

00524
26



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

La Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: CASTILLA RAMIREZ
Salvador Antonio

FECHA: 24/ JUNIO/ 2003

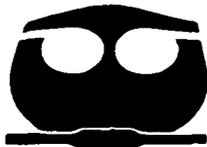
IDENTIFICACION DEL ^{TRABAJOS} TRANSCRITO DE UN CANAL DE POTASIO (Kv1.3) DEL RIÑON DE RATA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

SALVADOR ANTONIO / CASTILLA RAMIREZ



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2003



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.

PAGINACION DISCONTINUA

o Jurado asignado:

Presidente	Dra. Irma Ofelia Bernal Lugo
Vocal	Dra. Elena Zambrano González
Secretario	Dra. Laura Escobar Pérez
1º. Suplente	Dr. Ignacio Camacho Arroyo
2º. Suplente	Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

o Sitio donde se desarrolló el tema:

UNAM Facultad de Medicina, Departamento de Fisiología, Laboratorio 510,
UNAM Facultad de Medicina, Departamento de Microbiología, Sexto Piso,
UNAM

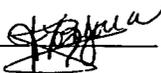
o Asesor del tema:

Dra. Leonila Irma Laura Escobar Pérez



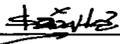
o Supervisor técnico:

Dra. Haydée Torres-Guerrero



o Sustentante:

Salvador Antonio Castilla Ramírez



**"Todo lo que se quiere alcanzar en la vida empieza como un simple sueño,
muerto se está cuando uno deja de soñar"**

Este trabajo se desarrolló bajo la dirección de:

Dra. Laura Escobar Pérez
Departamento de Fisiología
Facultad de Medicina
UNAM.

El financiamiento para la realización de este trabajo fue proporcionado por:

DGAPA IN233802

CONACyT 30570-M

A

A mis padres (por haberme brindado la oportunidad de estar en esta vida).

Salvador Castilla Hernández, por compartir conmigo uno de los tesoros más grandes que se necesitan para alcanzar el éxito: la libertad. Gracias por confiar ciegamente en mí y en todos mis actos, sin esperar nada a cambio. Te amo papá.

Rebeca Ramírez Herrera; por haber puesto en mí todos sus sueños y esperanzas, por continuar soportando la pesada carga del hogar, poniendo toda su entrega, amor y paciencia en los actos que a diario realiza. Te amo mamá.

A mis hermanos (cómplices de este sueño).

Héctor y Lizbeth; hoy comprendo que todas las disputas y consensos a los que llegamos, forman parte del combustible que nos continúa impulsado para alcanzar todo lo que queremos lograr. A ti Héctor agradezco la sensatez y serenidad de tu carácter, a ti Lizbeth agradezco tu tiempo y paciencia hacia conmigo; ya que estos detalles, junto con nuestros defectos y virtudes, permiten que se alcance el equilibrio de esta gran familia.

A Georgina Güereca (compañera eterna de esta aventura).

Gina; te estoy eternamente agradecido por haber llegado a ocupar ese lugar que te hacía falta a mi vida, ya que desde que apareciste te has convertido en partícipe de todos mis triunfos y todas mis derrotas, tu carácter y tu sabiduría te convierten en un ser extraordinario. Gracias por ser mi amiga y compañera en todo momento y sobretodo gracias por amarme de esa manera.

Con especial cariño:

A la **Dra. Laura Escobar Pérez**, ya que sin su apoyo y confianza, este momento no sería posible.

A la **Dra. Haydée Torres-Guerrero**, figura fundamental en la realización del presente trabajo. Pocas personas tienen y comparten los conocimientos como lo hace usted.

Al profesor **Alexandro Bonifaz**, por haberme brindado su amistad y la oportunidad de experimentar en sus clases y dentro de ese "gran" laboratorio, mis primeros pasos como "profesionista"; por que creo que los hongos llegaron a mi vida para indicarme por donde debo continuar. A ti Alex, todo mi respeto y agradecimiento por tu confianza y atención hacia conmigo.

Al **Dr. Juan Bolívar**, por compartir sus conocimientos experimentales.

A la **M. en C. Carolina Salvador**, por enseñarme a hacer bien y mejor las cosas.

A **Rolando Carrisoza**, un amigo difícil de encontrar.

A **Julio Castillo**, mi eterna admiración por demostrar ese coraje para enfrentar las cosas buenas y malas que tiene la vida.

A **Bianquita García**, por lo que puede llegar a ser.

A todos mis seres queridos que se me han adelantado en el transcurso de este viaje.

AGRADECIMIENTOS:

A mi jurado revisor: Dra. Irma Bernal, Dra. Helena Zambrano, Dra. Laura Escobar y Dra. Haydée Torres; a cada una de ustedes les agradezco la paciencia brindada en la revisión de este trabajo, así como sus valiosos comentarios y sugerencias.

A todos los integrantes de mi familia, a los que creyeron y a los que dudaron de este mi proyecto de vida, sobre todo a aquellos que me apoyaron moral y económicamente, muchas gracias.

A todos mis amigos: Osiris, Aleph, Gil, Teco, Areli, Isafas, Miguel, Claudia, Hansen, Iván y Alexis, y a los que han integrado las diferentes etapas de mi vida, todo mi cariño.

A todos los profesores que contribuyeron e hicieron posible mi formación, siempre les estaré agradecido.

A todos mis compañeros del laboratorio 510 de fisiología: Mónica, Ivonne, Gloria, Carolina, Rolando, Julio, Philip, y Laura; nunca los voy a olvidar.

A todos los integrantes del laboratorio de micología del Hospital General de México: Dra. Palacios, Marco, Xavier, Margarita, Ileri, Tonatiuh, Alma y Alex, gracias por haberme permitido ser partícipe de tan maravillosa tarea, brindar salud.

Y sobre todo mi eterno cariño y agradecimiento a la UNAM y todas las instituciones en las cuales tuve la oportunidad de crecer.

ABREVIATURAS

ADH	Hormona antidiurética
ADN	Acido desoxiribonucleico
AMPc	Monofosfato ciclico de adenosina
ARN	Acido ribonucleico
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
ATP	Trifosfato de adenosina
BrEt	Bromuro de etidio
Cl ⁻	Cloruro (ión)
COO ⁻	Carboxilo (ión)
DTT	Ditiotreitol
DEPC	Dietil pirocarbonato
dNTP's.	Desoxinucleótidos trifosfatados
EDTA	Acido etilendiaminotetracético
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GLB	Gel loading buffer (buffer de cargado)
HCl	Acido clorhídrico
H ₂ O-DEPC	Agua dietil pirocarbonato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
K ⁺	Potasio
K _{ATP}	Canales de potasio sensibles a ATP
Kir	Canales de potasio rectificadores entrantes
Kv	Canales de potasio dependientes de voltaje
Mg ²⁺	Magnesio (ión)
MgCl	Cloruro de magnesio
MOPS	Acido 3-(N-morfolino) propano sulfónico
MP	Marcador de peso molecular
NH ⁺	Amino (ión)
N ₂	Nitrógeno
Na ⁺	Sodio (ión)
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
PIP ₂	Fosfatidil inositol bifosfato
pS	pico Siemens
RT	Retrotranscriptasa; reacción de
RT-Pol	Retrotranscriptasa reversa polimerasa
S _x ⁻	Segmento transmembranal
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SSC	Solución salina concentrada
Taq-Pol	ADN polimerasa
TBE	Tris, boratos, EDTA
TC	Túbulo colector
TCD	Túbulo contorneado distal
TCME	Túbulo colector de la médula externa
TCMI	Túbulo colector de la médula interna
TCP	Túbulo contorneado proximal
TE	Tris, EDTA

INDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	
2.1 Función renal	3
2.2 Morfología renal	4
2.3 Membrana celular y canales iónicos	9
2.4 Transporte de potasio	12
2.5 Canales de potasio	
2.5.1 Canales de potasio dependientes de voltaje	13
2.5.2 Canales de potasio en el riñón	17
2.6 Expresión génica	18
2.6.1 Estrategias para el análisis de la expresión de un gen	21
3. OBJETIVOS	25
4. MATERIALES Y METODOS	26
5. RESULTADOS	
5.1 Obtención del ARN por el método del trizol	28
5.2 Obtención de ADN genómico	28
5.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	29
5.4 Purificación de los productos de PCR	32
5.5 Marcaje de las sondas	35
5.6 Análisis de Dot blot	36
5.7 Análisis de Northern blot	37
6. ANALISIS DE RESULTADOS	42
7. CONCLUSIONES.....	52
8. BIBLIOGRAFÍA	53
9. APENDICE DE PROTOCOLOS	
9.1 Tratamiento para eliminar nucleasas	59

9.2 Gel de agarosa al 1% (ADN)	59
9.3 Gel de agarosa al 1% (ARN)	59
9.4 Mezcla desnaturalizante para muestras de ARN	59
9.5 Aislamiento de ARN por el método del trizol	60
9.6 Aislamiento de ADN genómico	61
9.7 Reacción de la transcriptasa reversa (RT)	62
9.8 Reacción en cadena de la polimerasa	62
9.9 Purificación de los productos de PCR	63
9.10 Marcaje quimioluminiscente de las sondas	64
9.11 Marcaje radiactivo de las sondas	65
9.12 Análisis de Dot blot	66
9.13 Análisis de Northern blot (transferencia)	67
9.14 Hibridación quimioluminiscente	69
9.15 Hibridación radiactiva	70
9.16 Generación de la señal quimioluminiscente	71
9.17 Autoradiografía	71

1. RESUMEN

El riñón es el responsable de regular el contenido de iones y de agua en los organismos superiores, además de eliminar los compuestos que resultan de la degradación metabólica. Su función principal es el mantenimiento de la homeostasis del volumen y composición de los líquidos corporales. Esta función se lleva a cabo a través de tres procesos fundamentales: filtración glomerular, reabsorción y secreción tubular. El túbulo colector de la médula interna (TCMI) juega un papel fundamental en la regulación de la homeostasis de electrolitos por medio de la absorción de sodio (Na^+) y la absorción y/o secreción de potasio (K^+).

El K^+ interviene en distintas funciones celulares, fundamentalmente en el mantenimiento del potencial de membrana. La capacidad de cada segmento del túbulo renal para secretar K^+ depende de la permeabilidad y del transporte de este ión en las membranas luminal y basolateral. Los canales iónicos constituyen una extensa familia de proteínas integrales de membrana, responsables de facilitar selectivamente el transporte pasivo de iones a través de la membrana celular. Los canales de K^+ representan la clase más amplia y diversa de los canales iónicos. En el riñón los canales de K^+ se encuentran involucrados en los mecanismos por los cuales las células de los túbulos renales mantienen el fluido y equilibrio electrolítico, además de participar en la generación de un potencial celular negativo que provee una importante fuerza motriz la cual favorece el movimiento de solutos cargados a través de las membranas apical y basolateral de las células de los túbulos renales.

El dogma tradicional empleado durante muchos años para distinguir a las células excitables de las no excitables parece no ser compatible con la existencia de canales iónicos dependientes de voltaje en las células no excitables. Gracias a las técnicas de fijación de voltaje (patch clamp) se ha demostrado la existencia de canales iónicos dependientes de voltaje en estas células. El papel funcional de los canales iónicos en las células epiteliales se relaciona principalmente con los mecanismos de señalización, el transporte vectorial de iones y la regulación del volumen celular, principalmente. Sin embargo, la presencia y la caracterización funcional de los canales iónicos en estas células ha sido poco estudiada en

comparación con las células excitables. En el riñón se ha reportado la presencia de dieciséis canales de potasio, de los cuales sólo dos miembros pertenecen a la familia de canales dependientes de voltaje ($Kv_{1.5}$ y $Kv_{1.10}$).

Nuestro equipo de trabajo ha estudiado las corrientes de potasio en los cultivos celulares primarios del TCM1 por "patch clamp". Este trabajo tiene como objetivo estudiar la expresión del gen *KCNA3*, el cual codifica para un canal de potasio en las células del epitelio renal mediante análisis de tipo Northern blot, Dot blot y RT-PCR. Los canales $Kv_{1.3}$ se han identificado en diversos tipos celulares: linfocitos, sistema nervioso central, hígado, músculo esquelético, espermatozoides, por citar algunos ejemplos. Los canales $Kv_{1.3}$ participan en una gran variedad de funciones celulares en las células excitables como son la apoptosis, la regulación del volumen celular y la proliferación de células T, sin embargo, no existe en la actualidad referencia alguna que indique el papel funcional de estos canales en las células del epitelio renal.

2. INTRODUCCION

2.1 FUNCION RENAL

El riñón junto con los uréteres, la vejiga urinaria y la uretra, constituyen el aparato urinario. El riñón es un órgano par sólido, en el cual se llevan a cabo una gran parte de los procesos que contribuyen a la homeostasis de los líquidos y electrolitos, además de ser uno de los órganos responsables de la constancia del medio interno en los organismos multicelulares. Dichas funciones se realizan fundamentalmente mediante tres procesos: filtración glomerular, reabsorción tubular y secreción tubular. El aparato urinario (figura 2.1) constituye el principal medio del que dispone un organismo para eliminar toxinas, productos de desecho del metabolismo, así como sustancias extrañas que son ingeridas o producidas por el cuerpo.

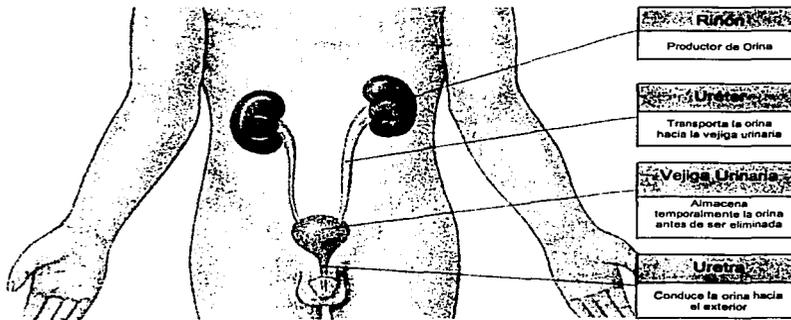


Figura 2.1 Componentes del aparato urinario: riñones, uréteres, vejiga y uretra. Los riñones se encargan de producir la orina a partir del plasma, la orina es transportada hacia la vejiga a través de los uréteres, en donde se almacena temporalmente antes de ser expulsada hacia el exterior a través de la uretra (Martini.,1995).

Los riñones llevan a cabo sus funciones más importantes filtrando el plasma y eliminando las sustancias del filtrado, según las necesidades de cada organismo. Como resultado de su función, los riñones forman orina, la cual debe ser expulsada constantemente del organismo. Además, los riñones son considerados órganos

endocrinos, ya que se encargan de producir hormonas y autacoides como la eritropoyetina y las prostaglandinas (Guyton.,2001). Entre las principales funciones que llevan a cabo los riñones, se encuentran:

- Excreción de productos metabólicos de desecho y de sustancias químicas extrañas.
- Regulación del equilibrio hídrico y electrolítico.
- Regulación de la *osmolalidad* de los líquidos corporales
- Regulación del equilibrio ácido-base.
- Regulación de la presión arterial.
- Secreción, metabolismo y excreción de hormonas.
- *Gluconeogénesis*.

Los riñones se encargan de generar un ambiente celular estable, resultado del equilibrio entre los ingresos y las pérdidas de agua y de la mayoría de los electrolitos del organismo, el cual es necesario para que las células efectúen sus actividades. Los riñones también contribuyen a la regulación de la presión arterial a corto plazo mediante la secreción de factores o sustancias vasoactivas como la renina, y es el único medio con que cuenta el organismo para eliminar del cuerpo los ácidos generados en el metabolismo de las proteínas, como lo son el ácido sulfúrico y el ácido fosfórico (Guyton.,2001).

2.2 MORFOLOGIA RENAL

En el hombre, los riñones se localizan a ambos lados de la columna vertebral, en la parte posterior del abdomen, al nivel de la costilla 12, entre las dos últimas vértebras dorsales y las cuatro primeras lumbares. Cada riñón presenta una coloración rojo-parduzca y tiene la forma de un frijol, contiene un polo superior y uno inferior, una cara anterior y una posterior, así como un borde externo convexo y un borde interno cóncavo. La superficie anterior del riñón derecho esta cubierta por el hígado, la porción hepática del colon y el duodeno. Por su parte, la superficie anterior del riñón izquierdo esta cubierta por el estomago, el páncreas, el yeyuno y la porción esplénica del colon (Muñoz-Martínez.,2000).

La superficie posterior de ambos riñones es plana, y se encuentra relacionada con el diafragma. Sobre la superficie superior de ambos riñones se localizan las glándulas adrenales (figura 2.2). La superficie externa de cada riñón es lisa y se hace rodear por una fina capa fibrosa denominada cápsula renal, mientras que la cara interna posee una hendidura denominada hilio, a través de la cual penetran el uréter, la arteria y la vena renal (figura 2.2). Si el riñón se divide en dos, mediante un corte sagital, pueden distinguirse macroscópicamente dos regiones que conforman el parénquima renal: la corteza externa y la médula interna (Martini.,1995).

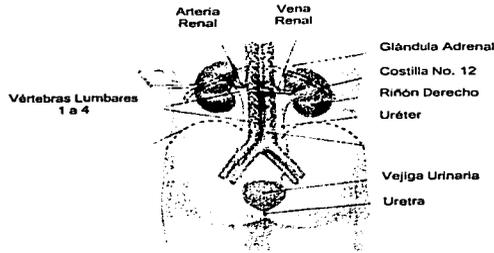


Figura 2.2 Vista posterior de un tronco humano, en el se puede observar la forma y posición que ocupan los componentes del sistema urinario, incluyendo los riñones (Martini.,1995).

La corteza renal es un tejido fácilmente distinguible en el cual se localizan los glomérulos. Presenta una coloración marrón y una textura granular, y se introduce en los espacios situados entre las pirámides renales. El tejido colector que se encuentra rodeado por las pirámides renales recibe el nombre de columnas de Bertin.

La médula es de aspecto estriado, se localiza en la vecindad del sistema colector y se encuentra formada por una serie de estructuras cónicas denominadas pirámides renales, cuyas bases se encuentran dirigidas hacia la corteza y sus vértices o papilas hacia el hilio, penetrando la pelvis renal (figura 2.3). Los vértices papilares se conectan con el sistema excretor externo, formado por los cálices menores, los cálices mayores y la pelvis renal (Tresguerres.,1992).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

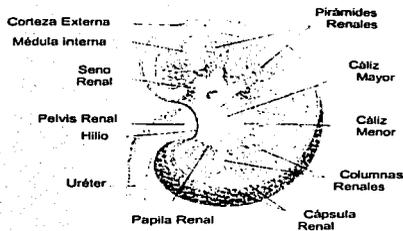


Figura 2.3 Vista frontal de un riñón humano en el que se muestran las estructuras sobresalientes que lo componen (Martini.,1995).

La nefrona representa la unidad anatómica funcional del riñón, en ella comienza la producción de orina mediante los procesos de filtración, reabsorción y secreción. En el humano se estima que en cada riñón existen alrededor de 1 millón de neuronas (Martini.,1995). Cada una de las nefronas se constituye por un túbulo renal, un asa de Henle, y un ramillete de capilares que se ramifican entre sí, denominados glomérulos, en los que se lleva a cabo la producción del ultrafiltrado a partir del plasma.

Cada uno de los glomérulos se encuentra recubierto por la cápsula de Bowman (Guyton.,2001). El túbulo renal tiene una longitud de aproximadamente 50 nm, es el sitio en donde el ultrafiltrado se convierte en orina y se compone de dos segmentos contorneados, proximal y distal, separados por un tubo sencillo en forma de U (figura 2.4).

Los cálices mayores son pequeñas bolsas de extremos abiertos, las cuales se extienden por la parte inferior para dividirse en los cálices menores, encargados de recoger la orina proveniente de los túbulos de cada una de las papilas. La médula suele dividirse por entre 8 y 12 pirámides renales. En las pirámides renales se puede observar la presencia de estriaciones lineales denominadas rayos medulares, las cuales corren del borde superior hacia arriba, conteniendo los túbulos colectores y el asa de Henle (Tresguerres.,1992).

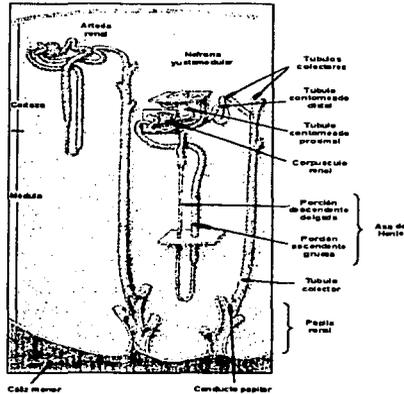


Figura 2.4 Localización y componentes de la nefrona, se muestra su ubicación tanto en la corteza, como en la médula renal (Martini.,1995).

