



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Expresión de la proteína HCN4 en médula interna renal  
en  
*Rattus norvegicus***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**Bismarck Vázquez Almazán**



**DIRECTOR DE TESIS:  
Salvador Leonardo Hernández  
López**

**Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2016**



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.



# **Expresión de la Proteína HCN4 en médula interna renal en *Rattus norvegicus***



**Este trabajo se realizó en el laboratorio de fisiología renal y bajo la Dirección del Dr. Juan José Bolívar González y se finalizó bajo la dirección del Dr. Salvador Leonardo Hernández López, ambos en la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.**

## **Agradecimientos:**

Para el Dr. Juan José Bolívar González, donde quiera que se encuentre gracias por su paciencia y apoyo, me ha dado uno de los mayores enseñanzas: “Siempre se deben tener metas ambiciosas y cumplirlas”.

A la M. en C. Gabina Arenas López quien proporcionó apoyo técnico a lo largo de la realización del presente trabajo y que ha sido esencial en la culminación de esta tesis. Gracias a sus consejos y dedicación férrea a la ciencia hizo todo lo que estuvo en sus manos para que pudiera terminar la parte experimental de este proyecto.

Al Dr. Salvador Hernández López que nos ayudó a finalizar este proyecto ante los hechos acontecidos. Finalmente quisiera agradecer a mi hermano Carlos Alberto Vázquez, que sin sus consejos y apoyo nada de esto hubiera sido posible.

# ÍNDICE

<b>Agradecimientos</b> .....	6
<b>1.Resumen</b> .....	9
<b>2.Introducción</b> .....	10
2.1.Nefrona.....	15
2.2.Mecanismo de formación de la orina.....	19
2.2.1.Transporte en túbulo proximal.....	19
2.2.2.Transporte tubular en el Asa de Henle.....	24
2.2.3.Transporte tubular en túbulo distal.....	28
2.2.4.Los túbulos colectores.....	29
2.2.5.Transporte y secreción de potasio en el túbulo colector cortical...31	
2.3.Canales iónicos.....	32
2.3.1. Membranas celulares.....	34
2.3.2. Tipos de transporte.....	35
<b>3. Antecedentes</b> .....	38
3.1.Los canales HCN. ....	38
3.2.Estructura y función.....	41
3.3.Patrones de expresión.....	43
3.4. Los canales HCN en tejidos no excitables.....	44
3.5. Los canales HCN en tejido renal.....	45
<b>4. Justificación</b> .....	47
<b>5. Hipótesis</b> .....	48
<b>6. Objetivos</b> .....	49
<b>7. Metodología</b> .....	50
7.1. Animales de experimentación.....	50
7.2. Obtención de médulas interna renal.....	50
7.3. Obtención de médula interna.....	51
7.4. Obtención de cultivos primarios y conductos colectores.....	51



7.5. Detección de los canales HCN1-4 en extractos proteicos de cerebro, médula interna y cultivo primarios por ELISA.....	53
7.6. Técnica de Western Blot.....	54
7.7. Análisis Western Blot.....	55
7.8. Péptido de inhibición.....	56
<b>8. Resultados</b> .....	<b>57</b>
<b>9. Discusión</b> .....	<b>65</b>
<b>10. Implicaciones fisiológicas</b> .....	<b>70</b>
<b>11. Conclusiones</b> .....	<b>73</b>
<b>12. Referencias</b> .....	<b>74</b>
<b>Soluciones</b> .....	<b>82</b>

# 1. Resumen

La familia de los canales HCN ha sido ampliamente caracterizada en tejidos excitables. Sin embargo en los últimos años se ha demostrado su existencia en células de hígado y riñón exhibiendo una gran complejidad y diversidad debido principalmente a la formación de diferentes heterotetrámeros producidos por el co-ensamble de las distintas isoformas.

En este trabajo se determinó por primera vez la expresión de la proteína HCN4 en extracto de médula interna, células de conducto colector y cultivo primario, con la técnica de Western blot, usando dos distintos anticuerpos. La presencia de estos canales merece un cuidadoso análisis por la propia naturaleza de las proteínas y sus implicaciones en la fisiología renal. Su posible participación en el equilibrio osmótico entre las células epiteliales y el intersticio así como su papel en el mantenimiento del balance ácido-base son discutidos en este trabajo.

