

# Rol fisiopatológico de los transportadores de bicarbonato en el corazón

BERNARDO V. ALVAREZ\*

El bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) es el producto de desecho de la respiración mitocondrial. Las proteínas transportadoras de  $\text{HCO}_3^-$  (TB) facilitan el movimiento del  $\text{HCO}_3^-$  para acelerar el descarte de  $\text{CO}_2$ , controlar el pH celular y de todo el cuerpo, y regular el movimiento de fluidos y la secreción ácido-base. Trece productos génicos facilitan el transporte de  $\text{HCO}_3^-$  en el sistema cardiovascular, y su papel fisiológico y patofisiológico es discutido en el presente artículo. La importancia de los TB en la función cardíaca explica el alto nivel de actividad metabólica del corazón y la sensibilidad de la actividad eléctrica a cambios del pH. El transporte de  $\text{HCO}_3^-$  es responsable de al menos el 50% de la regulación del pH en el corazón. La actividad contráctil del corazón produce una carga ácida, principalmente en forma de  $\text{CO}_2$ . La contracción continua requiere de la eliminación de ácido y  $\text{CO}_2$ . Durante procesos isquémicos, el pH cardíaco puede descender a valores muy bajos (aproximadamente 6,2), resultantes de la falla en la eliminación de ácidos originados por el metabolismo y la actividad anaeróbica. El pH ácido impacta directamente en la función cardíaca a través de: 1) cierre de las uniones tipo *gap* que conectan las células cardíacas para permitir la contracción conjunta; 2) alteración de la apertura de canales iónicos, los cuales establecen el potencial de membrana y señalizan la contracción. Por lo tanto, el control del pH intracelular y de la homeostasis del  $\text{HCO}_3^-$  mediada por los TB en células cardíacas es de fundamental importancia.

**Palabras clave:** Transportadores de bicarbonato. Miocardio. pH intracelular.

El bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) es el principal *buffer* de nuestro cuerpo y el principal producto primario de desecho del metabolismo celular. Nuestras células controlan la concentración y el movimiento de base en forma de  $\text{HCO}_3^-$  a través de la membrana plasmática, mediante la coordinación de la actividad de las anhidrasas carbónicas (AC) y del transporte mediado por proteínas denominadas transportadores de bicarbonato (TB) que catalizan rápidamente el movimiento transmembrana de  $\text{HCO}_3^-$  (Tabla 1).<sup>1-4</sup> El control del pH intracelu-

lar ( $\text{pH}_i$ ), y por ende la homeostasis del  $\text{HCO}_3^-$ , es esencial para la función celular, ya que la mayoría sino todos los procesos celulares son afectados por el  $\text{pH}_i$ .<sup>5</sup> En el corazón, las células regulan su pH a través de diversos mecanismos, siendo el transporte de  $\text{HCO}_3^-$  mediado por los TB el responsable de por lo menos el 50% de la regulación de  $\text{pH}_i$ .<sup>6,7</sup> El transporte de  $\text{HCO}_3^-$  es requerido para el control celular del  $\text{pH}_i$ , el metabolismo del  $\text{CO}_2$  y el control del volumen celular. Los TB son fundamentales en un amplio rango de condiciones fisiológicas y patofisiológicas, entre las que se incluye la hipertensión<sup>8</sup>, la hipertrofia cardíaca (HC)<sup>8-11</sup>, el daño causado durante procesos de isquemia/reperfusión<sup>6</sup> (IR), y la insuficiencia cardíaca (IC)<sup>11,12</sup>.

## TRANSPORTADORES DE BICARBONATO

Los mamíferos tienen 12 genes identificados como proteínas TB en el sistema cardiovascular, las cuales comparten una cierta identidad en sus secuencias aminoacídicas (Tabla 1). El árbol filogenético de los genes humanos de TB tiene tres ramas mayores (Figura 1); intercambiadores  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  independientes de  $\text{Na}^+$  (AE), intercambiadores  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  noveles, miembros de la familia SLC26A (SLC26A3 y SLC26A6), y transportadores de  $\text{HCO}_3^-$  acoplados al  $\text{Na}^+$  (NBC, también

\* Investigador Adjunto CONICET. Centro de Investigaciones Cardiovasculares (CIC). Jefe de Trabajos Prácticos de la Cátedra de Fisiología y Física Biológica de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata.

Dirección postal: Bernardo V. Alvarez. Centro de Investigaciones Cardiovasculares. Cátedra de Fisiología y Física Biológica (UNLP). Calle 60 y 120 S/N. 1900 La Plata. Pcia. de Buenos Aires. Argentina.

e-mail: balvarez@med.unlp.edu.ar

El autor de este trabajo declara al mismo no afectado por conflictos de intereses.

Recepción del artículo: 04-DIC-2010

Recepción de las correcciones: 07-ENE-2011

Aceptación: 21-ENE-2011

La versión digitalizada de este trabajo está disponible en [www.fac.org.ar](http://www.fac.org.ar)

TABLA 1  
PROTEINAS TRANSPORTADORAS DE BICARBONATO Y SUS PROPIEDADES

<i>Proteína</i>	<i>Otros nombres</i>	<i>Distribución en el sistema cardiovascular y otros tejidos</i>	<i>Mecanismo</i>	<i>Movimiento de carga neta</i>
AE1	SLC4A1 Banda 3	Eritrocitos, riñón, corazón	Intercambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$	0
AE2	SLC4A2	Ubicuo	Intercambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$	0
AE3	SLC4A3	Cerebro, corazón retina tracto gastrointestinal, riñón	Intercambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$	0
NBC1	SLC4A4 hhNBC, pNBC rb1NBC variante de <i>splicing</i> (NBC1)	Corazón, páncreas riñón, córnea próstata, colon estómago, glia, tiroides, cerebro	Cotransporte $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$	-2 o -1
NBC3	SLC4A7 NBC2, NBCn1 (SLC4A6)	Corazón, aorta, riñón, músculo pulmón, aorta, glándula submandibular	Cotransporte $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$	0
NBC4	SLC4A5 NBC4a, b, c, NBCe2	Hígado, bazo epidídimo, corazón cerebro, riñón	Cotransporte $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$	-1 o electroneutro
SLC4A9	AE4	Riñón, testis	Cotransporte $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$	0
NDCBE	SLC4A8 NDAE1, NCBE (NBC3) SLC4A10	Neuronas, riñón, fibroblastos, corazón (miocitos)	Intercambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ dependiente de $\text{Na}^+$ o cotransporte $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$	0 o +1
NBCn2	SLC4A10	Corazón (miocitos) neuronas, riñón, útero	Intercambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ dependiente de $\text{Na}^+$ o cotransporte $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$	0
SLC26A3	DRA, CLD	Colon, ilion, glándulas sudoríparas corazón	Intercambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$	-1 o -2
SLC26A6	PAT-1, CFEX	Riñón, corazón, páncreas, hígado, músculo, intestino, placenta	Intercambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ , también oxalato y formato	-1 $2\text{HCO}_3^-:1\text{Cl}^-$ o electroneutro
SLC26A9	SLC26A9	Riñón, estómago, cerebro, tráquea, glándula salival, pulmón, corazón	Intercambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$	Electrogénico