Las nefronas difieren ligeramente en su estructura dependiendo de su localización. Las nefronas corticales representan el 70% del total de las nefronas, sus glomérulos se localizan en la parte externa de la corteza del riñón y presentan asas de Henle cortas. Por su parte, las nefronas cuyos glomérulos se localizan cerca de la médula se denominan yuxtamedulares, representan el 30% del total de las nefronas y se caracterizan por presentar asas de Henle largas, las cuales se internan profundamente en la médula, extendiéndose en ocasiones hasta la papila renal (figura 2.4).

El túbulo contorneado proximal (TCP) tiene su origen en la corteza renal, para después unirse con la porción descendente del asa de Henle, su capa interna se compone de un epitelio simple, cuya superficie expuesta se encuentra recubierta por una serie de microvellos. La función principal del TCP es llevar a cabo la absorción activa de nutrientes orgánicos, iones, así como proteínas del plasma, todos ellos a partir del fluido tubular, para luego ser liberados en el fluido intersticial. Las células

epiteliares del TCP pueden llegar a secretar algunas sustancias hacia el lumen (Guyton.,2001). El asa de Henle se divide en: un segmento delgado descendente, un segmento delgado ascendente y un segmento grueso ascendente.

El segmento delgado descendente se interna en la médula renal en dirección a la pelvis y posteriormente retorna a la corteza renal a través del segmento delgado descendente, para conectarse con el túbulo contorneado distal a través de su porción gruesa ascendente. El segmento grueso ascendente tiene su inicio dentro de la médula y termina en la corteza. Contiene mecanismos de transporte activo, encargados de bombear iones Na^+ y Cl^- a partir del fluido peritubular. Por su parte, los segmentos delgados de las ramas ascendente y descendente se localizan únicamente en la médula renal (Muñoz-Martínez.,2000)

El túbulo contorneado distal (TCD) es aquel que continua a la porción gruesa ascendente del asa de Henle. Corresponde al último segmento de la nefrona, presenta un diámetro menor al del TCP y desemboca en el sistema colector. Es el sitio en donde se lleva a cabo la secreción activa de iones, ácidos y otros compuestos. Al TCD le siguen el túbulo de conexión, el túbulo colector cortical, el conducto colector y el conducto papilar (Martini.,1995).

Los túbulos colectores individuales se encargan de conectar cada nefrona con el conducto colector más cercano. La agrupación de 8 a 10 túbulos colectores corticales da como resultado la formación de un conducto colector más grande, el cual se adentra en la médula para convertir a los túbulos colectores corticales en túbulos colectores de la médula, que dependiendo de su profundidad se clasifican en túbulos colectores de la médula externa (TCME) y túbulos colectores de la médula interna (TCMI). Además de transportar la orina de la nefrona a la pelvis renal, el sistema colector se encarga de llevar a cabo los últimos ajustes en cuanto al volumen y la concentración osmótica (Guyton.,2001).

Los conductos colectores medulares formados por los túbulos colectores, se aglomeran hasta formar conductos cada vez mayores, los cuales vacían su contenido en la punta de las papilas renales ubicadas en la pelvis renal. Como resultado final de los procesos de filtración glomerular, reabsorción y secreción tubular se obtiene la orina, la cual es expulsada de los riñones hacia la vejiga, a

través de elementos contráctiles presentes en los cálices, en la pelvis renal y en los uréteres. Finalmente, la orina es almacenada en la vejiga durante un período razonable y expulsada hacia el exterior del organismo a través de la uretra mediante la micción (Guyton.,2001).

2.3 MEMBRANA CELULAR Y CANALES IONICOS

La membrana plasmática funciona como un regulador del tráfico molecular, al ser permeable a pequeñas moléculas liposolubles e impermeable a moléculas hidrosolubles. La impermeabilidad de la membrana celular permite que las concentraciones iónicas en el interior de la célula se mantengan en niveles diferentes a las del fluido extracelular, generándose con esto una diferencia de potencial entre el citoplasma y el medio externo. La diferencia de potencial, combinada con los gradientes de concentración iónicos, favorece la creación de un gradiente electroquímico a través de la membrana celular, el cual es empleado por la célula para generar sistemas de señalización y control (Lehninger.,1995).

La membrana plasmática se encuentra constituida por fosfolípidos, dentro de los cuales se localizan una gran variedad de proteínas; el resto lo integran azúcares presentes en forma de glucoproteínas y glucolípidos (figura 2.5A). Las proteínas integradas en la membrana se mantienen unidas a los lípidos mediante interacciones hidrofóbicas no covalentes, característica que le permite a la membrana celular poseer un alto grado de flexibilidad y con ello cambios en la forma y tamaño de la célula.

Las membranas plasmáticas de todo tipo de célula, contienen una gran variedad de proteínas especializadas capaces de integrar y transportar nutrientes hacia el interior de la célula (citósol), y expulsar productos de desecho hacia el exterior. Además, algunas proteínas le conceden a la membrana plasmática la capacidad de retener o excluir ciertos compuestos e iones dentro de la célula y dentro de compartimientos celulares específicos (Lehninger.,1995). Estas proteínas reciben el nombre de proteínas de membrana, y pueden actuar como proteínas transportadoras, receptores de señales y canales iónicos (figura 2.5B).

La estructura básica de los tejidos epiteliales corresponde a una lámina continua de células estrechamente asociadas entre sí, la cual se adhiere a una matriz extracelular subyacente a ella, la matriz extracelular es escasa y se ubica por debajo de las de células epiteliales formando una delgada capa llamada membrana basal. En los tejidos epiteliales, las células se encuentran estrechamente unidas entre sí formando láminas.

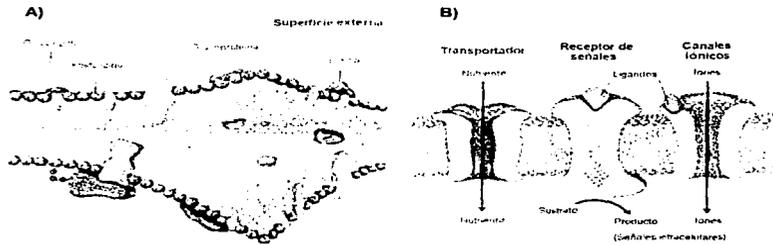


Figura 2.5 (A) Principales componentes de la membrana plasmática. (B) Se ilustran las tres clases de proteínas de membrana: transportadores, receptores de señales y canales iónicos (Lehninger.,1995).

La función particular del tejido epitelial es formar barreras selectivas mediante uniones especializadas, capaces de cubrir las superficies externas del organismo y delimitar las diferentes superficies internas existentes en los distintos órganos. La presencia de uniones especializadas entre sus células permite a los epitelios formar barreras para el movimiento de agua, solutos o células, desde un compartimento corporal a otro. De esta manera se distinguen dos zonas con diferente morfología en la membrana plasmática de las células epiteliales, la zona apical y la zona basolateral (Lehninger.,1995).

Las membranas apicales se caracterizan por presentar microvellocidades o plegamientos en la superficie de la membrana plasmática, los cuales se encargan de aumentar considerablemente la superficie de absorción, mientras que las membranas basolaterales presentan un complejo de unión especializado, cuya función es mantener la contigüidad celular al permitir que los epitelios formen

barreras entre los diferentes compartimientos corporales, proporcionando con ello solidez a las láminas celulares, al mismo tiempo que evita el paso de sustancias por la vía intracelular. Actualmente se conocen dos tipos de proteínas de membrana involucradas en el transporte de pequeñas moléculas hidrosolubles e iones: los transportadores y los canales iónicos. Los transportadores sufren cambios alostéricos durante el paso de moléculas, mientras que los canales iónicos forman un poro hidrófilico estrecho, el cual permite el movimiento pasivo de iones a través de él (Lehninger.,1995).

Los canales iónicos son proteínas de membrana responsables de la transferencia de iones específicos. Los canales iónicos son poros acuosos que pueden abrirse o cerrarse para permitir el flujo de iones a través de la membrana celular (Aidley.,1998). Estos canales constituyen una ruta transmembranal alternativa en el transporte de solutos a través de la membrana e incluso mas eficiente que la de los transportadores, ya que cuando los canales iónicos se encuentran abiertos, pueden fluir a través de ellos alrededor de un millón de iones por segundo sin requerir de alguna fuente de energía (Alberts.,1994). Así mismo, su cierre o apertura se encuentra en función de la respuesta a un estímulo. De esta manera, la función de los canales iónicos es permitir el paso acelerado de iones específicos (Na^+ , Ca^+ , K^+ o Cl^-) a través de una bicapa lipídica, siempre a favor de un gradiente de concentración.

Los mecanismos de apertura y selectividad son características que distinguen a los canales iónicos de ser simples poros acuosos. Algunos canales iónicos se abren al combinarse con moléculas específicas localizadas dentro y fuera de la membrana, como los neurotransmisores o los mensajeros citoplasmáticos, mientras que otros llevan a cabo su apertura en respuesta a cambios en el voltaje de la membrana, o bien, a través de estímulos sensoriales. Los canales iónicos se localizan en todas las células de animales, de plantas y de microorganismos. Su función se ha relacionado ampliamente con los fenómenos de excitabilidad eléctrica en el músculo y en el sistema nervioso central, así como en la regulación del potencial de membrana celular (Ashcroft F.,2000).

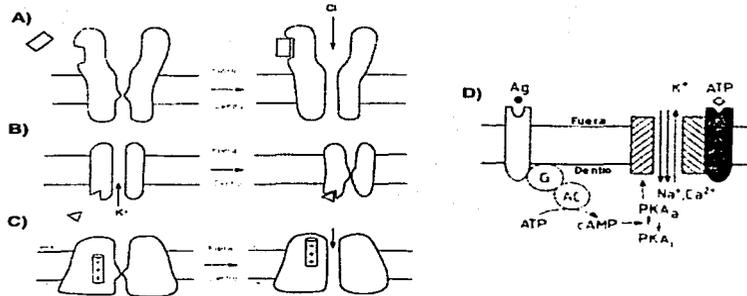


Figura 2.6 Diferentes mecanismos involucrados en la actividad de los canales iónicos. (A) Canal selectivo a iones Cl⁻, su apertura es en respuesta a un neurotransmisor. (B) Canal selectivo a iones K⁺, su cierre se presenta por unión a ligandos internos, como el ATP. (C) Canal dependiente de voltaje selectivo a iones Ca²⁺, su apertura se presenta cuando el potencial de membrana interno comienza a tornarse muy positivo (Aidley D., 1998). (D) Canal catiónico no selectivo, su apertura se presenta por la unión de un agonista a un receptor acoplado a proteínas G, el cual activa a la adenilato ciclasa (AC) generando AMPc. El AMPc generado activa a la proteína cinasa A (PK-A), permitiendo de esta manera la entrada iones Na⁺ y Ca²⁺ y la salida de iones K⁺, a través del canal. El canal se puede activar directamente por la unión de ATP extracelular a un receptor.

2.4 TRANSPORTE DE POTASIO

El movimiento de iones a través de la membrana plasmática, así como la apertura de un canal, son fenómenos que dependen tanto del campo eléctrico, como de la concentración de los iones localizados dentro y fuera de la membrana (tabla 2.1). Las diferencias en cuanto a la concentración de los iones genera gradientes de concentración, los cuales son mantenidos por una serie de bombas y algunos transportadores, localizados en la superficie de la membrana celular (Aidley., 1998).

Tabla 2.1 CONCENTRACION DE IONES DENTRO Y FUERA DE LA MEMBRANA PLASMATICA

Ion	Concentración (mM)	
	Extracelular	Intracelular
Sodio (Na ⁺)	135 - 145	12
Potasio (K ⁺)	3.5 - 5	140
Calcio (Ca ²⁺)	2.25 - 2.52	10 ⁻⁷ M
Cloruro (Cl ⁻)	115	2.5 - 50
Hidruro (H ⁻)	7.37 - 7.42	7.1 - 7.2

La célula debe ser eléctricamente neutra (contener igual número de cargas + y -). En la tabla sólo se muestran los aniones y cationes más abundantes, sin embargo existen otros aniones involucrados (HCO_3^- , PO_4^- , etc) en la electroneutralidad de la célula.

En el fluido extracelular el Na^+ resulta ser el catión más abundante (tabla 2.1), mientras que en el citosol el K^+ resulta ser el catión que se encuentra en mayor concentración (Patton.,1989). El transporte de K^+ a través de la membrana celular se lleva a cabo principalmente de dos maneras; mediante la bomba Na^+/K^+ (transporte activo) y a través de los canales iónicos específicos para este catión (transporte pasivo). La bomba Na^+/K^+ se localiza en la membrana plasmática de todas las células animales; su función es el mantenimiento de gradientes de Na^+ y K^+ a través de la membrana, moviendo 2 iones K^+ hacia el interior de la célula al mismo tiempo que expulsa 3 iones Na^+ hacia el fluido extracelular, empleando como energía ATP (Patton.,1989).

2.5.1 CANALES DE POTASIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE (Kv)

El estudio de los canales de K^+ ha adquirido una importancia clínica considerable en las últimas décadas, ya que un gran número de padecimientos cardiacos, renales, pancreáticos y neuronales, involucran alteraciones en los canales de K^+ ó mutaciones en los genes que codifican para ellos. Lo anterior ha conducido al desarrollo de nuevas estrategias experimentales, las cuales proporcionan mayor información acerca de las modificaciones que sufren los canales de K^+ en ciertos padecimientos; permitiendo a su vez el desarrollo de nuevas terapias profilácticas o terapéuticas que garantizan una mejor calidad de vida para los pacientes.

Las bases sobre las cuales se sustenta el conocimiento acerca de la fisiología y biología molecular de los canales de K^+ se deben en gran medida a los trabajos realizados por Papazian y col., al llevar a cabo la clonación del primer gen relacionado con canales de K^+ (el gen Shaker), de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Papazian.,1987). Hasta la fecha se han clonado alrededor de 200 genes que codifican para una amplia variedad de canales de K^+ ; entre ellos 50 genes que codifican para canales de K^+ humanos (Shieh.,2000). Recientemente se ha podido conocer la estructura cristalina de un canal de K^+ en *Streptomyces lividans* (Doyle.,1998).

Los canales de K^+ constituyen una extensa familia de proteínas de membrana localizadas en las células excitables (neuronas y músculo) y en las no excitables, (linfocitos). Los miembros de esta extensa familia, además de participar en los mecanismos de secreción y/o absorción de K^+ , desempeñan un papel muy importante en los procesos de señalización, al regular la liberación de neurotransmisores, secreción de insulina, excitabilidad neuronal, transporte epitelial de electrolitos, contracción del músculo liso y el volumen celular (Alberts.,1994).

El potencial de membrana en las células se establece por canales de K^+ , ya que estos son los responsables de generar un potencial celular negativo, el cual provee una importante fuerza electromotriz que favorece el movimiento de los solutos cargados a través de la membrana plasmática (Giebisch.,2000).

Dentro de la gran familia de canales de K^+ existe una subfamilia que comprende a los canales de K^+ dependientes de voltaje (Kv). Los canales Kv se agrupan en 6 diferentes subfamilias, en base a su secuencia primaria de aminoácidos (tabla 2.2). Todos los miembros que integran la familia de canales Kv, poseen una serie de características comunes entre ellos, contienen un poro acuoso por el cual fluyen los iones K^+ a través de la membrana; presentan un filtro de selectividad que permite el paso de iones K^+ exclusivamente; y exhiben un mecanismo de apertura, el cual funciona como switch en la conformación de apertura y cierre de los canales (Hille.,1992).

Los canales Kv funcionales se forman por la unión de 4 proteínas transmembranales denominadas subunidades α (figura 2.7), las cuales cuentan con un extremo amino (N^+) y un extremo carboxilo (COO^-) terminales, ambos localizados en el citoplasma. Cada subunidad α se compone a su vez, de seis dominios transmembranales (S1-S6), un poro transmembranal selectivo para K^+ (localizado entre los segmentos S5 y S6), y un sensor de voltaje (S4). Algunos canales Kv incluyen además una proteína citoplasmática accesoria unida a la porción N-terminal de la subunidad α , la cual recibe el nombre de proteína accesoria citoplasmática o subunidad β accesoria (Kv β) (Ashcroft.,2000).

Tabla 2.2 CLASIFICACIÓN DE LOS CANALES DE POTASIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE

Subfamilia	Integrantes	Gen	Tejidos en los que se expresa
Kv1.x	Kv1.1	KCNA1	Neuronas, corazón, retina, islotes pancreáticos
	Kv1.2	KCNA2	Cerebro, corazón, islotes pancreáticos
	Kv1.3	KCNA3	Linfocitos, cerebro, pulmón, vaso
	Kv1.4	KCNA4	Cerebro, corazón, islotes pancreáticos
	Kv1.5	KCNA5	Cerebro, corazón, riñón, pulmón, músculo esquelético
	Kv1.6	KCNA6	Cerebro
	Kv1.7	KCNA7	Corazón, islotes pancreáticos
	Kv1.10	KCNA10	Cerebro, aorta, riñón
Kv2.x	Kv2.1	KCNB1	Cerebro, corazón, riñón, músculo esquelético, retina
	Kv2.2	KCNB2	
Kv3.x	Kv3.1	KCNC1	Cerebro, músculo y linfocito
	Kv3.2	KCNC2	Cerebro
	Kv3.3	KCNC3	Cerebro, hígado
	Kv3.4	KCNC4	Cerebro, músculo esquelético
Kv4.x	Kv4.1	KCND1	Cerebro, corazón, hígado, riñón, pulmón, placenta, páncreas
	Kv4.2	KCND2	
	Kv4.3	KCND3	Corazón, cerebro
Kv5.x	Kv5.1	KCNF1	Cerebro
Kv6.x	Kv6.x	KCNG1	Cerebro

Los canales de potasio Kv pertenecientes a la subfamilia Kv1.x se localizan en tejidos excitables y no excitables (Shieh.,2000). La información contenida en la tabla, coincide con la reportada en la base de datos "LocusLink, NCBI".

Los canales Kv funcionales pueden constituirse exclusivamente por subunidades α iguales formando homomultímeros, o bien presentar subunidades α diferentes formando heteromultímeros. La formación de heteromultímeros se produce sólo cuando las subunidades α involucradas (proteínas transmembranales) se encuentran estrechamente relacionadas (Shieh.,2000).

La apertura o activación de los canales Kv se lleva a cabo por la despolarización de la membrana celular, la cual promueve un cambio en la conformación del sensor de voltaje, permitiendo con ello el flujo de iones a través de la membrana celular (Larsson.,1996).

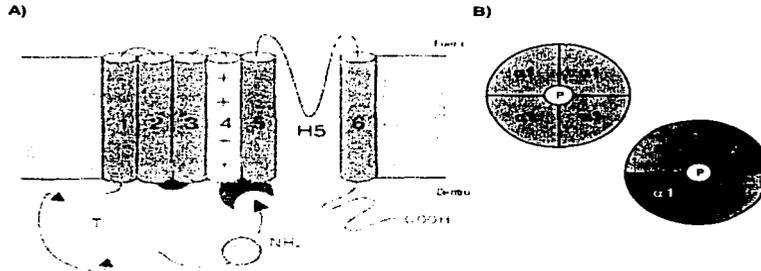


Figura 2.7 (A) Topología de la subunidad α de un canal de K^+ dependiente de voltaje (Kv). El segmento transmembranal S4 actúa como un sensor de voltaje (conjunto de aminoácidos cargados positivamente). La región del poro se localiza entre los segmentos S5 y S6. (B) Representación tetramérica de un canal Kv funcional, la unión de cuatro subunidades α da como resultado un canal funcional. Los homomultímeros se constituyen de cuatro subunidades α idénticas, mientras que los heteromultímeros se componen de subunidades α diferentes (Shieh.,2000).

La selectividad de los canales Kv se debe a la presencia de los aminoácidos YGY o GFG en la región del poro ubicada entre los segmentos S5 y S6. Dichas secuencias, al igual que los residuos adyacentes de aminoácidos, generalmente se conservan entre los distintos miembros que integran la familia de canales Kv (MacKinnon, 1991).

2.5.2 CANALES DE POTASIO EN EL RIÑÓN

Los canales de K^+ participan en la generación de un potencial celular negativo, generando con ello una importante fuerza motriz, la cual facilita el movimiento de solutos cargados a través de las membranas apical y basolateral en las células de los túbulos renales. Los canales de K^+ , al igual que otros canales iónicos, se encuentran involucrados en los procesos por los cuales las células de los túbulos renales mantienen el fluido y equilibrio electrolítico, al controlar el movimiento de iones a través de la membrana celular. Además, los canales de K^+ se encargan de regular el volumen de las células en los túbulos renales (Giebish.,2000).

La secreción de K^+ por parte de las células principales del túbulo colector, al igual que la reabsorción de K^+ por parte de las células intercaladas, representan los principales mecanismos por los cuales se regula el balance de K^+ en el organismo. Los canales de K^+ , además de permitir el flujo de iones K^+ , participan de manera indirecta en la reabsorción transepitelial de Na^+ y otros cationes . (Giebish.,2000). Los canales de K^+ apicales son de gran importancia en la porción ascendente gruesa del asa de Henle, ya que son los encargados de generar un potencial positivo a lo largo del lumen, el cual representa la principal fuerza motriz para el movimiento pasivo de iones Na^+ y H_2O , a través de una ruta paracelular (Sperelakis.,1995). La inhibición de estos canales genera una disminución en la absorción de iones Ca^{2+} y Mg^{2+} (Giebish.,2000).

