

109
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"EXPRESION GENICA DE LOS
COTRANSPORTADORES ELECTRONEUTROS EN EL
RIÑON DE RATA DURANTE EL TRATAMIENTO
CON FUROSEMIDE"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A :

BEATRIZ ALEJANDRA MERINO TRUJILLO

DIRECTOR DE TESIS: DR. GERARDO GAMBA AYALA

MEXICO, D. F.

1997



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FACULTAD DE CIENCIAS
SECRETARÍA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: "EXPRESION GENICA DE LOS COTRANSPORTADORES ELECTRONEUTROS EN EL RIÑON DE RATA DURANTE EL TRATAMIENTO CON FUROSEMIDE"

realizado por la pasante MERINO TRUJILLO BEATRIZ ALEJANDRA

con número de cuenta 9150644 - 3 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. GERARDO GAMBA AYALA

Propietario

M. en C. VICTOR MANUEL VALDES LOPEZ

Propietario

Dra. ALEJANDRA MAINERO DEL PASO

Suplente

Dra. MARIA LUISA FANJUL PERA

Suplente

Dr. RICARDO CORREA POTTER

FACULTAD DE CIENCIAS

Victor Manuel Valdes Lopez
Alejandra Mainero del Paso
Maria Luisa Fanjul Pera
Ricardo Correa Potter

Coordinación General de Biología

COORDINACION GENERAL
DE BIOLOGIA

*La gente solo puede ser feliz si
se asombra ante la naturaleza, si se
deslumbra ante la creación, si se
maravilla ante todo aquello que le rodea
por pequeño que sea.*

Jaques Yves Cousteau

**Esta tesis la dedico a mi mamá Beatriz Trujillo
por su apoyo y amor incondicional.
Mis logros también son tuyos!!**

Mi más grande agradecimiento a Gerardo Gamba por introducirme en el mundo de la ciencia el cual se ha vuelto una de las cosas más increíbles que me han pasado, y que como él mismo dijo un día: “requiere de esfuerzo, dedicación, inteligencia y paciencia, sin embargo es una de las delicias de la vida”, siendo todo una cuestión de actitud. Pero sobre todo le agradezco su incalculable amistad la cual me ha permitido crecer como ser humano.

Agradecimientos

A mi papá por ser mi mejor amigo y apoyarme en todas mis locuras, esta tesis es el resultado de una de ellas.

A mis hermanos Mario Enrique, Natalia, y Rodrigo ya que al ser tan diferentes han hecho que mi vida sea interesante y divertida.

A papá Mario y mamá Betty por ser los mejores abuelos del mundo, su amor y comprensión me van a acompañar toda la vida.

A mis amigas Gaby e Itziar por su amistad de tantos años la cual me a ayudado a ser mejor cada día.

A Adriana, Rafael, Roberto, Juan, y Pepe. quienes fueron mi apoyo durante toda la carrera y lo sigen siendo.

Un agradecimiento especial a mis amigos del laboratorio de la Unidad de Fisiología Molecular, por su apoyo en todo momento durante la realización de esta tesis, y por hacer un ambiente de trabajo único.

INDICE

RELACION DE ABREVIATURAS	2
RESUMEN	3
INTRODUCCION	4
ESQUEMA GENERAL DE LA REABSORCION RENAL DE SODIO	4
Túbulo proximal	5
Asa de Henle	7
Túbulo distal	9
Túbulo colector	10
LA FAMILIA DE COTRANSPORTADORES ELECTRONEUTROS DE Na-(K)-Cl	11
Características y regulación del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+ : 2\text{Cl}^-$ (CSB)	13
Características y regulación del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ (CST)	16
BIOLOGIA MOLECULAR DE LOS COTRANSPORTADORES DE Na-(K)-Cl	17
Árbol filogenético actual	18
Diversidad molecular de los cotransportadores de $\text{Na}^+:(\text{K}^+):\text{Cl}^-$	22
Clonación de los cotransportadores de $\text{Na}^+:(\text{K}^+):\text{Cl}^-$	23
Clonación de los cotransportaodres de $\text{Na}^+:(\text{K}^+):\text{Cl}^-$ miembros de mamíferos	24
RESISTENCIA A DIURETICOS	26
OBJETIVOS	28
HIPOTESIS	28
MATERIAL Y METODOS	29
Diseño experimental	29
Expresión génica	30
I Obtención de RNA	30
II Análisis de northern blot	31
III Análisis de dot-blot	32
IV Análisis de RT-PCR semicuantativa	33
- Inicoadores	33
- RT-PCR	33
Análisis Estadísticos	35
RESULTADOS Y DISCUSION	36
Análisis de northern blot	37
Análisis de dot-blot	43
PCR semicuantitativa	48
CONCLUSIONES	53
APENDICES	55
REFERENCIAS	75

RELACION DE ABBREVIACIONES UTILIZADAS

aa = aminoácidos	[³ H]BSTBA = Acido 4-benzoyl-5-sulfamoyl-3-(3-thenyloxy)benzólico
AMPc = Monofosfato cíclico de adenosina	Km = Inhibición enzimática al 50%
AQP-1 = canal de agua conocido como acuaporina - 1	Kb = Kilobases
APS = Persulfato de amonio	KDa = KiloDaltons
ARVC = Aumento regulador del volumen celular	mOsmol = miliosmoles
ATP = Trifosfato de adenosina	mM = milimolar
CSB = Cotransportador sensible a bumetanida	µl = microlitros
CSBr = CSB apical del riñón de rata	µM = micromolar
CSB2 = CSB basolateral de glándula rectal de tiburón	µg = microgramo
CSBm2 = CSB apical de riñón de ratón	NaCl = Cloruro de sodio
C9 = Cotransportador sensible a bumetanida completo	Na ⁺ :H ⁺ = cotransportador de sodio: Hidrogeno
C4 = Cotransportador sensible a bumetanida con el extremo carboxi terminal truncado	NaOH = Hidróxido de sodio
CST = Cotransportador sensible a tiazidas	NKCC1 = Cotransportador de sodio-potasio-cloro del conejo
CST _{II} = CST del lengudo de invierno	NKCC2A = Isoforma A del cotransportador de sodio-potasio-cloro basolateral cortical
CST _r = CST de riñón de rata	NKCC2B = Isoforma B del cotransportador de sodio-potasio-cloro basolateral medular
Cl ⁻ :HCO ₃ ⁻ = Cotransportador de cloro - bicarbonato	NKCC2C = Isoforma C del cotransportador de sodio-potasio-cloro basolateral medulo-cortical
DEPC = Dietil-pirocarbonato	pb = pares de bases
DNA = Acido desoxiribonucleico	PCR = Reacción en cadena de la polimerasa
cDNA = DNA complementario	PKC = protein kinasa C
DOCA = Droxicorticosterona	PKA = protein kinasa A
DRVC = Disminución reguladora del volumen celular	RNA = Acido ribonucleico
dCTP = desoxi citosin fosfato	mRNA = RNA mensajero
dATP = desoxi adenin fosfato	rNTP's = mezcla de ribonucleótidos
dGTP = desoxi guanidin fosfato	r. p. m. = Revoluciones por minuto
dTTP = desoxi timidin fosfato	SDS = Lauril sulfato
dUTP = desoxi uracil fosfato	TCC = Túbulo colector cortical
dNTP = desoxi nucleotidos	TCME = Túbulo colector medular interno
EE = Error estandar	TCMI = Túbulo colector medular interno
FNA = Factor natriurético auricular	TCD = Túbulo contorneado distal
GADPH (G3PD) = Gliceraldehido-3-Fosfato deshidrogenasa	TR = Transcripción reversa
	U.V = Luz ultravioleta
	V _{max} = Inhibición enzimática al 100%

RESUMEN

La administración crónica de furosemide bloquea la reabsorción de iones en el asa ascendente de Henle, con lo que aumenta la carga de sal que llega a la nefrona distal, lo que produce cambios adaptativos, funcionales y estructurales en el túbulo distal. Estos cambios se traducen en aumento en la capacidad de reabsorción de NaCl en esta región.

Uno de los mecanismos potenciales para la adaptación de la nefrona distal puede explicarse por aumento en los transportadores de NaCl en el Túbulo contorneado distal(TCD), como consecuencia del aumento en la carga de NaCl que llega a este. En ratas tratadas con furosemide se ha observado incremento el número de receptores de tiazidas, mediante la determinación de la unión de la [³H]metolazona a membranas, lo que sugiere que existe aumento en la expresión génica del cotransportador de Na⁺:Cl⁻ (CST). Sin embargo, no se conoce el efecto del furosemide sobre la expresión génica de estas proteínas.

Ratas Wistar macho de aproximadamente 250g fueron inyectadas intraperitonealmente con vehículo (V) o furosemide (F) (10mg/100g de peso/24h) durante 1 a 7 días. Las ratas inyectadas con furosemide bebieron una solución de NaCl al 0.8%, y las controles bebieron agua corriente. Los animales permanecieron en jaulas metabólicas 4 días para su adaptación y a lo largo del experimento. Se colectó la orina de cada 24h del día 0 a 7 respectivamente. Después de finalizar cada día de experimento los animales fueron sacrificados, y se colectó la sangre para la determinación de la creatinina sérica. Los riñones fueron removidos y separados macroscópicamente en corteza, médula externa, y médula interna. El análisis de expresión génica se llevó a cabo mediante northern blot o dot blot, así como los de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Los genes estudiados fueron: Na⁺:K⁺:2Cl⁻ (CSB) y Na⁺:Cl⁻ (CST) y de la subunidad α_1 de la Na⁺:K⁺-ATPasa.

Se estudiaron grupos de 10 ratas (5 V y 5 F) durante 1 a 5 días. En las ratas tratadas con furosemide la diuresis y la excreción urinaria de Na⁺, K⁺, y Cl⁻ aumentó, mientras que la osmolaridad urinaria disminuyó. La depuración de creatinina fue similar en ambos grupos. No se observaron diferencias en la expresión del RNA en la corteza, médula externa e interna de la Na⁺:K⁺-ATPasa entre las ratas tratadas con V y las tratadas con F. En contraste con lo observado en el RNA del cotransportador de Na⁺:K⁺:2Cl⁻ (CSB) y del cotransportador de Na⁺:Cl⁻ (CST) en la corteza en los primeros 5 días de tratamiento con furosemide en donde se observó una disminución en la expresión génica. En la médula externa e interna no hubo cambios en la expresión génica de CSB y CST en ningún día.

Estos datos los tomamos como preliminares y se estudió un segundo grupo de ratas de 1 a 7 días en donde se estudiaron 10 ratas (4 V y 6 F). En las mediciones fisiológicas se observó los mismos resultados que en los experimentos anteriores. En el análisis de las cortezas de cada rata en forma individual no se encontró diferencia en ninguno de los cotransportadores estudiados, a diferencia de lo que se observó en el experimento donde se trabajó con ratas agrupadas, el cual mostró una aparente disminución en la expresión génica de CST y CSB en corteza renal. Para corroborar los datos, se realizó el estudio con PCR semicompetitiva con iniciadores marcados con [³²P] dCTP para el cotransportador de CST. En este análisis no se observaron cambios en la expresión génica en las ratas tratadas con furosemide en comparación con las control.

La administración crónica de furosemide no afecta la expresión génica de los cotransportadores electroneutros de Na-(K)-Cl ni de la Na⁺:K⁺-ATPasa. El aumento en la capacidad de reabsorción del túbulo distal en este modelo puede ser secundario a un aumento en la expresión génica de otras isoformas de esta proteínas o inclusive de otras proteínas transportadoras o bien a cambios en la síntesis o función de los cotransportadores electroneutros.

INTRODUCCION

Una de las funciones más importantes y fundamentales del riñón es la excreción de sal y agua, lo que le permite mantener constantes la osmolaridad y la composición de los líquidos corporales a pesar de la gran variación en la ingesta de agua y solutos.

ESQUEMA GENERAL DE LA REABSORCION RENAL DE SODIO

El riñón es un órgano de vital importancia cuyo papel principal es el mantenimiento del volumen y la composición del líquido corporal (1). Esta función la realiza debido a la integración de: 1) el ultrafiltrado glomerular, un proceso pasivo que depende principalmente de la presión de perfusión renal, así como de la integridad del glomérulo, y 2) de la reabsorción tubular a lo largo de la nefrona, proceso activo, con gran consumo de energía y dependiente de los procesos de transporte epitelial que evita la pérdida de nutrientes como glucosa y aminoácidos. La eficiencia del epitelio tubular renal es de tal magnitud que reabsorbe en un día 178 litros de agua y 1.3 kg de NaCl.

De Wardener demostró en 1961 (2) que bajo condiciones fisiológicas la excreción urinaria de sodio no depende de la filtración glomerular, sino de la función del epitelio tubular renal. La investigación que se llevó a cabo en este campo en las siguientes décadas ha permitido saber que: 1) la reabsorción de sodio a lo largo de la nefrona depende de la operación simultánea de la $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPasa}$ en la membrana basolateral y de diversas proteínas acarreadoras de sodio en la membrana apical, y 2) en el túbulo proximal y en el asa de Henle esta reabsorción depende de la carga de sodio, mientras que en el túbulo colector depende de la necesidad de mantener el balance de sodio. Es decir, el ajuste fino de la natriuresis se define en los segmentos terminales de la nefrona (3,4).

A lo largo de la nefrona, la $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPasa}$ se localiza exclusivamente en la membrana basolateral, por lo que polariza a las células epiteliales en dos caras: apical o luminal y basolateral (5-7). Esta proteína es la encargada de sacar Na^+ de la célula, en

contra de su gradiente de concentración, mediante un mecanismo de transporte activo dependiente de trifosfato de adenosina (ATP), en el que salen tres iones Na^+ y entran dos de K^+ . La consecuencia de esta polarización es que el transporte de Na^+ y agua es vertical, desde la luz hacia el intersticio renal, con lo que la carga eléctrica negativa en el interior de la célula permanece constante, se mantiene la osmolaridad intracelular y aumenta la concentración de Na^+ en el espacio intersticial, lo que a su vez crea un gradiente osmótico que promueve la difusión de agua, por vía paracelular, desde la luz tubular hacia el espacio intersticial (6,7). El Na^+ entra a las células epiteliales por la membrana apical al seguir su gradiente de concentración; esto lo hace a través de un proceso de transporte activo secundario, en el que otros iones o moléculas son acoplados al Na^+ para transportarse en contra de su gradiente. Las proteínas de membrana que llevan a cabo este tipo de transporte se conocen como transportadores secundarios porque la energía requerida para el transporte no se obtiene por hidrólisis del ATP, sino a partir de la energía generada por el gradiente electroquímico del Na^+ (8).

La nefrona se divide en varias regiones, en las que la reabsorción de Na^+ es diferencial. Esta diferenciación esta dada por bases fisiológicas y por la acción de drogas de diversos tipos entre las que se encuentran los diuréticos.

Túbulo proximal

En el túbulo proximal se reabsorbe aproximadamente el 60% del ultrafiltrado glomerular y el 100% de la glucosa y aminoácidos. Esta intensa reabsorción se debe a la gran concentración de la $\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa en la membrana basolateral.

Túbulo proximal

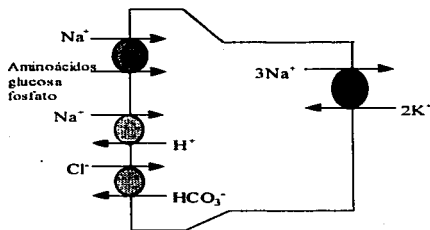


Figura 1. Mecanismo de transporte transepitelial de Na^+ en el túbulo proximal.

El transporte de Na^+ en el túbulo proximal se lleva a cabo en dos fases (9,10): En la primera se reabsorben los nutrientes esenciales como glucosa y aminoácidos debido a la presencia de cotransportadores de Na^+ -glucosa y de Na^+ -aminoácidos en la membrana apical de las células epiteliales de la porción apical del túbulo. La segunda

fase consiste en el transporte de NaCl que se lleva a cabo por la operación simultánea de los contratransportadores de Na^+ : H^+ , y de Cl^- : HCO_3^- (11-14)(figura 2). El contratransportador de Na^+ : H^+ , no sólo interviene en la reabsorción renal de Na^+ , sino también en procesos de regulación del volumen celular y del metabolismo ácido-base. Este tipo de transporte es sensible a drogas que inhiben la acción de la anhidrasa carbónica incrementando la acidez del fluido tubular en esta zona. En el túbulo proximal los factores físicos peritubulares juegan un papel preponderante en la regulación de la reabsorción del ultrafiltrado glomerular (balance glomerulotubular). A mayor filtración glomerular mayor será la presión intratubular y menor la capilar postglomerular, por lo que se incrementa la fuerza de reabsorción. En cambio, a menor filtración glomerular, menor será la presión intratubular y mayor la capilar postglomerular, lo que disminuye el gradiente de reabsorción (15-17).

Asa de Henle

Se ubica a continuación del túbulo proximal, en la zona marcada por la unión entre las regiones externa e interna de la médula externa. Se divide en dos partes: descendente y ascendente, esta última subdividida en porción gruesa y delgada. Es en el asa ascendente donde se reabsorbe el 20% del filtrado glomerular.

La porción descendente es altamente permeable al agua debido a la presencia de canales de agua localizados en la membrana apical, conocidos como acuaporina-1 (AQP-1) (18). Sin embargo, la actividad de la $\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa es muy baja, por lo que casi no hay reabsorción activa de solutos. Por lo tanto, la alta osmolaridad del intersticio renal, mantenida por el mecanismo de contracorriente, promueve la reabsorción de agua (1).

El asa ascendente de Henle es el sitio donde se diluye la orina. En la membrana basolateral, la concentración de $\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa es muy elevada mientras que la membrana apical es impermeable al agua, de modo que se reabsorbe Na^+ pero no agua (19). Las consecuencias del intenso transporte de Na^+ sin reabsorción de agua son, dilución del líquido tubular (lo que promueve la diuresis de agua) y acumulación de NaCl en el intersticio de la médula renal (lo que mantiene alta la osmolaridad y el mecanismo de contracorriente).

La proteína responsable del transporte de Na^+ en la membrana apical de la porción gruesa ascendente del asa de Henle es el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ (17) (figura 2). Como se trata de un acarreador de membrana, el transporte de Cl^- en la membrana apical depende del gradiente para reabsorción del Na^+ (20,21). En este cotransporte $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$, un Na^+ (a favor de su gradiente), un K^+ (en contra de su gradiente) y dos Cl^- (en contra de su gradiente) se transportan hacia el interior de la célula.

El Na^+ abandona la célula en la cara basolateral a través de la $\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa, el K^+ se recicla hacia el interior del túbulo por canales conductivos y los iones Cl^- salen de la célula en la cara basolateral mediante canales de Cl^- o por transporte activo secundario unido al K^+ (22-24).