SLC hace referencia a transportadores de soluto, nomenclatura usada para la organización de genes adoptada por la Organización de Genoma Humano (HUGO).

conocidos como cotransportadores  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ ), entre los que se incluye al NCBE. A pesar de que los miembros de la familia de TB comparten la función de transportar iones  $\text{HCO}_3^-$ , el mecanismo por el cual ellos lo transportan, su localización celular y subcelular y los

procesos que regulan el transporte mediado por los TB difieren en gran medida<sup>2</sup>. Se ha sugerido un papel preponderante para algunos de estos TB en el miocardio, y su mecanismo regulador, las AC, y se explica a continuación en secciones separadas.

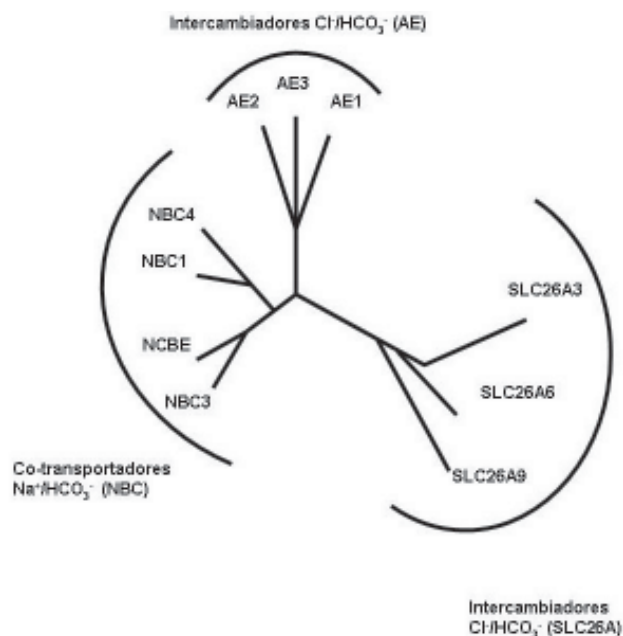
## INTERCAMBIADORES $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (AE, SLC26A) EN EL CORAZON

Los AE catalizan el intercambio electroneutro de un  $\text{Cl}^-$  por un  $\text{HCO}_3^-$ . En eritrocitos, este intercambio mediado por el AE1 facilita la eliminación de  $\text{CO}_2$ , como producto del desecho celular del cuerpo<sup>1</sup>. La familia de los AE comprende también al AE2 y al AE3, los cuales comparten aproximadamente el 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con el AE1 en sus dominios transmembrana<sup>13</sup>. El AE2 está expresado en casi todos los tejidos del cuerpo<sup>14</sup>, mientras que el AE3 tiene un patrón de expresión más restringido, encontrándose en corazón, cerebro y retina<sup>15</sup>. Recientemente fueron identificados otros intercambiadores  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  pertenecientes a la familia SLC26A, los cuales podrían transportar también otros iones, y que difieren de los AE, tanto en su secuencia aminoacídica (10% de identidad) como en la estequiometría (1  $\text{Cl}^-$ : 2  $\text{HCO}_3^-$ )<sup>16</sup>.

La primera observación de los AE en el corazón fue realizada por el grupo de Vaughan-Jones en fibras de Purkinje y músculo cardíaco, a través de un eflujo de  $\text{HCO}_3^-$  dependiente de la presencia de  $\text{Cl}^-$  en el medio extracelular<sup>17,18</sup>, un signo distintivo de los intercambiadores  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  también descrito en eritrocitos<sup>19,20</sup>. Análisis de Northern blots de tejidos cardíacos indicaron la presencia de dos transcritos del gen SLC4A3 (AE3)<sup>21</sup>. Análisis posteriores corroboraron la expresión de dos isoformas del AE3<sup>22</sup>: el AE3c, que se encuentra sólo en el corazón y en la retina<sup>15,23</sup>; y el AE3fl, expresado en corazón, cerebro y retina<sup>15,22,27</sup>. Posteriormente se demostró la expresión del SLC26A6, y se pudo comprobar que este intercambiador  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  era el más abundante en miocitos<sup>26</sup>. Inmunoblots y experimentos de inmunocitoquímica mostraron que, tanto AE3 como SLC26A6, localizan en el sarcolema de los miocitos, y que también estarían expresados en estructuras membranosas de retículo sarcoplasmático y en túbulos<sup>26,28</sup>.

La actividad de los AE también se ha reportado en la vasculatura<sup>29-31</sup>. El papel que cumplen los AE en el corazón es a través de la acidificación celular, mediante el eflujo de  $\text{HCO}_3^-$ <sup>32</sup>, como puede observarse en la recuperación del  $\text{pH}_i$  luego de la alcalosis. Experimentos realizados en corazones de hurón demostraron que los procesos dependientes del  $\text{HCO}_3^-$  (intercambio  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  mediado por AE, y co-transporte  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  mediado por NBC) son responsables de por lo menos el 40% de la actividad de recuperación de pH en el período postisquémico<sup>6,7</sup>.

Dos grupos mostraron efectos cardioprotectores en I/R cuando los corazones fueron tratados con inhibidores del intercambio aniónico, usando derivados del ácido disulfónico estilbene (SITS)<sup>33,34</sup>. Sin embargo estos datos deberían ser analizados con cierta precaución, ya que estos compuestos inhiben también el transporte de ácidos grasos, el cual es cardioprotector a tra-