En el túbulo colector (TC) se localizan canales de K^+ de baja conductancia con propiedades biofísicas y fisiológicas similares a las que se presentan en los canales de K^+ localizados en la porción ascendente gruesa del asa de Henle. Los canales de K^+ del TC son activados por monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), la hormona antidiurética (ADH), el pH celular y por fosfatidil inositol bifosfato (PIP_2) (Huang.,1998). Así mismo, su actividad se ve disminuida por la presencia de ácido araquidónico, fosfatasas y la disminución del pH celular (Kubokawa.,1995), presentan una baja probabilidad de apertura, además de que son inhibidos por trifosfato de adenosina (ATP). A pesar de que el túbulo colector de la médula interna (TCMI) del riñón de rata juega un papel muy importante en la homeostasis, las

conductancias en la membrana basolateral del TCMI, así como la presencia de canales Kv han sido poco estudiadas (Giebish.,2000).

2.6 EXPRESION GENICA

La regulación génica en mamíferos es un proceso que se lleva a cabo a través de diversos mecanismos moleculares, en respuesta a diferentes estados o condiciones fisiológicas de un organismo, a través de los cuales se activan o inactivan los genes. Dentro de estos mecanismos se incluyen: la remodelación de la cromatina, el ensamblado ("splicing", corte y empalme) del ARNm, el ensamblado alternativo, la orquestación entre activadores y represores (maquinaria general de transcripción), y la vida media de los mensajeros.

El proceso por el que un gen da origen a una proteína se conoce como expresión génica, y en ella se incluye los procesos de transcripción y de traducción (Black.,2000) En los organismos eucariotes, la transcripción inmediata del gen conforma el pre-ARNm, el cual debe procesarse antes de constituir el ARNm maduro ya que en él se incluyen los exones y los intrones. Este proceso se lleva cabo mediante el ensamblado (o "splicing") del ARN (figura 2.9) y representa la etapa más importante de la expresión génica (Black.,2000). En el ensamblaje del ARN algunos fragmentos del pre-ARNm, entre ellos los intrones, son eliminados dando lugar a un ARNm maduro cuya secuencia es completamente codificadora (figura 2.8).

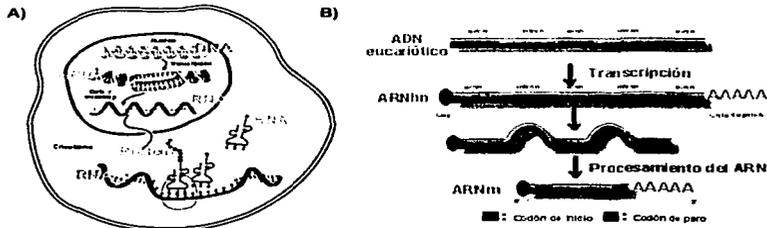


Figura 2.8 Expresión génica. (A) La expresión génica puede controlarse en uno o cualquiera de sus distintos estadios, los cuales se dividen en transcripción, procesamiento y traducción. (B) Los genes eucarióticos se transcriben para formar un pre-ARNm, el cual sufre diversos procesos, entre ellos la eliminación de intrones, antes de conformar un ARNm maduro (Shipston.,2001).

El orden de los exones en el ARNm siempre es el mismo en el gen, sin embargo no siempre se transcriben todos los exones. Cuando esto sucede, se dice que los genes sufren un proceso de ensamblaje alternativo, el cual contribuye a una gran diversidad en las síntesis de proteínas (figura 2.9). El ensamblado alternativo del ARN representa un mecanismo importante involucrado en la regulación de la expresión génica en organismos eucarióticos. Se estima que alrededor del 30% de los transcritos primarios son susceptibles a esta regulación, la cual se controla generalmente en patrones de espacio/tiempo durante el desarrollo.

El ensamblado alternativo del ARN se ha observado en casi todos los metazoarios como resultado de la producción de diversos polipéptidos funcionales a partir de un gen único, especialmente en vertebrados (Lopez, 1998). Debido a la producción de múltiples ARNm, producto del procesamiento del pre-ARNm, las proteínas frecuentemente presentan formas y funciones muy variables, aún cuando son producidas por un mismo gen (Black.,2000).

En genes complejos pueden producirse de docenas a cientos de isoformas diferentes de un ARNm maduro, a partir de un solo gen. Se ha señalado que más de la tercera parte de los genes humanos presentan ARNm maduros producto del ensamblado alternativo. En particular, los canales iónicos encargados de regular la excitabilidad en las neuronas y en las células endocrinas presentan una extensa regulación en el ensamblado, acompañada de una diferenciación en la función y distribución celular (Shipston.,2001).

El ensamblado del ARNm ocurre en el núcleo celular, específicamente en un complejo multimolecular denominado "spliceosoma". Este complejo se constituye por un juego de 5 pequeñas ribonucleoproteínas nucleares (rnSNP; U1, U2, U4, U5 y U6), así como por un gran número de polipéptidos auxiliares (Shipston.,2001).

Trabajos recientes realizados en *Drosophila*, demuestran que el número de proteínas que pueden producirse a partir de un gen único mediante el splicing alternativo es muy amplio, por lo que el número de genes no estima la complejidad proteica de un organismo (Black.,2000). El ensamblado alternativo del pre-ARNm representa un mecanismo fundamental, implicado en la regulación estructural y funcional de las proteínas (Shipston.,2001). Mediante el ensamblado alternativo, se

controla la inclusión de pequeñas secuencias peptídicas dentro de una gran proteína. La secuencia peptídica introducida puede poseer una longitud que va desde uno, hasta cientos de aminoácidos, produciendo un efecto muy específico en la actividad de la proteína producida (Black.,2000).

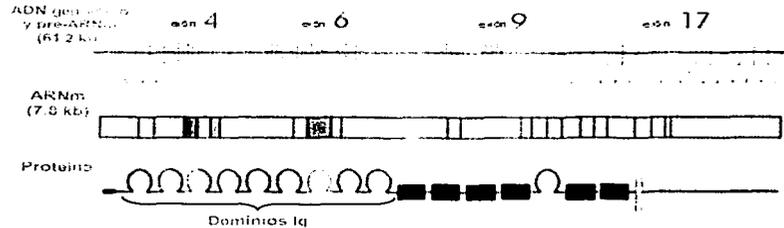


Figura 2.9 El ensamblado alternativo de un gen produce múltiples ARNm maduros, todos ellos generados a partir de un solo gen. Ensamblado alternativo del gen DSCAM ("down syndrome cell adhesion molecule"). En la parte superior se muestra el gen DSCAM cuya longitud es de 61.2 kb. La transcripción del gen DSCAM produce un ARNm de 7.8 kb compuesto de 24 exones. Cada ARNm que se llegue a formar puede presentar una de las 12 alternativas posibles para el arreglo del exón 4, una de las 48 alternativas para el exón 6, una de las 33 alternativas para el exón 9 y una de las 2 alternativas para el exón 17. En el producto final (proteína), el exón 4 codifica para una porción del dominio Ig2 localizada en el extremo amino terminal; el exón 6 codifica para la misma porción pero en el dominio Ig3; el exón 9 codifica para el dominio Ig7 completo; mientras que el exón 17 codifica para el dominio transmembranaral. Si se emplearan todas las combinaciones posibles entre los exones 4, 6, 9 y 17, el gen DSCAM podría producir 38 016 ARN's diferentes (Black.,2000).

La función del ARNm en las diferentes células que componen a un organismo es siempre la misma y generalmente constituye sólo el 3% de la masa del ARN celular total. En una célula eucariota la síntesis y maduración del ARNm se produce casi de forma exclusiva en el núcleo; al madurar el ARNm es exportado al citoplasma en donde es reconocido por los ribosomas para ser traducido (figura 2.8 A; Lewin.,2001). En los ribosomas se localizan un gran número de proteínas y ARNs de gran longitud, denominados ARN ribosomales (ARNr), cuya función se centra en el ensamblaje de la secuencia polipeptídica. Las moléculas de ARNr se encuentran constituidas principalmente por las subunidades 28S y 18S.

Durante la maduración del ARNm en el núcleo, el extremo 5' se cubre con una guanósina metilada denominada "cap", invirtiéndose con ello la orientación de los

nucleotidos y sellandose a su vez el extremo de la molécula; así mismo el extremo 3' se modifica por la adición de un gran número de adeninas, dando lugar a la región conocida como cola de poli(A). Ambas modificaciones rigen la eficiencia con la cual el ARNm será traducido y degradado en el citoplasma (Lewin.,2001). Una vez obtenido el ARNm maduro constituido exclusivamente por los exones del transcrito primario, el "cap" y la cola de poli(A); es exportado hacia el núcleo y traducido a proteínas en los ribosomas (figura 2.10).

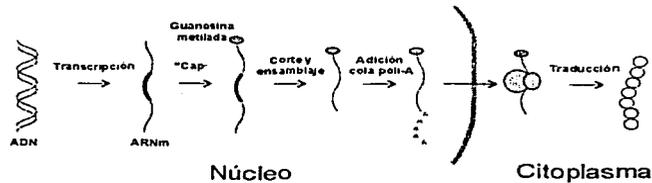


Figura 2.10 Maduración del ARN. Antes de abandonar el núcleo, el pre-ARNm sufre una serie de modificaciones; el ARNm resultado de la transcripción es metilado con una guanosina en el extremo 5' (cap), las regiones no codificantes son eliminadas durante el proceso de corte y empalme y por último una cola de poli(A) es adherida en el extremo 3'. Una vez en el citoplasma, la traducción del ARN modificado ocurre en los ribosomas.

Los ribosomas son partículas ribonucleoproteínicas de gran tamaño que contienen una gran cantidad de ARNr, las cuales son capaces de disociarse en subunidades grandes y pequeñas. Cada subunidad ribosomal presenta funciones específicas en la síntesis de proteínas y posee varios centros activos, que se concentran en el dominio de traducción del ribosoma donde se sintetizan las proteínas. La conformación del ribosoma puede cambiar en ciertas fases durante la síntesis proteínica (Osawa.,1992).

2.6.1 ESTRATEGIAS PARA EL ANALISIS DE LA EXPRESION DE UN GEN

La determinación del papel funcional de los canales iónicos, al igual que muchas otras proteínas se facilita si se conocen los tejidos y niveles en los cuales se expresan. Diferentes técnicas relacionadas con el análisis molecular de proteínas y ácidos nucleicos se han desarrollado en los últimos años; actualmente existe una gran cantidad y diversidad de ensayos moleculares. Las metodologías conocidas hoy

en día se derivan de las primeras técnicas de hibridación: "Western blot" para proteínas, "Southern blot" para ADN y "Northern blot" para ARN. El Northern blot es una técnica molecular empleada para identificar y determinar niveles de expresión de un gen, a través de moléculas de ARN, las cuales se separan de acuerdo a su tamaño a través de una electroforesis desnaturalizante. El Northern blot surge como una modificación a la técnica de separación de ADN descrita por Ed Southern en 1975. Las modificaciones empleadas en el Northern blot toman en cuenta las diferencias físicas que existen entre las moléculas del ADN y el ARN, principalmente el hecho de que esta última se constituye por una sola hebra (Alwine.,1977).

Aun cuando la molécula de ARN contiene una sola cadena, esta molécula presenta interacciones químicas entre pequeñas regiones complementarias de ella misma, formando pliegues o dobleces en la molécula, los cuales afectan la velocidad de migración durante la electroforesis. Para evitar este fenómeno, las moléculas de ARN deben ser desdobladas por completo durante la electroforesis, mediante la adición de agentes desnaturalizantes apropiados (Darling D.,1994).

El ARN es una molécula muy lábil ya que las enzimas encargadas de degradarlo, las ribonucleasas (ARNasas) son extremadamente estables, y se localizan en todos los tejidos y células de los organismos vivos, incluyendo la piel. Las moléculas de ARN son más propensas a la degradación enzimática que las moléculas de ADN, hecho que obliga a utilizar protocolos que eliminen o inactiven las ARNasas endógenas y exógenas durante la obtención del ARN y en el análisis de Northern blot (Darling D.,1994). Las moléculas de ARN, previamente separadas pueden ser transferidas a filtros de nitrocelulosa o a membranas de nylon. Estas últimas resultan ser más efectivas debido a que proporcionan un fondo mayor durante la hibridación, además de que pueden ser reutilizadas en diferentes ocasiones sin perder sus propiedades (Sambrook.,1989).

El ARN transferido a los filtros o membranas se puede fijar a temperaturas elevadas o por luz ultravioleta ("cross-linker"). Para la hibridación del ARN pueden emplearse como sondas, moléculas de ADN de doble cadena, de cadena sencilla, de ARN, oligonucleotidos sintéticos marcados, entre otros (figura 2.11). Un análisis de Northern blot, al igual que muchas otras técnicas moleculares, presenta un límite de

sensibilidad, por lo que la falta de una señal en la hibridación no indica necesariamente la ausencia definitiva del ARN de interés; así mismo, aun cuando el Northern blot nos proporciona una idea sobre la abundancia de un ARN particular, el análisis no es cuantitativo, por lo que no debe emplearse en la cuantificación absoluta de las distintas especies de ARN (Darling.,1994).

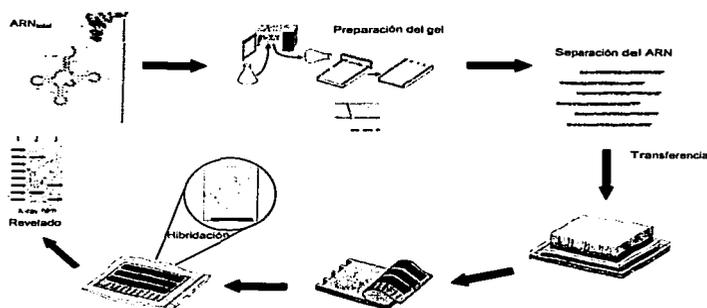


Figura 2.11 Esquema general de un análisis Northern Blot. El ARN se desnaturaliza al someterlo a condiciones desnaturalizantes durante la electroforesis. Una vez separado el ARN en sus diferentes componentes, estos se transfieren a un filtro o membrana y se fijan e hibridan con una sonda marcada.

El marcaje de la sonda puede llevarse a cabo de manera radioactiva, empleando radioisotopos, o mediante técnicas quimioluminiscente utilizando la peroxidasa, o la fosfatasa alcalina. En el marcaje no radiactivo o quimioluminiscente empleando la fosfatasa alcalina, la generación de una señal post hibridación se pone de manifiesto al hacer reaccionar la fosfatasa presente en la sonda, con un sustrato (1-2 dioxietano) contenido en el reactivo de detección (CDP-Star[®]), generándose con ello un compuesto intermediario, el cual espontáneamente se divide para formar una adamantanona y un fluoróforo. El fluoróforo producido se encuentra en un estado excitado, lo que le permite emitir energía en forma de luz mientras retorna a su estado basal (www1.amershambiosciences.com).

La luz emitida por el fluoróforo puede ser determinada inmediatamente, a diferencia de un ensayo radiactivo, alcanzado un máximo a las 4 h. La emisión de la

luz puede continuar durante algunos días, sin necesidad de realizar pasos adicionales. Por último, no se requieren de condiciones, equipo, áreas, ni entrenamientos rigurosos para manejar los elementos involucrados en el marcaje quimioluminiscente, por lo que resulta ser un método más seguro y menos contaminante que el marcaje radiactivo.

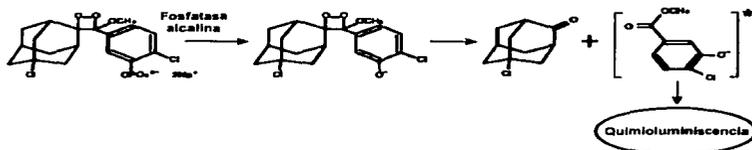


Figura 2.12 Reacción general de la fosfatasa alcalina con un sustrato quimioluminiscente basado en el 1-2 dioxietano.

En base a los antecedentes reportados, el presente trabajo pretende demostrar la expresión del canal $Kv_{1.3}$ en el riñón de rata, ya que en la actualidad no existe referencia alguna que indique la presencia de este tipo de canales en el riñón de la rata. Para llevar a cabo la comprobación de la expresión del canal, es necesario obtener muestras de ARN de alta calidad.

El análisis de RT-PCR tiene la capacidad de identificar si el transcrito del canal $Kv_{1.3}$ se expresa en el riñón de la rata, conociendo mediante un análisis de Northern blot el tamaño aproximado del transcrito expresado. Debido a que los métodos convencionales empleados en el análisis de Northern blot involucran el manejo de radiactividad, en este trabajo se pretende conocer las ventajas y desventajas que presenta el método radiactivo, al comparar los resultados con un análisis no radiactivo (quimioluminiscente). Así mismo se pretende comprobar la presencia del gen que codifica para el canal $Kv_{1.3}$ en la rata (KCNA3), mediante un análisis de tipo Dot blot, de manera que al comparar los resultados obtenidos con los tres ensayos se concluya sobre la presencia del gen que codifica para el canal $Kv_{1.3}$ en el genoma de la rata y su expresión en diferentes tejidos (riñón y cerebro).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL:

Estudiar la expresión del gen KCNA3 que codifica para un canal de potasio (Kv1.3) en el riñón de rata

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

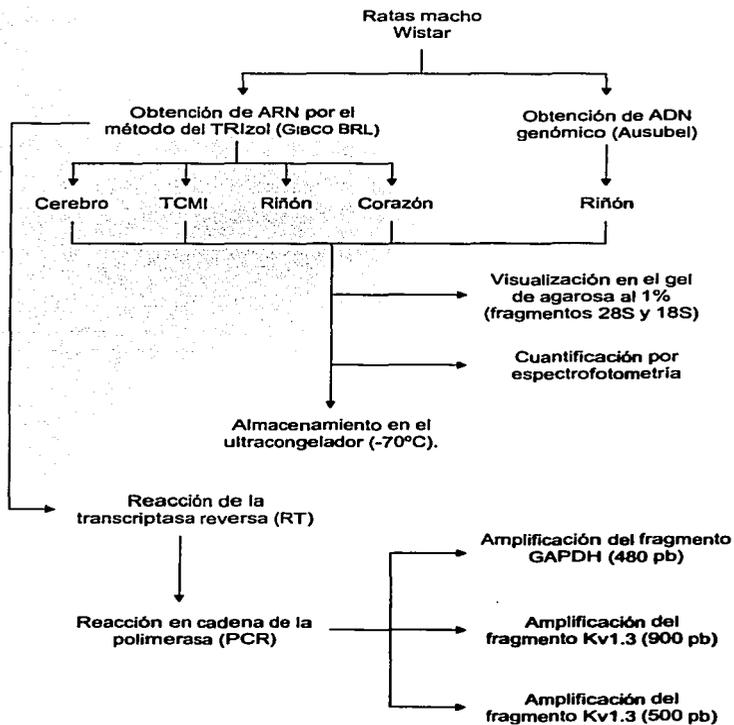
- o **Identificar la presencia del transcrito del canal Kv1.3 en el riñón de rata**

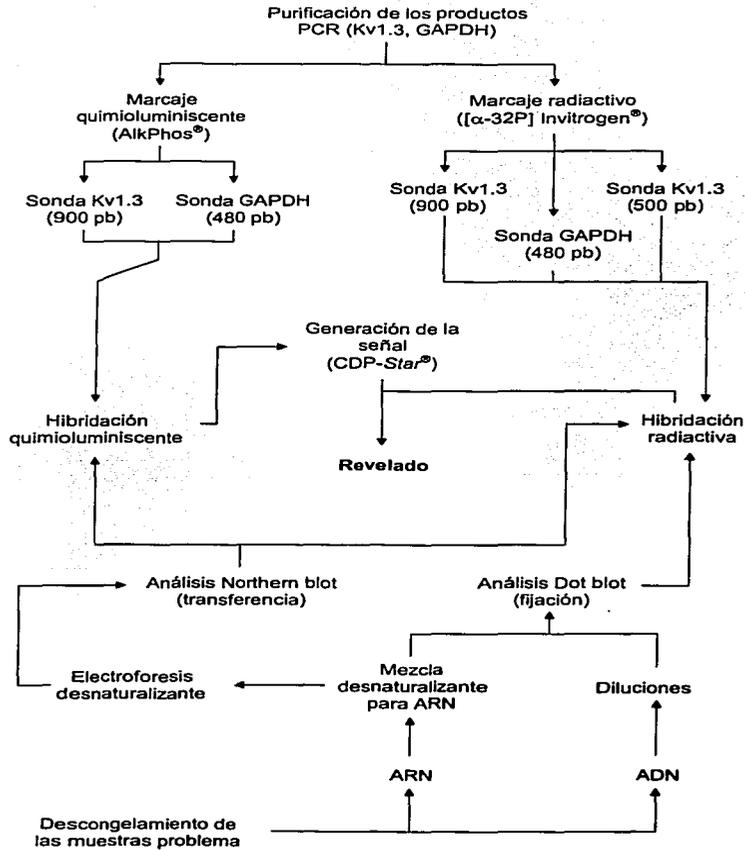
- o **Estandarización de las técnicas experimentales involucradas en el reconocimiento de la expresión del transcrito de interés (extracción de ARN, análisis de RT-PCR, de Northern blot y de Dot blot)**

- o **Comparación de los resultados obtenidos con las análisis de Northern blot, radiactivo y quimioluminiscente**

4. MATERIALES Y METODOS

Este capítulo muestra de manera general la metodología y los materiales involucrados en el desarrollo experimental del presente trabajo. La información detallada correspondiente a los materiales y métodos se incluye en el capítulo nueve.