La función del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ hace al epitelio del asa ascendente de Henle termodinámicamente más eficiente porque permite aumentar la reabsorción de Na^+ , sin que esto represente mayor gasto de energía. La salida de Cl^- por la membrana basolateral, junto con el

reciclaje del K^+ hacia la luz tubular, genera voltaje positivo en el interior de la luz tubular, lo que permite el transporte de otro ion Na^+ por vía paracelular. La reabsorción de este segundo Na^+ no consume energía porque no requiere de la $\text{Na}^+:\text{K}^+ \text{-ATPasa}$. Así, en el asa de Henle, la relación entre moles de Na^+ reabsorbidos por mol de O_2 consumido puede cambiar de 17:1 en ausencia del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ (25,26), a una relación cercana a 36:1 en su presencia; es decir, el doble de reabsorción, con el mismo gasto de energía (27).

El cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ es sensible a diuréticos de asa, como son los derivados del ácido sulfamoibenzoico tales como furosemide y bumetanida (20,28). Por su sensibilidad específica a la bumetanida llamamos al cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ CSB (cotransportador sensible a bumetanida). El CSB posee 4 distintos sitios de unión para iones. Tres de los sitios son ocupados exclusivamente por un ion Na^+ , K^+ , y un Cl^- , mientras que el sitio para el segundo Cl^- puede ser ocupado por el Cl^- o por el diurético en forma competitiva al unirse el diurético en lugar del segundo Cl^- es que se da la inhibición de este cotransportador (29), sin embargo en un trabajo reciente Forbush et al (30)

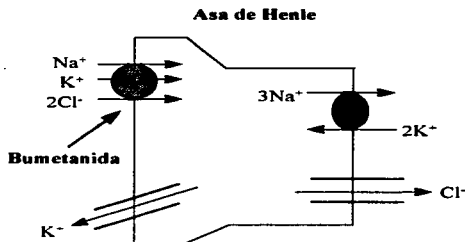


Figura 2. Mecanismo de transporte transepitelial de Na^+ en el asa ascendente de Henle.

encontraron que la afinidad para los aniones se encuentra entre los segmentos transmembrana 4-7, mientras que el sitio de unión a la bumetanida está más allá del dominio transmembrana 7 siendo esto contrario a las observaciones anteriores por lo que hay que corroborar este hallazgo.

Túbulo distal

En el túbulo distal se reabsorbe el 5% del filtrado glomerular y la reabsorción depende del flujo. El aumento del flujo al túbulo distal durante la terapia con diuréticos, así como la exposición a dietas altas en sodio se acompaña de aumento en la reabsorción de Na^+ y Cl^- , con hipertrofia tubular y aumento de la $\text{Na}^+:\text{K}^+-\text{ATPasa}$ (31-34).

El transporte de Na^+ en la membrana apical se lleva a cabo por dos mecanismos: 1) cotransporte electroneutro de NaCl y 2) transporte electrogénico de Na^+ (31,35) (Figura 3).

El primero se llevó a cabo en la región inicial del túbulo distal, donde el Cl^- es transportado hacia el interior de la célula en contra de su gradiente, y el segundo en la porción final del túbulo distal gracias a canales de sodio, sensibles a amilorida (35).

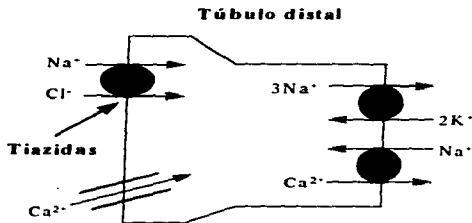


Figura 3. Mecanismo de transporte transepitelial de Na^+ en el túbulo distal

El Na^+ que ingresa a la célula por ambos mecanismos, se intercambia en la cara basolateral por K^+ via $\text{Na}^+:\text{K}^+-\text{ATPasa}$. El K^+ que entra por la cara basolateral es secretado hacia la luz tubular por canales conductivos, de

modo que la secreción de potasio depende tanto de la función de la bomba de Na^+ y K^+ , como del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$.

La proteína responsable del transporte de Na^+ en la membrana apical del túbulo distal es el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ (36,37), por ser este cotransportador el receptor para los diuréticos benzotiadiazinas (tiazidas) (38) lo llamaremos a partir de este momento CST (cotransportador sensible a tiazidas). Este cotransportador es inhibido por la acción directa de una gran variedad de diuréticos tipo tiazidas. Los diuréticos de asa no inhiben a este transportador. Al igual que los diuréticos de asa, los diuréticos tiazídicos son aniones orgánicos que parecen unirse en forma competitiva al sitio del anión en el cotransportador. Evidencias de este modelo incluyen la observación de que el Cl^- compite con la [^3H]metolazona por unión a receptores de alta afinidad en riñón de rata (39) y de conejo (40).

Túbulo colector

Se divide en tres porciones: túbulo colector cortical (TCC), túbulo colector medular externo (TCME) y túbulo cortical medular interno (TCMI), variando en cada una el mecanismo de transporte de Na^+ (figura 4).

En el TCC la reabsorción se realiza a través de canales de Na^+ , sensibles a amilorida (41). Esta droga es un compuesto catiónico que penetra al canal por la cara apical, bloqueando el transporte.

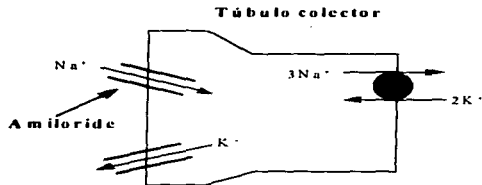


Figura 4. Mecanismo de transporte transepitelial de Na^+ en el túbulo colector.

El transporte activo de Na^+ , K^+ y Cl^- prácticamente desaparece en el TCME, debido a que el voltaje se vuelve positivo (42,43), dando como resultado que la reabsorción de Na^+ en esta zona se realice sólo por vía

paracelular. Algunos autores han sugerido la operación del CST en esta región (44,45), pero la presencia de esta proteína no ha podido corroborarse (46,47).

En el TCMI el transporte de Na^+ en la cara apical se lleva a cabo principalmente por los canales de Na^+ sensibles a amilorida en la membrana apical y por la $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{ATPasa}$ (41) en la membrana basolateral. En el TCMI realmente se modula la diuresis final (4). Es en esta región de la nefrona en donde se puede o no retener cierta cantidad de Na^+ y agua, y con esto se determina el volumen final de orina (4).

LA FAMILIA DE COTRANSPORTADORES ELECTRONEUTROS DE $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{Cl}^-$.

Los cotransportadores de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{Cl}^-$ son proteínas de membrana que se conocen como cotransportadores electroneutros porque cada catión que acarrear de un lado a otro de la membrana celular va acompañado de un anión, sin producir cambios en el potencial transmembranal (8). Su función en la membrana apical es la reabsorción de NaCl . En la membrana basolateral proveen a la célula con los electrólitos necesarios para mantener una secreción constante de sal. Además también se expresan en una gran variedad de células no epiteliales en donde su función es el mantenimiento y regulación del volumen celular.

Los dos tipos de cotransporte electroneutro de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{Cl}^-$ que se expresan en el riñón de mamífero, el CSB y el CST, funcionan como los receptores para los diuréticos más usados en el mundo (48). La función del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ es inhibida por la furosemida y la bumetanida (diuréticos de asa) (28) (tabla 1) y la función del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ es inhibida por los diuréticos derivados de las tiazidas (36)(figura 5). La clasificación de estos diuréticos esta dada en función del sitio de la nefrona donde llevan a cabo su acción inhibitoria, por el tipo de proteína que inhiben, así como por su capacidad a incrementar la excreción renal de sodio (Tabla 1), por lo que es necesario revisar el tipo de transporte de Na^+ y acción de los diuréticos a lo largo de la nefrona.

Los diuréticos se utilizan para producir natriuresis y diuresis, es decir, aumentar la excreción urinaria de sodio y agua, como sería el caso de la hipertensión arterial sistémica, la insuficiencia cardíaca congénita, el síndrome nefrótico, la insuficiencia renal crónica y el manejo de la retención de sodio asociada a las enfermedades crónicas del hígado, entre otras. Los diuréticos se dividen en lumbales y basolaterales (49). Los lumbales son los que actúan en el lado apical del epitelio, por lo que para ejercer su acción tienen que llegar a la luz tubular, ya sea por filtración glomerular o por secreción tubular. En este grupo están incluidos los agentes osmóticos (manitol), los diuréticos de asa (furosemide y bumetanida), los diuréticos tipo tiazidas y la amiloride. Los basolaterales ejercen su acción en la cara basolateral y no dependen de la filtración glomerular o de la secreción tubular, (la espironolactona). Los diuréticos lumbales aumentan la excreción urinaria de Na^+ al inhibir la función de las proteínas de membrana que transportan Na^+ de la luz tubular hacia el intersticio renal.

Tabla 1. CLASIFICACION FISIOLÓGICA DE LOS DIURETICOS LUMINALES

DIURETICO	SITIO DE ACCION	RECEPTOR
Diuréticos de asa		
Furosemide	Asa ascendente de Henle	$\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$
Bumetanida	Asa ascendente de Henle	$\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$
Diuréticos tipo tiazidas		
Hidroclorotiazida	Túbulo distal	$\text{Na}^+:\text{Cl}^-$
Clortalidona	Túbulo distal	$\text{Na}^+:\text{Cl}^-$
Diuréticos ahorradores de potasio		
Amiloride	Túbulo colector	Canal de Na^+
Triamtereno	Túbulo colector	Canal de Na^+

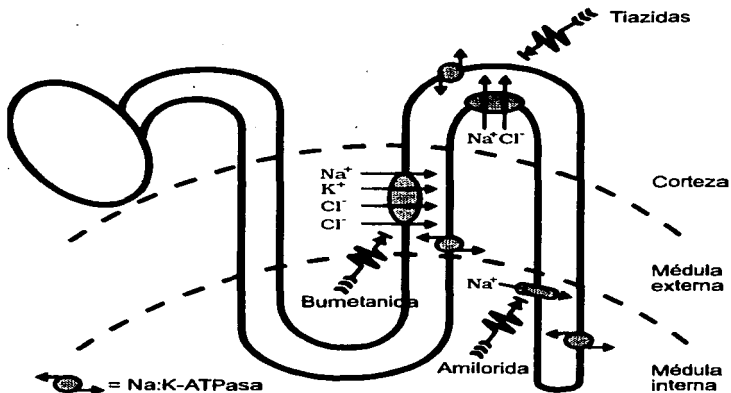


Figura 5. Vías de administración de NaCl en los diferentes segmentos de la nefrona distal.

Características y regulación del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ (CSB)

El cotransporte de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ (CSB) es una proteína electroneutra que en todas las células estudiadas ha mostrado una estequiometría de 1Na^+ , 1K^+ , 2Cl^- , excepto en el axón gigante del calamar en donde la estequiometría del cotransporte es $2\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{Cl}^-$ (50).

El CSB es el responsable de la intensa reabsorción de Na^+ y de la dilución de la orina en el asa ascendente de Henle. Este cotransportador es sensible a los diuréticos de asa, hace drogas con la mayor potencia natriúrica.

La existencia de este cotransportador en el asa de Henle fue demostrada por Greger y Schlatter (24,51-53). El modelo utilizado fue el de perfusión de túbulo aislado (asa de Henle) de conejo en el cual se estudió la diferencia de potencial eléctrico transepitelial y la corriente de corto circuito. Se demostró que en el asa de Henle existe un potencial eléctrico positivo en la luz del túbulo asociado a la reabsorción del NaCl, y que ambos son dependientes de la concentración de Na⁺ intraluminal y sensibles a furosemide y a ouabaina.

El transporte transepitelial de iones es dependiente de la concentración de potasio, el cual además se recicla hacia la luz tubular a través de canales conductivos. El reciclaje de K⁺ entre la célula y la luz tubular, se realiza a través de canales conductivos y el Cl⁻ abandona la célula en la membrana basolateral a través de canales conductivos y quizá también en cotransporte con el K⁺.

En 1983, Forbush III y Palfrey (54) sintetizaron [³H]bumetanida y demostraron que esta se une a las membranas con un componente saturable que se presenta al aumentar la concentración. Además, observaron que la fracción de membrana en la que se fijó la [³H]bumetanida carecía de ATPasa y era rica en fosfatasa alcalina, lo que indicó que se trataba de la membrana apical; que la [³H]bumetanida compite con la furosemida por el sitio de unión y que esta unión requiere de la presencia de Na⁺, K⁺ y Cl⁻; la ausencia de cualquiera de estos electrolitos en el medio inhibe por completo la unión de la [³H]bumetanida con las membranas.

Al exponer las membranas a la luz ultravioleta, en presencia de [³H]BSTBA (4-benzoil-5-sulfamoil-3-(3-teniloxi)benzoico) un análogo de la bumetanida y analizarlas mediante electroforesis en gel de acrilamida se observó que la [³H]BSTBA se incorporó en dos diferentes sitios: uno de ~150kDa y otro de ~50-60 kDa. Únicamente la incorporación al de ~150kDa (tamaño ~ del CSB) desapareció al agregar 10µM de bumetanida no radiactiva (55).

Por hibridación *in situ* se demostró que el transcrito CSBr1 se expresa en riñón únicamente y en particular en médula externa y se extiende dentro de la corteza a lo largo de los rayos medulo-corticales (56).

Los anticuerpos generados contra una de estas proteínas cotransportadoras de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ tipo CSBr1 mostraron que este transportador se localiza en la cara apical de las células epiteliales de la porción gruesa del asa ascendente de Henle de la médula así como en la corteza (56).

Actualmente se sabe que en la membrana apical de las células epiteliales del asa ascendente de Henle existen dos diferentes cotransportadores sensibles a diuréticos de asa: un cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ y otro de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$. El primero corresponde a una proteína de ~75 kDa que actúa durante normosmolaridad, mientras que el segundo corresponde a una proteína de ~150 kDa que se activa en presencia de alta osmolaridad o de hormona antidiurética. Estas dos diferentes proteínas se activan o desactivan mediante fosforilación/desfosforilación (27).

El CSB es sensible a diversos estímulos, uno de los cuales es la disminución en el volumen celular usualmente inducida por hipertonicidad, fenómeno conocido como "aumento regulador del volumen celular" o ARVC (este fenómeno junto con la disminución reguladora del volumen celular o DRVC son procesos mediante el cual muchas células animales como por ejemplo las células del epitelio renal controlan su volumen celular al hincharse o contraerse en un medio anisotónico) (57). En el asa ascendente de Henle, la vasopresina y el AMPc al parecer estimulan al CSB (22,25,26,58), además de ser estimulado por el factor natriurético auricular (FNA) (59).

Por el contrario, cuando las células aumentan de volumen se activan los mecanismos necesarios para impedir la entrada de sodio (DRVC) (60,61). Durante este fenómeno se inhibe la función del cotransportador en los ovocitos de *Xenopus laevis* (28,62,63).

Características y regulación del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ (CST)

El cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ sensible a tiazidas es una proteína electroneutra con una estequiometría de 1Na^+ y 1Cl^- , con una distribución limitada. En el mamífero el único sitio en donde se ha demostrado claramente la existencia del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ sensible a tiazidas (CST) es en la nefrona distal (64).

Costanzo (65) y Ellison et al (37) mostraron que la reabsorción sensible a tiazidas se localiza en la región proximal del túbulo distal, mientras que la sensible amilorida predomina en la región distal del mismo túbulo. En experimentos de microperfusión *in vivo* en ratas Sprague-Dawley, Velázquez et al (38) demostraron que el transporte de Na^+ y Cl^- en el túbulo es interdependiente y el estudio cinético mostró una K_m de 9 mM para el Na^+ y 12 mM para el Cl^- . Además, la concentración de K^+ no afecta el transporte de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$. Estudios preliminares en nuestro laboratorio han mostrado que el CST expresado en ovocitos tiene constantes de afinidad similares a las reportadas por Velázquez, (Poch E, et al artículo en preparación). Por otro lado, el grupo de Imai en Japón (66,67) al estudiar la nefrona distal del conejo con microperfusión *in vitro* demostraron la existencia de varios sistemas de transporte: (i) canales de Na^+ ; (ii) contra-transporte simultáneo de $\text{Na}^+:\text{H}^+$ y $\text{Cl}^-:\text{HCO}_3^-$ y (iii) cotransporte de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$.

Terada y Knepper (44) observaron que en ratas Sprague-Dawley tratadas con desoxicorticoesterona (DOCA) el 50% del transporte transepitelial de NaCl en el TCC es inhibido por 100 μM de hidrocortizida, sin efecto detectable en el voltaje, lo que sugiere que se trata del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ electroneuro. Sin embargo, Kaplan et al (46) con anticuerpos dirigidos contra CST demostraron que, al menos en condiciones normales CST se expresa exclusivamente en el túbulo distal.

Una característica fundamental del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ es la posibilidad de inhibirlo con diuréticos tipo tiazídicos. La primera demostración clara del sitio de acción de las tiazidas fue hecha por Kunau et al (68) al estudiar ratas mediante micropunción y observar disminución en la reabsorción de Cl^- en el túbulo distal al administrarle al animal

clorotiazida. Tran et al (39) estudiaron el efecto de varios iones en la unión de [^3H]metolazona a membranas de corteza renal y demostraron que el Na^+ estimula la unión, con un Km de $\sim 10\text{mM}$. En cambio, el Cl^- se comporta como inhibidor de la unión de [^3H]metolazona. El coeficiente de Hill entre la metolazona y el Na^+ fue de 1 a 1, lo que indica que la interacción del Na^+ y la metolazona tiene estequiometría de 1:1.

Biología molecular de los cotransportadores de Na:(K):Cl.

Los cotransportadores electroneutros pertenecen a la misma superfamilia de proteínas. A partir del cDNA del CST del lenguado de invierno clonada por Gamba et al (69), y del CSB de la glándula rectal del tiburón clonado por Xu J-C et al (70) se han identificado molecularmente cinco diferentes genes en diversas especies que codifican para miembros de la familia de cotransportadores electroneutro (figura7).

Hasta el momento se han identificado isoformas de: 1) cotransportador apical de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ (CSB1) (63); 2) cotransportador basolateral de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ (CSB2) (71); 3) cotransportador apical de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ (CST1) (72) y 4,5) 2 genes que codifican para el cotransportador basolateral de $\text{K}^+:\text{Cl}^-$ (73,74). Existen evidencias funcionales y estructurales sobre la existencia de un sexto gen, el cotransportador basolateral de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$, sin embargo, hasta el momento no se ha identificado una clona completa.

Estos cotransportadores electroneutros de Na-(K)-Cl establecen una nueva familia de proteínas transportadoras de membrana que presentan gran similitud en cuanto a su secuencia de aminoácidos y topología, pero con una gran diferencia en el número y tipo de iones que transportan y sensibilidad a inhibidores (tabla 1).

Basandose en el análisis de hidrofobisidad se ha derivado la posible topología básica de estos cotransportadores (fig 6) (75,76) el cual muestra que comparten el siguiente patrón estructural: las proteínas se pueden dividir en tres partes. Una región central hidrofóbica de ~ 250 residuos de aminoácidos que contiene 12 α hélices que corresponden probablemente a segmentos transmembrana. En la región central existe una asa hidrofílica glucosilada, de localización extracelular. Esta región esta flanqueada por

dos dominios hidrofílicos: el amino terminal, relativamente corto de ~ 150 aa, con la mayor diversidad y el carboxi terminal, largo de ~ 370 aa, con múltiples sitios potenciales para fosforilación vía proteína cinasa C (PKC) y proteína cinasa A (PKA).