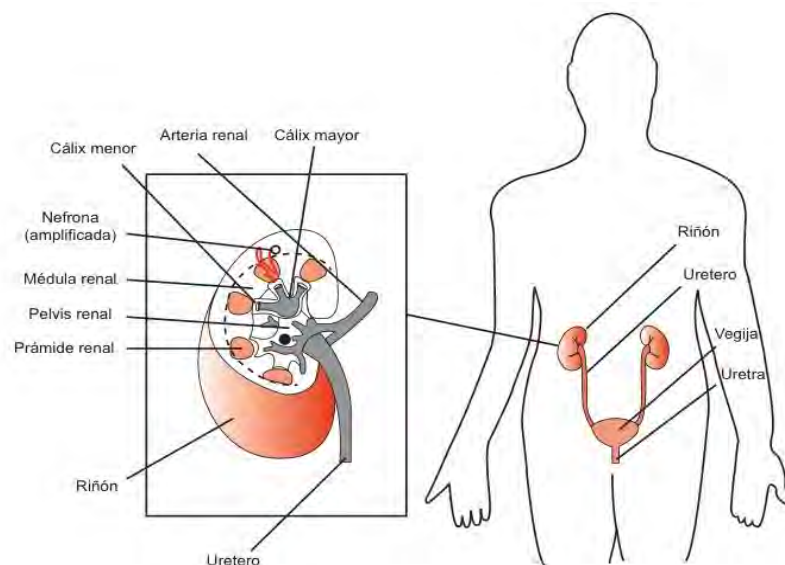
## 2. Introducción

En promedio un riñón pesa 150 gramos y no obstante su tamaño ambos riñones reciben entre el 20-25 % del gasto cardiaco. Cuando se secciona un riñón por la mitad resultan evidentes dos regiones: una región externa, denominada corteza y una región interna llamada médula. La corteza es de color castaño rojizo y tiene un aspecto granuloso. En la corteza se encuentran los glomérulos, los túbulos contorneados y los túbulos colectores corticales. La médula es de color más claro y tiene un aspecto estriado debido a la disposición paralela de las asas de Henle, los túbulos colectores y los vasos sanguíneos medulares. A su vez la médula puede subdividirse en la médula externa situada junto a la corteza, y la médula interna más alejada de la corteza (Rhoades *et al.*, 2012).

El riñón se encuentra organizado en una serie de lóbulos y cada uno de ellos consta de una pirámide de tejido medular. La pirámide medular forma la papila renal y cada una de ellas drena la orina hacia un cáliz menor (Fig.1). Los cálices menores se unen para formar un cáliz mayor. Por último la orina fluye hacia la pelvis renal (Rhoades *et al.*, 2012).

Los riñones se encuentran altamente irrigados para que se dé el proceso de filtración. El flujo sanguíneo renal es aproximadamente de 1100 ml/min, esto ajustado por peso en un hombre adulto de 70kg (Alexanderson y Gamba, 2014).

Cada riñón está irrigado por una arteria renal que se divide para formar las ramas anterior y posterior que a su vez forman cinco arterias segmentarias que al ramificarse dan lugar a las arterias interlobulares que se dirigen a la corteza entre los lóbulos renales. Estas últimas, una vez más se ramifican para formar las arterias arqueadas las cuales a su vez, forman las arterias radiales corticales que pasan a través de la corteza hacia la superficie del riñón.