5. RESULTADOS

5.1 OBTENCIÓN DE ARN_{TOTAL} POR EL MÉTODO DEL TRIZOL

Para la obtención del ARN_{total} se utilizaron 10 ratas macho Wistar, todas ellas obtenidas en el bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Los animales fueron anestesiados con cloroformo y decapitados, retirando inmediatamente los órganos de interés. Los órganos se colocaron en un mortero con N₂ líquido, se les adicionó trizol (1 ml por cada 100 mg de peso) y se homogenizaron (sección 9.5A). El ARN_{total} se obtuvo a partir de los riñones, del túbulo colector de la médula interna, del cerebro y del corazón, siguiendo el protocolo proporcionado por el proveedor (TRizol® Life Technologies, GIBCO BRL).

La integridad de las muestras del ARN_{total} extraído, se determinó por la presencia de las bandas correspondientes a los ARNs ribosomales (28S y 18S). La aparición en el gel desnaturalizante de las bandas correspondientes a los fragmentos 28S (5035 nucleótidos) y 18S (1869 nucleótidos) y 18S (1869 nucleótidos) y además del barrido del ARN de alto peso molecular observado en el gel (figura 5.1), indicaron que las muestras de ARN estaban en buen estado.

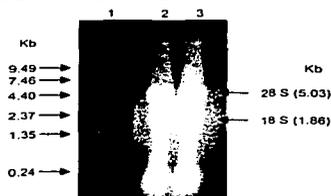


Figura 5.1 Visualización de ARN_{total} extraído por el método del trizol en un gel desnaturalizante de agarosa al 1%. Carril: 1) Marcador ARN "Ladder" 0.24-9.5 Kb (1µg/µL; GIBCO BRL); 2) 3 µl de ARN extraído del riñón de rata; 3) 3 µl de ARN extraído del cerebro de rata. Los fragmentos correspondientes a los ARN's 28S y 18S tienen un peso aproximado a los 5.03 y 1.86 kilo bases, respectivamente.

5.2 OBTENCIÓN DE ADN GENÓMICO

La obtención de ADN genómico se efectuó con el propósito de obtener un control, el cual nos indicara la existencia del gen correspondiente al canal Kv1.3 en el genoma de la rata. De acuerdo a lo reportado en la literatura, el gen del canal se expresa en diferentes tejidos y células de la rata, como son el cerebro, y

los linfocitos (Shieh.,2000); se localiza en el cromosoma 2, posición 2q34, y posee 3942 pb de las cuáles sólo 1577 pb dan lugar a la región codificante (NCBI, LocusLink.,2003). El ADN genómico se obtuvo a partir de 2 riñones de rata macho Wistar. La calidad del ADN genómico extraído se verificó por su corrimiento en un gel de agarosa al 1% (figura 5.2) y mediante su cuantificación espectrofotométrica (260nm).

En la figura se ilustran las diferentes diluciones realizadas al ADN extraído, se puede verificar que a pesar de que el ADN se fragmentó durante el proceso de extracción, esto no afectó su posterior utilización en el análisis de Dot blot. La finalidad del cargado de diferentes volúmenes de las muestras problema en el gel, fue encontrar la cantidad mínima de ADN visible, ya que en el análisis de Dot blot se requería agregar una cantidad moderada de ADN o ARN, evitando con ello la formación de manchas de gran tamaño durante su realización.

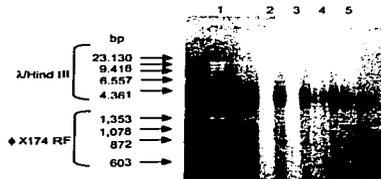


Figura 5.2 Visualización de ADN genómico, extraído por el método de Ausubel, en un gel de agarosa al 1%. Carril: 1) Marcador de peso molecular (PM) λ /Hind III (2.5 μ g; alto PM) y ϕ X174 RF ADN/Hae III (2.5 μ g; bajo PM); 2) 20.75 μ g de ADN genómico; 3) 12.45 μ g de ADN genómico; 4) 8.3 μ g de ADN genómico; 5) 4.15 μ g de ADN genómico. El ADN genómico presente en todos los carriles se extrajo a partir del riñón de rata.

5.3 REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Mediante la reacción de PCR se amplificaron secuencias específicas correspondientes al canal $Kv_{1.3}$ y a la GAPDH. La amplificación de estas secuencias tuvo como objetivo validar las metodologías involucradas durante la extracción del ARN_{total} y la reacción de RT. A su vez, la amplificación de los fragmentos de interés nos indicó la expresión del canal en diferentes tejidos, siendo este un control en cuanto al funcionamiento y calidad de los iniciadores utilizados.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En la reacción de PCR se utilizaron dos series diferentes de iniciadores para llevar a cabo la amplificación de fragmentos del canal Kv_{1.3}. Los sitios de iniciación se localizan en diferentes regiones de la secuencia de aminoácidos del canal. La primera serie de iniciadores tomó en cuenta la secuencia de aminoácidos que comprenden las regiones amino terminal y del poro, mientras que la segunda serie se diseñó tomando en cuenta la secuencia de aminoácidos reconocida por un anticuerpo específico anti-conejo Kv_{1.3} (Alomone Labs), localizada entre las regiones del poro y el extremo carboxilo terminal. La tabla 5.1 muestra las secuencias de los nucleótidos iniciadores utilizados en la amplificación de los fragmentos del canal Kv_{1.3} y la GAPDH.

Tabla 5.1 SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS CORRESPONDIENTES A LOS INICIADORES EMPLEADOS EN LA PCR

Iniciadores	Región	Secuencia	Orientación
inicKv _{1.3}	Amino y Poro	GAG-THC-TTC-GAC-CG	} Sentido
		CAT-GGT-CAC-CCA-GCC-CAC-CAG-AA	
inicPCRKv	Poro y Carboxilo	GAG-GCA-GAC-GAC-CCC-ACT-TCA-	} Sentido
		GGT-TTC-AGC	
		C-ATC-CTC-GAG-TTA-CAA-ATC-TGT- TTC-CCG-GCT-AGT-GTC	} Antisentido
inicGAPDH	--	CCT-GCA-CCA-CCA-ACT-GC	} Sentido
		CAA-TGC-CAG-CCC-CAG-CA	} Antisentido

Las secuencias de los nucleótidos se muestran en dirección 5' → 3'. Los iniciadores se diseñaron tomando en cuenta la secuencia de nucleótidos del ARNm del canal Kv_{1.3}.

En las diferentes reacciones de PCR se emplearon iniciadores específicos sentido y antisentido (5' y 3' respectivamente; tabla 5.1). Empleando los iniciadores "inicKv_{1.3}" y utilizando como molde un fragmento del canal Kv_{1.3} contenido en el vector pCR[®] 2.1-TOPO (clona A y B), se lograron amplificar dos productos de 891 pb y 849 pb, a partir de cada clona. Además, se amplificaron dos fragmentos de tamaño similar empleando los mismos iniciadores pero utilizando como molde un fragmento de ADN obtenido a partir del cerebro y del riñón de rata mediante un análisis de RT (figura 5.5), comprobándose de esta manera la expresión del canal Kv_{1.3} en tejidos diferentes. Además, con base en la cantidad de ADN, producto de PCR que se visualiza en el gel, podemos observar que los niveles de expresión del canal Kv_{1.3} en el cerebro son superiores a los observados en el riñón de la rata.

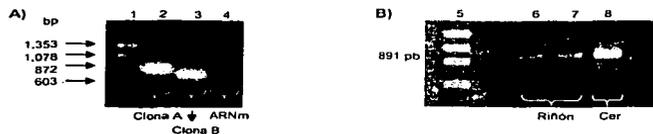


Figura 5.5 Amplificación de algunos fragmentos de ADN empleando los iniciadores "inicKv_{1.3}". (A) Fragmentos de Kv_{1.3} amplificados a partir del vector PCR², 1-TOPC y del ADN, producto de RT de riñón de rata. Carril: 1) Marcador bajo PM; 2) Fragmento amplificado de la clona A; 3) Fragmento amplificado de la clona B; 4) Fragmentos del canal Kv_{1.3} amplificado a partir del producto de RT del riñón de rata. (B) Fragmentos del canal Kv_{1.3} amplificados a partir del ADN, producto de RT del riñón y cerebro de rata. Carril: 6y 7) Fragmento amplificado del riñón; 8) Fragmento amplificado del cerebro.

Los iniciadores "inicPCRKv", específicos para el canal Kv_{1.3} se emplearon exclusivamente en la amplificación de un fragmento del canal Kv_{1.3}, a partir del ADN, producto de RT del riñón de rata (figura 5.6). El tamaño del fragmento amplificado fue de aproximadamente 500 pb; sin embargo la cantidad amplificada es mucho menor a la obtenida con los iniciadores "inicpKv_{1.3}", ya que las bandas observadas en el gel apenas son visibles. El fragmento de 500 pb se empleó como sonda en la identificación del transcrito Kv_{1.3} a partir del riñón de rata, sólo se marcó radiactivamente y se empleó exclusivamente en el análisis de Northern blot.

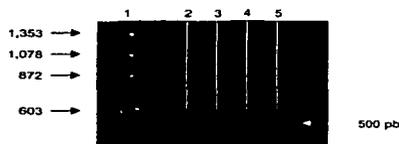


Figura 5.6 Amplificación de un fragmento del canal Kv_{1.3}, utilizando los iniciadores "inicPCRKv", a partir del producto RT del riñón de rata. Carril: 1) Marcador bajo PM; 2 y 3) ADN producto de RT a partir de riñón completo de rata; 4 y 5) ADN producto de RT a partir de médula interna del riñón de rata.

Como control positivo de la expresión de genes, se amplificó un fragmento de 459 pb, correspondiente al gen constitutivo de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Debido a que se trata de una enzima constitutiva, la amplificación se llevo a cabo en los diferentes tejidos (riñón, cerebro y corazón), utilizando para ello iniciadores específicos (Arrieta.,2000). La secuencia correcta de los iniciadores se verificó mediante su comparación con la base de datos del ARNm de la GAPDH. El gen que contiene la información de la

enzima se localiza en el cromosoma 10, posición 10q,12, posee una región de 1233 pb de los cuales solo 1001 pb corresponden a la región codificante (NCBI, LocusLink.,2003).

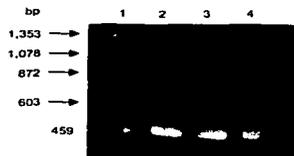


Figura 5.7 Utilización de los iniciadores "inicGAPDH" como control positivo en el análisis RT. Carril: 1) Marcador bajo PM; 2) Fragmentos de GAPDH a partir de riñón;-3) Fragmentos de GAPDH a partir de corazón; 4) Fragmento de GAPDH a partir de cerebro.

5.4 PURIFICACION DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Una vez amplificados los fragmentos de interés, correspondientes al canal $Kv_{1.3}$ y a la GAPDH, estos se purificaron antes de ser empleados como sondas. Para ello se empleó el estuche comercial, concert gel extraction systems" (GIBCO BRL).

Durante el desarrollo experimental se realizaron tres series de purificaciones (figura 5.8), a partir de los productos obtenidos con los iniciadores "inic $Kv_{1.3}$ ", "inicPCR Kv " e "inicGAPDH" (891, 500 y 459 pb respectivamente). Cada serie incluyó 90 μ l del producto de PCR del canal $Kv_{1.3}$, así como 90 μ l del producto de PCR de la GAPDH. Las concentraciones obtenidas al final de la purificación de los productos de PCR se muestran en la tabla 5.2.

Tabla 5.2 PURIFICACION DE PRODUCTOS DE PCR

Serie	Fuente	Iniciador	Tamaño	Concentración (1ª elusión)	Marcaje
A	Clona A Riñón	inic $Kv_{1.3}$	891 pb	50 ng/ μ l	Radiactivo
		inicGAPDH	459 pb	25 ng/ μ l	
B	Clona A Riñón	inic $Kv_{1.3}$	891 pb	25 ng/ μ l	Quimioluminiscente
		inicGAPDH	459 pb	38 ng/ μ l	
C	Riñón	inicPCR Kv	500 pb	13 ng/ μ l	Radiactivo
		inicGAPDH	459 pb	38 ng/ μ l	

Para determinar la concentración de los fragmentos purificados, se colocaron 4 μ l de ADN en un volumen final de 1 ml de H_2O destilada. Las lecturas de la absorbancia se realizaron a 260 nm.



Figura 5.8 Purificación de los productos de PCR empleando los iniciadores "inicKv_{1.3}" e "inicGAPDH". Carril: 1) Marcador bajo PM; 2 y 3) Fragmentos del canal Kv_{1.3} a partir de la clona A (1ª y 2ª elusión respectivamente); 4 y 5) Fragmentos de GAPDH a partir del riñón de rata (1ª y 2ª elusión). La imagen correspondiente a la amplificación del canal Kv_{1.3} a partir del TCM1 no se muestra.

Los productos de PCR amplificados con los iniciadores "inicKv_{1.3}" (891 pb), se purificaron y secuenciaron para verificar que la secuencia amplificada correspondiera con la del canal de interés. Los resultados de dicha secuenciación fueron introducidos en la base de datos "nucleotide-nucleotide BLAST[®]" (Basic Local Alignment Search Tool, NCBI).

La información proporcionada por la base de datos BLAST indicó que el fragmento amplificado de 891 pb presentaba una gran similitud con los loci KCNA3 ("potassium voltage gated channel, member 3", No. de referencia: NM 019270 [gi:9506826]), RATKV3AA ("rat potassium channel-Kv3 gene", No. de referencia: M31744 [gi:205104]), y RATR GK5 ("rat voltage-gated potassium channel protein [RGK5] gene", No. de referencia: M30312 [gi:206634]) (Swanson.,1990).

La secuenciación de los nucleótidos del fragmento de 891 pb se tradujo a una secuencia de aminoácidos (DNAsar[®]) y se comparó con la secuencia reportada de aminoácidos, correspondiente al ARNm del canal Kv_{1.3} (NCBI, LocusLink.,2003). Los resultados indicaron una identidad del 100 % en los 210 aminoácidos comparados. Los resultados de los alineamientos, tanto de nucleótidos como de aminoácidos se muestran en la figura 5.9.

A) Alineamiento de nucleótidos correspondientes al fragmento amplificado y los canales reportados en la base de datos BLAST.

	[421	480]
KCNA3 (1578 pb)	GAGGAGGCTATGGAGAAGTCCCGTAGGACGAGGGCTTCTCCGGGAGGAGGACGACCC	
RATKV3AA (1577 pb)	GAGGAGGCTATGGAGAAGTCCCGTAGGACGAGGGCTTCTCCGGGAGGAGGACGACCC	
Frag Kv1.3 (758 pb)	-----CGAANAGANGACC	
	[481	540]
KCNA3 (1578 pb)	CTGCCCCCGCTGACTTCCAGCGCCAGGTGTGGCTCCTTCGAAATACCCCTAAGTCC	
RATKV3AA (1577 pb)	CTGCCCCCGCTGACTTCCAGCGCCAGGTGTGGCTCCTTCGAAATACCCCTAAGTCC	
Frag Kv1.3 (758 pb)	CTGCCCN--CCGTN--NTTCAAGGCCAGNGC--GNTG--TTTTGAAATACCCCTAAGTCC-	



KCNA3 (1578 pb) 1541
 RATKV3AA (1577 pb) GGGCGGGC GGGGCAT GCCATCGTCTCAGTCTGGTCACTTCATCCATTCGCATC
 Frag Kvl.3 (758 pb) GGGCGGGC GGGGCAT GCCATCGTCTCAGTCTGGTCACTTCATCCATTCGCATC

KCNA3 (1578 pb) 6601
 RATKV3AA (1577 pb) TTCTGCTTG AGACACTACCCGAGTTTCGGGACGAGAGGACTATCCCGCCCTCCGGTCG
 Frag Kvl.3 (758 pb) TTCTGCTTG AGACACTACCCGAGTTTCGGGACGAGAGGACTATCCCGCCCTCCGGTCG

KCNA3 (1578 pb) 6661
 RATKV3AA (1577 pb) CAGGACGCTTTGAGGCTGCCAACAACAGCAGCTCGGGGCCCTCTCGGAGCCTCCAGC
 Frag Kvl.3 (758 pb) CAGGACGCTTTGAGGCTGCCAACAACAGCAGCTCGGGGCCCTCTCGGAGCCTCCAGC

KCNA3 (1578 pb) 7201
 RATKV3AA (1577 pb) TTCTCGGACCCCTTCTTCGTAGTGGAGACCCGTGTCATCATCTGGTTCCTTTGAGCTG
 Frag Kvl.3 (758 pb) TTCTCGGACCCCTTCTTCGTAGTGGAGACCCGTGTCATCATCTGGTTCCTTTGAGCTG

KCNA3 (1578 pb) 7211
 RATKV3AA (1577 pb) TTCTCGGACCCCTTCTTCGTAGTGGAGACCCGTGTCATCATCTGGTTCCTTTGAGCTG
 Frag Kvl.3 (758 pb) TTCTCGGACCCCTTCTTCGTAGTGGAGACCCGTGTCATCATCTGGTTCCTTTGAGCTG

KCNA3 (1578 pb) 7811
 RATKV3AA (1577 pb) CTGGTCCGATTCTTTGCTGCCCCAGTAAAGCCACCTCTCCAGAAATATCATGAACCTG
 Frag Kvl.3 (758 pb) CTGGTCCGATTCTTTGCTGCCCCAGTAAAGCCACCTCTCCAGAAATATCATGAACCTG

KCNA3 (1578 pb) 8411
 RATKV3AA (1577 pb) ATAGACATTGTAGCCATCATCCCTTATTTTATTACTCTGGGCATGAGCTGGCTGAGCGA
 Frag Kvl.3 (758 pb) ATAGACATTGTAGCCATCATCCCTTATTTTATTACTCTGGGCATGAGCTGGCTGAGCGA

KCNA3 (1578 pb) 9011
 RATKV3AA (1577 pb) CAGGTTAAATGGCCAGCAGGCTATGTCACCTGGCCATCCTGAGGGTCACTCCGCCATGAAAG
 Frag Kvl.3 (758 pb) CAGGTTAAATGGCCAGCAGGCTATGTCACCTGGCCATCCTGAGGGTCACTCCGCCATGAAAG

KCNA3 (1578 pb) 9601
 RATKV3AA (1577 pb) CAGGTTAAATGGCCAGCAGGCTATGTCACCTGGCCATCCTGAGGGTCACTCCGCCATGAAAG
 Frag Kvl.3 (758 pb) CAGGTTAAATGGCCAGCAGGCTATGTCACCTGGCCATCCTGAGGGTCACTCCGCCATGAAAG

KCNA3 (1578 pb) 9611
 RATKV3AA (1577 pb) GTCTTCGGCATCTTCAAGCTCTCCGCCATTCTAAGGGGCTGCAGATCTCCGGGACAGACA
 Frag Kvl.3 (758 pb) GTCTTCGGCATCTTCAAGCTCTCCGCCATTCTAAGGGGCTGCAGATCTCCGGGACAGACA

KCNA3 (1578 pb) 10801
 RATKV3AA (1577 pb) CTGAAGGCTTCATCCGAGAGCTGGGGCTCCCTATTTCTTCCCTTTCACTGGGCTCATC
 Frag Kvl.3 (758 pb) CTGAAGGCTTCATCCGAGAGCTGGGGCTCCCTATTTCTTCCCTTTCACTGGGCTCATC

KCNA3 (1578 pb) 11401
 RATKV3AA (1577 pb) CTTTTCT-CCAGTGCAGTCTACTTTGCTGAGCCAGACGACCCCTTCTCGGGTTTTAAACAG
 Frag Kvl.3 (758 pb) CTTTTCT-CCAGTGCAGTCTACTTTGCTGAGCCAGACGACCCCTTCTCGGGTTTTAAACAG

KCNA3 (1578 pb) 12011
 RATKV3AA (1577 pb) TATCCCGGATCCCTTCGTGGGGC GTGGT ACCATGA AAAATGTCGGTTATGGTGATAT
 Frag Kvl.3 (758 pb) TATCCCGGATCCCTTCGTGGGGC GTGGT ACCATGA AAAATGTCGGTTATGGTGATAT

KCNA3 (1578 pb) 12601
 RATKV3AA (1577 pb) GCACCCAGTGCACATAGGAGGCAAGATTGTGGGCTCTCTTTGTGCCATCCGAGCTGTCT
 Frag Kvl.3 (758 pb) GCACCCAGTGCACATAGGAGGCAAGATTGTGGGCTCTCTTTGTGCCATCCGAGCTGTCT

B) Alineamiento de aminoácidos correspondientes al fragmento amplificado y los canales reportados. Sólo se muestra la secuencia correspondiente al gen KCNA3, ya que esta es homólogo a las secuencias RATKV3AA y RGK5.