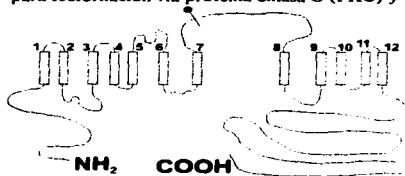


Figura 6. Topología básica de los cotransportadores electroneutros de Na-(K)-Cl

Una de las diferencias encontradas entre el patrón de hidrofobicidad de estas proteínas es el número de sitios potenciales (teóricos) para glucosilación (56). El CSTfl presenta tres sitios potenciales localizados entre los segmentos M7 y M8 y otros dos en M6 y M10. El

CSTr únicamente presenta dos de los tres sitios en los segmentos M7 y M8, mientras que el CSBr sólo presenta uno de ellos, el cual está conservado en los tres cotransportadores.

Una característica en esta familia es que se han identificado isoformas en cada gen, resultado de empalme alternativo que producen proteínas más pequeñas por faltar un fragmento, ya sea del extremo amino o del carboxi terminal. La comparación de las secuencias completas de estas proteínas cotransportadoras electroneutras es de entre el 45 y 50% de identidad.

Arbol filogenético actual

La figura 7 muestra un árbol filogenético que describe la similitud de los cotransportadores de Na-(K)-Cl en distintos subgrupos de vertebrados e invertebrados.

En base a dicha similitud la familia se divide en 4 grupos. El grupo **CST apical** está formado por el cotransportador apical de Na⁺Cl⁻ sensible a tiazidas (CST) que se ha clonado de teleosteos (72), rata (56) y humano (47), con una similitud de aminoácidos del 70%. En el segundo grupo que corresponde al del **CSB apical** se han identificado el cDNA clonado del riñón de rata (56), de ratón (77), de conejo (78) y humano (79) con una similitud de más del 95%. En el grupo de **CSB basolateral** se han clonado las

isoformas de la glándula rectal del tiburón (70), de las células de IMCD-3 del ratón (80), y de las células T84 de colon humano (81) con una similitud del 82%. Finalmente se han identificado 2 genes del cotransportador $K^+:Cl^-$, del conejo, dos isoformas de la rata, y del humano (73,74) con una similitud del 68%.

Esta alta similitud se mantiene al comparar a los grupos entre sí: CST apical vs CSB apical (46-52%); CST apical vs CSB basolateral (47-50%); CSB apical vs CSB basolateral (59-61%), a pesar de que en los grupos existen clonas tanto de peces como de mamíferos.

Al comparar a los miembros vertebrados de la familia de los cotransportadores electroneutros de $Na^+-(K^+)Cl^-$ que se muestra en la figura 7, se observa que es mayor la similitud que presenta una proteína con la misma función en diferentes organismos a pesar de estar distantes filogenéticamente (CSTr y CSTñ), que dos proteínas con diferente función en el mismo organismo (CSBrI y CSTrI). Por ejemplo, el CST de la rata tiene una similitud de 61.5% con el del lenguado, mientras que al comparar el CST con el CSB, ambos de la rata, el porcentaje de similitud es sólo del 45.9%.

Este hecho pone de manifiesto la importancia que tiene la relación estructura-función, ya que para llevar a cabo una misma función, la estructura de las proteínas deben contener un cierto grado de conservación. Al comparar a los cotransportadores con afinidad al Na^+ (CST y CSB apicales y CSB basolateral) con los que no la presentan ($K^+:Cl^-$), podemos observar que hay una mayor homología entre los cotransportadores con afinidad al Na^+ , incluyendo a proteínas de invertebrados como la proteína del túbulo de Malpígio de *Manduca sexta* (un insecto), la cual tiene una homología del 37.6 %, con respecto al CSB apical, que con los que no tienen afinidad a dicho catión.

Esto se observa también al comparar al cotransportador de $K^+:Cl^-$ con respecto a una proteína hipotética de *Caenorhabditis elegans* (un nemátodo) los cuales tienen, entre sí, una similitud del 40%, mientras que la homología que existe entre los transportadores con afinidad al Na^+ y los que no la tienen es apenas del 20 %. Todos estos hallazgos nos

sugieren que durante la evolución de dichas proteínas hubo una divergencia en su ancestro común, dando lugar a dos grupos de proteínas: los transportadores con afinidad al Na^+ y los transportadores que no tienen afinidad a este catión.

Con todo lo anterior, no podemos dejar de notar, que aún con esta diferencia, sigue existiendo un alto porcentaje de homología entre todas estas proteínas a lo largo de la escala evolutiva, lo cual indica que estas proteínas provienen de un ancestro común que ya se expresaba en los eucariotas primitivos y son de vital importancia para el buen funcionamiento del organismo, ya que se ha comprobado que mutaciones puntuales en alguno de los transportadores de $\text{Na}^+-(\text{K}^+)-\text{Cl}^-$ causa serias enfermedades que pueden llegar a ser mortales (79,82).

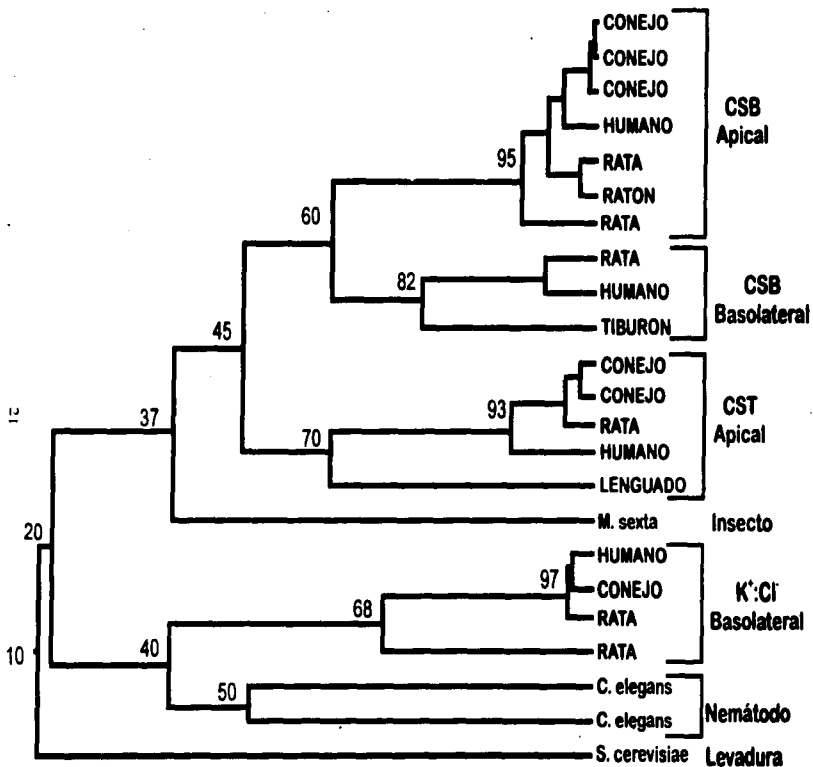


Figura 7. Arbol filogenético de la familia de cotransportadores electroneutros de Na^+ -(K^+)- Cl^- basado en la secuencia de aminoácidos.

Diversidad molecular de los cotransportadores de Na⁺-(K⁺)-Cl⁻

La diversidad molecular de los cotransportadores de Na⁺-(K⁺)-Cl⁻ en mamíferos se incrementa aún más en cada gen debido al empalme alternativo de exones. Payne y Forbush (78) reportaron variaciones de empalme en el cotransportador Na⁺:K⁺:2Cl⁻ del riñón de conejo, donde encontraron un exón variable con 3 cassettes mutuamente excluyentes (NKCC2A, NKCC2B, NKCC2F) (Fig. 7).

Como ya se mencionó, el CSB es una proteína compuesta de una región central con 12 segmentos transmembranales flanqueados por dos regiones hidrofílicas probablemente intracelulares. La región amino terminal es corta y la carboxi terminal puede variar de tamaño. En estudios realizados en nuestro laboratorio se ha encontrado que el gen del CSB de ratón da origen al menos a seis isoformas por empalme alternativo de exones. Las seis isoformas son el resultado de dos mecanismos de splicing (83). Uno de estos mecanismos, descritos por Payne y Forbush (78) da origen a los exones A, B y F que son mutuamente excluyentes. El segundo mecanismo da origen a dos isoformas que resultan de tener el extremo carboxi terminal completo, denominadas como C9 o bien el extremo carboxi truncado con una región diferente de 55 aminoácidos, llamada C4. De este modo, el gen del CSB de ratón da lugar a las isoformas C9 o C4 que a su vez pueden ser isoformas A, B o F. Cabe hacer notar que existen diferencias en sitios de fosforilación entre las isoformas C9 y C4 (83).

Los cotransportadores apical (CSB1) y basolateral (CSB2) provienen de dos diferentes genes. Una evidencia clara de esto es que los genes CSB1 y CSB2 del ratón están localizados en diferentes cromosomas (2 y 18 respectivamente) (80).

En cuanto al CST, Ellison recientemente reportó una variación de empalme en el cotransportador sensible a tiazidas del ratón incluida en una delección dentro del marco de lectura de 105 pb, localizados en el cuarto segmento transmembrana (84), mientras que Gamba y cols (56) reportaron el hallazgo de 2 clonas completas de CSTr1 pero de

diferente tamaño (CSTr1a de ~ 4.4kb y CSTr1b ~ 3.3kb) difiriendo sólo por la región truncada 3' no transcrita de 231pb.

Clonación de los cotransportadores de Na⁺:K⁺:Cl⁻

El cotransportador de Na⁺:Cl⁻ sensible a tiazidas es una proteína con una distribución limitada. En el mamífero el único sitio en donde se ha demostrado su existencia es en la nefrona distal, lo que ha dificultado su estudio. Sin embargo, en 1984 se descubrió este sistema en la vejiga urinaria del lenguado de invierno (*Pseudopleuronectes americanus*). El lenguado es un pez que habita en las aguas de la zona norte del océano Atlántico. Este es el único tejido con expresión extrarrenal en el que está comprobada claramente la existencia de este cotransportador (69).

El primer cotransportador electroneutro identificado desde el punto de vista molecular fue el de Na⁺:Cl⁻ sensible a tiazidas de la vejiga urinaria del lenguado de invierno (69). El cDNA que codifica para esta proteína se obtuvo a través de la estrategia de clonación por expresión funcional en ovocitos de *Xenopus laevis* mediante la cual se obtuvo un cDNA de 3.7 kb que corresponde al cotransportador electroneutro de Na⁺:Cl⁻ sensible a tiazidas (CSTII) (72).

Las características cinéticas y farmacológicas del cotransportador clonado son consistentes con las propiedades del cotransportador Na⁺:Cl⁻ sensible a tiazidas nativo en la vejiga urinaria de teleosteos y el epitelio del túbulo distal del riñón de mamíferos. El cDNA del lenguado tiene un marco de lectura de 3069 pb que codifica para una proteína de 1023 residuos de aminoácidos con un peso molecular calculado de 112 kDa (69).

La vejiga urinaria del lenguado es anatómica y funcionalmente semejante al riñón, ya que en los teleosteos embriológicamente proviene del mesonefros renal, por lo que corresponde al túbulo distal del mamífero (85-91). Estas similitudes tanto funcionales como farmacológicas de los procesos de reabsorción de NaCl en el túbulo distal de rata y de la vejiga urinaria del lenguado sugirieron que el transporte que se expresa en estos epitelios son similares (36-38,92).

Clonación de los cotransportadores de $\text{Na}^+:(\text{K})^+:\text{Cl}^-$ miembros de mamíferos.

Gamba et al obtuvieron a partir del mRNA de la vejiga urinaria del lenguado de invierno un cDNA de 3.7kb que codifica para el cotransportador $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ (CSTfl) (72). El cDNA obtenido del lenguado de invierno fue utilizado como sonda homologa para clonar el cDNA del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ del riñón de rata (CSTr). El cDNA que codifica para CSTr tiene ~ 4.4 kb, con un marco de lectura de 3006 pb, que codifica para una proteína que comprende 1002 residuos de aminoácidos, con un peso molecular de 110 kDa (56). Anticuerpos contra la proteína de fusión generada con esta clona demostraron que CSTr se localiza en la membrana apical del túbulo distal del riñón (46).

Mediante northern blot, el mRNA del CSTr se ha localizado exclusivamente en el riñón, por lo que se cree que es exclusivo de este órgano. Sin embargo, Drewnowska K et al (93), Clader J A, et al (94), y Cremaschi D et al (95) han demostrado evidencias funcionales de un transportador de Na^+ sensible a tiazidas en corazón de rata, músculo liso vascular de humano y vesícula biliar, respectivamente. Además, recientemente, Ellison et al (96), y Friedman et al (97), mostraron datos preliminares que sugieren la existencia de mRNA en las células β del páncreas y en osteoblastos, respectivamente. Esto trabajos sugieren fuertemente la posibilidad de un gen que codifique para el CST basolateral. Mas aun, Gamba et al (69) mostraron que varios tejidos extrarrenales del lenguado, algunos no epiteliales, expresan mRNA del CST. Mediante análisis de northern blot en condiciones de alta estringencia y usando una sonda completa para examinar la distribución del mRNA del CST en otros órganos, se observaron dos bandas de hibridación: una banda de ~ 3.7 kb correspondiente al cDNA del CSTfl, se encontró exclusivamente en la vejiga urinaria y una segunda banda más pequeña (~ 3.0 kb) se encontró en intestino (distal > medio > proximal), ovario, músculo esquelético, ojo, cerebro y riñón. El nivel más alto de expresión del producto génico de 3.0 kb fue en ovario. La función del producto génico más pequeño de CSTfl se desconoce hasta hoy (69).

El patrón de distribución del mRNA de CSTR en el riñón de rata fue consistente con la expresión en el túbulo contorneado distal (46), y usando anticuerpos policlonales CST apical-específicos mostraron que el cotransportador está presente exclusivamente en la membrana apical de este segmento de la nefrona. Así, el mRNA del cotransportador $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ tipo CSTR1 y la localización de la proteína combinada con los datos funcionales en ovocitos de *X. laevis*, indican que el gen CSTR1 codifica para el cotransportador $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ apical del túbulo contorneado distal.

Los cotransportadores electroneutros de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ y $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ pertenecen a la misma familia de proteínas. Gamba y colaboradores, utilizaron el cDNA del lenguado como sonda para clonar el cDNA que codifica para el CSB del riñón de la rata, un cDNA de ~ 4.7kb que corresponde al cotransportador apical de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ sensible a bumetanida (CSBr1) de rata (56) y de ratón (CSBm2) (98) en la médula externa del riñón. Posteriormente, con iniciadores degenerados, para las regiones de alta homología entre CSTR1, CSTR1, y el CSBr1 mediante PCR se amplificó un fragmento de cDNA de las células del túbulo colector medular interno del ratón. Este cDNA fue utilizado para aislar el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ basolateral del ratón (CSBm2) (80). El cDNA de ~4.7 Kb corresponde al CSB de la rata, tiene 3285 pb en el marco de lectura, y codifica para una proteína de 1095 residuos de aminoácidos, con un peso molecular de 120 kDa, localizada en la membrana apical del riñón de rata (99).

Por otro lado, Forbush y colaboradores (70), emplearon una estrategia en la cual aislaron y purificaron una proteína de 195 kDa sensible a bumetanida del epitelio secretor de Cl^- de la glándula rectal del tiburón *Squalus acanthias*. De este modo lograron aislar un cDNA de 4.8 kb (CSB2) (70) que codifica para el cotransportador basolateral de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{Cl}^-$ de la glándula rectal del tiburón. Este cDNA de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ (CSB2) lo usaron para clonar por homología el cDNA del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{Cl}^-$ de la corteza y de la médula renal del conejo (NKCC1) (78), y del riñón de ratón (77).

RESISTENCIA A DIURETICOS.

El tratamiento crónico con diuréticos de asa se asocia con una disminución paulatina de la eficiencia del tratamiento (35). La administración crónica de diuréticos de asa (furosemide) aumenta la capacidad de reabsorción de la nefrona distal, lo que disminuye la respuesta natriurética (100). La base fisiológica de esta resistencia son los cambios que sufre la nefrona distal ante el aumento de la carga de NaCl (101) que llega al túbulo distal como resultado del bloqueo en la reabsorción de sodio en el asa de Henle por el furosemide.

Se ha demostrado que el furosemide (32,102) y el aumento de Na⁺ en la dieta (33) incrementan la carga de NaCl a la nefrona distal e inducen hipertrofia e hiperplasia del túbulo distal, con proliferación de la membrana basolateral (103), aumento en el volumen de las mitocondrias (103), de la actividad de la Na⁺:K⁺-ATPasa basolateral (32,104) y del número de receptores para tiazida en la membrana apical (105), lo que incrementa la capacidad de reabsorción de Na⁺ (33,106). Ellison et al (107) observaron que la reabsorción de Na⁺ y Cl⁻ sensible a clorotiazida aumentó significativamente en ratas tratadas con dieta alta en sodio o con furosemide. Esto sugiere que el aumento en el flujo en el túbulo distal se acompaña de aumento en la capacidad de reabsorción via el cotransportador Na⁺:Cl⁻.

Chen et al (105), al estudiar el efecto de diferentes concentraciones de sodio en la dieta y el efecto de la administración de furosemide, acetazolamida o tiazidas, en la capacidad de unión de la [³H]metolazona a las membranas de corteza de ratas Sprague-Dawley, demostraron que el tratamiento agudo o crónico con furosemide o tiazidas aumenta la capacidad de unión de la [³H]metolazona. En cambio, la capacidad de unión no se vio afectada por variaciones en el contenido de sodio en la dieta. El aumento en la capacidad de unión fue secundario a aumento en el número de transportadores y no por aumento en la afinidad por metolazona, ya que lo que se modificó fue la V_{max} y no la Km.

El furosemide, la acetazolamida y el aumento en la concentración de Na^+ en la dieta incrementan la carga de NaCl al túbulo distal. Sin embargo, únicamente el furosemide aumentó la capacidad de unión de las membranas de corteza renal a la [^3H]metolazona. Esto sugiere que es el aumento en la carga de Cl^- y no de Na^+ el estímulo que aumenta la cantidad de receptores para tiazidas.

Stanton et al (34) demostraron en ratas adrenalectomizadas tratadas con furosemide, a las cuales se les suministro una concentración constante de aldosterona, que el incremento en la reabsorción de Na^+ en el túbulo distal no se debía al efecto creciente de la aldosterona sino al del furosemide.

La reciente clonación de miembros de la familia de cotransportadores electroneutros provee de herramientas para el estudio de la expresión génica de estas proteínas. En el presente trabajo nos propusimos estudiar el efecto de la administración crónica del furosemide sobre la expresión génica de CST, CSB, y $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPasa}$. Además junto con otros trabajos, al final obtener suficientes datos como para conocer un poco más de la fisiología renal en cuanto a la regulación del sodio, y de dar pie para entender el mecanismo de algunas enfermedades en donde esta involucrada la regulación del sodio a través de estos cotransportadores.

OBJETIVO

El objetivo general del presente estudio es conocer el efecto de la administración crónica de diuréticos (furosemide), sobre la expresión génica en el riñón de las proteínas que intervienen en la absorción de sodio en la nefrona distal.