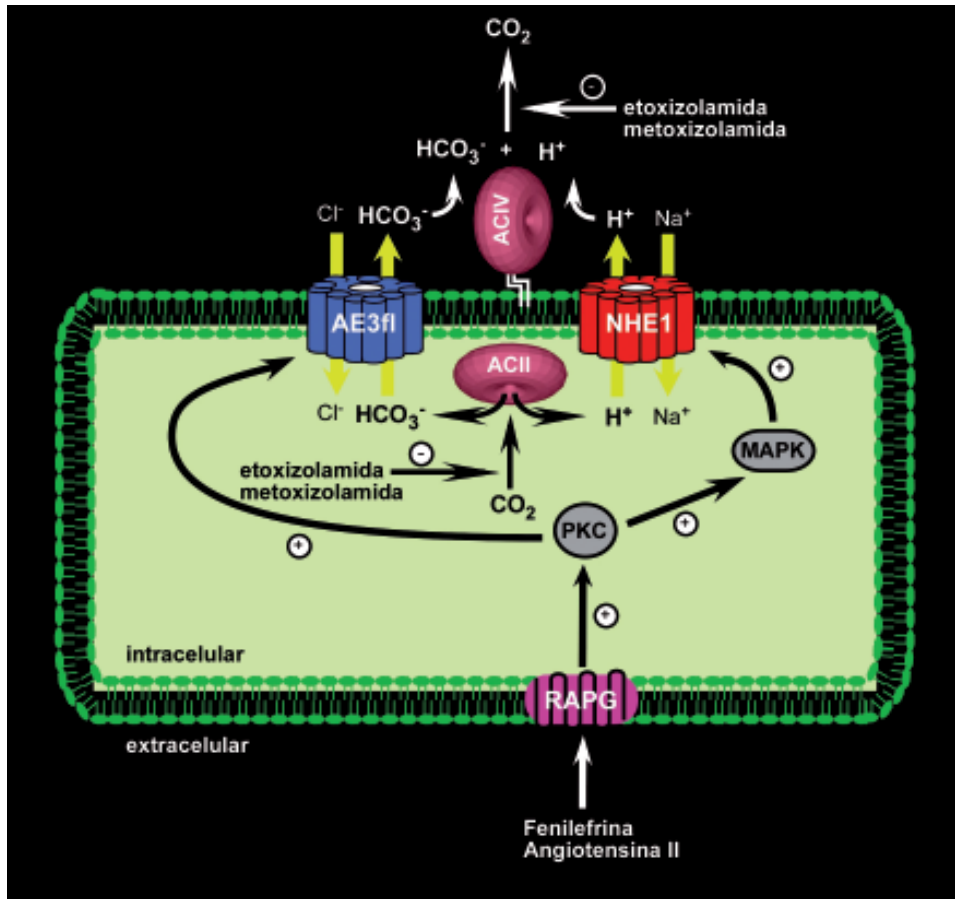


**Figura 1. Relación filogenética entre transportadores de bicarbonato humanos.** Las secuencias de aminoácidos de los transportadores de bicarbonato humanos fueron analizadas con el programa Phylip del *website* ClustalW. El tamaño de las líneas es proporcional al grado de identidad en la secuencia de aminoácidos entre las distintas proteínas. Los transportadores de bicarbonato se agrupan en tres familias: la familia AE de intercambiadores  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ , la familia SLC26A de "nuevos" intercambiadores  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ , y la familia NBC de cotransportadores  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ .

vés de la reducción de la producción de  $\text{H}^+$ <sup>34</sup>, e inhiben a la anhidrasa carbónica (AC)<sup>35</sup>, fenómeno que sería cardioprotector, impidiendo la sobrecarga de  $\text{Na}^+$ . Por otro lado, el SITS inhibió la recuperación de un episodio isquémico en el miocardio de conejos, sugiriendo que los AE podrían alcalinizar los miocitos<sup>36</sup>. Debido a que el SITS también inhibe a los canales de  $\text{Cl}^-$  y al cotransportador  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  NBC1 en el miocardio, estos experimentos son difíciles de interpretar.

En resultados recientes, usando anticuerpos inhibitorios de la función de  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  mediada por AE3, se demostró un aumento del  $\text{pH}_i$  en miocitos de rata, lo cual llevaba a un aumento en la fuerza contráctil<sup>37,38</sup>. Esto sugiere que, bajo condiciones normales, el AE3 acidifica los miocitos a través del eflujo de  $\text{HCO}_3^-$ , lo cual tendría mayores implicancias en el corazón cuando ese mecanismo está hiperactivo.

La HC, caracterizada por un crecimiento anormal de los miocitos cardíacos, frecuentemente culmina en la IC<sup>39</sup>. Diversas evidencias han sugerido un papel preponderante en la activación del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE1) y el desarrollo de la HC<sup>40</sup>. El NHE1 es activado luego del infarto de miocardio, y en este contexto la inhibición farmacológica del NHE1 previene el desarrollo de hipertrofia<sup>41</sup>. En el corazón, el NHE1 es activado por agonistas que activan receptores acoplados a



**Figura 2. Modelo para la acción antihipertrófica de la etoxizolamida y metoxizolamida.** Receptores acoplados a proteína G (RAPG), los cuales incluyen receptores  $\alpha_{1a}$ -R y receptores AT1 activados por fenilefrina y angiotensina II, respectivamente, están acoplados a la activación de proteína quinasa C (PKC) en cardiomiocitos. La PKC activa directamente al intercambiador  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  AE3 y también activa la vía de señalización de la quinasa activada por mitógenos (MAPK), la cual, a su vez, activa al intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  NHE1. AE3 y NHE1 están asociados físicamente con la anhidrasa carbónica II (ACII), la cual cataliza sus actividades de transporte mediante la provisión de  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{H}^+$  para sus respectivas funciones de transporte. La coactivación del AE3 y el NHE1 es patológica debido a que el ácido generado por el eflujo de  $\text{HCO}_3^-$  mediado por el AE3 es luego removido por el NHE1. La hiperactivación del NHE1 tiene como resultado una carga celular neta de sodio. A su vez el sodio activa la PKC en un mecanismo de retroalimentación positiva. Aumentos del sodio intracelular reducen la actividad del intercambiador sodio-calcio (NCX), el cual es normalmente requerido para mantener bajos los niveles de calcio intracelular. La activación de la PKC y la elevación de los niveles de calcio citosólicos contribuirían al crecimiento hipertrófico del miocardio. La etoxizolamida y la metoxizolamida pueden detener la señal hipertrófica directamente por inhibición de las anhidrasas carbónicas ACII y ACIV, e indirectamente limitando el sustrato para el transporte del AE3 y el NHE1.

proteínas G y que estimulan la proteína quinasa C (PKC)<sup>42</sup>, siendo éstas señales prohipertróficas bien conocidas. La activación del intercambiador NHE1 llevaría a la acumulación de  $\text{Na}^+$  intracelular ( $\text{Na}_i^+$ ) y, subsecuentemente, a la acumulación de  $\text{Ca}^{+2}$ , a través de la activación del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$  (NCX). Esta alteración en la homeostasis iónica activaría el programa de crecimiento hipertrófico de una manera compleja, involucrando la vía de factores de transcripción calcineurina/NFAT5, y los niveles de especies reactivas del oxígeno<sup>40</sup>. Numerosas evidencias indicarían un rol esencial del NHE1 en la cascada hipertrófica<sup>8,43-45</sup>, y sugerirían que la inhibición del NHE1 sería un blanco esencial para la prevención de la HC. Sin embargo, el alto riesgo de infarto cerebral en humanos asociado con drogas existentes que inhiben al NHE1<sup>46-</sup>

<sup>48</sup>, sugeriría el uso alternativo de terapias dirigidas a otros blancos que afecten a la regulación del pH en miocitos.