KCNA3 (525 aa) 181 240
 Kvl.3 (210 aa) GPARGIAIVSVLVILISIVIFCLETLPEFRDEKDTFASPSGVVFAANNSTGASSGASS
 --ARGIAIVSVLVILISIVIFCLETLPEFRDEKDTFASPSGVVFAANNSTGASSGASS

KCNA3 (525 aa) 241 300
 Kvl.3 (210 aa) FSDIFFVVEITLCIIFWFSPELLVRFACPSKATFSRINDMLIDIVAIIPFIFITGLTELAER
 FSDIFFVVEITLCIIFWFSPELLVRFACPSKATFSRINDMLIDIVAIIPFIFITGLTELAER

	(301	360)
KCNA3 (525 aa)	CGNGQQAMSLAAILRVIRLVVFRIFKLSRHSKGLQILGQTLKASHRELGLLIFFIFIGVI	
Kv1.3 (210 aa)	CGNGQQAMSLAAILRVIRLVVFRIFKLSRHSKGLQILGQTLKASHRELGLLIFFIFIGVI	
	(361	420)
KCNA3 (525 aa)	LFSSAVYFAEADDPSSCFNSIPDAFNMVAVTMTTIVGYGDHHPVTIGGKIVGSLCAIAGVL	
Kv1.3 (210 aa)	LFSSAVYFAEADDPSSCFNSIPDAFNMVAVTM-----	

Figura 5.9 Alineamiento del fragmento de 900 pb, amplificado con los iniciadores "inicKv_{1.3}", frente a secuencias de nucleótidos y aminoácidos pertenecientes a canales Kv_{1.3}. (A) Secuencia de nucleótidos del producto de PCR alineada con las secuencias de los canales KCNA3 (Gen del canal Kv_{1.3}) y RATKV3AA (Kv_{1.3} del cerebro de rata); sólo se muestra la región en donde existe una gran similitud (B) Secuencia de aminoácidos del producto de PCR alineada con las secuencias de los canales KCNA3 (Kv_{1.3}) y RATKV3AA; el número total de aminoácidos del canal Kv_{1.3} es de 525. Las secuencias consenso de nucleótidos y aminoácidos del fragmento kv1.3 con mayor homología se encuentran subrayadas.

5.5 MARCAJE DE LAS SONDAS

Las sondas obtenidas a partir de los productos de PCR purificados del canal Kv_{1.3} (clona A) y la GAPDH (tabla 5.1) se marcaron radiactivamente y por métodos quimioluminiscentes; mientras que la sonda pcrKv, obtenida a partir del riñón de rata, solo se marcó radiactivamente.

(A) Marcaje quimioluminiscente.- Las sondas marcadas de manera quimioluminiscente se emplearon únicamente en el análisis de Northern blot. El marcaje se realizó empleando una fosfatasa alcalina termoestable (AlkPhos DIRECT). Se emplearon 100 ng del producto de PCR del canal Kv_{1.3} y la GAPDH. La eficacia en el marcaje quimioluminiscente se comprobó adicionando el reactivo CDP-*Star*[®], durante la detección de la señal (sección 5.7A).

(B) Marcaje radiactivo.- Las sondas marcadas radiactivamente se emplearon en los análisis de Northern y Dot Blot. El marcaje radiactivo de la sonda se realizó empleando el estuche comercial "Random Primers DNA Labeling System[®]", según lo indicado en el protocolo proporcionado por el proveedor (Invitrogen™ life technologies). El radionucleótido marcado fue citosina dCTP y el radioisótopo empleado fósforo [α -³²P]. El porcentaje de incorporación y el número de cuentas se determinaron en un contador de centelleo LS Analyzer (Beckman Coulter, Inc.).

Se marcaron 20 ng de los productos purificados de PCR, obtenidos a partir del canal Kv_{1.3} y la GAPDH, a los cuales se les agregaron 2 μ l del nucleótido [α -³²P] dCTP (10 μ Ci/ μ l). La eficacia en cuanto a la incorporación de nucleótidos radiomarcados se comprobó inmediatamente, verificando en un contador de centelleo el número de cuentas por minuto (cpm). La cantidad mínima de cpm que



se requirió para llevar a cabo la hibridación fue de 1×10^6 cpm/ml. Los resultados obtenidos en el marcaje de las sondas $Kv_{1.3}$ y GAPDH, superaron dicha cantidad (tabla 5.3) En cada uno de los ensayos Northern blot realizados (radiactivo y no radiactivo), se empleó siempre una sonda problema ($Kv_{1.3}$) y una sonda control (GAPDH).

Tabla 5.3 INCORPORACION DE [α - ^{32}P] dCTP EN LA PREPARACIÓN DE LAS SONDAS $Kv_{1.3}$ Y GAPDH.

Sonda (elusión)	Tamaño	Volumen	Total cpm
GAPDH 1*	480 pb	160 μ l	5.64×10^7
GAPDH 2*		150 μ l	
$Kv_{1.3}$ 1*	900 pb	280 μ l	6.52×10^7
$Kv_{1.3}$ 2*		150 μ l	
$Kv_{1.3}$ 1*	500 pb	200 μ l	3.25×10^7

En total se realizaron cuatro marcajes radiactivos de las sondas problema. En la tabla se reportan las cpm de tres series de sondas marcadas, ya que no se cuenta con los datos del primer marcaje. Durante la hibridación ambas eluciones, correspondientes a la misma sonda, se mezclaron antes de ser agregadas al buffer de hibridación

5.6 ANALISIS DE DOT BLOT

El análisis de Dot blot se realizó para comprobar que la información contenida en el gen *KCNA3* (2q34), correspondiente el canal $Kv_{1.3}$ (ADN), se transcribía (ARNm) en el cerebro y en el riñón de rata. Para ello se fijaron a una membrana de nylon (Hybond-N+, Amersham) muestras de ADN genómico obtenidas a partir del riñón de rata, y muestras de ARN_{total} obtenido a partir del riñón y del cerebro de rata (sección 9.12).

En este análisis sólo se realizó una hibridación radiactiva, empleando como sonda el producto de PCR de 891 pb purificado a partir del canal $Kv_{1.3}$. Una vez extraídos y purificados el ADN genómico y el ARN total, ambos se colocaron dentro de los cuadrantes previamente marcados sobre la superficie de la membrana de nylon.

En el caso del ADN se adicionaron alícuotas de 4.15 μ g/ μ l (concentración inicial) en el primer cuadrante, 0.51 μ g/ μ l en el segundo cuadrante, 1.03 μ g/ μ l en el tercer cuadrante y 2.07 μ g/ μ l en el cuarto y último cuadrante (figura 5.8), todas ellas se desnaturalizaron previamente.

Las muestras de ARN se diluyeron (30 y 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), se desnaturalizaron y se colocaron en la superficie de la membrana. En el caso de las muestras de ARN provenientes del cerebro únicamente se adicionaron 30 μg en el primer cuadrante y 1 μl de la muestra sin diluir (1.26 μg) en el segundo cuadrante; mientras que para las muestras provenientes de los riñones, se colocaron 40 μg de ARN en el primer cuadrante, 30 μg de ARN en el segundo cuadrante y 6.48 μg en el tercer cuadrante (figura 5.10).

La membrana empleada en el análisis de Dot blot tuvo un área de 41.48 cm^2 (1.5 cm^2 por cuadrante). La hibridación se realizó en un horno (Shel Lab[®]) a una temperatura de 60°C, durante 18 horas y 45 minutos. La autoradiografía se obtuvo exponiendo la membrana caliente (radiactiva) junto con una película para diagnóstico (X-OMAT[®] XK-1, Kodak) dentro de un casete, durante 3 días a -70°C. Debido a que la imagen obtenida después del primer revelado no fue lo suficientemente clara para indicarnos un resultado, fue necesario repetir la hibridación empleando la misma membrana y aumentando la astringencia durante la hibridación. Para ello la membrana se tuvo que tratar antes de ser reutilizada. La segunda hibridación se realizó a una temperatura de 55°C, durante 22 horas. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5.10 B.

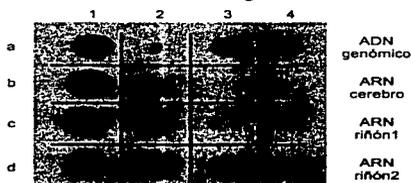


Figura 5.10 Imagen del análisis de Dot blot radiactivo. La hibridación se llevo a cabo con una alta astringencia. Fila (a) ADN genómico; cuadrante: a1) 4.15 μg ; a2) 0.51 μg ; a3) 1.03 μg a4) 2.07 μg . Fila (b) ARN de cerebro; cuadrante: b1) 30 μg ; b2) 1.26 μg . Fila (c) ARN de riñón serie 1; cuadrante: c1) 40 μg , c2) 30 μg ; c3) 6.48 μg . Fila (d) ARN de riñón serie 2; cuadrante: d1) 40 μg , d2) 30 μg ; d3) 5.85 μg .

5.7 ANALISIS DE NORTHERN BLOT

Todos los materiales empleados en el análisis de Northern blot se sometieron a tratamientos para eliminar nucleasas. Las muestras de ARN_{total} se extrajeron por el método del trizol y se corrieron en un gel de agarosa al 1% para

ARN. Las distintas electroforesis se efectuaron bajo condiciones desnaturalizantes.

(A) Hibridación y detección quimioluminiscente.- Las muestras problema de ARN se trataron de acuerdo a lo descrito en la preparación de mezclas desnaturalizantes para ARN (sección 9.4). La electroforesis se corrió a una velocidad de 98 mA/V durante 3 horas y 10 minutos. Una vez concluida la electroforesis, el gel se colocó en un transiluminador UV y se fotografió (figura 5.11). Al comprobar la integridad del ARN, el gel se lavó con suficiente H₂O DEPC, posteriormente el ARN se hidrolizó parcialmente con una solución de NaOH 0.05N y por último el gel se sumergió en solución salina concentrada (SSC) 10X preparado con H₂O DEPC. El ARN hidrolizado parcialmente se transfirió a una membrana de nylon (Hybond-N+, Amersham), dentro de un recipiente libre de nucleasas, de acuerdo a lo indicado en la sección 9.13.

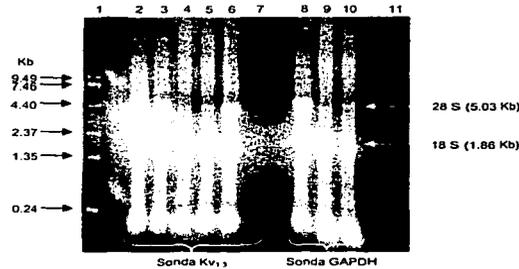


Figura 5.11 Electroforesis de las muestras de ARN, las cuales se hibridaron con una sonda quimioluminiscente. Sonda Kv_{1.3} de 900pb. Carril: 1 y 11) Marcador RNA Ladder 0.24-9.5 Kb (1µg/µl); 2) Riñón serie I (30 µg); 3) Riñón serie II (30 µg); 4) Cerebro serie I (30 µg); 5) Cerebro serie II (30 µg); 6) Corazón (30 µg); 7) Clona A, control positivo (ADN no visible). Muestras hibridadas con la sonda GAPDH. Carril: 8) Riñón serie II (30 µg); 9) Cerebro serie I (30 µg); 10) Cerebro serie II (30 µg).

La transferencia se realizó durante 24 horas, empleando SSC 10X como fuerza motriz. Al concluir la transferencia, se desprendió la membrana del gel, marcando previamente la correspondencia de los carriles entre el gel y la membrana. Por último la membrana se lavó con SSC 6X y se fijó dentro de un equipo de entrecruzamiento ("cross-linker") durante 2 minutos. En una sesión posterior se llevó a cabo la hibridación de las sondas marcadas de manera

quimioluminiscente con el ARN fijado a la membrana. La hibridación se realizó en un horno (Shel Lab), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el proveedor, a una temperatura de 55°C durante 24 horas y 15 minutos; al finalizar la membrana se lavó dos veces con el buffer de lavado secundario.

La señal quimioluminiscente se puso de manifiesto adicionado el reactivo de detección CDP-*Star*[®] (40 μ l/cm²) sobre la membrana (5 minutos a temperatura ambiente). El exceso de reactivo se retiró y la membrana se expuso junto con una película para diagnóstico (X-OMAT[®] XK-1, Kodak) dentro de un casete, durante 12 horas, 1 hora 30 minutos y 30 minutos, a temperatura ambiente.

Los resultados obtenidos muestran únicamente las manchas correspondientes a la señal emitida por la sonda de la GAPDH, tanto en riñón como en cerebro (figura 5.12A), obteniéndose la mejor calidad en cuanto a la imagen, a los 30 minutos de exposición dentro del casete. Así mismo se comprobó la calidad y especificidad de la sonda del canal Kv_{1.3}, al detectar una mancha en el carril correspondiente a la clona A (control; figura 5.12 B), a partir de la cual se obtuvo la sonda, siendo negativa la presencia de alguna señal en las demás muestras cargadas.

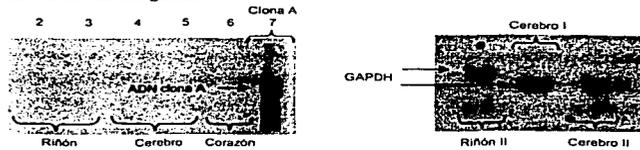


Figura 5.12 Northern blot quimioluminiscente. El gel a partir del cuál se realizó la transferencia corresponde a la figura 5.11, tiempo de exposición 30 minutos. (A) Membrana hibridada con la sonda Kv_{1.3} de 900pb, obtenida a partir de la clona A; sólo se observa la hibridación de la sonda problema con la muestra de ADN contenida en la clona A (control). (B) Membrana hibridada con la sonda GAPDH (sonda control); Riñón serie II (30 μ g); Cerebro serie I (30 μ g); Cerebro serie II (30 μ g).

(B) Hibridación y detección radiactiva.- Las muestras problema de ARN se trataron de acuerdo a lo descrito en la preparación de mezclas desnaturalizantes para ARN (sección 9.4). Se realizaron dos electroforesis con diferentes muestras, ambas se corrieron a una velocidad de 98 mAV, durante 1 hora y 53 minutos y 1 hora y 32 minutos respectivamente. Una vez concluidas las electroforesis, los geles se colocaron en un transiluminador de UV y se fotografiaron (figura 5.13).

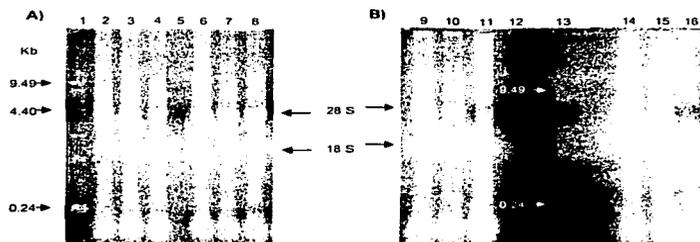


Figura 5.13 Electroforesis de las muestras de ARN, las cuales se hibridaron con una sonda radiactiva. (A) 1ª Electroforesis. Carril: 1) Marcador RNA Ladder 0.24-9.5 Kb (1µg/µl); 2) Riñón serie I (40 µg); 3) Riñón serie I (30 µg); 4) Cerebro (30 µg); 5) Clona A (1 µl); 6) Riñón serie II (40 µg); 7) Riñón serie II (30 µg); 8) Cerebro (30 µg). (B) 2ª Electroforesis. Carril: 9) Riñón serie I (30 µg); 10) Riñón serie II (30 µg); 11) Cerebro (30 µg); 12) Clona A (1 µl); 13) Marcador RNA Ladder 0.24-9.5 Kb (1µg/µl); 14) Riñón serie I (30 µg); 15) Riñón serie II (30 µg); 16) Cerebro (30 µg/µl).

Al igual que en el análisis no radiactivo, una vez comprobada la integridad del ARN, los geles se lavaron con suficiente H₂O DEPC, el ARN se hidrolizó con una solución de NaOH 0.05N, sumergiendo ambos geles SSC 10X, durante 45 minutos. El ARN parcialmente hidrolizado se transfirió a una membrana de nylon (Hybond-N+, Amersham), dentro de un recipiente libre de nucleasas (sección 9.13). La transferencia se realizó durante 16 horas y 32 minutos en el caso de la 1ª membrana, y 15 horas 30 minutos en el caso de la 2ª membrana, empleando en ambos casos SSC 10X como fuerza motriz.

Al finalizar la transferencia, las membranas se desprendieron del gel, marcando previamente la correspondencia de los carriles entre el gel y la membrana. Por último la membrana se lavó con SSC 6X y se fijó dentro de un equipo de entrecruzamiento (cross-linker) durante 2 minutos. En una sesión posterior se llevó a cabo la hibridación de las sondas marcadas radiactivamente con el ARN fijado en las membranas. La hibridación se realizó en un horno (Shel Lab®) a una temperatura de 65 °C durante 18 horas y 45 minutos; al finalizar las membranas se lavaron con una solución SSC 2X.

Una vez lavadas las membranas con la solución SSC 2X, estas se expusieron, por separado junto con una película para diagnóstico (X-OMAT® XK-1, Kodak) dentro de un casete a una temperatura de -70°C. El tiempo de

exposición inicial fue de ocho días, sin embargo los resultados obtenidos al revelar las películas mostraban un fondo muy elevado y una hibridación poco específica, por lo que se decidió realizar una segunda exposición a la misma temperatura, la cual tuvo una duración de tres días.

Los resultados obtenidos en la segunda hibridación mostraron una mejor resolución en las imágenes, sin embargo las películas continuaban mostrando una alta inespecificidad, por lo que se decidió realizar una nueva hibridación con las mismas membranas, tratándolas previamente.

La segunda hibridación se realizó a una temperatura de 65°C, durante 22 horas. Al finalizar las membranas hibridadas se lavaron con una solución SSC 0.2X y se expusieron a una película para diagnóstico durante 5 días a -70°C dentro de un casete. Aun cuando los resultados obtenidos fueron más específicos que en el primer marcaje, las películas continuaron mostrando un fondo elevado, aunque se pudo observar con más claridad la hibridación.

Al igual que en el marcaje quimioluminiscente, solo se logro la hibridación de los controles, tanto de la sonda pGAPDH con las muestras de riñón y cerebro, así como de la sonda pKv_{1,3} con la clona A (figura 5.14). No se observo en ningún caso la hibridación de la sonda pPCRKv con alguna de las muestras problemas. La mejor resolución en el revelado de las películas se obtuvo, en el caso de las membranas hibridadas con la sonda pKv_{1,3} a los cinco días de exposición, mientras que para las membranas hibridadas con la sonda pGAPDH a los tres días de exposición, ambos revelados realizados a una temperatura de -70°C.

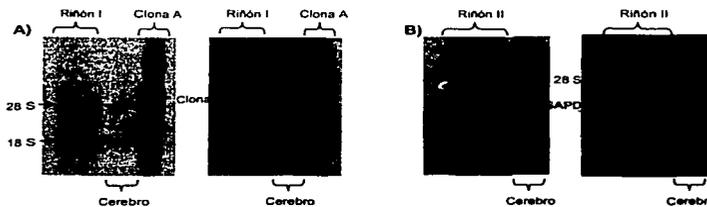


Figura 5.14 Northern blot radiativo. Los gels a partir de los cuales se realizó la transferencia, corresponden a los de la figura 5.13A: (A) Membranas hibridadas con la sonda Kv_{1,3} de 900pb obtenida a partir de la clona A; exposiciones de 5 y 3 días respectivamente; (B) Membranas hibridadas con la sonda GAPDH de 480 pb, exposiciones de: 5 y 3 días respectivamente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6. ANALISIS DE RESULTADOS

Actualmente se conocen un gran número de subunidades α de canales Kv con funciones distintas. Muchas de las subunidades α son productos únicos de una superfamilia de genes. La expresión diferencial de estos genes en diferentes tejidos, así como el co-ensamblaje de las subunidades- α pueden contribuir a una marcada diversidad funcional de los canales Kv_{1,x} (Harte R.,2002). En este estudio se pretendió demostrar la expresión de un canal Kv_{1,3} en el riñón de la rata.

Para llevar a cabo el estudio de la expresión de genes en diferentes tejidos (riñón, TCMi y cerebro), y de acuerdo a uno de los objetivos planteados en este estudio, fue muy importante establecer un método reproducible que permitiera obtener un ARN_{total} íntegro y de alta calidad, ya que al tratarse de una molécula extremadamente lábil, la acción de las ribonucleasas sin el tratamiento adecuado resultaba inminente.