Los objetivos particulares fueron determinar el nivel de expresión genica de:

- El cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+::2\text{Cl}^-$ sensible a bumetanida, (CSB).
- El cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ sensible a tiazidas, (CST).
- La subunidad α_1 de la $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{ATPasa}$.

en el RNA de la corteza, médula externa y médula interna de riñón de ratas tratadas con furosemide o control durante 1 a 7 días.

HIPÓTESIS.

La administración crónica de furosemide aumenta la expresión génica en el riñón de los cotransportadores electroneutros en el riñón.

MATERIAL Y MÉTODOS

a) Diseño experimental

Se estudiaron ratas tratadas con furosemide (10mg/100g de peso/día) o con vehículo (ratas control) durante 1 a 7 días.

Las ratas empleadas fueron de la cepa Wistar especie *Ratus norvegicus*. Todos los animales fueron machos de entre 250 y 300g de peso. El furosemide (SIGMA) se preparó en agua bidestilada pH ~ 8.0. El vehículo consistió en agua bidestilada al mismo pH que el furosemide.

Para administrar la dosis óptima se pesó todos los días a los animales. Las ratas tratadas con furosemide bebieron la cantidad deseada de una solución al 0.8% de cloruro de sodio y al 0.1% de cloruro de potasio, mientras que las controles bebieron agua corriente. Ambos grupos comieron 20g /día de alimento para ratas molido 5001 PMI.

Todos los animales del presente trabajo permanecieron en el bioterio del Instituto Nacional de la nutrición, donde se mantuvo un estricto control del periodo luz-oscuridad 12:12h, así como una temperatura de 18°-19°C y una humedad relativa 60-65%.

Los animales permanecieron en jaulas metabólicas 4 días para su adaptación, antes de iniciar el tratamiento, y una vez iniciado se mantuvieron en las jaulas durante los días de administración del furosemide, que varió entre 1 a 7 días. Cada día se estudiaron 4 ratas vehículo y 6 furosemide.

La permanencia de las ratas en las jaulas metabólicas fue con la finalidad de coleccionar la orina de 24h y así determinar el volumen, la osmolaridad, y la excreción urinaria de electrolitos. La osmolaridad se midió por el punto de congelación en un aparato micro osmómetro Beckman. La concentración de sodio, potasio, y cloro se determinó mediante el potencial de ion selectivo en un aparato de electrolitos NOVA 4.

El día del sacrificio se tomaron muestras de sangre a través de una punción cardíaca para determinar la osmolaridad y los electrolitos séricos. El día del sacrificio se

determinó además la creatinina sérica y la urinaria mediante la técnica de reacción de punto final con ácido picrico e hidróxido de sodio en el analizador de creatinina II de Beckman.

Para medir la creatinina sérica, la sangre se centrifugó durante 10 min a 3,000 r.p.m., y se separó el suero. La creatinina sérica y urinaria se utilizó para calcular la depuración de creatinina que nos permitió obtener un aproximado de la filtración glomerular según la fórmula $(u)(v/p)$.

u= creatinina urinaria

v= flujo urinario (vol. de orina /1440seg/día)

p= creatinina sérica.

Al finalizar el tratamiento las ratas fueron llevadas al laboratorio en donde se anestesiaron en una cámara de éter, y una vez que se obtuvo la muestra de sangre por medio de una punción cardíaca, los animales fueron sacrificados por decapitación.

Ambos riñones fueron extraídos y separados macroscópicamente en corteza, médula externa y médula interna. Estos cortes fueron realizados en una base de vidrio sobre hielo para evitar lo mas posible la degradación del tejido; e inmediatamente después de realizar los cortes, el tejido fue congelado en nitrógeno líquido y guardados a -80°C en un ultracongelador Heto-Holter.

b) Expresión Génica.

La expresión génica de los cotransportadores electroneutros se midió mediante combinación northern blot, dot-blot, análisis de PCR, a partir del RNA mensajero o RNA total de la corteza, médula externa y médula interna renal

i. Obtención del RNA

Para la obtención del RNA se realizaron dos técnicas diferentes: en algunos casos se juntaron los riñones de varios animales y al contar con suficiente tejido se utilizó la técnica de homogeneización en guanidina y ultracentrifugación en cloruro de cesio (Apéndice A). Cuando se extrajo RNA de la corteza de cada rata en forma individual se

utilizó la técnica de un solo paso del TRIZOL (Apéndice B). En el caso de la extracción del RNA total con cloruro de cesio posteriormente se separó el RNA mensajero (mRNA) en columnas de oligo dT-celulosa (Apéndice C).

El RNA, se cuantificó mediante cromatografía en un espectrofotómetro Beckman DU640 de luz UV a una absorbancia de 260nm/280nm en el programa de ácidos nucleicos. Una vez cuantificado, se corroboró la calidad del RNA total y del mRNA, mediante un gel de agarosa/formaldehído al 1x, teñidos con bromuro de etidio (Apéndice D) donde se observaron las dos bandas correspondientes a los tamaños 18s y 28s ribosomal en el caso del RNA total y un barrido en el del mRNA. Una vez corroborado la calidad del RNA, se recipitó con 0.1 volumen de acetato de Na⁻ (3M pH 5.2) y 3 volumen de ethanol a 100%, se guardó a -20°C para luego utilizarlo en los análisis de expresión génica.

ii. *Análisis de northern blot.*

El análisis de northern blot se llevó a cabo inicialmente con mRNA de corteza, médula externa y médula interna de grupos de 5 ratas tratadas con furosemide y 5 controles, por día, entre 1 y 5 días. El análisis se realizó con 5µg del mRNA en condiciones de alta estrictencia (hibridación a 65°C, lavado a 65°C con 0.1x SSCP y 0.1% SDS), que asegura la hibridación de los ácidos nucleicos cuando existe solamente el 100% de homología (Apéndice E). Para poder llevar a cabo el análisis, primero se corrió un gel de agarosa/formaldehído con 5µg de mRNA de cada grupo de ratas el cual, fue transferido a una membrana de nylon por capilaridad (apéndice F) y fijado a esta con luz UV (Stratalinker).

El análisis se realizó con sondas no radiactivas, específicas para la detección de CSB, CST, y la subunidad α_1 de la Na⁺·K⁺-ATPasa. Como control se utilizó la sonda de β -Actina por ser un gen constitutivo.

El cDNA utilizado como molde para sintetizar las sondas fue obtenido mediante una mediprep con la técnica de cloruro de cesio (Apéndice G)

Para sintetizar la sonda el DNA fue inicialmente digerido (~1µg) en el extremo 5' con la enzima de restricción apropiada; en el caso de CST, CSB, y β Actina con *Eco RI* y para la subunidad α, del la Na⁺: K⁺-ATPasa con *Hind III* (Apéndice H). Para corroborar la cantidad y calidad del DNA se leyó en el espectrofotómetro en UV a 260nm/280nm con el programa de ácidos nucleicos y se corrió en un gel de agarosa/TAE 1x (Apéndice I). Posteriormente, las sondas de RNA no radiactivas, contruida a partir de cDNA por transcripción antisentido *in vitro*, con el promotor SP6, en presencia de UTP marcado con el esteroide digoxigenina (Apéndice J).

Una vez hibridada la membrana con la sonda, se llevó a cabo la inmuno-detección de la digoxigenina (Apéndice K). En breve, la membrana fue expuesta a anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina, contra digoxigenina y la presencia de los anticuerpos fue revelada mediante colorimetría sobre la membrana de nylon (DIG Nucleic Acid Detection Kit, de Boehringer). Las bandas resultantes fueron medidas con el análisis densitométrico de las imágenes digitalizadas con un escaner HP11cx. Estas imágenes fueron analizadas en el programa Sigma Scan/imagen en una computadora personal.

iii. *Análisis de dot-blot.*

Como se verá mas adelante, en base a los resultados obtenidos en los northern-blot del grupo de ratas, se decidió analizar las cortezas renales en forma individual de ratas tratadas con furosemide de 1 al 7 días, mediante análisis de dot-blot, en el que el RNA total es incorporado a la membrana de manera directa y fijado con luz UV en el Stratalinker 2400. Con esta técnica no es necesario correr el RNA en un gel de agarosa y luego transferirlo a la membrana.

Para realizar este análisis se extrajo el RNA total de la corteza renal, mediante Trizol y una vez corroborado su calidad en un gel de agarosa/formaldehido 1x, se hizo un análisis de dot-blot (Apéndice L) con 15 µg de RNA total de corteza renal de cada rata del día 1 al 7. Los lavados de las membranas fueron hechos con alta estringencia (hibridación a 65°C, lavado a 65°C con 0 1x SSCP y 0.1% SDS) (Apéndice E)

Las sondas empleadas fueron hechas con el RNAc en forma no radiactiva de los cotransportadores electroneutros CST, CSB, y la subunidad α_1 de la $\text{Na}^+:\text{K}^-\text{-ATPasa}$. Las sondas fueron marcadas con UTP-Digoxigenina (Apéndice J). Para la inmunodetección de la digoxigenina, la membrana fue expuesta a anticuerpos contra esta, conjugados con fosfatasa alcalina. Las bandas de hibridación fueron determinadas mediante quimioluminiscencia con el reactivo CDP-Star, (Apéndice K). Las bandas resultantes fueron medidas con el análisis densitométrico. El tiempo de exposición varió dependiendo de la sonda utilizada.

iv. *Análisis de RT-PCR semicuantitativa.*

Una vez hechos los análisis de northern-blot, y de dot-blot y en base a lo que observamos en ellos (ver resultados), se decidió hacer de PCR semicuantitativa de las ratas en forma individual de 7 días, con iniciadores específicos de CST, y GAPDH como gen control.

Iniciadores PCR

Para llevar a cabo la PCR se diseñaron iniciadores específicos tanto para CST como el de un gen control gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Los iniciadores de CST se obtuvieron de Genosys y fueron diseñados para amplificar la región que mostrara el menor grado de identidad con los otros miembros de la familia de cotransportadores electroneutros(75) que corresponde a las bases 589-792 de la clona de CST de rata (56) (204 pb).

(5'3') 5' AATGGCAAGGTCAAGTCGG3'

(3'5') 5' GATCGGGATGTCATTGATGG3'

Los iniciadores de GAPDH se usaron como control dando un producto de 515pb (108)

RT-PCR

Una vez obtenidos los iniciadores y teniendo el RNA total resuspendido en agua se llevo a cabo la transcripción reversa (TR) (Apéndice P) para la cual se utilizaron 5 μg de RNA total de riñón completo y corteza para la PCR control y 5 μg de RNA total de riñón

completo de 4 ratas control y 6 ratas vehiculo en forma individual para el análisis de PCR experimental. El RNA se calentó a 65°C x 10 min antes de la TR, esta se realizó a 37°C x 60 min en un volumen total de 20 µl usando 200 U de transcriptasa reversa (Moloney murina leukemia virus) (Life technologies), 100 pmol de hexámeros (Life technologies), 0.5 mM de dNTP (sigma), y 1x TR buffer. Las muestras se calentaron a 95°C x 5 min para inactivar la TR y se diluyó a una concentración final de 40 µl con H₂O grado PCR.

Se tomo el 2% de la muestra de TR para la PCR (Apéndice Q) en 20 µl de volumen final de la reacción que contenía 1x buffer de PCR, 0.1 mM de cada dNTP, 0.2 µCi de [α^{32} P]dCTP; 10 µM de los iniciadores (CST o GAPDH) y 1x de la taq DNA polimerasa (Biotecnologías universitarias). A las muestras se les agrego 30 µl de aceite mineral, y los ciclos de la PCR fueron los siguientes: 1 min a 94°C para desnaturalizar, 1 min a 60°C de anidación y 1 min a 75°C de extensión. El número de ciclos de repetición fue determinado por una curva y se decidió que a 20 ciclos se encontraba en fase exponencial. Al finalizar los ciclos se dejó 5 min a 75°C. Todas las reacciones se hicieron por duplicado. Para analizar los productos de cada reacción se corrió un gel de agarosa al 1.2% y otro de acrilamida bis al 5% (Apéndice O). Dos alícuotas de 10 µl fueron removidas y se corrieron en un gel de agarosa y de acrilamida. Las bandas fueron reveladas en bromuro de etidio y visualizadas en una lámpara con luz U.V. en el caso del gel de agarosa las bandas se cortaron y derritieron a 95°C con 500 µl de agua bidestilada. La amplificación de cDNA se midió en un contador Beckman (S6500) de acuerdo a la cantidad de radiactividad liberada en el líquido de centelleo, y así determinar los cambios en la expresión dentro la fase exponencial. Por otro lado las muestras que se corrieron en el gel de acrilamida se secaron a 80°C y se dejaron exponer toda la noche a -80°C para obtener una imagen de las bandas, además de las cuentas obtenidas en el contador Beckman.

ANALISIS ESTADISTICOS

Los resultados obtenidos del análisis de northern blot, dot-blot fueron analizados mediante densitometría computarizada. Para esto se obtuvo el radio del cotransportador/ β actina al dividir el número obtenido en el gen de interés, sobre aquel del análisis con la β actina. La prueba estadística que se hizo en estos casos fue una ANOVA de una sola vía. Estos resultados se expresaron como la media \pm el error estándar. En el caso de las pruebas de PCR el análisis que se realizó fue una t de Student no pareada con corrección de Bonferroni.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La figura 8 muestra el efecto de la administración de furosemide sobre el volumen urinario y la excreción urinaria de electrolitos, en ratas tratadas durante 1 a 7 días. En las gráficas, las barras blancas representan las ratas control y las barras negras las ratas tratadas con furosemide. El resultado se muestra como la media \pm EE (error estándar).

El volumen urinario esta expresado en ml/24h, mientras que la excreción urinaria de electrolitos en mEq por cada 100g de peso por 24h.

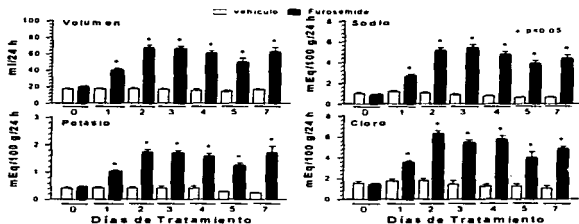


Figura 8. Volumen urinario y excreción de electrolitos en ratas tratadas con vehículo o furosemide de 0 a 7 días.

La administración de furosemide indujo un aumento en el volumen urinario así como en la excreción de sodio, potasio, y cloro en comparación con las ratas controles.

La figura 11 muestra el efecto del furosemide sobre la osmolaridad, referida como mOsm/litro y la depuración de creatinina, referida como ml/minuto. En ambas gráficas las barras blancas representan a las ratas control y las barras negras a las ratas tratadas con furosemide, el resultado se muestra como la media \pm EE.

En la figura 9 se observa que la osmolaridad disminuyó significativamente en las ratas tratadas con furosemide, mientras que la depuración de creatinina permaneció sin cambios.

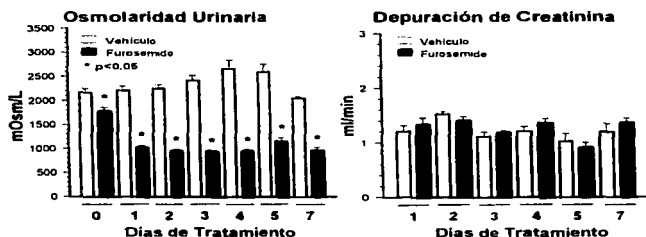


Figura 9 Osmolaridad urinaria y depuración de creatinina en ratas tratadas con vehículo o furosemide de 0 a 7 días.

Análisis de northern blot con sondas no radiactivas de CST, CSB y Na⁺-K⁺-ATPasa

Las figuras 10, 11, y 12 muestran el resultado del análisis de northern blot de CST, CSB, y la subunidad α_1 de la Na⁺ K⁺-ATPasa, respectivamente, en el mRNA de corteza renal de grupos de 5 ratas tratadas con furosemide o vehículo. En todos los casos se utilizó la β -actina como control. En la parte superior de cada figura se observa una imagen computarizada del northern blot en donde las ratas tratadas con furosemide están representadas con un signo de (+) debajo de cada carril y las controles con el signo de (-). En la parte inferior de la figura se muestra el resultado del análisis densitométrico. Este análisis es el resultado de dividir el número obtenido para el gen problema (CST, CSB, o Na⁺ K⁺-ATPasa) sobre el obtenido para el gen control (actina). De esta manera, el resultado se estandariza para corregir los posibles errores técnicos de la colocación o

transferencia del mRNA. Esta relación esta referida como el radio del gen problema sobre la β -actina.

La figura 10 muestra el análisis del mRNA de la corteza renal con el cotransportador de $\text{Na}^+ \cdot \text{Cl}^-$ sensible a tiazidas, con un tiempo de exposición de 16h, en que claramente se observa una disminución en la intensidad de la banda de 4.4 Kb del CST en las ratas tratadas con furosemide en comparación con el control, durante los primeros

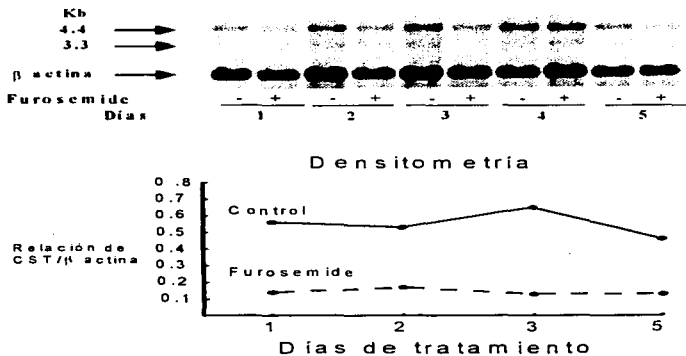


Figura 10. Análisis de northern blot del mRNA de corteza renal con la sonda del cotransportador de $\text{Na}^+ \cdot \text{Cl}^-$ 5 días de tratamiento.

De la misma forma, la figura 11 muestra disminución en el nivel de expresión del mRNA del cotransportador de $\text{Na}^+ \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$ sensible a bumetanida (CSB). La banda de 4.6 kb que corresponde a CSB es claramente de menor intensidad en las ratas tratadas con

furoseme, mientras que la β -actina es similar entre las ratas controles y experimentales, en los primeros 5 días de tratamiento.

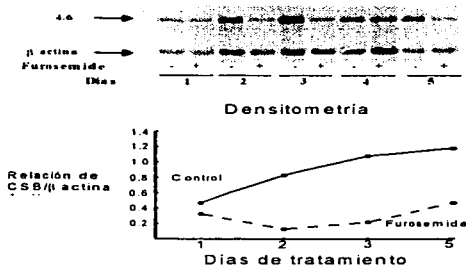


Figura 11. Análisis de northern blot del mRNA de corteza renal con la sonda del cotransportador de $\text{Na}^+ \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$

En cambio, la figura 12 muestra que no hubo cambio en el nivel de expresión génica de la subunidad α_1 del $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPasa}$ (banda de 3.6 kb), durante los 5 días de tratamiento entre las ratas tratadas con furoseme y las controles.

El hecho de que no se observó cambio en el mRNA de la $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPasa}$ y en la β -actina, pero si en CST y en CSB sugiere que el cambio puede ser real y no secundario a diferente selección de mRNA en ratas furoseme sobre las control.