Además, el intercambiador NHE1 no es el único mecanismo regulador de pH involucrado en la cascada hipertrófica. En condiciones experimentales, en las cuales el  $\text{HCO}_3^-$  está ausente, la activación del NHE1 produce un aumento significativo del pH. Sin embargo, en condiciones fisiológicas, en las cuales hay abundante  $\text{HCO}_3^-$ , los procesos reguladores de pH dependientes de  $\text{HCO}_3^-$  se activan al mismo tiempo que ocurre la activación del NHE1. Un hecho importante, que es comúnmente ignorado, es que cuando el NHE1 se activa bajo condiciones fisiológicas, no se observa aumento de  $\text{pH}_i$ <sup>8,49</sup>. Esto puede ser debido a que la alcalinización de las células que se produce cuando se activa el NHE1



tiene un efecto autoinhibitorio sobre el propio NHE1. Por lo tanto, la sobreactivación del NHE1 no puede sostenerse sin la presencia de un mecanismo acidificante de las células que actúe como balance. Es interesante destacar que, bajo condiciones en las cuales ocurre hipertrofia en cardiomiocitos, no se observan cambios en el  $\text{pH}_i$  en condiciones basales, pero sí se pueden observar aumentos en la concentración de  $\text{Na}^+$  citosólica<sup>8</sup>. Este fenómeno de sobreactivación del NHE1 sin alcalinización celular, puede ser explicado únicamente por un mecanismo acidificante, como es el intercambio  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  mediado por el AE3 que es activado en paralelo<sup>8</sup>, y que es regulado además por la PKC, proteína quinasa que integra la vía hipertrofia<sup>9,50</sup>.

### COTRANSPORTADORES $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC) EN EL CORAZON

Los NBC catalizan el cotransporte electrogénico o electroneutro de  $\text{Na}^+$  y  $\text{HCO}_3^-$ , a través de la membrana plasmática. Los NBC fueron primero clonados e identificados en el riñón de salamandra (NBC1)<sup>51</sup>. La secuencia aminoacídica de los NBC está estrechamente relacionada con los AE descritos más arriba, teniendo una similitud de más del 40% (**Figura 1**). Se han descrito e identificado varias isoformas, las cuales tienen distinta distribución en tejidos, estequiometría y regulación en su actividad de transporte (**Tabla 1**).

Un segundo NBC, llamado NBC1b fue clonado de páncreas y corazón humano<sup>52,53</sup>. El NBC3 fue clonado de músculo esquelético, y posteriormente identificado en corazón<sup>54,55</sup>. Es importante destacar que, mientras el NBC3 media el cotransporte iónico electroneutro de 1  $\text{HCO}_3^-$  y 1  $\text{Na}^+$ , los NBC1 pueden catalizar el cotransporte iónico de 2 o 3  $\text{HCO}_3^-$  por cada 1  $\text{Na}^+$ , comportándose de esta manera como mecanismos electrogénicos. Otra particularidad de los NBC3 es que, a diferencia de otros NBC, son inhibidos por la droga amiloride, pero su transporte no es afectado por derivados del ácido estilbene disulfónico (DIDS, SITS). El último NBC en ser clonado y caracterizado fue el NBC4, que tiene una alta expresión en hígado, y una expresión moderada<sup>55,56</sup> o nula<sup>10</sup> en el corazón.

En el corazón, los NBC son activados por un aumento de la carga ácida en los miocitos cardíacos. La acidificación celular activa los NBC, los cuales mueven  $\text{HCO}_3^-$  hacia adentro de las células para neutralizar los  $\text{H}^+$ . La activación de los NBC implica también un influjo neto de  $\text{Na}^+$  hacia adentro de los miocitos. Esto último tendría alguna implicancia patofisiológica, ya que el aumento de  $\text{Na}^+$  estaría vinculado con la HC, como ha sido probado para el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  NHE1<sup>57-59</sup>. La activación del NHE1 durante la isquemia cardíaca produciría arritmias, atontamiento miocárdico y daño irreversible a través del aumento de  $\text{Na}^+$ , proceso en el cual también podrían estar implicados los NBC. Además, parte de los efectos beneficiosos descritos

para los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina II, después de un infarto de miocardio, podrían ser mediados por inhibición del NBC.

Otras pruebas importantes del papel de los NBC en condiciones patológicas están dadas por el efecto beneficioso dado por la inhibición del NBC1b, mejorando la respuesta contráctil del corazón luego de un episodio isquémico<sup>11</sup>, y por el descubrimiento del aumento de la actividad del NBC en la HC por sobrecarga de presión<sup>10</sup>.

Durante procesos patológicos tales como la HC mediada por sobrecarga de presión, el aumento en la expresión y la actividad de transporte de  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ , mediada por los NBC, provee un mecanismo para la sobrecarga de  $\text{Na}^+$ , la cual puede aumentar la sensibilidad del miocardio al aumento del  $\text{Ca}^{+2}$  durante la reperfusión que sigue a la isquemia<sup>10</sup>.

Además se demostró que el NBC1 (también conocido como hhNBC) está involucrado en la disfunción cardíaca luego de un período isquémico, y que la inhibición de la función del NBC1 mejora la respuesta contráctil cardíaca luego de la isquemia<sup>11</sup>. Brill y colaboradores también demostraron un aumento en la expresión del NBC1 (ARNm y proteína) en cardiomiopatías humanas, evidenciando un papel de estos transportadores en procesos patológicos cardíacos<sup>11</sup>.

Los NBC han sido ignorados muchas veces como potenciales mecanismos que llevan a un aumento del  $\text{Na}^+$ , siendo este cambio en la homeostasis del  $\text{Na}^+$  perjudicial para el normal funcionamiento del corazón.