Extracción del ARN_{total}

El método del trizol (GIBCO BRL) se eligió para lograr las características deseadas en el ARN_{total}, debido a que su realización no requiere de periodos prolongados, además de ser un método muy práctico, ya que la correcta realización del protocolo asegura la obtención de un ARN_{total} libre de moléculas de ADN y/o de proteínas, sin la necesidad de agregar reactivos o enzimas adicionales, como las ADNasas (TRizol[®] Reagent; No Cat: 15596, Insert No: 3796).

Además del protocolo de extracción seleccionado, fue necesario colocar los órganos extraídos en N₂ líquido, ya que de lo contrario la integridad del ARN_{total} sería seriamente afectada. La combinación del método de trizol, así como el empleo de N₂ líquido en los órganos recién extraídos, permitieron obtener un ARN_{total} con las características requeridas. La integridad del ARN extraído se verificó al correr las muestras en un gel de agarosa al 1% bajo condiciones desnaturizantes, observándose en el transiluminador las bandas correspondientes a los fragmentos de los ARN's ribosomales 28S y 18S. El ARN_{total} obtenido fue de tamaño homogéneo y la presencia de moléculas de diferente peso molecular indicó que la extracción del ARN fue adecuada.

Expresión del canal (análisis de RT-PCR)

Actualmente se conoce una gran variedad de canales iónicos distribuidos ampliamente en toda clase de células. La diversidad de estos canales a nivel molecular puede surgir como resultado de la combinación de diversos procesos endógenos y/o exógenos que incluyen: genes múltiples responsables de cada una de las corrientes, ensamblado alternativo de los genes, formación de homomultímeros o heteromultímeros y modificaciones diferenciales post-traduccionales (Coetzee.,1999), sin embargo el mecanismo responsable de la expresión diferencial de los genes Kv1.x aun no se ha determinado (Cox.,2001).

La obtención de un ARN_{total} íntegro fue de gran importancia en la realización de este trabajo, ya que a partir de él se demostró la expresión del gen del canal Kv_{1,3} en el cerebro y el riñón de rata mediante los análisis de RT-PCR (figura 5.5 B). Así mismo, el ARN extraído se utilizó en la identificación del transcrito del canal Kv_{1,3} mediante el ensayo de Northern blot (sección 5.7).

La expresión del gen correspondiente al canal Kv_{1,3} en el riñón y cerebro se demostró por el método de RT-PCR, para ello se emplearon iniciadores diseñados a partir de la región conservada (inickKv_{1,3}) y específica (inickPCRKv) de los canales Kv_{1,3}. La comparación de los iniciadores en el GeneBank (NCBI/Blast) nos indicó que los fragmentos amplificados corresponden a una región del canal de potasio Kv_{1,3}.

Los fragmentos amplificados de 891 y 500 pb demuestran que el canal Kv_{1,3} se expresa constitutivamente en el cerebro de la rata (control), sin embargo la expresión de este canal en el riñón no es constante, ya que sólo a partir de tres riñones y utilizando los iniciadores inickKv_{1,3}, fue posible amplificar el fragmento del canal (figura 5.5 A). En el caso de la expresión del canal Kv_{1,3} en el túbulo colector de la médula interna (TCMI), sólo fue posible amplificar el fragmento de 891 pb en una ocasión (no se muestran los datos).

El fragmento de 891 pb amplificado con los iniciadores inickKv_{1,3} se secuenció. Los resultados de la secuenciación indicaron que de los 891 pb que integran el fragmento amplificado, 630 pb corresponden al menos a un canal Kv_{1,3} del linfocito de rata y un canal Kv_{1,3} del cerebro de rata (2264 pb y 1883 pb, respectivamente; Douglas.,1990; Swanson., 1990). Estos resultados, además de la amplificación constante en el cerebro confirman la identidad del fragmento de

891 pb. Además, la secuencia de nucleótidos fue traducida y comparada con la secuencia de aminoácidos reportada del gen que codifica para el canal Kv_{1.3} (KCNA3), obteniéndose resultados similares (figura 5.9 B).

Los resultados obtenidos con el análisis de RT-PCR no son concluyentes, debido a que no fueron reproducibles en todos los análisis realizados. Para descartar la ausencia del canal o si se trató de un problema de expresión, o bien de un error en la metodología, será necesario realizar un análisis cuantitativo para determinar la concentración mínima de ARNm detectable.

Control de los análisis de RT-PCR

Con el propósito de validar las metodologías implicadas en la extracción del ARN y en el análisis de RT-PCR, se decidió utilizar como control el ARNm de una enzima constitutiva, presente en todas las células: la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Los iniciadores de la GAPDH se diseñaron de acuerdo a las secuencias reportadas por Cerbón y cols. El tamaño del fragmento amplificado de la enzima GAPDH fue de 459 pb. Además, en este trabajo se incluyó un control adicional de la expresión, el análisis de Dot blot. La realización de este ensayo pretendió identificar la presencia del gen KCNA3 en el genoma de la rata.

Análisis de Dot blot

Para llevar a cabo el análisis de Dot blot, se colocaron diluciones de ARN_{total}, obtenido a partir de diferentes tejidos (cerebro y riñón), sobre la superficie de una membrana de nylon. Adicionalmente se colocaron diluciones decrecientes de ADN genómico, con el fin de corroborar que la información contenida en él se transcribiera. De esta manera el ADN genómico funcionó además como un control para validar la hibridación de las sondas problema.

En el análisis de Dot blot, sólo se empleó la sonda obtenida a partir de la clona A, contenida en el vector pCR⁺ 2.1-TOPO (891 pb). La hibridación de la sonda con el ADN genómico nos indicó que la sonda problema (Kv_{1.3}) identificó una secuencia complementaria; la cual no corresponde necesariamente a la información que se transcribe en el cerebro y riñón.

Los resultados obtenidos en el análisis de Dot blot indicaron que la sonda problema fue capaz de identificar una región homóloga en el ADN genómico, así

como el transcrito del canal Kv_{1,3} en el riñón y cerebro de la rata, lo que demuestra que el marcaje fue correcto. Los hallazgos obtenidos mediante el análisis de RT-PCR y de Dot blot confirman la expresión del gen del canal Kv_{1,3} en el cerebro y en el riñón de rata.

Análisis de Northern blot

Los genes Kv1.x se expresan diferencialmente en las ratas Wistar. La expresión diferencial de los genes que codifican para los canales de K⁺ dependientes de voltaje (Kv), así como el co-ensamblaje de las subunidades- α , contribuyen a una marcada diversidad funcional de estos canales. Actualmente se conocen un gran número de subunidades α de canales Kv con funciones distintas (Cox.,2001), sin embargo no existen referencias que indiquen la funcionalidad de estos canales en las células no excitables. El propósito de realizar un análisis de Northern blot fue conocer el tamaño aproximado y la integridad del transcrito del canal Kv_{1,3}.

Para llevar a cabo el análisis de Northern blot fue necesario separar las muestras de ARN mediante una electroforesis. Durante la electroforesis fue necesario recircular constantemente el buffer MOPS 1X, evitando con esto que el buffer se calentara y causara la degradación de las muestras. Aun cuando el gel empleado fue preparado para muestras de ARN y las condiciones bajo las cuales se corrió la electroforesis fueron desnaturalizantes, estos detalles no afectaron la integridad del ADN control contenido en el vector, ya que como se puede observar en el carril 7 de la figura 5.12 A, se llevo a cabo la hibridación entre la sonda problema y un fragmento del canal Kv_{1,3} contenido en la clona A. Esta hibridación era necesariamente obligatoria, ya que la sonda problema (Kv_{1,3}) fue obtenida a partir de la clona A.

Otro de los objetivos planteados en este estudio consistió en comparar dos técnicas involucradas en el marcaje de las sondas. Para ello se realizó un marcaje radiactivo (³²P) y un marcaje quimioluminiscente (kit AlkPhos) de las sondas. En el análisis de Northern blot se utilizaron tres sondas diferentes, todas ellas constituidas por ADNc.

Al igual que en la obtención de un ARN de calidad, la transferencia de este a la membrana de nylon fue de gran importancia en la obtención de resultados confiables. Todos los materiales y reactivos involucrados en la transferencia del

ARN fueron tratados conforme a lo descrito en el apéndice de protocolos. Antes de llevar a cabo la transferencia del ARN, fue necesario separar sus componentes a través de una electroforesis desnaturalizante.

Durante la transferencia del ARN, fue muy importante asegurarse que el papel utilizado en el sistema de transferencia no se humedeciera completamente, ya que esto disminuía considerablemente la velocidad con la cual el ARN se transfería a la membrana. Además, fue muy importante rodear los bordes del gel con suficiente papel de cera (parafilm) ya que si el papel entraban en contacto con el gel o con la SSC, esta solución se absorbería rápidamente sin pasar a través del gel, llegando incluso a agotarse, desapareciendo con ello la fuerza motriz necesaria para realizar la transferencia

Al finalizar la transferencia se verificó la integridad del ARN. Aún cuando las bandas correspondientes a los fragmentos 28 S y 18 S no indicaron la integridad más adecuada del ARN, las muestras se consideraron aceptables para emplearse en la identificación de los transcritos de interés.

Marcaje de las sondas

En la realización de los análisis de Northern blot y de Dot blot se emplearon tres ondas diferentes. Dos de las sondas tuvieron como objetivo identificar el transcrito del canal $Kv_{1.3}$, mientras que la tercera validó la integridad del ARN, su transferencia a una membrana de nylon, además de servir como control positivo de la expresión.

La comparación de las técnicas radiactiva y no radiactiva, en lo que respecta al tiempo de realización, indican que el marcaje quimioluminiscente resultó ser mas rápido que el marcaje radiactivo, ya que se requirió de aproximadamente 1 hora para su realización, mientras que el marcaje radiactivo tuvo una duración de aproximadamente 2 horas. En cuanto al empleo de materiales o equipos especiales, en el marcaje quimioluminiscente no se requirió el uso de un contador de radiactividad (contador Geiger), o de una camisa de plomo para el transporte de muestras, ambos necesarios en el marcaje radiactivo. Además, durante la realización de este último fue necesario trabajar en un sitio asignado exclusivamente para el manejo de muestras radiactivas, detrás de una pantalla de acrílico.

Al finalizar el marcaje radiactivo, fue necesario conocer la eficacia en cuanto a la incorporación de nucleótidos marcados, acción que no se realizó en el marcaje quimioluminiscente. Este paso proporcionó información sobre la eficiencia en el marcaje de la sonda, pero implicó el uso de un contador de centello para determinar el número de nucleótidos marcados incorporados.

Una vez marcadas las sondas, estas podían ser conservadas por algunos días, según fuera su uso. La estabilidad de las sondas quimioluminiscentes fue de hasta 3 meses a -20°C almacenadas en glicerol (50% v/v), mientras que la estabilidad de las sondas radiactivas dependió del número de nucleótidos incorporados (cpm), pudiéndose almacenar máximo 2 semanas a -20°C, dentro de una camisa de plomo.

Ventajas y desventajas en el marcaje de las sondas

Con base en las observaciones citadas en los apartados anteriores y agregándoseles el hecho de que el manejo de muestras radiactivas involucra una licencia especial, así como una capacitación del personal que labora con ella, además de representar un riesgo latente para la salud y el medio ambiente, se concluye que el método quimioluminiscente resultó la mejor opción para llevar a cabo el marcaje de las sondas; esto sin tomar en cuenta los resultados que se obtienen durante la hibridación e identificación de las muestras problema.

Controles en el análisis de Northern blot

Para validar los resultados obtenidos en el análisis de Northern blot no radiactivo, fue necesario emplear dos controles internos. Uno de ellos consistió en correr una muestra del vector pCR[®] 2.1-TOPO (clona A), en el cual se localizaba el fragmento del canal Kv_{1.3}, previamente secuenciado y amplificado con los iniciadores inicKv_{1.3} (ver secciones 5.4 y 5.5). Este control validó la calidad, función y especificidad de la sonda.

El segundo control empleado en los análisis fue la enzima GAPDH. Los resultados obtenidos en el análisis de Northern blot después de agregar el reactivo quimioluminiscente (figura 5.12 B) muestran la presencia de una mancha en cada carril, correspondiente a la hibridación entre la sonda GAPDH y las muestras de ARN de cerebro y riñón de rata.

En el análisis de Northern blot radiactivo, la clona A sirvió también como un control para validar la calidad, función y especificidad de las sondas. Lo anterior demuestra que la sonda problema no tuvo la capacidad de identificar el transcrito del canal Kv_{1.3} en el riñón y cerebro de rata, sin embargo si reconoció un fragmento del canal Kv_{1.3} contenido en la clona A, a partir del cual se obtuvo la sonda (control).

Interpretación del análisis de Northern blot

En el análisis de Northern blot quimioluminiscente se realizaron dos exposiciones de la membrana dentro de un casete. Debido a que la primera exposición fue bastante prolongada (1H y 30 min), obteniéndose un fondo muy elevado en la películas, fue necesario realizar una exposición adicional (30 min.), en ella se aprecian perfectamente las manchas correspondientes a la hibridación entre la GAPDH y los ARN's problema (figura 5.12 B). A pesar de que la temperatura a la cual se realizó la hibridación fue baja (55°C), no se observan hibridaciones inespecíficas entre la sonda y otros ARN's.

Los tamaños (pares de base) de las manchas observadas en los carriles del cerebro y del riñón son ligeramente distintos. Esto no indica que se trate de dos transcritos diferentes, sino mas bien de una diferencia en el número de bases que componen los transcritos de uno y otro tejido. Hay que tomar en cuenta que en el análisis de Northern blot, el tamaño de la sonda es siempre el mismo y lo que varía es el número de bases del fragmento identificado, siendo en este caso ligeramente mayor el número de bases identificadas en el ARN obtenido del riñón de rata.

En el análisis de Northern blot radiactivo se llevaron a cabo dos hibridaciones. Los resultados obtenidos durante la primera hibridación no proporcionaron información suficiente para ser interpretados, por lo que fue necesario realizar una nueva hibridación empleando las mismas moléculas de ARN fijadas a la membrana. Al llevar a cabo la segunda hibridación se comprobó que los lavados realizados con una astringencia mayor disminuyeron el problema de la hibridación inespecífica, sin embargo, no fueron suficientes para identificar los transcritos del canal Kv_{1.3} (figura 5.14).

En el caso de las membranas hibridadas con la sonda Kv_{1,3} de 891 pb, se observó que los resultados más claros se obtuvieron al realizar una segunda exposición (figura 5.14). En la película se distingue la presencia de dos manchas de diferente tamaño en cada uno de los carriles en donde se colocaron las muestras de ARN, estas manchas coinciden con los fragmentos 28 S y 18S de los ARN's ribosomales, lo cuál nos indica una hibridación inespecífica debida a la baja astringencia con la que se realizaron los lavados. La intensidad de las manchas fue muy tenue e inferior a la alcanzada por la hibridación entre la sonda problema y la clona A.

Con lo que respecta a los resultados obtenidos al hibridar las sondas control (GAPDH) con los transcritos del riñón y del cerebro de rata, estos fueron satisfactorios. Al igual que en el análisis no radiactivo, se observa una diferencia en el tamaño de los transcritos de la GAPDH localizados en el riñón y cerebro de rata; siendo ligeramente mayor el número de bases de los transcritos identificados en el riñón. Este hecho coincide con los resultados del análisis quimioluminiscente y valida la calidad del ARN, así como los procesos involucrados en la obtención y marcaje de las sondas. Los resultados obtenidos en la segunda hibridación nos muestran una imagen más clara en donde disminuye la inespecificidad en la unión, aunque se continúa apreciando ligeramente la hibridación de la sonda con los fragmentos 18 S y 28 S (figura 5.14). No obstante, se puede observar en cada carril la presencia de una mancha de gran intensidad, localizada por debajo del fragmento 18S, la cuál corresponde al transcrito de la enzima GAPDH.

Comparación de las técnicas utilizadas

Los resultados obtenidos con el análisis de Northern blot no coinciden con los alcanzados en la amplificación, secuenciación y análisis de Dot blot. En las películas, producto del análisis de Northern blot no radiactivo (figura 5.12 A), se puede observar que ni en el cerebro, ni en el riñón fue posible detectar una señal que nos indicara la presencia de un ARNm complementario a la secuencia de la sonda marcada. En la hibridación radiactiva tampoco fue posible detectar los transcritos del canal Kv_{1,3} en el riñón y en el cerebro de rata, sin embargo en ambos análisis sí se detectó el transcrito de la GAPDH, hecho que valida los resultados de este análisis, los cuales no coinciden con los obtenidos en la amplificación, secuenciación y análisis de Dot blot.

Al comparar los resultados obtenidos con ambos análisis de Northern blot (radiactivo y quimioluminiscente), se concluye que ninguno de los dos fue lo suficientemente sensible para llevar a cabo la identificación de los transcritos, cuya expresión en algunos tejidos es limitada, como en el caso del canal Kv_{1.3}.

Esta conclusión se basa en el hecho de que los controles involucrados en el análisis funcionaron perfectamente: la sonda problema de 891 pb hibridó con el vector pCR^{2.1}-TOPO (clona A), el cual contenía un fragmento del canal Kv_{1.3} a partir del cuál fue preparada; la sonda GAPDH hibridó con los transcritos de la enzima presentes en riñón y cerebro de la rata, además de que se identificó la presencia del gen que codifica para el canal Kv_{1.3} en el ADN genómico, así como el ARNm no desnaturalizado en el ensayo de Dot blot. A lo anterior se le agregan los resultados obtenidos con la amplificación del canal, empleando iniciadores específicos, cuyo fragmento obtenido fue purificado y secuenciado, indicando que se trataba de una fracción del canal Kv_{1.3} (figura 5.9).

Finalmente al llevar a cabo la comparación de ambas metodologías implicadas en el análisis de Northern blot, se encontró que el análisis quimioluminiscente fue la mejor opción tanto en el marcaje de las sondas, como en la obtención de una señal confiable y específica, ya que a diferencia del análisis radiactivo, no fue necesario realizar hibridaciones secundarias variando la astringencia, con el fin de disminuir la hibridación inespecífica de las sondas.

Además de lo citado anteriormente y tomando en cuenta los aspectos de seguridad, de salud, de ecología, de materiales y de capacitación, hacen que el análisis quimioluminiscente empleando el kit AlkPhos sea una buena alternativa para llevar a cabo el marcaje de las sondas, sin la necesidad de manejar radioisotopos. Aun cuando el marcaje quimioluminiscente resulta ser la mejor opción para el marcaje de las sondas, en este trabajo no fue posible identificar por ninguno de los análisis de Northern blot (radiactivo y quimioluminiscente), la presencia de los transcritos del canal Kv_{1.3} ni en el riñón y ni en el cerebro de la rata.

Estos resultados parecen no ser claros, ya que la expresión del canal en diferentes tejidos (riñón y cerebro) se demostró (análisis de RT-PCR) en este trabajo. La expresión del canal Kv_{1.3} en cerebro no es sorprendente pues en él se encuentran una gran cantidad de células excitables, por lo que la presencia de un gran número de transcritos es común en este órgano, sin embargo la expresión

de este canal en el riñón es un hallazgo novedoso e importante, aun cuando se desconoce el papel específico de los canales dependientes de voltaje en las células endoteliales (Harte R.,2002, Cox.,2001). Se han sugerido algunas funciones de los canales Kv en células epiteliales, de las cuales la regulación del volumen celular, y la reabsorción de sodio trans-epitelial parecen ser la más importante (Yao.,1996; Sperelakis.,1995).

7. CONCLUSIONES

- o Se lograron establecer las condiciones experimentales de los análisis de Northern y de Dot blot, por dos metodologías: radiactiva y quimioluminiscente.
- o El análisis de Northern blot resultó ser un método poco sensible en la identificación del transcrito del canal Kv_{1,3} en el riñón y cerebro de rata. Aún así, la ausencia de un resultado positivo en los análisis de Northern blot, no nos indica la inexistencia del transcrito del canal Kv_{1,3}.
- o El análisis Dot blot proporcionó información sobre la presencia del gen del canal Kv_{1,3} y los transcritos obtenidos a partir de este.
- o La combinación de tres protocolos moleculares (PCR, Northern blot y Dot blot), resultó ser de gran importancia en la interpretación de los resultados obtenidos.
- o El marcaje radiactivo de las sondas, resultó ser un método complicado, laborioso y sobre todo riesgoso para la salud. La calidad de los resultados obtenidos fue similar a la del marcaje quimioluminiscente.
- o El marcaje quimioluminiscente de las sondas, utilizando el juego AlkPhos® fue un método práctico, rápido e inocuo, por lo tanto resulta ser una buena alternativa para llevar a cabo hibridaciones de tipo Northern blot en la identificación de muestras problema, aun cuando la sensibilidad de la técnica no siempre es la mas adecuada.