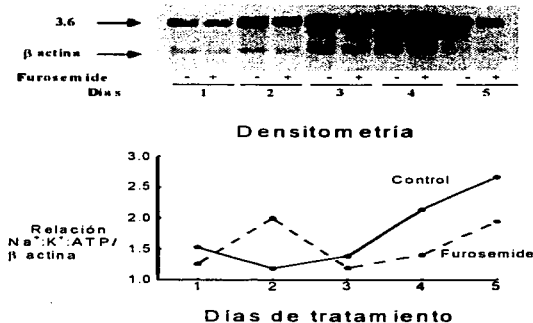


Figura 12. Análisis de northern blot del mRNA de corteza renal con la sonda de la $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{ATPasa}$

Las figuras 13 y 14 muestran las imágenes del northern blot para las tres proteínas (CST, CSB, y $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{ATPasa}$) en el mRNA de la médula externa y el RNA total de la médula interna respectivamente, en ambas figuras se observa que no hay cambios en la expresión génica de estas proteínas durante los 5 días que duró el tratamiento.

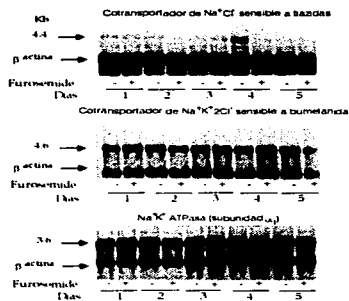


Figura 13. Análisis de northern blot del mRNA de la médula externa renal

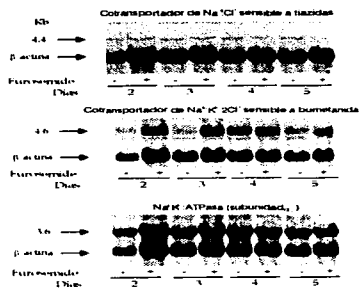


Figura 14. Análisis de northern blot del RNA total de la médula interna renal

Estos resultados sugieren que la administración de furosemide induce una disminución en la expresión génica de los cotransportadores electroneutros en la corteza renal mas no en la médula externa ni en la médula interna renal

Este hallazgo fue opuesto al esperado. Según lo revisado en la introducción la administración crónica de furosemide aumenta la capacidad de reabsorción del túbulo distal, por lo que esperábamos ver aumento en la expresión de estos genes, sin embargo, observamos una disminución.

La imposibilidad de analizar las diferencias con análisis estadísticos, por contar en cada grupo con un solo número (producto de juntar el RNA de 5 ratas) nos llevó a la idea de estudiar la expresión en ratas individuales. El análisis se realizó unicamente en las cortezas renales, y no en las médulas externas e internas ya que a este nivel no se observaron cambios a nivel génico. La expresión génica en el RNA total se estudió

inicialmente con dot-blot con sondas no radiactivas, y posteriormente con PCR semicuantitativa.

Para realizar este nuevo estudio se utilizó RNA total extraído de cada corteza renal en forma individual, es decir no mezclar el RNA de cinco ratas, sino conocer lo que sucede rata por rata. Esto significó repetir los experimentos, produciendo nuevas ratas con tiempos de administración del furosemide hasta de 7 días.

Para este análisis se estudiaron cuatro ratas inyectadas con vehiculo y seis con furosemide de 1 a 7 días. Los resultados obtenidos en la excreción urinaria de Na^+ , K^+ y Cl^- , volumen, osmolaridad urinaria y depuración de creatinina fueron similares a los observados en las figuras 8 y 9 (datos no mostrados).

Una vez obtenido estos datos, y después de haber corroborado el efecto del furosemide, se realizaron los análisis moleculares con las cortezas de rata en forma individual.

Para extraer RNA total de cantidades tan pequeñas de tejido (1 corteza renal = ~ 60 mg) utilizamos la técnica de extracción de RNA modificada y simplificada por Gibco Comp (TRIZOL).

Para comprobar la calidad del RNA total obtenido con trizol realizamos un análisis de northern blot para β -actina comparativo entre el RNA extraído con cloruro de cesio o con trizol. La figura 15 muestra el northern blot de 5 μg de RNA de riñón completo extraído con ambas técnicas mostrando que ambas son adecuadas, debido a que no hubo diferencias en la hibridación

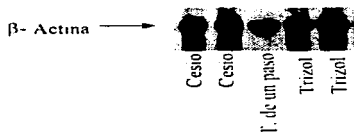


Fig 15 Análisis de northern blot de 5 μg de RNA de riñón completo extraído con 3 técnicas diferentes

Una vez que estuvimos seguros de la calidad del RNA con la técnica de Trizol, se utilizó este RNA para el análisis molecular.

Análisis de dot blot con sondas no radiactivas de CST, CSB y $\text{Na}^+:\text{K}^-\text{ATPasa}$

Las figuras 16, 17 y 18 muestran del lado izquierdo una imagen computarizada del análisis de dot-blot del RNA total de la corteza renal con los cotransportadores electroneutros CST, CSB y de la $\text{Na}^+:\text{K}^-\text{ATPasa}$ respectivamente, la β -actina no se muestra, pero el resultado del análisis densitométrico que se utilizó para generar las gráficas corresponde al resultado de dividir el número obtenido para el gen problema (CST, CSB y $\text{Na}^+:\text{K}^-\text{ATPasa}$) sobre el obtenido para el gen control (β -actina), y se refiere como el radio de del gen problema/ β -actina. En el análisis densitométrico de las figuras los puntos claros representan a las ratas controles y los oscuros a las ratas tratadas con furosemide. Del lado izquierdo de la figura se observa una imagen digitalizada del dot-blot. Por cada día hay cuatro ratas control (primeras cuatro columnas) y 6 ratas tratadas con furosemide (las 6 columnas restantes) de 1 a 7 días. Los tiempos de exposición para obtener esta imagen fue de 12h para CST, 1h para CSB y 1h para la $\text{Na}^+:\text{K}^-\text{ATPasa}$.

Como se observa tanto en la imagen del dot-blot como en el análisis densitométrico de la figura 16 no hay diferencias significativas en la expresión génica del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ entre las ratas tratadas con furosemide y las control.

Mientras que en el análisis densitométrico de la figura 17 se puede observar que hay una pequeña disminución estadísticamente significativa con una $p > 0.05$ en los días 1, 2 y 4 del cotransportador de CSB en las ratas tratadas con furosemide, mientras que en los días restantes no se observó ninguna diferencia.

Al igual que en la figura 16, en la figura 18 se observa que tanto en la imagen del dot-blot como en la gráfica del análisis densitométrico no hay diferencias estadísticamente significativas en la expresión génica de la subunidad α_1 de la $\text{Na}^+:\text{K}^-\text{ATPasa}$ en las ratas tratadas con furosemide y las control.

Tomando en cuenta que al estudiar la expresión génica de los cotransportadores electroneutros (CST y CSB) en el mRNA en corteza renal de un grupo de ratas observamos una clara disminución de la expresión en las ratas tratadas con furosemide en comparación con las control, pero al estudiar la expresión de estos cotransportadores en RNA total en corteza renal de manera individual solo observamos esta disminución de la expresión génica en los primeros días en CSB mas no en CST. decidimos utilizar la técnica PCR semicuantitativa, la cual es una técnica mas confiable.

Este análisis se hizo con la finalidad de corroborar los resultados obtenidos mediante la técnica de northern blot como de dot-blot, y de esta manera poder determinar si efectivamente hay una disminución en la expresión de los cotransportadores, y al ser esta tan pequeña no se pudo observar a través de estas técnicas convencionales pero si con PCR.

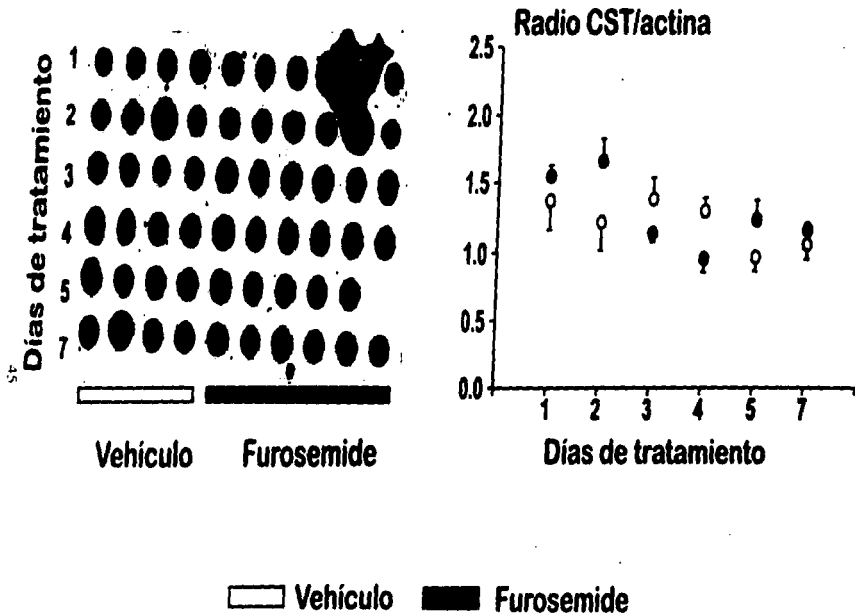


Figura 16. Análisis de dot-blot del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ sensible a tiazidas (CST) en corteza renal de ratas tratadas con furosemide

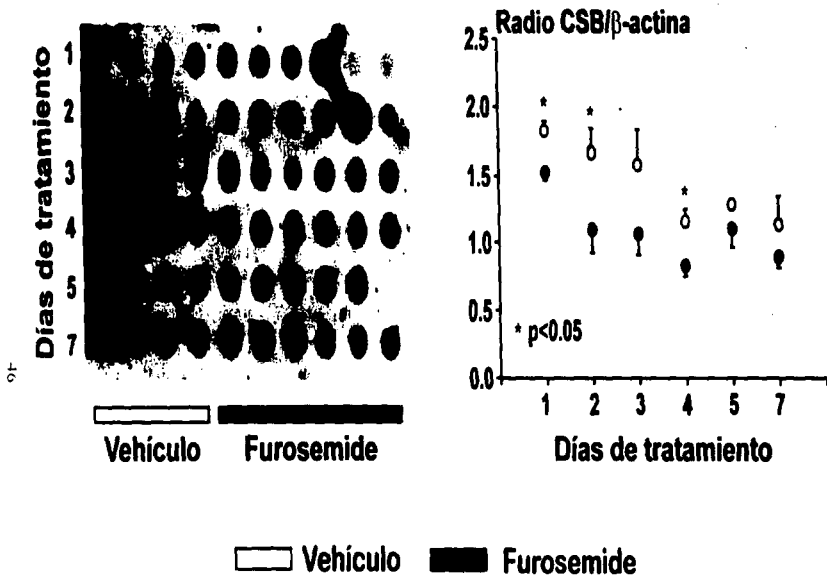


Figura 17. Análisis de dot-blot del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ sensible a bumetanida (CSB) en corteza renal de ratas tratadas con furosemide

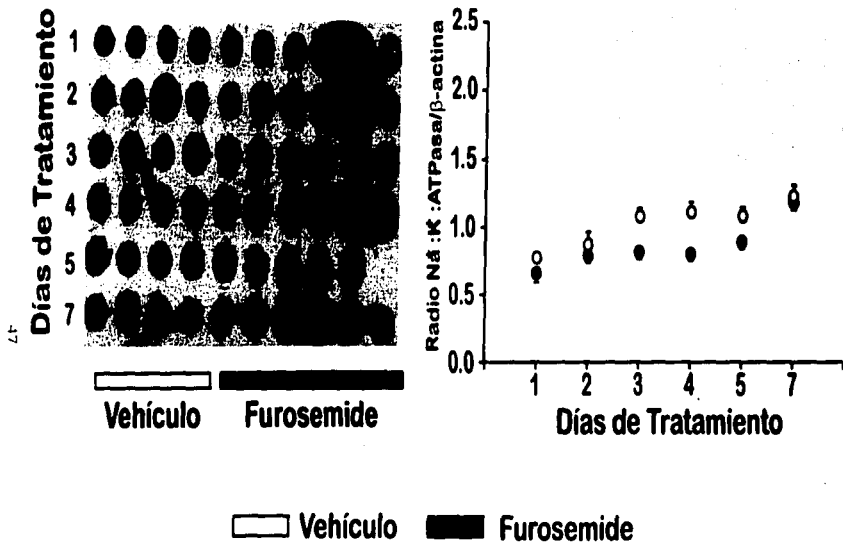


Figura 18. Análisis de dot-blot de la subunidad α_1 de la $\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa en corteza renal de ratas tratadas con furosemide

Análisis de PCR semicuantitativa con sondas radiactivas de CST.

El propósito de la PCR semicuantitativa es detectar cambios en el nivel de expresión de genes con bajos niveles de transcripción. Estos cambios pueden ser en ambas direcciones, ya que el nivel de expresión puede disminuir o aumentar, y se utiliza en caso de mensajeros poco abundantes (109,110).

Esta prueba ayuda a detectar de una manera mas confiable los cambios pequeños de expresión en genes transcripción poco abundante que en pruebas como northern blot serian difíciles de detectar. Este sería el caso de CST que se expresa únicamente en la membrana apical del túbulo distal (46), un segmento de la nefrona que se localiza en la corteza. El mRNA de este gen es de baja abundancia en comparación con el resto de los productos de RNA de todo el riñón.

La amplificación de PCR para un gen consiste de 2 fases: una exponencial donde el incremento de la cantidad de producto es lineal en cada número de ciclos, y una fase de meseta, donde los productos obtenidos no muestran un incremento significativo en el número de ciclos. La baja abundancia del mRNA, determina la duración de la fase exponencial. La determinación de la fase exponencial es crítica para llevar a cabo la reacción de PCR semicuantitativa para evitar falsos resultados durante el análisis que se podrían obtener en fase de meseta (Bobadilla et al simi-cuantitative PCR: A tool to study low abundance messages in the kidney. Arch. Med. Res. En prensa).

La fase exponencial se determino por una doble prueba (200 μ l dividido en 20 μ l por reacción individual con 1 μ l de cDNA) en presencia de 1 μ Ci/100 μ l de [α^{32} P]-dCTP. Los ciclos analizados fueron 15, 17, 19, 21, 23, 29, 35 y 40.

La figura 19 muestra la cinética de amplificación de los iniciadores (CST y G3PD) en RNA total de riñón de rata, la cual esta expresada como el producto de la PCR por cpm. En el panel superior de la figura se muestra la curva de G3PD donde se observa que la fase exponencial esta entre los ciclos 15 y 25; mientras que en el panel inferior se muestra la curva de CST donde la fase exponencial esta entre los ciclos 15 y 24. Al ser

muy semejantes los puntos de la fase exponencial de ambos genes, se decidió hacer el análisis en el ciclo 20 para ambos genes.

Debido a que CST se expresa únicamente en el túbulo distal, que esta localizado en la corteza renal, consideramos importante amplificarlo tanto de la corteza como del riñón completo, esperando que el nivel de expresión fuese mayor en el RNA total de la corteza que en el riñón completo. Esto con la finalidad de determinar la capacidad de la PCR para detectar cambios pequeños en la expresión.

Cinetica de amplificación de GAPDH y CST en RNA total de riñón en presencia de $1\mu\text{Ci}/100\ \mu\text{l}$ de $[\alpha^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$

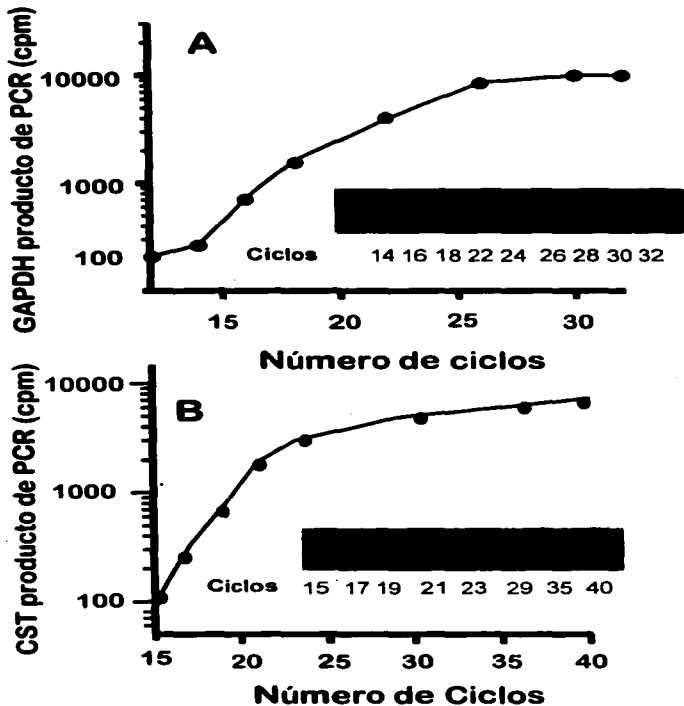


Figura 19

La figura 20 muestra la RT-PCR de CST y GAPDH de riñón completo vs. corteza renal, referida como el producto de PCR por cpm, y el resultado se muestra como la media \pm EE. Las barras blancas corresponden a riñón completo y las negras a la corteza renal. La gráfica de la izquierda muestra que la corteza expresa una mayor cantidad CST en comparación con el riñón completo y esta diferencia es significativa. En contraste, con lo que se observa en la gráfica de la derecha con las mismas muestras, en donde la expresión de GAPDH fue similar en ambos.

Una vez que corroboramos que la PCR detecta cambios pequeños en la expresión

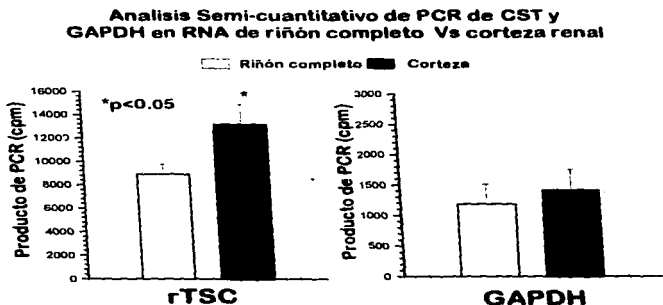


Figura 20

génica de genes transcripción poco abundante, se llevó a cabo la PCR de las ratas tratadas durante 7 días con furosemide vs. las controles con el RNA total extraído de riñón completo, en forma individual.

La figura 21 muestra el análisis de la RT-PCR de CST y GAPDH de ratas tratadas con furosemide o vehículo. Las barras blancas representan el promedio \pm EE de 4 ratas control y las barras negras el promedio \pm EE de 6 ratas tratadas con furosemide, referidas como el producto de la PCR por cpm. Como se observa en la gráfica no hay cambios en la expresión génica de CST y GAPDH en las ratas tratadas con furosemide en comparación con las control.