### ANHIDRASAS CARBONICAS EN EL CORAZON

El corazón expresa ACII citosólica, ACIV anclada a la membrana plasmática a través de un anclaje de glicosilfosfatidilinositol<sup>60-62</sup>, y ACIX, y ACXIV ambas con un segmento transmembrana<sup>62,63</sup>. Mientras que la ACII tiene su sitio catalítico en el citoplasma de las células, la ACIX y la ACXIV realizan su actividad catalítica en el medio extracelular. La existencia de AC extracelulares en miocitos ha sido bien documentada. Sin embargo la presencia de ACII ha sido objeto de discusión, con un único reporte temprano que sugiere la presencia de ACII en el citosol de cardiomiocitos fetales<sup>64</sup>. Recientemente se identificó a la ACII en miocitos de rata<sup>65</sup>, y también en ventrículos de corazón de ratón y humano adulto, tanto a nivel del ARNm como a nivel de la proteína. Estudios recientes demostraron que el tratamiento con inhibidores de la AC, tales como la etoxizolamida (ETZ) y la metazolamida (MTZ), inhiben la hipertrofia de cardiomiocitos cultivados de ratas neonatas y ratas adultas inducida por los agonistas alfaadrenérgico, fenilefrina (FE) o angiotensina II (AngII), respectivamente<sup>65</sup>, en una relación dependiente de la dosis (10-100  $\mu\text{M}$ ), y pueden revertir la hipertrofia una vez establecida (**Figura 2**). Además, la FE incrementó la expresión de genes marcadores de la HC, como el péptido natriurético atrial (ANP), y tam-

bién de la ACII, tanto a nivel del ARNm como a nivel de proteínas. La ETZ normalizó la expresión de ANP y ACII, consistente con la normalización de la hipertrofia.

Por último, el intercambiador  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  AE3fl se activa por la estimulación adrenérgica, pero no el intercambiador  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  SLC26A6, lo cual refuerza la idea de que el AE3fl es la isoforma que se activa durante la HC<sup>65</sup>. Otros datos que apoyan estos estudios mencionados están basados en perfiles de genes, los que sugieren que la expresión de la ACII está aumentada en el corazón hipertrófico de ratón, en modelos de hipertrofia inducida hormonalmente por aumentos de angiotensina II<sup>66</sup>. También el efecto de ETZ sobre la inhibición del crecimiento celular ha sido probado en otros sistemas<sup>67,68</sup>. La ETZ usada en una dosis de 100  $\mu\text{M}$  inhibió el crecimiento de tres líneas celulares. Sin embargo, no se elucidaron las bases fisiológicas de dicha inhibición. Estos resultados no son inconsistentes con el modelo de inhibición de la actividad del NHE1, NBC1 y AE3 que han sido propuestos, dado que estos transportadores están universalmente expresados en células de mamíferos. Un estudio reciente demostró que inhibidores del NHE1 que son comúnmente usados, inhiben también a la ACII, en concentraciones similares a las reportadas como antihipertróficas<sup>35</sup>; esto sugeriría que al menos una parte del efecto inhibitorio de ciertos inhibidores del NHE1 sobre la HC estaría dada a través de la inhibición de las AC y no del NHE1.

Se ha sugerido que la AE3, la ACII (y tal vez otras AC), el NHE1 y los NBC, que forman un complejo físico y funcional, tendrían un rol patológico, activando el crecimiento hipertrófico del corazón. Este complejo formado por intercambiadores iónicos y AC podría denominarse "metabolón de transporte iónico hipertrófico" (MTIH). Por lo tanto, el MTIH podría ser un blanco para la prevención de la HC y otras patologías cardíacas.

### METABOLONES DE TRANSPORTE IONICO E HIPERTROFIA

Un metabolón es un complejo físico de enzimas asociadas en una vía enzimática<sup>69</sup>. El flujo a través de la vía enzimática es acelerado por la co-localización de enzimas, las cuales aumentan la concentración local de sustrato en el sitio activo de la enzima contigua, por lo tanto el producto de una reacción alimenta a la siguiente. Cuando el producto enzimático es consumido en una reacción, luego la enzima contigua le provee el sustrato, dirigiendo de alguna manera la dirección del flujo. En el transporte de  $\text{HCO}_3^-$  la primera indicación del fenómeno del metabolón es la indicación de la asociación de la ACII con el dominio C-terminal de los intercambiadores  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ , AE1, AE2 y AE3, mediada por una interacción entre una secuencia ácida de aminoácidos en los AE (un residuo hidrofóbico seguido por cuatro residuos, con al menos dos residuos áci-

dos)<sup>70</sup>, y una secuencia de residuos de aminoácidos básica en el extremo N-terminal de la ACII<sup>71</sup>. Este tipo de interacción física también tiene un significado funcional, ya que la interacción directa de AE/ACII es esencial para la máxima actividad de transporte mediado por los AE, con una disminución de entre 40-60% cuando la ACII está libre en el citoplasma de las células y no asociada a los AE<sup>72</sup>.

Esto condujo a la introducción del concepto de "metabolón de transporte iónico" (MTI), que hace referencia al complejo formado entre un transportador iónico y la enzima que produce y consume el sustrato que se transporta.

Recientemente se demostró que, además de los AE (AE1, AE2 y AE3), tanto el NHE1 (**Figura 2**) como los cotransportadores  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  (NBC, NBC1, NBC3), que se mencionan junto al NHE1 como mecanismos alcalinizantes del miocardio, interaccionan física y funcionalmente con la anhidrasa carbónica II (ACII)<sup>65,72-77</sup>, formando MTI. Todas estas observaciones permitirían pensar que el AE3fl, el AE principal en el corazón de mamíferos, es esencial para las señales hipertróficas que actúan a través del NHE1. Otra observación que no puede dejarse de lado es que AE3 también actuaría en contraposición de los NBC, mecanismos alcalinizantes que también han sido implicados en patologías cardíacas<sup>11</sup>. La acción combinada de AE3fl y NHE1 y NBC resultaría en una carga celular neta de NaCl, sin cambios en el  $\text{pH}_i$ , lo cual concuerda con los hallazgos de elevación del  $\text{Na}^+$ , sin cambios en el  $\text{pH}_i$  en miocitos estimulados por agentes hipertróficos. El nexo entre la actividad de transporte mediada por restos transportadores iónicos y la señal hipertrófica, podría ser la ACII. La actividad catalítica de la ACII ( $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ ) produce  $\text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ , sustratos necesarios para los flujos mediados por AE3/NBC, y NHE1, respectivamente. De esta manera, ACII, NHE1, NBC y AE3fl estarían asociados. La coactivación de NHE1-NBC/ACII y AE3 sería patológica, debido a que la activación del NHE1 y NBC podría sostenerse en el tiempo sin ser inhibida por pH alcalino, ya que la coactivación de mecanismos acidificantes (AE3fl) no cambia el  $\text{pH}_i$ <sup>28</sup>.

