en aproximadamente 9,5 kilobases,

equivalente a lo descrito en otras especies. Finalmente, la localización del mensajero se estudió mediante hibridación in situ utilizando una sonda de 662 pares de bases sintetizada por transcripción in vitro marcada con digoxigenina. Con esta técnica se demostró la presencia del mensajero de C1C-5 en las células del epitelio que conforman tanto las criptas como las vellosidades del duodeno yeyuno e ileon. La localización del RNA mensajero exclusivamente en las células epiteliales del intestino delgado sugiere la posible participación de este canal en el transporte transepitelial lo cual debe ser resuelto mediante futuros estudios.