Análisis semi-cuantitativo de PCR de CSTr y G3PD de riñón completo de ratas tratadas con furosemide o vehículo

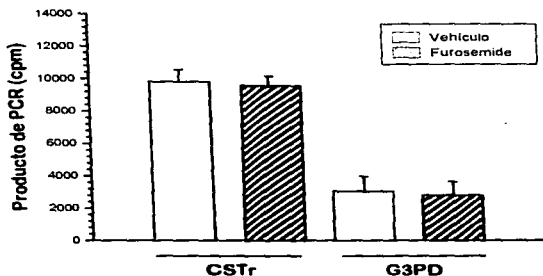


Figura 21

CONCLUSIONES

En esta tesis estudiamos la expresión génica de los cotransportadores electroneutros, CST y CSB, así como de la subunidad α_1 de la $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{ATPasa}$ durante el tratamiento crónico con furosemide con la finalidad de conocer los mecanismos de regulación de estos cotransportadores.

Como se menciona en la introducción el incremento de sodio en la nefrona distal producido por la administración crónica de furosemide, induce cambios adaptativos tanto funcionales como estructurales en el túbulo contorneado distal (TCD) que se acompaña de aumento en la capacidad de reabsorción de NaCl a este nivel.

Un mecanismo que pensamos podría explicar la adaptación de la nefrona distal en este modelo sería el aumento en la expresión génica de los cotransportadores electroneutros (CST, CSB), como consecuencia del aumento en la carga de NaCl que llega al TCD; por lo que esperábamos observar este tipo de cambios en las ratas tratadas con furosemide, sin embargo, los resultados de esta tesis muestran que en las ratas tratadas con furosemide no existen cambios en la expresión génica de los cotransportadores electroneutros.

Por lo tanto, podemos concluir lo siguiente:

- 1) El aumento en la capacidad de transporte en el túbulo distal que se observa durante el tratamiento con furosemide no se acompaña de aumento en la expresión génica de los cotransportadores electroneutros, ni de subunidad α_1 de la $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{ATPasa}$
- 2) El bloqueo crónico del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ con furosemide no afecta la expresión de este gen.

El que no cambie la expresión génica de los cotransportadores electroneutros durante la administración con furosemide no descarta a estas proteínas como responsables o involucradas en el aumento de la capacidad de transporte en este modelo. Existen cuando menos dos explicaciones alternativas:

Por un lado, recientemente, el estudio de los cotransportadores electroneutros con anticuerpos ha mostrado que se trata de proteínas de membrana que residen en vesículas de tráfico intracelular. Por lo tanto, un mecanismo potencial de adaptación durante la administración crónica de diuréticos podría ser la de cambiar simplemente el número de vesículas que alcanzan la membrana apical. Por otro lado, en nuestro laboratorio hemos demostrado que existen isoformas por empalme alternativo de exones tanto de CSB como de CST. En ambos casos las isoformas carecen de la mayor parte del extremo carboxi-terminal y algunas de ellas inclusive carecen de los últimos segmentos transmembrana (83). No está claro aún la naturaleza funcional de estas isoformas, sin embargo, hasta el momento los análisis de expresión funcional de las isoformas de CSB en ovocitos de *Xenopus laevis* sugiere que la isoforma truncada en el extremo carboxiterminal ejerce un efecto negativo sobre la función del CSB, por lo que podría tratarse de una isoforma reguladora. De ser así, un mecanismo potencial para la regulación crónica de los cotransportadores electroneutros podría ser la de cambiar la proporción entre isoformas. Un aumento en la producción de isoformas efectora, con disminución de la inhibidora podría ser suficiente para incrementar la función de la proteína en forma crónica. El estudio de los mecanismos antes expuestos es motivo de subsecuentes tesis en la Unidad de Fisiología Molecular.

SECCION DE APENDICES

APENDICE A

EXTRACCION DE RNA CON GUANIDINA Y CsCl

******Todo el trabajo debe ser libre de RNAsas

DIA 1

1. Preparar 8 ml de tiocianato de guanidina (TG) y 4 ml de cloruro de cesio (CsCl) por cada 0.5 a 1.0 g de tejido. Si el RNA se va a extraer de células en cultivo preparar 6 ml de TG por caja de Petri.

TEJIDO

2. Transferir 0.5 a 1.0 g de tejido congelado a un tubo de plástico de 50 ml que contenga 8 mls de TG.
3. Homogeneizar 15 sec. x 3 a máxima velocidad.
4. Agregar 400 μ l de sarcosil al 10%; mezclar con cuidado.
5. Centrifugar 10 min a 12,000 r.p.m. a 4°C.
6. Transferir el sobrenadante a un tubo de ultracentrifuga en el que previamente se colocaron 4 ml de CsCl
7. Ultracentrifugar a 32,000 r.p.m. durante 18 horas a 18°C.

DIA 2

8. Resuspender el precipitado con 600 μ l de agua GIBCO o DEPC (hacerlo con 300 μ l x2). Mezclar bien con la pipeta y luego agitar en vortex.
9. Tomar 2 μ l de RNA + 48 μ l de H₂O GIBCO o DEPC para espectrofotometría.
10. Separar los 600 μ l en dos tubos de 1.5 ml y precipitarlos con 0.1 V de Acetato de Na a pH 5.2 y con 3 V de EtOH al 100%.

Reactivos de grado biología molecular

Isotiocianato de Guanidina. Para preparar 8 ml:

- 4 M Guanidina: 3.78 g
- 25 mM Citrato de Na: 200 μ l de 1 M citrato de Na pH 7.0
- Llevar el volumen a 8 mls con agua GIBCO o DEPC.
- Calentar para disolver (~ 40°C). Enfriar en hielo.
- 0.7% β -mercaptoethanol: 56 μ l (agregar el β -ME hasta

que la guanidina esté fría y lista para ser usada.)

- Esterilizar por filtración

Cloruro de Cesio.

Para preparar 4 ml:

- 5.7 M CsCl: 3.83 g
- 25 mM Acetato de Na⁺: 33.3 μ l de 3 M Acetato de Na⁺

con pH 5.2

- Llevar el volumen a 4 mls con agua GIBCO o DEPC
- Esterilizar por filtración

APENDICE B

EXTRACCION DE RNA CON TRIZOL

** Todo el trabajo debe ser libre de RNAasas

1. Transferir 0.5 a 1.0 g de tejido a un tubo de plástico de 50 ml que contenga 1 ml de trizol (Life technologies).
2. Homogeneizar 15 seg x 3 a máxima velocidad.
3. Transferir el homogeneizado a un tubo eppendorf.
4. Incubar en hielo 5 min.
5. Agregar 0.2 ml (200 μ l) de cloroformo por cada ml de trizol.
6. Agitar en vórtex 15 seg.
7. Incubar en hielo 3 min.
8. Centrifugar a 12,000 rpm durante 15 min a 4°C.
9. Transferir el sobrenadante a otro tubo eppendorf.
10. Agregar al sobrenadante 0.5 ml (500 μ l) de isopropanol por cada ml de trizol.
11. Mezclar por inversión.
12. Incubar en hielo 10 min.
13. Centrifugar a 12,000 rpm durante 10 min a 4°C (debe obtenerse una pastilla).
14. Desechar el sobrenadante.
15. Lavar la pastilla con 1 ml de etanol al 70% por cada ml de trizol.
16. Mezclar por inversión.
17. Centrifugar a 12,000 rpm durante 5 min a 4°C.
18. Quitar el exceso de etanol y secar en speed vac por 90 seg.
19. Resuspender en 100 μ l de agua GIBCO o DEPC.
20. Tomar 2 μ l de RNA + 498 μ l de agua bidestilada (no BM) para espectrofotometría.
21. Presipitar en 0.1 V de acetato de Na⁺ a pH5.2 y con 3V de EtOH al 100%
22. Guardar a -20 ° C.

APENDICE C

SELECCION DEL mRNA (POLI(A)*RNA)

Nota: Todo el trabajo debe de realizarse en condiciones libres de RNAsas. Todas las soluciones deben ser preparadas con agua tratada con DEPC o tipo GIBCO, en material de vidrio tratado durante ocho horas a 240°C, o en material de plástico nuevo, y utilizando guantes y reactivos de grado biología molecular.

1. Suspender 50 mg de oligo(dT)celulosa (Farmacia) tipo 7 en 5 ml de buffer de elución* en un tubo de poli propileno de 15 ml.
2. Vacie el contenido en una columna plástica de cromatografía.
3. Agregue 7 ml de Buffer de unión (binding buffer)**
4. Disolver el RNA a ser seleccionado (máximo 1 mg por columna) en 200 µl de agua GIBCO o DEPC.
5. Calentar el RNA a 65°C durante 4 min, enfriar en hielos y dejarlo llegar a Temperatura ambiente.
6. Agregar 1.3 ml de buffer de unión al RNA, vaciarlo en la columna y recolectar el eluante.
7. Cuando este casi seca la columna agregar 300 µl de buffer de unión a la columna. Los cuales se recolectan con el resto del eluyente.
8. Calentar el eluante a 65°C durante 4 min, enfriar en hielos y dejarlo llegar a temperatura ambiente. Se mezcla un poco para que el buffer de unión se disuelva bien (ya que este se precipita en frío).
9. Reaplicar el eluyente a la columna, recolectarlo nuevamente y guardarlo a -80°C.
10. Lavar la columna con 5 ml de buffer de unión
11. Lavar la columna con 5 ml de buffer de lavado.***
12. Etiquetar 5 tubos del número uno al cinco.
13. Aplicar 400 µl de buffer de elución y recolectarlo en el tubo número 1. Repetir la maniobra cinco veces (tubos 1-5).
14. Precipitar el mRNA de cada tubo con: 40 µl Acetato de Na pH 5.2 y 1.0 ml de EtOH frío al 100%.
15. Agitar bien y guardar durante la noche a -20°C

DIA SIGUIENTE

16. Centrifugar las muestras por 30 min a 4°C
17. Lavar con 1 ml de EtOH al 70% y desecarlas por 3 min
18. Resuspender en 50 µl de agua GIBCO o DEPC (esperar cuando menos 30 min para estar seguro que el RNA se ha disuelto)
19. Tomar 2µl para medir la concentración (espectrofotómetro) y
20. Precipitar de nuevo en EtOH y guardar a -20°C.

***Buffer de elución**

10 mM Tris HCl
0.05% SDS
1 mM EDTA

****Buffer unión**

10 mM Tris HCl
0.5 M NaCl
0.5% SDS
1 mM EDTA

*****Buffer lavado**

10 mM Tris HCl
0.1 M NaCl
0.1 % SDS
1 mM EDTA

el pH a 7.5 con HCl concentrado. Esterilizar por filtración

Nota 1: En cada paso hay que esperar a que todo el buffer pase antes de agregar el siguiente.

Nota 2: El buffer de unión se precipita a temperatura ambiente menor a 20°C. Por lo tanto, checar que la temperatura ambiente este por arriba.

para re utilizar la oligo (dT)

poner a la columna:

-7 ml de buffer de elución

-7 ml de 0.1N NaOH

-7 ml de H₂O BM (2 veces)

-7 ml de Etanol 100% (2 veces)

-Transferir con 1.5 ml de etanol 100% a un tubo Ependorf

-Speed vac

-guardar a -20°C.

APENDICE D

GEL DE AGAROSA PARA RNA (Mini-Gel)

Colocar el plato para la agarosa debajo de la campana.

En un matraz sin polvo mezclar para cada 10 ml de gel:

- 0.1 g agarosa
- 8.5 ml de H₂O destilada

Disolver por calentamiento (horno de microondas 1'40")

Dejar que enfrie a ~ 50°C y agregar para cada 10 ml de gel:

- 1 ml 10x MOPS
- 0.5 ml Formaldehido

Vaciar sobre la caja de gel y dejarlo secar cuando menos por 30 min antes de usarlo.

Para correr el RNA preparar la siguiente mezcla para cada muestra:

- 5 µl formamida
- 1 µl 10x MOPS*
- 2 µl formaldehido
- 1 µl gel loading**
- 0.16 µl bromuro de etidio (10 mg/ml)

Mezclar 8.1 µl con 1 a 1.5 µl de RNA

Calentar a 65°C por 10 min

Enfriar rápido en hielo y dejarlo a temperatura ambiente.

Vaciar las muestras en el gel sumergido en 1x MOPS

Correr el gel a 75 V durante 1.5 h

Para desteñir el gel: ponerlo en agua durante 10 min x 3

*10x MOPS: 1 L:

- 41.86 g MOPS
- 6.80 g Acetato de Na⁻
- 20 ml 0.5 M EDTA
- pH a 7.0 con 10N NaOH
- Esterilizar por filtración

*Gel loading. Para 2 mls

- 1 ml glicerol (50%)
- 40 µl 0.5 M EDTA pH 8.0 (10 mM)
- 5 mg Azul de Bromo fenol (0.25%)
- 5 mg Xylene lyanol FF (0.25%)
- Esterilizar por filtración

APENDICE E

ANALISIS DE NORTHERN BLOT CON SONDAS NO RADIOACTIVAS

PRIMER DIA

La primera etapa en este protocolo es correr un gel de agarosa con el RNA que se pretende utilizar para el análisis. Si es RNA total se deben de utilizar 10 a 20 µg por canal. Si es mRNA se deben de utilizar de 2.0 a 10 µg por canal.

Cuando el gel esté listo se debe de transferir a una membrana utilizando metodología convencional (mantener el siguiente orden de abajo hacia arriba: papel filtro, gel colocado de cabeza, membrana de nylon, papel filtro y toallas). Para la transferencia se debe de utilizar SSC* 20x. La transferencia se debe de llevar a cabo en periodo de cuando menos 16 horas. En general las membranas Duralon de Stratagene funcionan muy bien.

SEGUNDO DIA

- Checar la transferencia, marcar el inicio de los canales y la guía de RNA en el lado correcto de la membrana.
- Fijar el RNA a la membrana mediante Cross link de UV (Stratalinker de Stratagene). Después de este paso la membrana puede guardarse indefinidamente a temperatura ambiente.
- Pre hibridar la membrana en solución de hibridación (10 ml/10 cm²) durante 2 horas de 37°C a 65°C, dependiendo del grado deseado de estringencia
- Agregar 20 ng de la sonda de RNA por cada ml de solución de hibridación.
- Calentar la sonda a 83°C durante 3 min antes de agregarla.
- Hibridar durante la noche de 37°C a 65°C, dependiendo del grado deseado de estringencia.

TERCER DIA

- Lavar dos veces en 2xSSCP, 0.1% SDS a temperatura ambiente durante 5 min
- Lavar dos veces en 0.1x (alta) a 1x (muy baja)-SSCP; 0.1% SDS en 37°C (muy baja) a 65°C (alta). La temperatura y la concentración de sal dependen de la estringencia deseada. Este es el paso mas importante para determinar la estringencia.
- Equilibrar en Buffer A por > 1 min
- Pasar a Buffer B durante 2 h a temperatura ambiente (10 mls/10cm²).
- Agregar al Buffer B 4 µl de anticuerpo por cada 20 ml de buffer (150 mU/ml. 1:5000. (<DIG>AP-Conjugate*, polyclonal sheep anti-digoxigenin Fab-fragments, conjugated to alkaline phosphatase [750 U/ml]) Incubar 45 min a temperatura ambiente. Se recomienda movimiento
- Lavar dos veces en buffer A por 15 min a temperatura ambiente.
- Equilibrar en Buffer C por 3 min a temperatura ambiente
- Exponer a CDP-Star 1 µl por cada ml de buffer C, se recomienda sacar antes el CDP-Star de 4°C para que llegue a T,A antes de ponerlo.
- Incubar a 37°C durante 5 min
- Quitar el CDP-Star y pasar la membrana a una bolsa nueva
- Exponer a la autorradiografía.

(Continúa Análisis de northern no radioactivo)

Soluciones

Solución de hibridación (50 mls):	100% Formamida	25 ml
	20x SSCP	12.5 ml
	10% SDS	10 ml
	10% Laurilsarcosina-	0.5 ml
	"Blocking agent"	2.5 g

El "blocking agent" no se disuelve fácilmente por lo que hay que preparar la solución con una hora de anticipación. Para esto se debe de calentar la formamida entre 50° y 70°C, luego agregar el "blocking agent" y ya disuelto, agregar el resto de los reactivos. La solución permanece estable y turbia a -20°C

20x SSC (Para 1 litro)

- 175.3g NaCl
- 88.2g citrato de Na
- Ajustar el pH a 7 con HCl
- Aforar a 1lt

Buffer A (por litro)	100 mM Tris HCl, pH 7.5:	Agregar 100 ml 1 M Tris 7.5
	150 mM NaCl:	Agregar 150 ml 1 M NaCl

Buffer B Igual que el A + 1 g de "Blocking agent" por cada 50 ml.

Buffer C (por litro)	100 mM Tris HCl, pH 9.2:	Agregar 100 ml 1 M Tris 9.2
	100 mM NaCl	Agregar 100 ml 1 M NaCl
	50 mM MgCl ₂	Agregar 50 ml 1 M MgCl ₂

10% SDS (por 100 ml)	10 g SDS
	Llevar el volumen a 100 ml con H ₂ O

- 2x SSCP, 0.1% SDS (1 L)= 100 ml de 20xSSCP + 10 ml 10% SDS
- 1x SSCP, 0.1% SDS (1 L)= 50 ml de 20xSSCP + 10 ml 10% SDS
- 0.5x SSCP, 0.1% SDS (1 L)= 25 ml de 20xSSCP + 10 ml 10% SDS
- 0.1x SSCP, 0.1% SDS (1 L)= 5 ml de 20xSSCP + 10 ml 10% SDS

Nota: todas las soluciones de lavado deben de esterilizarse.

APENDICE F

TRANSFERENCIA DEL GEL A UNA MEMBRANA DE NYLON

1. papel filtro: -20 x 20 cm (1)
 -10 x 15 cm (3)
- gel mediano -10 x 7 cm (4)
- gel chico -7 x 7 cm (4)

2. Membrana de nylon del mismo tamaño que el gel
3. Solución 10x SSC (~ 300 a 400 ml)
4. Dentro del refractario de vidrio se coloca:
 - un vidrio sobre el que se coloca
 - papel filtro de 20 x 20 cm enzima
 - papel filtro de 10 x 15 cm
 - gel de cabeza (rodeado de Kleen pack)
 - membrana del tamaño del gel
 - columna de sanitas (~ 5 cm)
 - cubrir todo el refractario con klenn pack.

Nota: en cada paso se le va agregando solución 10 x SSC y es muy importante quitar todas las burbujas.

APENDICE G
TECNICA DE MEDI-PREP
OBTENCION DE PLASMIDOS (cDNA)

Día 1

Cultivo de iniciación: Tomar una colonia de las cajas de petri o usar una pequeña cantidad de los stocks de bacterias conservados en glicerol y colocarla en un tubo de 15 ml con 2 ml del medio LB con ampicilina (100µg/ml). Incubar con agitación (250 rpm) a 37°C, de 4 a 8h.

Cultivo de toda la noche: En la tarde adicionar ampicilina (100µg/ml) a 200ml de medio *2X YT, en un matraz de 500ml (esterilizado en la autoclave). Adicionar los 2 ml del medio LB con las células e incubar con agitación (250 rpm) a 37°C toda la noche.