Basados en modelos de cultivos celulares, hemos propuesto que algunos TB, más específicamente el AE3 y los NBC, conjuntamente con la anhidrasa carbónica II (ACII y, tal vez, otras AC), y el NHE1 forman un complejo físico y funcional que patológicamente activaría el crecimiento hipertrófico del corazón<sup>65</sup>. Este complejo podría denominarse metabolón de transporte iónico hipertrófico (MTIH). Otras evidencias que sostienen el papel del AE3fl y la ACII en la HC son: 1) inhibidores de la AC, como la ETZ y la MTZ, previnieron y revirtieron la HC con una dosis-respuesta similar a sus efectos sobre el transporte iónico mediado por NHE1 y AE3fl; 2) biopsias de corazones humanos expresan ACII, ACIV y ACXIV, y los niveles de ACII y ACIV aumentarían en

el miocardio hipertrófico (Alvarez y colaboradores, datos no publicados).

De confirmarse el hallazgo del MTHH sería de una importancia fundamental, ya que inhibidores de la AC, como la acetazolamida (ACTZ, Diamox) y la ETZ (Cardrasa) han sido usados como diuréticos y en el tratamiento de la hipertensión ocular (glaucoma) entre 1950 y 1960<sup>22,23</sup>, y podrían ser adoptados rápidamente para el tratamiento de la hipertrofia cardíaca.

## SUMMARY

### PHYSIOLOGICAL ROLE OF BICARBONATE TRANSPORTERS IN HEART

Bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) is the waste product of mitochondrial respiration. Bicarbonate transport (BT) proteins facilitate the movement of membrane-impermeant  $\text{HCO}_3^-$  across membranes to accelerate disposal of waste  $\text{CO}_2$ , control cellular and extracellular pH, and to regulate fluid movement and acid/base secretion. Thirteen gene products facilitate mammalian bicarbonate transport, whose physiology and pathophysiology is discussed in the present review. The importance of BT in cardiac function is explained by the high level of metabolic activity of the heart and the sensitivity of electrical activity to changes of pH. Indeed,  $\text{HCO}_3^-$  transport is estimated to be responsible for approximately 50% of pH regulation in heart. Contractile activity of cardiac muscle produces an acid load, mainly in the form of  $\text{CO}_2$ . Continued contraction requires disposal of waste  $\text{CO}_2$  and acid. During ischemia, cardiac pH may drop as low as pH 6.2, resulting from a failure to remove metabolic acid and anaerobic metabolism. Acid conditions directly impact cardiac function through: 1) closure of gap junctions that connect cardiac cells together to allow concerted contraction; this extreme sensitivity to low pH may limit the coupling of healthy normo-pH cells to unhealthy acid cells; 2) alteration of ion-channel gating. Ion channels establish the membrane potential and signal contraction. Thus, regulation of the intracellular pH and  $\text{HCO}_3^-$  homeostasis mediated by BR in cardiac cells is essential.

**Key words:** Bicarbonate transporters. Myocardium. Intracellular pH.

## BIBLIOGRAFIA

1. Sterling D, Casey JR: Bicarbonate transport proteins. *Biochem Cell Biol* **2002**; 80: 483-497.
2. Cordat E, Casey JR: Bicarbonate transport in cell physiology and disease. *Biochem J* **2009**; 417: 423-439.
3. Romero MF, Fulton C, M.Boron WF: The SLC4 family of  $\text{HCO}_3^-$  transporters. *Pflugers Arch* **2004**; 447: 495-509.
4. Alper SL: Molecular physiology of SLC4 anion exchangers. *Exp Physiol* **2006**; 91: 153-161.
5. Sperelakis N: *Cell Physiology Source Book. A molecular approach* (2<sup>nd</sup> ed). San Diego, California, USA, Academic Press **1998**.
6. Vandenberg JI, Metcalfe JC, Grace AA: Mechanisms of pH recovery after global ischemia in the perfused heart. *Circ Res* **1993**; 72: 993-1003.
7. Vandenberg JI, Metcalfe JC, Grace AA: Intracellular pH recovery during respiratory acidosis in perfused hearts. *Am J Physiol* **1994**; 266: C489-C497.
8. Perez NG, Alvarez BV, Camilion de Hurtado MC, Cingolani HE:  $\text{pH}_i$  regulation in myocardium of the spontaneously hypertensive rat. Compensated enhanced activity of the  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  exchanger. *Circ Res* **1995**; 77: 1192-1200.
9. Alvarez BV, Fujinaga J, Casey JR: Molecular basis for angiotensin II-induced increase of chloride/bicarbonate exchange in the myocardium. *Circ Res* **2001**; 89: 1246-1253.
10. Yamamoto T, Shirayama T, Sakatani T, et al: Enhanced activity of ventricular  $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$  cotransport in pressure overload hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2007**; 293: H1254-H1264.
11. Khandoudi N, Albadine J, Robert P, et al. Inhibition of the cardiac electrogenic sodium bicarbonate cotransporter reduces ischemic injury. *Cardiovasc Res* **2001**; 52: 387-396.
12. Al Moamen NJ, Prasad V, Bodi I, et al: Loss of the AE3 anion exchanger in a hypertrophic cardiomyopathy model causes rapid decompensation and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* **2011**; 50:137-146.
13. Alper SL, Darman RB, Chernova MN, Dahl NK: The AE gene family of  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchangers. *J Nephrol* **2002**; 15 (Suppl 5): S41-S53.
14. Wang Z, Schultheis PJ, Shull GE: Three N-terminal variants of the AE2  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchanger are encoded by mRNAs transcribed from alternative promoters. *J Biol Chem* **1996**; 271: 7835-7843.
15. Kobayashi S, Morgans CW, Casey JR, Kopito RR: AE3 anion exchanger isoforms in the vertebrate retina: developmental regulation and differential expression in neurons and glia. *J Neurosci* **1994**; 14: 6266-6279.
16. Mount DB, Romero MF: The SLC26 gene family of multifunctional anion exchangers. *Pflugers Arch* **2004**; 447: 710-721.
17. Vaughan-Jones RD: Non-passive chloride distribution in mammalian heart muscle: micro-electrode measurement of the intracellular chloride activity. *J Physiol* **1979**; 295: 83-109.
18. Vaughan-Jones RD: Regulation of chloride in quiescent sheep-heart Purkinje fibres studied using intracellular chloride and pH-sensitive micro-electrodes. *J Physiol* **1979**; 295: 111-137.
19. Reithmeier RA, Lieberman DM, Casey JR, et al.: Structure and function of band 3  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  transporter. *Ann NY Acad Sci* **1989**; 572: 75-83.
20. Salhany JM: *Erythrocyte band 3 protein*. Boca Raton (Florida), CRC Press **1990**.
21. Linn SC, Kudrycki KE, Shull GE: The predicted translation product of a cardiac AE3 mRNA contains an N-terminus distinct from that of the brain AE3  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchanger. *J Biol Chem* **1992**; 267: 7927-7935.
22. Linn SC, Askew GR, Menon AG, Shull GE: Conservation of an AE3  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchanger cardiac-specific exon and promoter region and AE3 mRNA expression patterns in murine and human hearts. *Circ Res* **1995**; 76: 584-591.
23. Alvarez BV, Gilmour GS, Mema SC, et al: Blindness caused by deficiency in AE3 chloride/bicarbonate exchanger. *PLoS One* **2007**; 2: e839.
24. Morgans CW, Kopito RR: Association of the brain anion exchanger, AE3, with the repeat domain of ankyrin. *J Cell Sci* **1993**; 105: 1137-1142.
25. Kopito RR, Lee BS, Simmons DM, Lindsey AE, Morgans CW, Schneider K: Regulation of intracellular pH by a neuronal homolog of the erythrocyte anion exchanger. *Cell* **1989**; 59: 927-937.
26. Alvarez BV, Kieller DM, Quon AL, Markovich D, Casey JR: SLC26A6: a cardiac chloride-hydroxyl exchanger and predominant chloride-bicarbonate exchanger of the mouse heart. *J Physiol* **2004**; 561: 721-734.
27. Alvarez BV, Kieller DM, Quon AL, Robertson M, Casey JR: Cardiac hypertrophy in anion exchanger 1-null mutant mice