8. BIBLIOGRAFÍA

- 1. Aidley D, Stanfield P. "Ion Channels, molecules in action". Ed Cambridge University Press, Reprinted (1998): 1-7,65-68**
- 2. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD "Molecular Biology of the Cell". Ed. Garland Publishing. Inc., 3rd edition (1994): 523-547**
- 3. Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR "Method for detection of specific RNA in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes" Proceedings of the National Academy of Sciences (1977) **74**:5350-54**
- 4. Amersham pharmacia biotech "Hybond-N" RPN2020B PL/98/08 (1998)**
- 5. Arrieta I, Camacho I, Mendoza A, Cerbón M "c-Fos gene expression in the hypothalamus and the preoptic area of defeminized rats" Brain Research (2000) **867**: 100-106**
- 6. Ashcroft F "Ion Channels and Disease". Ed. Academic press (2000): 54-59, 97-111**
- 7. Atwater J, Wisdom R, Verma IM "Regulated mRNA stability" Annu Rev Genet (1990) **24**:519-541**
- 8. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore D, Seidman JG, Smith JA, Struhl K "Short protocols in molecular biology" Published John Wiley & Sons, Inc., 3rd edition (1995): 2.8,2.13,2.33-35,4.22-27**
- 9. Baker H, Lindsey R, Weisbroth S, "The Laboratory Rat; Biology Diseases" Ed. Academic Press Inc (1979) Vol I.**
- 10. Black DL "Protein Diversity from Alternative Splicing: A challenge for Bioinformatics and Post-Genome Biology" Cell (2000) **103**:367-370**
- 11. Bezanilla F "The voltage sensor in Voltage-Dependent ion channels" Physiological Reviews (2000) **80**(2):555-589**

12. Cai Y, Peregrine BO, Alan N, Douglas CD, Douglas J. "Characterization and functional expression of genomic DNA encoding the human lymphocyte Type *n* Potassium Channel." *DNA and Cell Biology* (1992) **11(2)**:163-172.
13. Choe S. "Potassium channel structures" *Nature Reviews Neuroscience* (2002) **3**:115-121
14. Christopher GK, Walsh L, Laroux FS, Kalogeris T, Grisham MB, Alexander JS "An improved, rapid Northern protocol" *Biochemical and Biophysical Research Communications* (1997) **238**:277-79
15. Coetzee WA "Molecular diversity of K⁺ channels" *Ann New York Acad Sci* (1999) **868**:233-285
16. Cox RH, Folander K, Swanson R "Differential expression of voltage-gated K⁺ channel genes in arteries from Spontaneously Hypertensive and Wistar-Kyoto rats". *Hypertension* (2001) **37**:1315-1322
17. Darling D, Brickell P "Nucleic Acid Blotting, the basics" Ed IRL press at Oxford university press (1994): 45-69
18. Douglas J, Osborne PB, Cai YC, Wilkinson M, Christie MJ, Adelman JP "Characterization and functional expression of a rat genomic DNA clone encoding a lymphocyte potassium channel" *J Immunol* (1990) **144(12)**:4841-50
19. Doyle A, Cabral M, Pfuetzner A, Kuo A, Gulbis M, Cohen L, Chait T, MacKinnon R. "The structure of the potassium channel: Molecular basis of K⁺ conduction and selection" *Science* (1998) **280**:69-77
20. Ford W, Stevens B, Treherne M, Packer J, Bushfield M. "Potassium channels: gene family, therapeutic relevance, highthroughput screening technologies and drug discovery" *Prog Drug Res* (2002) **58**:133-68
21. Giebisch G, Wang W. "Renal tubule Potassium Channels: function, regulation and structure" *Acta Physiol Scand* (2000) **170**: 153-173.

22. Guyton A "Tratado de Fisiología Médica" Hall, Ed. Mc Graw Hill Interamericana, 10ª Edición (2001): 339-343
23. Harte R, Ouzounis CA "Genome-wide detection and family clustering of ion channels" FEBS letters (2002) **514**:129-34
24. Hartmann HA, Kirsch GE, Drewe JA, Tagliatela M, Joho RH, Brown AM "Exchange of conduction pathways between two related channels K⁺ channels" Science (1991) **251**:942-44
25. Hille B. "Ionic Channels of excitable membranes. Ed. Sinauer, 2nd edition (1992)
26. Huang CL, Feng S, Hilgeman DW. "Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP2 and its stabilization by G γ " Nature (1998) **362**:31-38
27. Hughes FM, Cidlowski JA "Potassium is a critical regulator of apoptotic enzymes in vitro and *in vivo*" Adv Enzyme Regul (1999) **39**:157-171
28. Jackson R "Cytoplasmic regulation of mRNA function: The importance of the 3' untranslated region" Cell (1993) **74**:9-14
29. Xu J, Koni PA, Wang P, Li G, Kaczmarek L, Wu Y, Li Y, Flavell RA, Desir GV. "The voltage-gated potassium channel Kv1.3 regulates energy homeostasis and body weight" Human Molecular Genetics (2003) **12(5)**: 551-559
30. Kreft KZ, Kreft S, Komel R, Grubič Z "Nonradioactive northern blotting for the determination of acetylcholinesterase mRNA. Comparison to the radioactive technique" Eur J Physiol (2000) **439[Suppl]**:R66-R67
31. Kubo Y, Timothy B, Jan Y N, Jan L Y. "Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel". Nature (1993) **362**:127-133
32. Kubokawa M, McNicholas CM, Higgins MA, Wang W, Giebish G. "Regulation of ATP-sensitive K⁺ channel by membrane-bound protein phosphatases in rat principal tubule cell" Am J Physiol (1995) **269**:F335-F362

33. Larsson HP, Baker OS, Dhillon DS, Isacof EY. "Transmembrane movement of the *Shaker* K⁺ channel S4" *Neuron* (1996) **16**:387-397
34. Lehninger AL, Nelson DL and Cox MM, Principios de Bioquímica. Ed. Ediciones Omega, S.A., 1ª reimpresión (1995): 30-32 ,268-295
35. Lewin B. Genes VII. Ed. Marbán (2001): 25-29, 119-137, 233-271,801-804
36. Lopez A.J "Alternative splicing of pre-mRNA: developmental consequences and mechanisms of regulation" *Annu. Rev. Genet* (1998) **32**:279-305
37. MacKinnon R "Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel". *Nature* (1991) **350**:232–235.
38. Martel J, Depuis G, Deschênes, Payet M. "The sensitivity of the human Kv1.3 (hKv1.3) lymphocyte K⁺ channel to regulation by PKA and PKC is partially lost in HEK 293 host cells". *J. Membrane Biol.* (1998) **161**:183-196
39. Martini FH. Fundamentals of Anatomy and Physiology. Ed. Prentice Hall, 3ª edición (1995): 979-1017
40. McDonough A, Curtis T, Jang Y. "Skeletal muscle regulates extracellular potassium". *Am J Physiol Renal Physiol* (2002) **282**:F967-F974.
41. Muñoz-Martínez EJ, García X. V. Fisiología. Células, Organos y Sistemas. Ediciones Científicas Universitarias, Tomo III (2000): 97-99,119-123.
42. Papazian M, Schwarz L, Tempel L, Jan Y N, Jan L Y. "Cloning of genomic and complementary DNA from *shaker*, a putative potassium channel gene from *Drosophila*", *Science* (1987) **237**:749-753
43. Pardo LA, del Camino D, Sánchez A, Alves F, Bruggemann A, Beckh S, Stuhmer W "Oncogenic potential of EAG K⁺ channels" *EMBO J* (1999) **18**:5540-5547
44. Patton H, Fuchs A, Hille B, Scher A, Steiner R. "Textbook of physiology". Ed. Saunders, 21ª edición (1989) Vol 1 y 2: 1061-91

45. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T "Molecular Cloning, a laboratory manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edition, Vol 1 (1989): 6.3-19,7.3-11,7.37-50,7.53-57
46. Shieh CC, Coghlan M, Sullivan JP and Gopalakrishnan M. "Potassium Channels: Molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities." Pharmacological Reviews (2000) 52:557-593.
47. Shipston MJ "Alternative splicing of potassium channels: a dynamic switch of cellular stability" TRENDS in cell biology (2001) 11(9):353-358
48. Sigworth J. "Potassium channels mechanics" Neuron (2001) 32(4):555-6
49. Sperelakis Nicholas "Cell Physiology, Source Book" Ed. Academic Press (1995): 315-329
50. Swanson R, Marshall J, Smith J, Williams J, Boyle MB, Folander K, Luneau CJ, Antanavage J, Oliva C, Buhrow SA "Cloning and expression of cDNA and genomic clones encoding three delayed rectifier potassium channels in rat brain" J Neuron (1990) 4(6):929-939
51. Szymanski M, Barcisyewski J "Beyond the proteome: non-coding regulatory RNAs" Genome Biology (2002) 3(5):reviews 0005.1-0005.8
52. Tresguerres Jesús Angel "Fisiología Humana" Ed. Interamericana McGraw-Hill, 1^a edición (1992): 435-438
53. Trayhurn P, Thomas MEA, Duncan JS, Black D, Beattie JH, Rayner DV "Ultra-rapid detection of mRNA's on Northern blots with digoxigenin-labelled oligonucleotides and CDP-*Star*, a new chemiluminescence substrate" Biochemical Society Transactions (1995) 23:494S
54. Yao JA, Chang AY, Boulpaep EL, Segal AS, Desir GV "Molecular Cloning of a Glibenclamide-sensitive, Voltage-gated Potassium Channel Expressed in Rabbit Kidney" Journal of Clinical Investigation (1996) 97(11):2525-2533

55. Yao JA, Jiang M, Fan JS, Zhou YY, Tseng GN. "Heterogeneous changes in K currents in rat ventricles three days after myocardial infarction" *Cardiovasc Res* (1999) **44**:132-145
56. Yellen G, Jurman ME, Abramson T, MacKinnon R "Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K⁺ channel" *Science* (1991) **251**:939-942
57. Yi B A, Minor D, Lin Y F, Jan Y N, Jan L Y. "Controlling potassium activities: interplay between the membrane and intracellular factors" *PNAS* (2001) **98**(20):11016-11023
58. Young B, Gruber TM, Gross CA "Views of transcription initiation" *Cell* (2002) **109**:417-420
59. Wang W, Hebert S, Giebisch G. "Renal K⁺ Channels: structure and function." *Annu. Rev. Physiol.* (1997) **59**:413-436.
60. Windhager Erich E. "Handbook of Physiology, Renal Physiology" Ed. Oxford University Press (1995) Vol 1, section 8: 41-107
61. www1.amershambiosciences.com/apatrix/upp01077.nsf/Content/Products?OpenDocument&parentid=46577&moduleid=46579
62. www.ambion.com/techlib/trn/83/8313.html
63. www.microarray.mbg.jhmi.edu/Trizol.pdf (TRIzol[®] Reagent, Total RNA Isolation Reagent; No Cat: 15596, Insert No: 3796)
64. www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
65. www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/list.cgi
66. www.uam.es/personal_pdi/medicina/algvilla/guiones/canales.html
67. www.uninet.edu/tratado/c050301.html

9. APENDICE DE PROTOCOLOS

9.1 TRATAMIENTO PARA ELIMINAR NUCLEASAS DE RECIPIENTES EMPLEADOS EN EL MANEJO DE MUESTRAS QUE CONTIENEN ARN

Lavar los recipientes con suficiente solución detergente (Extrane®).
Enjuagar perfectamente.
Secar con etanol al 96%.
Cubrir los recipientes con H₂O₂ al 3% (10 minutos a temp. ambiente).
Enjuagar con suficiente H₂O-DEPC.

9.2 GEL DE AGAROSA AL 1% PARA MUESTRAS DE ADN

Pesar 0.3 g de agarosa LE (low electroendosmosis).
Agregar 30 ml de buffer TBE 1X.
Calentar en microondas hasta que la agarosa se disuelva.
Vaciar en un tubo de plástico.
Adicionar entre 1.0 y 1.4 µl de bromuro de etidio (10 µg /µl) y mezclar.
Vaciar la solución en la cámara de electroforesis.
Permitir que solidifique a temperatura ambiente.
Correr electroforesis con Buffer TBE 1X.

9.3 GEL DE AGAROSA AL 1% PARA MUESTRAS DE ARN

Pesar 0.3 g de agarosa LE.
Agregar 25 ml de H₂O-DEPC.
Calentar en microondas hasta que la agarosa se disuelva.
Adicionar H₂O-DEPC cbp alcanzar 25 ml.
Agregar 3 ml de MOPS 10X, o bien 6 ml de MOPS 5X.
Permitir que la temperatura disminuya hasta los 35°C aproximadamente.
Adicionar 1.5 ml de formaldehído.
Vaciar la solución en la cámara de electroforesis.
Permitir que el gel solidifique a temperatura ambiente.
Correr la electroforesis con Buffer MOPS 1X.

9.4 MEZCLA DESNATURALIZANTE PARA MUESTRAS DE ARN

NOTA: Por cada 3 µL de ARN, se emplean 9.16 µL del mix desnaturalizante (reacción 1X)

	Volumen (reacción 1X)
Formamida	5.0 µl
MOPS 10X	1.0 µl
Formaldehído	2.0 µl
GLB	1.0 µl
BrEt	0.16 µl
Volumen Total	9.16 µl

9.5 AISLAMIENTO DE ARN POR EL METODO DEL TRIZOL (Gibco BRL®)

A. Homogenización de tejidos

Colocar de inmediato los órganos extraídos en una solución fría que contenga inhibidores de nucleasas, o bien en nitrógeno líquido.

Pesar los órganos de interés.

Adicionar 1 ml de trizol por cada 50-100 mg de tejido u órganos pesados, colocándolos de inmediato en un baño de hielo.

Homogenizar brevemente la mezcla con ayuda de un homogenizador (Polytron), sumergiéndola en un baño de hielo cada 5 segundos.

Repetir esta operación cuantas veces sea necesario, hasta que los órganos o tejidos queden perfectamente homogenizados .

Dispensar los órganos o tejidos homogenizados en alícuotas adecuadas

Almacenar las alícuotas a -70°C (REVCO).

B. Obtención del material genético

Remover el material insoluble del homogenizado, centrifugándolo a no más de 12000 g durante 10 minutos a una temperatura de entre 2-8°C.

Transferir el sobrenadante obtenido a un tubo limpio y estéril.

Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Adicionar 0.2 ml de cloroformo por cada ml de trizol empleado en la homogenización.

Agitar con la mano los tubos durante 15 segundos.

Incubar de 2 a 3 minutos a temperatura ambiente.

Centrifugar a 12000 g durante 15 minutos a una temperatura de entre 2-8°C.

Al final de la centrifugación se obtienen tres fases, transferir la fase acuosa a un tubo limpio y estéril.

Precipitar el ARN obtenido (fase acuosa), adicionando 0.5 ml de alcohol isopropílico por cada ml de trizol empleado en la homogenización.

Agitar en un vortex suavemente y de manera casi inmediata.

Incubar las muestras a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Centrifugar a 12000 g durante 10 minutos a una temperatura de entre 2-8°C, al final de la centrifugación se obtiene un precipitado gelatinoso semitransparente (ARN).

Eliminar el sobrenadante obtenido, procurando que el ARN no se desprenda de las paredes del tubo.

Lavar el ARN precipitado con etanol al 75% (grado molecular) en H₂O-DEPC, adicionando al menos 1 ml por cada ml de TRizol empleado en la homogenización.

Agitar en un vortex suavemente y de manera casi inmediata.

Centrifugar a 7500 g durante 5 minutos a una temperatura de entre 2-8°C.

Eliminar el sobrenadante obtenido, procurando que el ARN no se desprenda de las paredes del tubo.

Permitir que el ARN seque a temperatura ambiente, aproximadamente durante 10-15 minutos.

C. Resuspensión del material genético

Resuspender el ARN en 30-40 μ L de H₂O-DEPC.

Pipetear varias veces el ARN disuelto, hasta obtener una suspensión completa del ARN.

Si el ARN no se emplea de inmediato, dispensarlo en alícuotas adecuadas, almacenándolas a -70°C máximo 3 meses.

Si el ARN se emplea de inmediato, incubarlo durante 10 minutos a una temperatura de entre 55-60°C.

Tomar 5 μ L del ARN resuspendido y correrlos en un gel de agarosa al 1%.

Tomar 2 μ L mas para llevar a cabo su cuantificación espectrofotométrica.

Verificar la cantidad e integridad del ARN obtenido.

9.6 AISLAMIENTO DE ADN GENOMICO (Ausubel., 1995)

Reactivos:	Componentes:
Buffer de digestión	Tris-HCl [pH 8.0], EDTA 1mM [pH 8.0]
Mezcla fenol: cloroformo: alcohol isoamílico	(25: 24: 1)
Acetato de amonio 7.5 M	Acetato de amonio, H ₂ O
Buffer TE, pH 8.0	Tris-HCl 10mM [pH 8.0], EDTA.1.0 mM[pH 8.0]
Nitrógeno líquido	N ₂ (-70°C)
Etanol al 70% y 100%	CH ₃ CH ₂ OH

Colocar inmediatamente los órganos extraídos en nitrógeno líquido.

Moler entre 0.2 g y 1 g de tejido, con ayuda de un pistilo y mortero.

Resuspender el tejido molido en el buffer de digestión (1.2 ml por cada 0.1g).

Colocar la mezcla en un tubo de polipropileno de 1.5 ml.

Incubar las muestras en un baño con agitación a 50°C entre 12 y 18 horas.

Extraer el ADN con un volumen equivalente de la mezcla fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:34:1).

Centrifugar a 1700 g durante 10 minutos (si las fases de separación no son apreciables, adicionar otro volumen equivalente de buffer de digestión, sin proteinasa K, repitiendo la centrifugación).

Transferir la fase acuosa (superior) a un tubo nuevo.

Adicionar ½ volumen de acetato de amonio 7.5 M y 2 volúmenes de etanol al 100%.

Centrifugar a 1700 x g durante 2 minutos.

Lavar con etanol al 70% y secar a temperatura ambiente.

Resuspender en buffer TE (1 mg/ml).

Eliminar el ARN residual adicionando SDS al 1% y ARNasas libres de ADNasas (1mg/ml).

Incubar a 37°C durante 1 hora.

Extraer de nueva cuenta el ADN.

El ADN extraído se puede almacenar hasta un año a -20°C.

9.7 REACCION DE LA TRANSCRIPTASA REVERSA (RT)

Diluir 5 µg de ARN_{total} en 10 µL de H₂O-DEPC (0,5µg / µl).
Incubar la reacción a 65°C durante 10 minutos.
Inmediatamente enfriar a 4°C durante 5 minutos.
Preparar la mezcla para la reacción de RT:

Reactivos:		Volumen (Reacción 1X)
Buffer RT 5X	(Tris-HCl 100 mM, KCl 500 mM, pH 8.3)	4 µl
dNTP's	(dATP, dTTP, dGTP, dCTP 10mM, pH 7.0)	2 µl
DTT	(0.1 M) Gibco BRL	2 µl
Hexámeros	(100pmoles) Roche	1 µl
RT-Pol	(200 U/ml) Gibco BRL	1 µl

Agregar 10 µl de la mezcla de la reacción de RT a los tubos que contienen el ARN precalentado y enfriado.
Incubar la reacción a 37°C durante 1 hora.
Inmediatamente incubar a 95°C durante 5 minutos.
Enfriar a 4°C
Adicionar a cada tubo 20 µl de H₂O-DEPC (opcional).
El producto de la reacción de RT puede ser almacenado a -20°C, máximo 1 semana.

9.8 REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Establecer las condiciones necesarias para llevar a cabo la amplificación de los fragmentos de interés.
Preparar la mezcla de la reacción de PCR (emplear al momento de su preparación):

Reactivos:		Volumen (Reacción 1X)
H ₂ O		34.0 µl
Buffer 10X	(Tris-HCl 100 mM, KCl 500 mM, pH 8.3)	5.0 µl
dNTP's	(dATP, dTTP, dGTP, dCTP 10mM, pH 7.0)	1.0 µl
MgCl	(25mM) Gibco BRL	1.5 µl
Taq-Pol	(5 U/µl) Gibco BRL	0.5 µl
<u>Iniciador 1</u>		2.0 ml
<u>Iniciador 2</u>		2.0 µl
ADN	(50 ng)	4.0 ml

Agregar la cantidad requerida de ADN .
Centrifugar brevemente en una microfuga
Incubar la reacción a las temperaturas seleccionadas.
Si los productos de la reacción PCR no son utilizados inmediatamente, pueden ser almacenados a -20°C hasta por un mes.

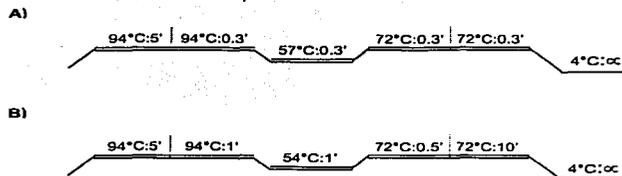


Figura 9.2 (A) Rampa de temperatura de la PCR diseñada para amplificar un fragmento de 891 pb, empleando los iniciadores "inicKv_{1.3}" e "inicGAPDH". (B) Rampa de temperatura de la PCR diseñada para amplificar un fragmento de 500 pb, empleando los iniciadores pPCRkv y pGAPDH. En ambos casos, la reacción constó de 30 ciclos.