Día 2

1. Transferir el medio de cultivo a los frascos Nalgene de plástico con tapa de rosca y centrifugar a 6000 rpm) por 10 min a 4 °C, usando el rotor (JA-10).
2. Durante este tiempo se prepara la solución **I.
3. Resuspender el pellet en 4 ml de solución **I y llevarlo a temperatura ambiente por 10 min. usando una pipeta para transferir la solución a tubos para centrifuga Nalgene de 50 ml. Posteriormente adicionar 8 ml de solución II y dejar en hielo 10 min (mezclar por inversión, **no agitación con vortex**). Finalmente, adicionar 6 ml de solución **III e incubar en hielo 10 min (mezclar por inversión, **no agitación con vortex**)
4. Centrifugar a 16000 rpm por 20 min en el rotor (J-A 20) remover el sobrenadante y adicionar 1 volumen de isopropanol (~18 ml). Desechar el pellet, y dejar el sobrenadante 20 min en hielo.
5. Centrifugar a 9000 rpm por 10 min en el rotor SA 600, remover el sobrenadante y lavar el pellet con ethanol al 70% teniendo cuidado de no romper el pellet.
6. Disolver el Pellet en 4 ml de ***TE, agregar 4.4g de CICs y disolverlo, transferir la mezcla a viales de plástico (S orvall 03945) a los cuales se les agregó previamente 0.4 ml de bromuro de etidio (10mg/ml) Estar seguros de que no queden burbujas ni espacios vacios en el tubo (en caso de ser necesario se puede llenar con 1g de CsCl/ml TE). Sellar el vial con calor.
7. Centrifugar toda la noche a 55000 rpm a 20°C.

Día 3

8. remover con mucho cuidado el DNA plasmidico usando una jeringa, previamente hay que hacer un orificio en la parte superior con un aguja para ventilar el tubo. Para facilitar la extracción del DNA hay que colocar el tubo en la lampara de luz UV y buscar las dos bandas de color rojo en la mezcla, la banda superior es el DNA lineal y la de abajo es el DNA circular (plásmido)

Nota: en la base del tubo habrá un botón que corresponde al RNA, hay que tener cuidado de no contaminar, de lo contrario hay que volver a centrifugar.

9. Después de tomar el bromuro de etidio con el extracto de DNA usar n-butanol + 10% de SDS (solución de extracción = n-butanol al 10%, SDS 9:1) para eliminar el bromuro. Este paso se realiza 3 veces con una solución de extracción 1:1 con respecto a la muestra (2 ml de muestra 2 ml de solución de extracción). Agitar con vortex y dejar que las fases se separen por asentamiento, eliminar la fase superior de color púrpura.

10. Separar el volumen final en dos tubos ependor (200µl c/u).

- agregar 400 µl de H₂O BM
- agregar 600 µl de EtOH al 100% a temperatura ambiente
- incubar 15 min a 4 °C
- lavar con EtOH al 70%
- secar en speed vac
- Resuspender en 100 µl de H₂O BM
- dejar Resuspender por 30 min
- tomar 2 µl + 498µl de H₂O y leerlo en el espectrofotometro
- guardar a -80°C.

***2X YT medium:**

a 900 ml H₂O desionizada, agregar:

Bacto-tryptone 16 g
Bacto-yeast extract 10 g
NaCl 5 g;

↑ pH a 7.0 con 5N NaOH, aforar a un volumen de 1 L esterilizar en autoclave de 20 a 30 min.

****Solución I**

5 ml 1 M glucosa
2 ml 0.5 M EDTA
2.5 ml 1 M TrisCl, pH 8
90.5 ml H₂O

****Solución II**

(Preparar fresco)
1 ml 10% SDS
2 ml 1 M NaOH
7 ml H₂O

****Solución III**

29.45 g Acetato de K⁺
60 ml de H₂O
11.5 ml Ácido acético glacial
28.5 ml H₂O

*****TE pH 7.4**

10 mM Tris Cl (pH 7.4)
1 mM EDTA (pH 8.0)

APENDICE H

DIGERIR CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Para el uso de enzimas de restricción en general se debe de hacer lo siguiente:

- 0.5 a 1 µg de cDNA (usualmente en 1 µl)
- 1 µl del buffer apropiado 10x (el buffer universal funciona bien)
- 7 µl de agua
- 1 µl de enzima
 - Incubar 2 horas a temperatura apropiada. (normalmente a 37°C)
 - llevar a un volumen final de 100 µl
 - extraer con fenol cloroformo 50 µl-50 µl
 - centrifugar a 4°C 4 min
 - pasar la fase acuosa a otro tubo (~95 µl)
- precipitar con acetato de Amonio la mitad del volumen (45 µl) y 3 vol de EtOH 100%
- guardar a -20 °C.

NOTAS:

1) Las enzimas de restricción están en 50% de glicerol para su conservación. Para que la reacción sea idónea no debe de existir en la mezcla final mas de 10% de glicerol. Por lo tanto, en términos generales cada µl de enzima se debe diluir en 10 µl de reacción.

2) Siempre confirmar la temperatura ideal para cada enzima. No todas trabajan apropiadamente a 37°C.

3) Siempre confirmar el buffer ideal. El buffer Universal de Boehringer es muy bueno.

4) Si se va a utilizar fosfatasa alcalina intestinal (CIAP) se deben agregar 12 U al final de la reacción e incubar por 30 minutos mas. No es conveniente agregar CIAP desde el principio porque su presencia inhibe la función de algunas enzimas de restricción.

Fenol saturado

1. Calentar el fenol a 65 °C
2. 25 ml fenol + 25 ml de 0.5 M Tris pH 8.0
3. agitar 15 min
4. quitar el tris
5. agregar 25 ml de 0.1 M tris pH 8.0
6. agitar 15 min
7. repetir 4-6
8. quitar todo el tris
9. agregar 0.1 vol de tris 0.1 M pH 8.0
10. Para evitar la oxidación del fenol se agrega 0.1 % de hidroxiquinoleína
11. guardar a -4°C

Cloroformo - alcohol isoamílico relación 24:1

- 24 ml de cloroformo
- 1 ml de alcohol isoamílico

APENDICE I

GEL DE AGAROSA PARA DNA (Mini-Gel)

En un matraz sin polvo mezclar para cada 10 ml de gel:

- 0.1 g agarosa
- 10 ml de 1x TEA*

Disolver por calentamiento (horno de microondas 50 seg).

Dejar que enfrie a ~ 50°C.

Vaciar sobre la caja de gel y dejarlo secar cuando menos por 30 min antes de usarlo.

Para correr el DNA mezclarlo con solución de "gel loading" a razón de 1:4 µl.

Vaciar las muestras en el gel sumergido en 1x TEA

Correr el gel a 60 V durante 1.5 h

Para teñirlo poner el gel en un recipiente con 100 ml de agua y 7 µl de Br. Et. (10 mg/ml)

Para desteñir lavar en agua durante 10 min x 3.

***50x TAE:** 500 ml:

- 121g Tris Base
- 28 ml Acido acético glacial
- 50 ml 0,5 M EDTA pH 8.0
- Esterilizar por filtración

***Gel loading.** Para 2 mls

- 1 ml glicerol (50%)
- 40 µl 0.5 M EDTA pH 8.0 (10 mM)
- 5 mg Azul de Bromofenol (0.25%)
- 5 mg Xylene lyanol FF (0.25%)
- Esterilizar por filtración

***Guía de DNA.** Para 100µl

- 10µl Hae III
- 10µl Phi X 174
- 80µl H2O BM.

APENDICE J

PREPARACION DE UNA SONDA NO RADIOACTIVA DE RNA CON POLIMERASA T3, T7 O SP6

****** Todo el trabajo debe realizarse libre de RNAasa

Este protocolo debe de iniciar con plásmido previamente linearizado en el extremo 5'

Agregar los reactivos y el cDNA en el siguiente orden a temperatura ambiente.

- 10 μ l de cDNA linearizado (1-2 μ g)
 - 9 μ l de H₂O BM
 - 5 μ l 10 mM rATP
 - 5 μ l 10 mM rGTP
 - 5 μ l 10 mM rCTP
 - 3.25 μ l 10 mM rUTP
 - 3.75 μ l 1 M DTT
 - 10 μ l de buffer de transcripción 5x*
 - 1.75 μ l 10 mM Digoxigenina-rUTP (Boehringer)
 - 2 μ l de RNAasa Inhibitor
- Centrifugar rápido
- 1 μ l de RNA polimerasa T7, T3 o SP6 ** (~ 25U)
 - Incubar 1 h a 37°C
 - Agregar 4 μ l de RNase-free DNase (Stratagene 10 U/ μ l)
 - Incubar 20 min a 37°C
 - Agregar 0.5 μ l de 0.5 M EDTA pH 8.0
 - Precipitar en EtOH (0.1 vol. de Acetato de Na⁻ y 3 vol. de EtOH al 100%).
 - Guardar durante la noche a - 20°C

DIA SIGUIENTE

Centrifugar, lavar en EtOH al 70% y desecar. Luego resuspender en 30 μ l de agua GIBCO o DEPC. Tomar 1 μ l para correr un gel y 1 μ l para cuantificación. Precipitar el resto de nuevo en ethanol y guardarlo a - 20°C. o hacer alicuotas de 10ng/ μ l y guardar a -80°C

***5X buffer de transcripción :**
(Generalmente viene junto con la enzima)

200 mM Tris pH 8
40 mM MgCl₂
10 mM Spermidina
250 mM NaCl

****** La polimerasa de RNA a usarse depende del plásmido y orientación del inserto. Lo importante a recordar es que lo que se pretende es sintetizar RNA antisentido.

APENDICE K

INMUNODETECCION DE BANDAS DE HIBRIDACION

FOR COLORIMETRIA

En un vaso de precipitados cubierto con papel aluminio añadir por cada membrana de 10cm² de superficie:

- 10 ml de buffer C
- 45 µl/ 10 de NBT en dimethylformamide*
- 35 µl/ 10 de X-phosphate en dimethylformamide*

*Ambos reactivos de DIG Nucleic Acid, Kit Detection de Boehringer.

Añadir 10 ml de la solución por cada membrana y dejarla en un lugar oscuro, ya que el reactivo es sensible a la luz.

Se recomienda guardar la membrana en una bolsa de plástico hasta que se definan las bandas de hibridación.

Para detener la reacción se pone la membrana en buffer D indefinidamente.

Buffer D (250 ml):

- 5 ml 0.5M Tris-HCl pH 8.0
- 500 µl 0.5M EDTA pH 8.0

FOR QUIMIOLUMINISCENCIA

- En un tubo eppendorph añadir 990 µl de buffer C + 10 µl del reactivo CDP-STAR (boehringer)
- Mezclar bien
- centrifugar rápidamente
- agregar a la membrana, que previamente se colocó en una bolsa
- meter al horno de hibridación durante 5 min
- sacar la membrana del horno y de la bolsa
- quitar el exceso de CDP star con un papel filtro
- colocar la membrana en una nueva bolsa
- exponer con una placa radiológica el tiempo necesario (algunos minutos es suficiente)

buffer C (1 litro):

- 100ml tris pH 9.2
- 100ml NaCl 1
- Aforar a 1 litro con H₂O

APENDICE L

ANALISIS DE DOT BLOT CON SONDAS NO RADIATIVAS

NOTA: Con el fin de conocer la calidad del RNA, es decir, que no este degradado, es conveniente correr un gel de agarosa antes de iniciar el análisis.

PRIMER DÍA

MUESTRAS.

Por cada 10 µl de muestra añadir:

- 20 µl de formamida
- 7 µl de formaldehido
- 2 µl de 20x SSC
- Incubar a 68°C durante 15 min.
- Añadir 78 µl de 20x SSC
- Centrifugar a 12,000 rpm durante 2 min a 4°C.

APARATO

Lavar el aparato de dot-blot con una solución al 0.1 %NaOH.

Secarlo muy bien.

Colocar el papel filtro y la membrana de nylon previamente remojados en 20x SSC por 5 min.

1. Hacer el mapa del orden de las muestras en el aparato de dot-blot.
2. Añadir a cada pozo 500 µl de 10x SSC (dos veces y pasarlo con vacío)
3. Cargar cada pozo con 110 µl de la muestra correspondiente según el mapa.
4. Una vez que se hayan colocado todas las muestras se hacen pasar con vacío.
5. Lavar cada pozo con 500 µl de 10x SSC y pasar vacío.
6. Sacar la membrana del aparato.
7. Fijar el RNA a la membrana mediante Cross link de UV (Stratalinker de Stratagene).

Después de este paso la membrana puede guardarse indefinidamente a temperatura ambiente.

8. Prehibridar la membrana en solución de hibridación (10ml/10cm²) durante 30 min de 37 °C a 65°C, dependiendo del grado deseado de estringencia
9. Agregar 20 ng de la sonda de RNA por cada ml de solución de hibridación.
10. Calentar la sonda a 83°C durante 3 min antes de añadirla.
11. Hibridar durante toda la noche de 37°C a 65°C, dependiendo del grado de estringencia deseado.

SEGUNDO DIA

- Lavar dos veces en 2xSSCP, 0.1% SDS a temperatura ambiente durante 5 min
- Lavar dos veces en 0.1x (alta) a 1x (muy baja) SSCP; 0.1% SDS en 37°C (muy baja) a 65°C (alta). La temperatura y la concentración de sal dependen de la estringencia deseada. Este es el paso mas importante para determinar la estringencia.
- Equilibrar en Buffer A por > 1 min
- Pasar a Buffer B durante 2h a temperatura ambiente (10 ml/10cm²).
- Agregar al Buffer B 4 µl de anticuerpo por cada 20 ml de buffer (150 mU/ml. 1:5000; (<DIG>AP-Conjugate*; polyclonal sheep anti-digoxigenin Fab-fragments, conjugated to alkaline phosphatase [750 U/ml]) Incubar 45 min a temperatura ambiente. Se recomienda movimiento.
- Lavar dos veces en buffer A por 15 min a temperatura ambiente.
- Equilibrar en Buffer C por 3 min a temperatura ambiente.

APENDICE M ANALISIS DE TRANSCRIPCION REVERSA

TR

- 10 μ l RNA total
- llevar a un volumen de 12 μ l con H₂O BM
- 10 min a 65 °C en el oscilador térmico
- agregar 2 μ l de Buffer de transcripción reversa 10x (75 mM KCl; 50 mM Tris-HCl; 3 mM MgCl₂; 10 mM DTT, pH 8.3)
- 1 μ l de dNTP 0.5mM (sigma)
- 2 μ l DTT (0.5 mM)
- 1 μ l de hexameros 100 pmol/ μ l (Life technologies)
- 2 μ l de la transcriptasa reversa MMLV (Moloney murina leukemia virus) (Life Technologies)(200U/reacción)

la RT se lleva a cabo a las siguientes temperaturas en el oscilador térmico:

- 37°C 1 hora
- 95°C 5 min

llevar a un volumen final de 40 μ l con H₂O BM.

Notas:

Toda las reacciones se tienen que llevar a cabo con agua BM que se use exclusivamente para PCR

Los tubos donde se lleve a cabo la reacción deben estar estériles

Es importante que los guantes no tengan talco ya que este inhibe la reacción.

APENDICE N

ANALISIS DE LA REACCION DE LA POLIMERASA EN CADENA (PCR)

PCR

- 2 μ l cDNA (1/20 muestra de RT)
- 2 μ l Buffer de Taq polimerasa (10mM tris-HCl; 1.5 mM $MgCl_2$; 50 mM KCl, pH 8.3)
- 0.4 μ l del mix de dNTP (0.1mM de cada dNTP)
- 0.2 μ Ci de [α^{32} P]dCTP (~300Ci/mmol, 9.25 mEq, 250 μ Ci)
- 2 μ l =10 μ M del primer de CST
- 0.2 μ l de taq DNA polimerasa =1 unidad de la reacción final (Biotecnologías universitarias)
- llevar a un volumen final de 20 μ l con H_2O BM
- a las muestras se les agrego 30 μ l de aceite mineral

Los ciclos de la PCR fueron los siguientes:

1 min a 94°C para desnaturalizar

1 min a 60°C de animación

y 1 min a 75°C de extensión,

El número de ciclos de repetición fue determinado por una curva.

Al terminar los ciclos se dejo 5 min a 75°C.

todas las reacciones se hicieron por duplicado.

Para analizar los productos de cada reacción se corrió un gel de agarosa al 1.2% y otro de acrilamida al 5%.

Nota:

- Es importante determinar la fase exponencial antes de llevar a cabo la reacción de PCR.
- Las reacciones se deben hacer en un lugar en donde solo se hagan PCR para evitar la contaminación con otros productos.

APENDICE O

GELES DE POLIACRILAMIDA PARA DNA (Tamaño mini)

Para preparar 10 ml de gel al 5% agregar:

7.4 ml de agua bidestilada
1 ml 10x TBE*
1.5 ml 30% acrilamida (1:29 bis)
100 μ l 10% persulfato de amonio (APS)
10 μ l TEMED

El gel polimeriza en unos cuantos minutos después de agregado del catalizador TEMED.

Se debe de vaciar rápido el gel, insertar el peine y esperar cuando menos 15 minutos.

Agregar las muestras y correrlo a 100 V por Aprox. 40 min

Para teñirlo poner el gel en un recipiente con 100 ml de agua y 4 μ l de Br. Et. (10 mg/ml)

Para desteñir cambiar el agua y esperar 10 min

NOTA: Se deben de portar guantes porque el APS es neurotóxico.

El APS al 10 % es estable a 4°C durante una semana.