- with severe hemolytic anemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2007**; 292: H1301-H1312.
28. Alvarez BV, Kieller DM, Quon AL, Robertson M, Casey JR: Cardiac hypertrophy in anion exchanger 1-null mutant mice with severe hemolytic anemia. *Am J Physiol*. **2007**; 292: H1301-H1312.
  29. Aalkjaer C, Hughes A: Chloride and bicarbonate transport in rat resistance arteries. *J Physiol (Lond)* **1991**; 436: 57-73.
  30. Carr P, McKinnon W, Poston L: Mechanisms of pHi control and relationships between tension and pHi in human subcutaneous small arteries. *Am J Physiol* **1995**; 268: C580-C589.
  31. Aickin CC: Regulation of intracellular pH in smooth muscle cells of the guinea-pig femoral artery. *J Physiol (Lond)* **1994**; 479: 331-340.
  32. Vaughan-Jones RD: An investigation of chloride-bicarbonate exchange in sheep cardiac Purkinje fibre. *J Physiol* **1986**; 379: 377-406.
  33. Tanaka H, Matsui S, Kawanishi T, Shigenobu K: Use of chloride blockers: a novel approach for cardioprotection against ischemia-reperfusion damage. *J Pharmacol Exp Ther* **1996**; 278: 854-861.
  34. Ramasamy R, Hwang Y, Bakr S, Bergmann SR: Protection of ischemic hearts perfused with an anion exchange inhibitor, DIDS, is associated with beneficial changes in substrate metabolism. *Cardiovasc Res* **2001**; 51: 275-282.
  35. Villafuerte FC, Vaughan-Jones RD: Common inhibitors of membrane H<sup>+</sup>-transport also inhibit carbonic anhydrase. *The FASEB Journal* **2007**; 21: 916.10.
  36. Nakanishi T, Gu H, Seguchi M, Cragoe EJ, Momma K: HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-dependent intracellular pH regulation in the premature myocardium. *Circ Res* **1992**; 71: 1314-1323.
  37. Chiappe de Cingolani GE, Ennis IL, Morgan PE, Alvarez BV, Casey JR, Camilion de Hurtado MC: Involvement of AE3 isoform of Na<sup>+</sup>-independent Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger in myocardial pH<sub>i</sub> recovery from intracellular alkalization. *Life Sci* **2006**; 78: 3018-3026.
  38. Cingolani HE, Chiappe GE, Ennis IL, et al: Influence of Na<sup>+</sup>-independent Cl<sup>-</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchange on the slow force response to myocardial stretch. *Circ Res* **2003**; 93: 1082-1088.
  39. Frey N, Katus HA, Olson EN, Hill JA: Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation* **2004**; 109: 1580-1589.
  40. Cingolani HE, Ennis IL: Sodium-hydrogen exchanger, cardiac overload, and myocardial hypertrophy. *Circulation* **2007**; 115: 1090-1100.
  41. Kusumoto K, Haist JV, Karmazyn M: Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange inhibition reduces hypertrophy and heart failure after myocardial infarction in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2001**; 280: H738-H745.
  42. Avkiran M, Haworth RS: Regulatory effects of G protein-coupled receptors on cardiac sarcolemmal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger activity: signalling and significance. *Cardiovasc Res* **2003**; 57: 942-952.
  43. Fortunato A, Tisaire J, Lopez R, Bueno J, Diez J: Angiotensin converting enzyme inhibition corrects Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger overactivity in essential hypertension. *Am J Hypertens* **1997**; 10: 84-93.
  44. Camilion de Hurtado MC, Portiansky EL, Perez NG, Rebolledo OR, Cingolani HE: Regression of cardiomyocyte hypertrophy in SHR following chronic inhibition of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *Cardiovasc Res* **2002**; 53: 862-868.
  45. Ennis IL, Alvarez BV, Camilion de Hurtado MC, Cingolani HE: Enalapril induces regression of cardiac hypertrophy and normalization of pHi regulatory mechanisms. *Hypertension* **1998**; 31: 961-967.
  46. Erhardt LR: GUARDIAN During Ischemia Against Necrosis (GUARDIAN) trial in acute coronary syndromes. *Am J Cardiol* **1999**; 83: 23G-25G.
  47. Theroux P, Chaitman BR, Danchin N, et al: Inhibition of the sodium-hydrogen exchanger with cariporide to prevent myocardial infarction in high-risk ischemic situations. Main results of the GUARDIAN trial. Guard During Ischemia Against Necrosis (GUARDIAN) Investigators. *Circulation* **2000**; 102: 3032-3038.
  48. Karmazyn M: Pharmacology and clinical assessment of cariporide for the treatment coronary artery diseases. *Expert Opin Investig Drugs* **2000**; 9: 1099-1108.
  49. Ganz MB, Boyarsky G, Sterzel RB, Boron WF: Arginine vasopressin enhances pHi regulation in the presence of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> by stimulating three acid-base transport systems. *Nature* **1989**; 337: 648-651.
  50. Camilion de Hurtado MC, Alvarez BV, Ennis IL, Cingolani HE: Stimulation of myocardial Na<sup>+</sup>-independent Cl<sup>-</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger by angiotensin II is mediated by endogenous endothelin. *Circ Res* **2000**; 86: 622-627.
  51. Romero MF, Hediger MA, Boulpaep EL, Boron WF: Expression cloning and characterization of a renal electrogenic Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter. *Nature* **1997**; 387: 409-413.
  52. Abuladze N, Lee I, Newman D, et al: Molecular cloning, chromosomal localization, tissue distribution, and functional expression of the human pancreatic sodium bicarbonate cotransporter. *J Biol Chem* **1998**; 273: 17689-17695.
  53. Choi I, Romero MF, Khandoudi N, Brill A, Boron WF: Cloning and characterization of a human electrogenic Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter isoform (hhNBC). *Am J Physiol* **1999**; 276: C576-C584.
  54. Pushkin A, Abuladze N, Lee I, Newman D, Hwang J, Kurtz I: Cloning, tissue distribution, genomic organization, and functional characterization of NBC3, a new member of the sodium bicarbonate cotransporter family. *J Biol Chem* **1999**; 274: 16569-16575.
  55. Pushkin A, Abuladze N, Newman D, Lee I, Xu G, Kurtz I: Two C-terminal variants of NBC4, a new member of the sodium bicarbonate cotransporter family: cloning, characterization, and localization. *IUBMB Life* **2000**; 50: 13-19.
  56. Pushkin A, Abuladze N, Newman D, Lee I, Xu G, Kurtz I: Cloning, characterization and chromosomal assignment of NBC4, a new member of the sodium bicarbonate cotransporter family. *Biochim Biophys Acta* **2000**; 1493: 215-218.
  57. Doggrel SA, Hancox JC: Is timing everything? Therapeutic potential of modulators of cardiac Na<sup>+</sup> transporters. *Expert Opin Investig Drugs* **2003**; 12: 1123-1142.
  58. Karmazyn M, Sawyer M, Fliegel L: The Na<sup>+</sup>(+)/H<sup>+</sup>(+) exchanger: a target for cardiac therapeutic intervention. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* **2005**; 5: 323-335.
  59. Fliegel L, Karmazyn M: The cardiac Na-H exchanger: a key downstream mediator for the cellular hypertrophic effects of paracrine, autocrine and hormonal factors. *Biochem Cell Biol* **2004**; 82: 626-635.
  60. Okuyama T, Sato S, Zhu XL, Waheed A, Sly WS: Human carbonic anhydrase IV: cDNA cloning, sequence comparison, and expression in COS cell membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* **1992**; 89: 1315-1319.
  61. Waheed A, Zhu XL, Sly WS: Membrane-associated carbonic anhydrase from rat lung Purification characterization, tissue distribution and comparison with carbonic anhydrase IVs of other mammals. *J Biol Chem* **1992**; 267: 3308-3311.
  62. Purkerson JM, Schwartz GJ: Expression of membrane-associated carbonic anhydrase isoforms IV, IX, XII, and XIV in the rabbit: induction of CA IV and IX during maturation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **2005**; 288: R1256-R1263.
  63. Scheibe RJ, Gros G, Parkkila S, et al: Expression of membrane-bound carbonic anhydrases IV, IX, and XIV in the mouse heart. *J Histochem Cytochem* **2006**; 54: 1379-1391.