9.9 PURIFICACION DE LOS PRODUCTOS PCR (Concert gel extraction systems, Gibco BRL®)

Reactivos:	Componentes:
Buffer de solubilización del gel L1	Perclorato de sodio concentrado, acetato de sodio, Solubilizador TBE
Buffer de lavado L2	Cloruro de sodio, EDTA y Tris-HCl
Buffer TE	Tris-HCl 10mM [pH 8.0], EDTA 0.1 mM

Precalentar una alícuota del buffer TE a 65-70°C.

Equilibrar un baño maria o termoblock a 50°C.

Cargar las muestras de ADN a purificar en un gel de agarosa al 1%.

Correr la electroforesis.

Verificar las bandas de interés en un transiluminador de UV.

Cortar el área del gel que contiene los fragmentos de ADN, empleando para ello una navaja limpia.

Pesar las rebanadas de gel.

Para geles de agarosa menores al 2%, colocar 400 mg de gel en un tubo de polipropileno de 1.5 ml.

Adicionar 300 µL de Buffer de Solubilización L1 por cada 10 mg de gel.

Solubilizar las rebanadas del gel, incubándolas a 50°C por 15 minutos.

Mezclar en un vortex cada 3 minutos, asegurando la completa disolución del gel.

Una vez disuelto el gel, incubar la reacción 5 minutos adicionales a 50°C.

Colocar la(s) columna(s) en un tubo para lavado de 2 ml.

Colocar máximo 500 µl del gel solubilizado en una columna (transferir todo el volumen del gel solubilizado a través de una columna única).
Centrifugar a 12000 rpm durante 1 minuto.
Descartar el volumen eluido.

Lavado opcional: colocar la(s) columna(s) nuevamente en el tubo de lavado.
Adicionar 500 µl de Buffer de Solubilización L1 en la columna
Incubar 1 minuto a temperatura ambiente.
Centrifugar a 12000 rpm durante 1 minuto.
Descartar el volumen eluido.

Colocar la(s) columna(s) nuevamente en el tubo de lavado.
Adicionar 700 µl Buffer de Lavado L2 (con etanol) a la columna.
Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
Centrifugar a 12000 rpm durante 1 minuto.
Descartar el volumen eluido.
Centrifugar 1 minuto adicional para eliminar el Buffer de Lavado L2 residual.

Colocar la(s) columna(s) en un tubo para recuperación de 1.5 ml.
Adicionar 50 µl del Buffer TE precalentado, justo en el centro de la columna.
Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
Centrifugar a 12000 rpm durante 2 minutos (1ª elusión), en este paso el buffer TE puede ser remplazado por H₂O destilada estéril si se requieren obtener muestras libres de sales.
Repetir los cuatro pasos anteriores si se requirieran eluciones adicionales

Verificar la integridad del ADN purificado a través de una electroforesis.
Cuantificar ambas extracciones con el fin de conocer su concentración.
Las eluciones obtenidas pueden ser almacenadas a -20°C, máximo 3 meses.

9.10 MARCAJE QUIMIOLUMISCENTE DE LAS SONDAS (AlkPhos DIRECT, Amersham farmacia biotech)

Reactivos:

Reactivo de marcaje
Solución de entrecruzamiento
Buffer de reacción
Agua

Componentes:

Azida de sodio 0.1% (p/v)
Contiene 4.7% (p/v) de formaldehído
No indicados
H₂O

NOTA: Antes de iniciar con el protocolo, se debe equilibrar un baño maría o termoblock a ebullición. Preparar un baño con hielos, en el cual permanecerán los reactivos mientras no sean utilizados. La reacción de marcaje de la sonda puede ser escalada, incrementando proporcionalmente el volumen de todos los componentes de la reacción de marcaje.

Diluir 20 µl de la Solución de Entrecruzamiento con 80 µl del H₂O proporcionada por el fabricante (concentración de trabajo).

Diluir el ADN (o ARN) a marcar, a una concentración de 10 ng/µl, empleando para ello H₂O (la concentración de sales en las muestras de ácidos nucleicos deberá ser lo mas baja posible y jamás exceder una concentración 50mM).

Colocar 10 µl del ADN (o ARN) diluido en un tubo de microfuga

Desnaturalizar las muestras por calentamiento en un baño maría a ebullición durante 5 minutos.

Enfriar inmediatamente el ADN (o ARN), colocándolo en un baño de hielo durante 5 minutos, centrifugar brevemente

Adicionar al ADN, 10 µl del buffer de reacción, mezclar brevemente.

Adicionar 2µl del reactivo de marcaje, mezclar brevemente.

Adicionar 10 µl de la solución de entrecruzamiento (concentración de trabajo).

Centrifugar brevemente.

Incubar la reacción a 37°C durante 30 minutos.

La sonda recién marcada puede permanecer en hielo hasta por dos horas, o bien puede ser almacenada hasta por seis meses a -30°C, siempre y cuando se le agregue glicerol (50% v/v).

9.11 MARCAJE RADIOACTIVO DE LAS SONDAS (Random primers ADN labeling system, Invitrogen)

Reactivos:

Mezcla de iniciadores al azar y regulador (Random Buffer)

dATP

dCTP

dGTP

dTTP

Fragmentos de Klenow (ADNpol I) 3 U/µl

Buffer de paro

Agua

Componentes:

HEPES 0.67 M, Tris-HCl 0.17 M, MgCl₂ 17 mM, 2-mercaptoetanol 33 mM, BSA 1.33 mg/ml, Hexámeros 18 OD 260 U/ml, [pH 6.8]

dATP 0.5 mM en Tris 1 mM

[α-³²P] dCTP (10 µCi/ µL)

dATP 0.5 mM en Tris 1 mM

dATP 0.5 mM en Tris 1 mM

Fragmentos de Klenow en buffer de fosfato de potasio 50 mM [pH 7.0], KCl 100 mM, DTT 1 mM , 50% (v/v) glycerol

EDTA 0.5 M [pH 8.0]

H₂O

NOTA: Extremar precauciones. Contar con un detector (gaiger) y un recipiente designado para conservar los desechos radioactivos. Utilizar pipetas, puntas, bata, guantes y lentes de seguridad, designados exclusivamente para este uso. Trabajar atrás de una pantalla de acrílico. El transporte de muestras radiactivas deberá realizarse dentro de una camisa

de plomo. Los reactivos deberán permanecer en un baño de hielo mientras sean utilizados.

Disolver 20 ng de ADN en un volumen de 5-20 ml de agua.

Sellar el tubo con papel parafilm.

Desnaturalizar las muestras por calentamiento en un baño maría a ebullición durante 5 minutos.

Enfriar inmediatamente el ADN (o ARN) en un baño de hielo durante 5 minutos.

Colocar cada uno de los siguientes reactivos en las paredes del tubo:

dATP	1.0 μ l
dGTP	1.0 μ l
dTTP	1.0 μ l
Random Buffer	7.5 μ l
H ₂ O	24.5 μ l
[α - ³² P] dCTP (10 μ Ci/ μ L)	2.0 μ l

Adicionar 1 μ l de Klenow., mezclar y centrifugar brevemente.

Incubar la reacción a 28°C durante toda la noche (O/N).

Adicionar 5 μ l de 0.5 M EDTA, pH 8.0 (buffer de paro).

Tomar 1 μ l de la sonda recién marcada y colocarlo sobre un trozo de papel.

Transferir la reacción a una columna Sephadex G50, ensamblada previamente.

Colocar la columna en un tubo para microfuga.

Eluir la sonda a través de la columna, centrifugando a 3 K durante 3 minutos.

Colocar 1 μ l de la sonda recién marcada sobre un trozo de papel.

Determinar la incorporación de los nucleótidos marcados, antes y después de eluir las sondas, en un contador de centelleo (cuentas por minuto).

Las sondas deberán emplearse de inmediato, el tiempo de almacenamiento máximo es de 1 semana, ya que después de este periodo los valores cpm disminuyen considerablemente.

9.12 ANALISIS DE DOT BLOT

NOTA: Las membranas deben remojarse en H₂O destilada estéril o SSC 10 X antes de ser utilizadas.

A. MUESTRAS DE ADN

Cortar la membrana de acuerdo al número de muestras problema, marcando con un lápiz las casillas correspondientes (1.5 cm² por muestra).

Tomar 2 μ l del ADN problema, y colocarlos en 8 μ l de H₂O destilada (D1, C1).

Tomar 5 μ l de la D1, y colocarlos en 5 μ l de H₂O destilada (D2, C0.5).

Tomar 5 μ l de la D2, y colocarlos en 5 μ l de H₂O destilada (D2, C0.25).

Tomar 5 μ l de la D1, y colocarlos en 5 μ l de H₂O destilada (D2, C0.125).

Desnaturalizar el ADN por calentamiento a ebullición durante 10 minutos.

Inmediatamente enfriar el ADN, colocándolo 3 minutos en un baño de hielo.

Colocar las muestras de ADN en cada una de las casillas (máximo 50 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$) marcadas en la membrana.
Fijar el ADN contenido en la membrana por exposición a luz UV (cross-linker).

B. MUESTRAS DE ARN

Cortar la membrana de acuerdo al número de muestras problema, marcando con un lápiz las casillas correspondientes (1.5 cm^2 por muestra).
Diluir el ARN a una concentración de entre 30 y 40 μg .
Preparar una mezcla desnaturalizante para muestras de ARN (sección 9.4).
Desnaturalizar las muestras por calentamiento a 65°C durante 15 minutos.
Inmediatamente enfriar el ARN, colocándolo 3 minutos en un baño de hielo.
Colocar las muestras de ARN en cada una de las casillas (máximo 40 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$), marcadas en la membrana.
Fijar el ARN contenido en la membrana por exposición a luz UV (equipo de entrecruzamiento).

9.13 ANALISIS DE NORTHERN BLOT (TRANSFERENCIA)

Reactivos:	Componentes:
MOPS 10X y 1X	MOPS 0.2 M [pH 7.0], CH_3COONa 0.08 M, EDTA 0.01 M
H_2O -DEPC	H_2O destilada, Dietilpirocarbonato (DEPC)
SSC 10X	NaCl , $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
NaOH 0.05N	NaOH , H_2O -DEPC

NOTA: Asegurarse de que todos los materiales involucrados en este protocolo, se encuentren perfectamente libres de nucleasas. Las soluciones involucradas deberán contener inhibidores de nucleasas

Preparar una mezcla desnaturalizante para ARN (ver sección 4.6, tabla 4.2).
Adicionar el ARN problema: 1.0 μl de guía para ARN y entre 10 y 30 μg de ARN problema
Calentar la mezcla de reacción durante 10 minutos a 65°C, e inmediatamente colocarla en un baño de hielo durante 3 minutos.
Cargar las muestras en un gel de agarosa al 1% para ARN, procurando que quede un carril libre entre la guía y el ARN problema.
Correr la electroforesis en una campana de extracción, a una velocidad de 5 – 7 V/cm (el voltaje total no deberá exceder los 200 V).
Una vez concluida la electroforesis, colocar brevemente el gel en un transiluminador UV.
Alinear una regla para UV a un costado del gel (el cero deberá ubicarse a la altura de los pozos).

Fotografiar el gel procurando que la exposición de este a la luz UV sea mínima.
Eliminar el exceso de formaldehído, colocando el gel dentro de un recipiente que contenga suficiente H₂O-DEPC.

Lavar el gel durante 5 minutos con agitación.

Transferir el gel a un recipiente que contenga NaOH 0.05 N, remojarlo 20 min. a temperatura ambiente (hidrólisis parcial del ARN).

Eliminar el exceso de NaOH colocando el gel dentro de un recipiente que contenga suficiente H₂O-DEPC, lavar durante 5 minutos con agitación.

Transferir el gel a un recipiente que contenga suficiente SSC 10X.

Remojar el gel durante 45 minutos a temperatura ambiente.

Eliminar el exceso de SSC, colocando el gel dentro de un recipiente que contenga suficiente H₂O-DEPC, lavar durante 5 minutos con agitación.

Cortar un trozo de papel Whatman 3MM, este deberá ser aproximadamente 3 cm más ancho y largo que el gel y deberá cubrir el puente por completo.

Humedecer el papel Whatmann 3MM en SSC 20X.

Colocar el puente y papel Whatman 3MM en el recipiente de transferencia.

Agregar suficiente volumen de la solución SSC 20X, de manera que el papel Whatman colocado sobre el puente alcance a humedecerse.

Eliminar con ayuda de un rodillo (pipeta), las burbujas que se lleguen a formar, entre el puente y el papel Whatman 3MM.

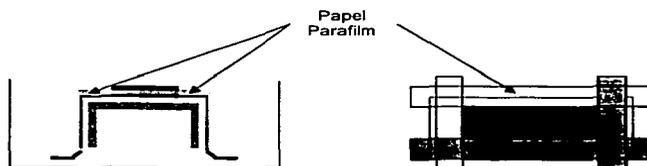
Cortar la esquina inferior del gel e invertirlo (identificación de los carriles), colocándolo encima del papel Whatman 3MM, localizado encima del puente.

Cortar la membrana de nylon del mismo tamaño que el gel.

Con ayuda de unas pinzas colocar la membrana perfectamente alineada encima del gel.

Eliminar con ayuda de un rodillo (pipeta), las burbujas que se lleguen a formar.

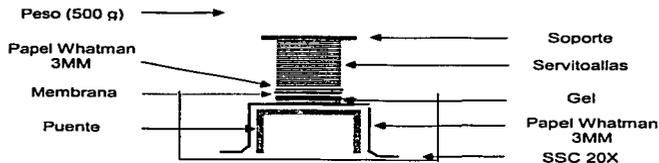
Rodear con papel parafilm el papel 3MM que no alcanzó a ser cubierto por el gel:



Cortar 2 piezas de papel Whatman 3MM del mismo tamaño del gel, humedeciéndolas en SSC 2X.

Colocar una pila de servitoallas (aproximadamente 10 cm de altura) sobre los papeles Whatman 3 MM.

Colocar una placa de vidrio o plástico (alrededor de 500 g) encima de la pila de servitoallas:



Transferir el ARN a temperatura ambiente alrededor de 6 a 18 horas.

Verificar cada hora que las servitoallas no se encuentren húmedas, si este fuera el caso será necesario remplazarlas por servitoallas secas.

Una vez finalizada la transferencia, retirar las servitoallas junto con los papeles Whatman 3MM que se encuentran sobre la membrana.

Voltear el gel junto con la membrana, sin separarlos, colocando el gel encima de un papel Whatman 3MM seco.

Marcar cuidadosamente con ayuda de un lápiz, o bien con una pluma de punta redonda, el lugar que corresponde a cada uno de los pozos del gel sobre la membrana.

Despegar la membrana del gel, desechando este último.

Lavara la membrana con suficiente SSC 6X durante 5 min.

Permitir que la membrana seque a temperatura ambiente, colocándola encima de un servitoalla limpia, mínimo durante 30 min.

Fijar el ARN contenido en la membrana por exposición a luz UV_{254 nm} (equipo de entrecruzamiento) durante 2 min.

Si la membrana no es empleada de inmediato, esta puede ser almacenada hasta por 1 mes a temperatura ambiente, dentro de papel aluminio.

9.14 HIBRIDACION QUIMIOLUMINISCENTE

Reactivos:

Reactivo de bloqueo

Buffer de hibridación

Buffer de lavado primario

Componentes:

No indicados

Urea 12% (p/v)

Urea, SDS, Fosfato de sodio 0.5 M (pH 7.0), NaCl, MgCl₂ 1.0 M, Reactivo de bloqueo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Buffer de lavado secundario	Tris base, NaCl y MgCl ₂ 1M
Buffer de hibridación (solución de trabajo)	NaCl concentración final 0.5 M, Reactivo de bloqueo 4% concentración final

NOTA: Trabajar a las temperaturas indicadas, pequeñas variaciones podrían afectar los resultados. La astringencia se controla variando la temperatura de hibridación.

En un tubo colocar el volumen requerido de buffer de hibridación (0.25 - 0.125 ml/cm² de membrana).

Precalentar el buffer de hibridación a 55°C.

Colocar las membranas dentro del buffer de hibridación.

Pre-hibridar por al menos 15 minutos a 55°C en un horno de hibridación.

Es esencial que las membranas se muevan libremente.

Adicionar la sonda marcada al buffer pre-hibridado (5-10 ng de sonda/ml de buffer de hibridación).

Mezclar cuidadosamente (la sonda quimioluminiscente no debe ser desnaturalizada antes de ser utilizada).

Hibridar a 55°C durante toda la noche en un horno de hibridación.

Precalentar a 55°C el buffer de lavado primario (2-5 ml / cm² de membrana).

Transferir cuidadosamente las membranas al buffer de lavado primario.

Lavar las membranas durante 10 minutos a 55°C.

Efectuar un lavado adicional con buffer de lavado primario (nuevo).

Lavar las membranas durante 10 minutos a 55°C.

Transferir las membranas a un contenedor limpio.

Adicionarles buffer de lavado secundario en exceso.

Lavar durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Efectuar un lavado adicional con buffer de lavado secundario (nuevo)

Lavar durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Si la detección no es inmediata, las membranas pueden permanecer en este buffer máximo 30 minutos a temperatura ambiente antes de ser reveladas.

9.15 HIBRIDACION RADIATIVA

Reactivos:

Buffer formamida de
prehibridación / hibridación

SSC 2X, 0.2X y 0.1X al 1%
en SDS (p/v)

Componentes:

SSC 5X, Solución Denhardt 5X, Formamida al 50% (p/v), SDS al 1% (p/v), ADN esperma de salmón

NaCl, C₆H₅Na₃O₇·2 H₂O, SDS

NOTA: Trabajar a las temperaturas indicadas, ya que pequeñas variaciones podrían afectar los resultados. La astringencia puede ser controlada variando la temperatura de hibridación y la concentración de SSC. Extremar las precauciones.

Colocar la membrana dentro de un tubo de hibridación.
Agregar la cantidad requerida de buffer formamida (1 ml / 1×10^6 cpm).
Pre-hibridar la sonda a 55-60°C durante toda la noche.
Desnaturalizar la sonda por calentamiento a ebullición durante 10 minutos.
Adicionar la sonda marcada al buffer pre-hibridado (1×10^6 cpm /mL de buffer formamida), mezclar cuidadosamente.
Hibridar a 55-60°C durante toda la noche en un horno de hibridación.
Eliminar el buffer de hibridación y lavar las sondas con una solución SSC 2X, 0.2X, 1X en SDS al 1% (según sea la astringencia requerida).
Envolver las membranas en papel Saran Wrap®, eliminando cuidadosamente las burbujas que se lleguen a formar entre la membrana y el papel.

9.16 GENERACION DE LA SEÑAL QUIMIOLUMINISCENTE (CDP-Star®)

Reactivos:

Reactivo de detección
CDP-Star

Componentes:

Solución de 2-cloro-5-(4 metoxispiro [1,2 dioxetano-3,2'-(5'-cloro)-tricyclo[3,3,1,1^{3,7}] decano]-4 il) fenil fosfato disódica < 15% (p/v)

NOTA: Emplear guantes libres de polvo, o bien lavarlos con suficiente agua o alcohol antes de ser utilizados. Dispensar el reactivo de detección en alcuotas adecuadas.

Eliminar el buffer de lavado secundario.
Colocar la membrana sobre una superficie lisa, limpia y no absorbente. No permitir que las membranas sequen completamente.
Adicionar el reactivo de detección sobre las membranas (30-40 μ l / cm^2 de membrana).
Incubar la reacción durante 2-5 minutos a temperatura ambiente.
Eliminar el exceso del reactivo de detección, escurriendo las membranas a través de una superficie no absorbente.
Envolver las membranas en papel Saran Wrap®, eliminando cuidadosamente las burbujas que se lleguen a formar entre la membrana y el papel.
La señal quimioluminiscente generada al agregar el reactivo de detección puede observarse en tan solo unos minutos y su duración puede ser de hasta 5 días.

9.17 AUTORADIOGRAFIA

NOTA: Para experimentos iniciales se recomienda exponer la película durante 1 hora, sin embargo el tiempo de exposición puede variar. La señal quimioluminiscente dura algunos días, alcanzando su punto más alto unas horas después de que se le adiciona el reactivo de detección.

Colocar las membranas envueltas en papel Saran Wrap dentro de un casete, el lado que contiene el ARN debe quedar frente a la película de diagnóstico.

Apagar las luces del cuarto y colocar la película de diagnóstico encima de la membrana.

Cerrar el casete y exponer el tiempo que sea necesario (membranas quimioluminiscentes desde algunos minutos hasta cinco días; membranas radiactivas desde 24 horas, hasta 1 semana). Las membranas radiactivas pueden revelarse en menor tiempo, exponiéndolas a -70°C .

Retirar la película del casete y revelarla.

Si los resultados no son los esperados, se pueden realizar exposiciones subsecuentes (tiempos de exposición prolongados incrementan el fondo).