REFERENCIAS

1. Burg M B. Renal handling of sodium, chloride, water, aminoacids and glucose. In: Brenner B M, Rector F J, editors. The kidney. 3rd ed. New York: W.B.Saunders Company, 1986:145
2. de Wardener H E, Mills I H, Clapham W F, Hayter C J. Studies on the efferent mechanism of the sodium diuresis which follows the intravenous administration of saline in the dog. Clin Sci 1961; 21:249-258.
3. de Wardener H E. Control of sodium excretion. In: Gottschalk C W, Berliner B W, Giebisch G H, editors. Renal Physiology. People and ideas. New York: American Society of Physiology. Williams and Wilkins Company. 1987:217-246.
4. de Wardener H E. The control of sodium excretion. Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol) 1978; 235:F163-F173.
5. Fambrough M, Wolitzky B A, Tamkun M M, Takeyasu K. Regulation of the sodium pump in excitable cells. Kidney Int 1987; 32 (suppl 23):S97-S112.
6. Jorgensen P L. Structure, function and regulation of Na-K-ATPase in the kidney. Kidney Int 1986; 29:10-20.
7. Jorgensen P L. Sodium and potassium ion pump in kidney tubules. Physiol Rev 1980; 60:864-908.
8. Geck P, Heinz E. Secondary active transport: Introductory remarks. Kidney Int. 1989; 36:334-341.
9. Rector F C. Sodium, bicarbonate, and chloride absorption by proximal tubule. Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol) 1983; 244:F461-F471.
10. Schafer J A. Mechanism coupling the absorption of solutes and water in the proximal tubule. Kidney Int. 1984; 25:708-716
11. Bery C A, Rector F C. Renal transport of glucose, aminoacids, sodium, chloride and water. In: Brenner B M, Rector F J, editors. The kidney. 4th ed. Philadelphia: W.B.Saunders Company, 1991 245-282.
12. Zeidel M L, Silva P, Brenner B M. cGMP mediates effects of atrial peptides on medullary collecting duct cells. Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol) 1987; 252:F551

13. Baum M. Evidence that parallel $\text{Na}^+\text{-H}^+$ and $\text{Cl}^-\text{-HCO}_3\text{-(OH-)}$ antiporters transport NaCl in the proximal tubule. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1987; 252:F338-F345.
14. Preisig P A, Rector F C Jr. Role of $\text{Na}^+\text{-H}^+$ antiport in rat proximal tubule NaCl absorption. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1988; 255:F461-F465
15. Brenner B M, Troy J L, Daugharty T M, MacInnes R M. Quantitative importance of changes in postglomerular colloid osmotic pressure in mediating glomerulotubular balance in the rat. *J Clin invest* 1973; 52:190-197.
16. Ichikawa I, Brenner B M. Mechanism of inhibition of proximal tubule fluid reabsorption after exposure of the rat kidney to the physical effects of expansion of extracellular fluid volume. *J Clin invest* 1979; 64:1466
17. Ott C E, Haas J A, Cuche J L. Effect of increased peritubule protein concentration on proximal tubule reabsorption in the presence and absence of extracellular volume depletion. *J Clin invest* 1975; 55:612
18. Nielsen S, Pallone T, Smith B L, Christensen E I, Agre P, Maunsbach A B. Aquaporin-1 water channels in short and long loop descending thin and in descending vasa recta of rat kidney. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1995; 268:F1023-F1037.
19. Gamba G. Biología molecular de la reabsorción renal de sodio. *Rev Invest Clin* 1992; 44:545-562.
20. Molony D A, Reeves W B, Andreoli T E. $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ cotransport and the thick ascending limb. *Kidney Int* 1989; 36:418-426.
21. Greger R. Chloride reabsorption in the rabbit cortical thick ascending limb of the loop of Henle. A sodium dependent process. *Pflügers Arch* 1981; 390:38-43.
22. Hebert S C, Andreoli T E. Control of NaCl transport in the thick ascending limb. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1984; 246:F745-F756.
23. Guggino W B, Oberleithner H, Giebisch G. The amphibian diluting segment. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1988; 254:F615-F627.
24. Greger R, Schlatter E. Properties of the basolateral membrane on the cortical thick ascending limb of Henle's loop of rabbit kidney. A model for secondary active chloride transport. *Pflügers Arch* 1983; 396:325-334

25. Hebert S C, Culpepper R M, Andreoli T E. NaCl transport in mouse medullary thick ascending limbs. I. Functional nephron heterogeneity and ADH-stimulated NaCl cotransport. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1981; 241:F412-F431.
26. Hebert S C, Culpepper R M, Andreoli T E. NaCl transport in mouse medullary thick ascending limbs. II. ADH enhancement of transcellular NaCl cotransport; origin of transepithelial voltage. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1981; 241:F432-F442.
27. Sun A, Grossman E B, Lombardi M, Hebert S C. Vasopressin alters the mechanism of apical Cl⁻ entry from Na⁺:Cl⁻ to Na⁺:K⁺:2Cl⁻ cotransport in mouse medullary thick ascending limb. *J Membrane Biol* 1991; 120:83-94.
28. Haas M, McManus T J. Bumetanide inhibits (Na⁺:K⁺:Cl⁻) co-transport at a chloride site. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 1983; 245:C235-C240.
29. Haas M, Forbush III B. [3H]Bumetanide binding to duck red cells. Correlation with inhibition of (Na⁺:K⁺:Cl⁻) co-transport. *J Biol Chem* 1986; 261:8434-8441.
30. Isenring P, Forbush III B, Wang T. Mutagenic analysis of the Na-K-Cl cotransporter: Cl and bumetanide binding sites. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7:1282
31. Velazquez H, Wright F S. Effects of diuretic drugs on Na, Cl and K transport by rat renal distal tubule. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1986; 250:F1013-F1023.
32. Scherzer P, Wald H, Popovtzer M M. Enhanced glomerular filtration and Na⁺-K⁺-ATPase with furosemide administration. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1987; 252:F910-F915.
33. Ellison D H, Velazquez H, Wright F S. Adaptation of the distal convoluted tubule of the rat. Structural and functional effects of dietary salt intake and chronic diuretic infusion. *J Clin invest* 1989; 83:113-126.
34. Stanton B A, Kaissling B. Adaptation of distal tubule and collecting duct to increased Na delivery. II Na⁺ and K⁺ transport. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1988; 255:F1269-F1275.
35. Rose B D. Diuretics. *Kidney Int* 1991, 39:336-352.
36. Stokes J B, Lee I, D'Amico M. Sodium Chloride absorption by the urinary bladder of the winter flounder. A thiazide-sensitive, electrically neutral transport system. *J Clin invest* 1984; 74:7-16.

37. Ellison D H, Velazquez H, Wright F S. Thiazide-sensitive sodium chloride cotransport in early distal tubule. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1987; 253:F546-F554.
38. Velazquez H, Good D W, Wright F S. Mutual dependence of sodium and chloride absorption by renal distal tubule. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1984; 247:F904-F911.
39. Tran J M, Farrell M A, Fanestil D D. Effect of ions on binding of the thiazide-type diuretic metolazone to kidney membrane. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1990; 258:F908-F915.
40. Ellison D H, Morrisey J, Desir G V. Solubilization and partial purification of the thiazide diuretic receptor from rabbit renal cortex. *Biochem Biophys Acta* 1991; 1069:241-249.
41. Stokes J B. Sodium and potassium transport by collecting duct. *Kidney Int* 1990; 38:679-686.
42. Stokes J B, Tisher C C, Kokko J P. Structural-functional heterogeneity along the rabbit collecting tubule. *Kidney Int* 1978; 14:585-593.
43. Stokes J B, Ingram M J, Williams A D, Ingram D. Heterogeneity of the rabbit collecting tubule: Localization of mineralocorticoid hormone action to the cortical portion. *Kidney Int* 1981; 20:340-347.
44. Terada Y, Knepper M A. Thiazide-sensitive NaCl absorption in rat cortical collecting duct. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1990; 259:F519-F528.
45. Wilson D R, Honrath U, Sonnenberg H. Thiazide diuretic effect on medullary collecting duct function in the rat. *Kidney Int* 1983; 23:711-716.
46. Plotkin M D, Kaplan M R, Verlander J M, Lee W-S, Brown D, Poch E, et al. Localization of the thiazide sensitive Na-Cl cotransporter, rTSC1, in the rat kidney. *Kidney Int* 1996; 50:174-183.
47. Obermuller N, Bernstein P, Velázquez H, Reilly R, Moser D, Ellison D H, et al. Expression of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter in rat and human kidney. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1995; 269:F900-F910.
48. Hebert S C, Gamba G, Kaplan M. The electroneutral Na⁺-(K⁺)-Cl⁻ cotransport family. *Kidney Int* 1996; 49:1638-1641.
49. Gamba G. Estructura molecular de los receptores de diuréticos lumbales. *Rev Invest Clin* 1995; 47:231-249.

50. Russell J M. Cation coupled chloride influx in squid axon: role of potassium and stoichiometry of the process. *J Gen Physiol* 1983; 81:909-25.
51. Greger R, Schlatter E, Lang F. Evidence for electroneutral sodium chloride cotransport in the cortical thick ascending limb of Henle's loop of rabbit kidney. *Pflugers Arch* 1983; 396:308-314
52. Greger R, Schlatter E. Presence of luminal K^+ , a prerequisite for active $NaCl$ transport in the cortical thick ascending limb of Henle's loop of rabbit kidney. *Pflugers Arch* 1981; 392:92-94.
53. Greger R, Schlatter E. Properties of the lumen membrane of the cortical thick ascending limb of Henle's loop of rabbit kidney. *Pflugers Arch* 1983; 396:315-324.
54. Forbush III B, Palfrey H C. [3H]Bumetanide binding to membranes isolated from dog kidney outer medulla. Relationship to the Na,K,Cl co-transport system. *J Biol Chem* 1983; 258:11787-11792.
55. Haas M, Forbush III B. Photolabeling of a 150-kDa ($Na^+K^+Cl^-$) cotransport protein from dog kidney with a bumetanide analogue. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 1987; 253:C243-C250.
56. Gamba G, Miyanoshta A, Lombardi M, Lytton J, Lee W S, Hediger M A, et al. Molecular cloning, primary structure and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney. *J Biol Chem* 1994; 269:17713-17722.
57. DiPolo R, Beauge L. In squid axons ATP modulates Na^+-Ca^{2+} exchange by a Ca^{2+} -dependent phosphorylation. *Biochem Biophys Acta* 1987; 897:347-354.
58. Molony D A, Reeves W B, Hebert S C, Andreoli T E. ADH increases apical $Na^+,K^+,2Cl^-$ entry in mouse medullary thick ascending limbs of Henle. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1987; 252:F177-F187.
59. O'Donnell M E, Owen N E. Role of cyclic GMP in atrial natriuretic factor stimulation of Na^+,K^+,Cl^- cotransport in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1986; 261:15461-15466.
60. Hebert S C. Volume regulation in renal epithelial cells. *Sem Nephrol* 1987; 7:48-60.
61. Eveloff J, Warnock D K. Activation of ion transport system during cell volume regulation. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1987; 252:F1-F10.

62. Shetlar R E, Kinne R K H. Effects of extracellular osmolarity on cell volume and bumetanide-sensitive ^{86}Rb uptake in *Xenopus* oocytes. *FASEB J* 1990; 4:A563
63. Gamba G, Saltzberg S M, Lombardi M, Hediger M A, Hebert S C. A high molecular weight mRNA fraction from rat outer medulla induces expression of the $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ cotransporter in *Xenopus* oocytes. *J Am Soc Nephrol* 1990; 1:740
64. Gamba G. Clonación de la proteína Cotransportadora de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ de la vejiga urinaria del lenguado de invierno (*Pseudopleuronectes americanus*). Ciudad de México. Tesis de Doctorado en Ciencias Médicas. Facultad de Medicina UNAM, 1994.
65. Costanzo L S. Comparison of calcium and sodium transport in early and late rat distal tubules: effect of amiloride. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1984; 246:F937-F945.
66. Shimizu T, Yoshitomi K, Nakamura M, Imai M. Site and mechanism of action of trichlormethiazide in rabbit distal nephron segments perfused in vitro. *J Clin invest* 1988; 82:721-730.
67. Yoshitomi K, Shimizu T, Taniguchi J, Imai M. Electrophysiological characterization of rabbit distal convoluted tubule cell. *Pflügers Arch* 1989; 414:457-463.
68. Kunau R T, Weller D R, Webb H L. Clarification of the site of action of chlorothiazide in the rat nephron. *J Clin invest* 1975; 56:410-407.
69. Gamba G, Saltzberg S N, Lombardi M, Miyanoshita A, Lytton J, Hediger M A, et al. Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the thiazide-sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:2749-2753.
70. Xu J-C, Lytle C, Zhu T T, Payne J A, Benz Jr.E, Forbush III B. Molecular cloning and functional expression of the bumetanide-sensitive $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{Cl}^-$ cotransporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:2201-2205.
71. Forbush III B, Haas M, Lytle C. $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{Cl}^-$ cotransport in the shark rectal gland. I. Regulation in the intact perfused gland. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 1992; 262 C1000-C1008.
72. Gamba G, Miyanoshita A, Lombardi M, Hebert S C. Cloning, functional characterization, and tissue distribution of the thiazide-sensitive $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ cotransporter of the winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) urinary bladder. *J Gen Physiol* 1992; 100.8a

73. Payne J A, Stevenson T J, Donaldson L F. Molecular characterization of a putative K-Cl cotransporter in rat brain. A neuronal-specific isoform. *J Biol Chem* 1996; 271:16245-16252.
74. Gillen C M, Brill S, Payne J A, Forbush III B. Molecular cloning and functional expression of the K-Cl cotransporter from rabbit, rat and human. A new member of the cation-chloride cotransporter family. *J Biol Chem* 1996; 271:16237-16244.
75. Kaplan M R, Mount D B, Delpire E, Gamba G, Hebert S C. Molecular mechanisms of NaCl cotransport. *Annu Rev Physiol* 1996; 58:649-668.
76. Gamba G, Miyanoshita A, Lombardi M, Lytton J, Lee W S, Hediger M A, et al. The electroneutral Na⁺:(K⁺):Cl⁻ cotransporters belong to the same family of membrane proteins. *J Am Soc Nephrol* 1993; 4:866
77. Igarashi P, Vanden Heuvel G B, Payne J A, Forbush III B. Cloning, embryonic expression, and alternative splicing of a murine kidney-specific Na-K-Cl cotransporter. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1995; 269:F406-F418.
78. Payne J A, Forbush III B. Alternatively spliced isoforms of the putative renal Na-K-Cl cotransporter are differentially distributed within the rabbit kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:4544-4548.
79. Simon D B, Karet F E, Hamdan J M, Di Pietro A, Sanjad S A, Lifton R P. Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nature Genetics* 1996; 13:183-188.
80. Delpire E, Rauchman M I, Beier D R, Hebert S C, Gullans S R. Molecular cloning and chromosome localization of a putative basolateral Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter from mouse inner medullary collecting duct (miMCD-3) cells. *J Biol Chem* 1994; 269:25677-25683
81. Payne J A, Xu J-C, Haas M, Lytle C Y, Ward D, Forbush III B. Primary structure, functional expression, and chromosomal localization of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter in human colon. *J Biol Chem* 1995; 270:17977-17985.
82. Simon D B, Nelson-Williams C, Johnson-Bia M, Ellison D, Karet F E, Morey-Molina A, et al. Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Nature Genetics* 1996; 12:24-30.
83. Plata C, Mount D B, Hebert S C, Gamba G. Functional interaction between isoforms of the apical bumetanide-sensitive Na-(K)-Cl cotransporter. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7:1288

84. Kunchaparty S, Bernstein P L, Bartiss A, Desir G V, Reilly R, Ellison D H. Evidence for alternative splicing of the thiazide-sensitive Na-Cl transporter in mouse kidney. *FASEB J* 1995; 9:A586 Abstract.
85. Lagler K F, Bardach J E, Miller R R. *Ichthyology*. New York: New York Wiley, 1962.
86. Hirano T, Johnson D W, Bern H A. Control of water movement in flounder urinary bladder by prolactin. *Nature* 1971; 230:45-47.
87. Renfro J L. Water and ion transport by the urinary bladder of the teleost *Pseudopleuronectes americanus*. *Am J Physiol* 1975; 228:52-61.
88. Hogben C A, Brandes M, Danforth J, Forster R P. Ion transport by the isolated urinary bladder of teleost, *Hemitripterus americanus*. *Mount Desert Island Biological Laboratory Bulletin* 1972; 12:52-57.
89. Renfro J L, Miller D S, Karnaky K L, Kinter W B. Na-K-ATPase localization in teleost urinary bladder by [³H]ouabain autoradiography. *Am J Physiol* 1976; 231:1735-1743.
90. Lahlou B. Excretion renale chez un poisson euryhalin, le flet (*Platichthys flesus* L.): Caractéristiques de l'urine normale en eau douce et en eau de mer et effets des changements de milieu. *Comp Biochem Physiol* 1967; 20:925-938.
91. Fleming W R, Stanley J G. Effect of rapid changes in salinity on the renal function of a euryhaline teleost. *Am J Physiol* 1965; 209:1025-1030.
92. Renfro J L. Interdependence of active Na⁺ and Cl⁻ transport by the isolated urinary bladder of the teleost, *pseudopleuronectes americanus*. *J Exp Zool* 1978; 199:383-390.
93. Drewnowska K, Baumgarten C M. Regulation of cellular volume in rabbit ventricular myocytes: bumetanide, chlorthiazide, and ouabain. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 1991; 260:C122-C131.
94. Clader J A, Schacheter M, Sever P S. Direct vascular actions of hydrochlorothiazide and indapamide in isolated small vessels. *Eur J Pharmacol* 1992; 220:19-26.
95. Cremaschi D, Porta C, Riccardi D, Botta G, Meyer G. The three forms of NaCl neutral entry are all present in the apical membrane of rabbit gallbladder epithelium. *J Gen Physiol* 1992; 100:45a
96. Bernstein P L, Zawalach W, Bartiss A, Reilly R, Palcso M, Ellison D H. The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter is expressed in rat endocrine pancreas. *J Am Soc Nephrol* 1995; 6:732 Abstract.

97. Barry E L R, Gesek F A, Friedman P A. Expression of the thiazide-sensitive Na:Cl cotransporter in osteoblast-like cells. *J Am Soc Nephrol* 1994; 5:282 Abstract.
98. Baekgaard A, Lombardi M, Hebert S C. Cloning and characterization of the bumetanide-sensitive Na-(K)-Cl cotransporter from mouse kidney outer medulla (OM). *J Am Soc Nephrol* 1994; 5:282 Abstract.
99. Kaplan M R, Plotkin M D, Lee W-S, Xu Z-C, Lytton J, Hebert S C. Apical localization of the Na-K-Cl cotransporter, rBSC1, on rat thick ascending limbs. *Kidney Int* 1996; 49:40-47.
100. Loon N R, Wilcox C, Unwin R J. Mechanism of impaired natriuretic response to furosemide during prolonged therapy. *Kidney Int* 1989; 36:682-689.
101. Brigitte K. Structural aspects of adaptive changes in renal electrolyte excretion. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1982; 243:F211-F226.
102. Kaissling B, Bachmann S, Kriz W. Structural adaptation of the distal convoluted tubule to prolonged furosemide treatment. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1985; 248:F374-F381.
103. Kaissling B, Hir M L. Distal tubular segments of the rabbit kidney after adaptation to altered Na- and K-intake. I Structural changes. *Cell Tissue Res* 1982; 224:469-492.
104. Hir M L, Kaissling B, Dubach U C. Distal tubular segments of the rabbit kidney after adaptation to altered Na- and K-intake. II. Changes in Na-K-ATPase activity. *Cell Tissue Res* 1982; 224:493-504.
105. Chen Z, Vaughn D A, Beaumont K, Fanestil D D. Effects of diuretic treatment and of dietary sodium on renal binding of 3H-metolazone. *J Am Soc Nephrol* 1990; 1:91-98.
106. Kaissling B, Stanton B A. Adaptation of distal tubule and collecting duct to increased sodium delivery. I Ultrastructure. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1988; 255:F1256-F1268.
107. Morsing P, Velazquez H, Wright F S, Ellison D H. Adaptation of distal convoluted tubule of rats. II. Effects of chronic thiazide infusion. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1991; 261:F137-F143.
108. Rocco-Neilson E, Hoyer J, Ziyadeh F. Attenuated expression of epithelial cell adhesion molecules in murine polycystic kidney disease. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1992; 262:F679-F686.

109. Ahn K Y, Turner P B, Madsen K M, Kone B C. Effects of chronic hypokalemia on renal expression of the "gastric" H⁺-K⁺-ATPase α -subunit gene. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1996; 270:F557-F566.

110. Stauffer T P, Hilfiker H, Carafoli E, Strehler E E. Quantitative analysis of alternative splicing options of human plasma membrane calcium pump genes. *J Biol Chem* 1993; 266:25993-26003.