64. Vuillemin M, Pexieder T: Carbonic anhydrase II expression pattern in mouse embryonic and fetal heart. *Anat Embryol (Berl)* **1997**; 195: 267-277.
65. Alvarez BV, Johnson DE, Sowah D, et al: Carbonic anhydrase inhibition prevents and reverts cardiomyocyte hypertrophy. *J Physiol* **2007**; 579: 127-145.
66. Domenighetti AA, Ritchie ME, Smyth G, Pedrazzini T, Proietto J, Delbridge: Gene expression profiling reveals distinct sets of genes altered during hormonally and metabolically induced cardiac hypertrophies. *J Mol Cell Cardiol* **2004**; 37: 303-304.
67. Chegwiddden WR, Carter ND: Introduction to the carbonic anhydrases. *Exs* **2000**; 90: 14-28.
68. Takahata T, Kumano T, Ookawa K, Hayakari M, Kakizaki I, Tsuchida S: Inhibition of 3T3-L1 adipocyte differentiation by 6-ethoxyzolamide: repressed peroxisome proliferator-activated receptor gamma mRNA and enhanced CCAAT/enhancer binding protein beta mRNA levels. *Biochem Pharmacol* **2004**; 67: 1667-1675.
69. Srere PA: Complexes of sequential metabolic enzymes. *Ann Rev Biochem* **1987**; 56: 89-124.
70. Vince JW, Reithmeier RA: Identification of the carbonic anhydrase II binding site in the Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> anion eXchanger AE1. *Biochemistry* **2000**; 39: 5527-5533.
71. Vince JW, Carlsson U, Reithmeier RA: Localization of the Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> anion exchanger binding site to the amino-terminal region of carbonic anhydrase II. *Biochemistry* **2000**; 39: 13344-13349.
72. Sterling D, Reithmeier RA, Casey JR: A transport metabolon. Functional interaction of carbonic anhydrase II and chloride/bicarbonate exchangers. *J Biol Chem* **2001**; 276: 47886-47894.
73. Li X, Alvarez B, Casey JR, Reithmeier RA, Fliegel L: Carbonic anhydrase II binds to and enhances activity of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *J Biol Chem* **2002**; 277: 36085-36091.
74. Li X, Liu Y, Alvarez BV, Casey JR, Fliegel L: A novel carbonic anhydrase II binding site regulates NHE1 activity. *Biochemistry* **2006**; 45: 2414-2424.
75. Alvarez BV, Loiselle FB, Supuran CT, Schwartz GJ, Casey JR: Direct extracellular interaction between carbonic anhydrase IV and the human NBC1 sodium/bicarbonate cotransporter. *Biochemistry* **2003**; 42: 12321-12329.
76. Pushkin A, Abuladze N, Gross E, et al: Molecular mechanism of kNBC1-carbonic anhydrase II interaction in proximal tubule cells. *J Physiol* **2004**; 559: 55-65.
77. McMurtrie HL, Cleary HJ, Alvarez BV, et al. The bicarbonate transport metabolon. *J Enzym Inhib Med Chem* **2004**; 19: 231-236.

La ciencia no es otra cosa que un intento por descubrir unidad en el complejísimo mundo de la naturaleza, o mejor dicho, en la variedad de nuestra experiencia.

J. BRONOWSKI