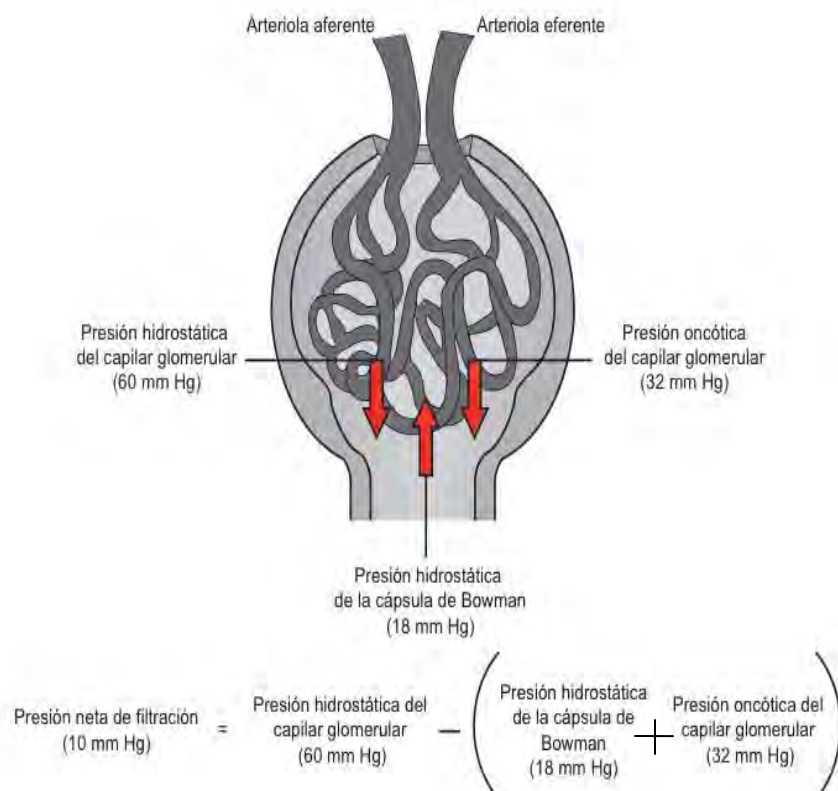
**Figura 1.** Organización del sistema urinario y del riñón ( tomada de Alexanderson y Gamba, 2014).

Por último, se forman varias arteriolas aferentes que dan origen al glomérulo, el cual se encuentra contenido en la cápsula de Bowman y se continúan para formar las arteriolas eferentes que se dividen en una segunda red capilar que se extiende dentro y fuera de la médula. Esta disposición facilita el intercambio de sustancias entre el flujo sanguíneo que entra y el que sale de la médula (Rhoades *et al.*, 2012).

La función del glomérulo es llevar a cabo un proceso de filtrado del plasma que entra en la cápsula de Bowman produciendo una solución (ultrafiltrado) que contiene diferentes electrolitos tales como sodio, cloro, fosfatos y otras sustancias como aminoácidos y glucosa que pasan al túbulo proximal. La presión de filtrado glomerular depende de la presión capilar glomerular que representa un 60% de la presión arterial media y es de aproximadamente 60 mm de Hg. Esta presión empuja el filtrado hacia el interior de la cápsula de Bowman (Alexanderson y Gamba, 2014).

A esta fuerza se le opone la presión oncótica ( $\approx 32$  mm de Hg) que empuja la sangre de vuelta hacia el interior del capilar por la concentración excesiva de proteínas dentro del mismo. Además la presión hidrostática de la cápsula de Bowman ( $\approx 18$  mm de Hg) que también tiende a regresar la sangre hacia el capilar (Fig.2). De tal manera que la presión de filtrado glomerular restando la fuerzas opuestas, es de aproximadamente 10 mm de Hg (Alexanderson y Gamba, 2014)

Esta fuerza empuja el filtrado a través del endotelio capilar poroso, pasa a través de membrana basal constituida por la lámina rara y la lámina densa y atraviesa por último las células epiteliales de la cápsula de Bowman para entrar luego al túbulo contorneado proximal. La tasa de filtrado glomerular es aproximadamente 125 ml/min lo cual representa  $\approx 20\%$  del flujo sanguíneo renal total (650 a 750 ml/min) (Best y Taylor, 2003).



**Figura 2.** Esquema de la relación de las fuerzas de Starling en el glomérulo que favorecen la filtración ( tomada de Alexanderson y Gamba, 2014).

Los riñones son los órganos responsables de muchas de las funciones homeostáticas del cuerpo, entre las que se encuentran:

- Regulación la presión osmótica de los líquidos corporales mediante la excreción de orina
- Regulación de la concentración de iones, incluidos  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ , bicarbonato, ( $\text{HCO}_3^-$ ), fosfatos y sulfatos.
- Regulación del equilibrio ácido-básico.
- Regulación de la presión sanguínea arterial mediante el ajuste de la excreción de  $\text{Na}^+$  y la producción de sustancias.
- Eliminación de productos de desecho del metabolismo, numerosos fármacos y sustancias tóxicas.
- Síntesis y degradación de ciertas hormonas (Rhoades *et al.*, 2012).

## 2.1 Nefrona

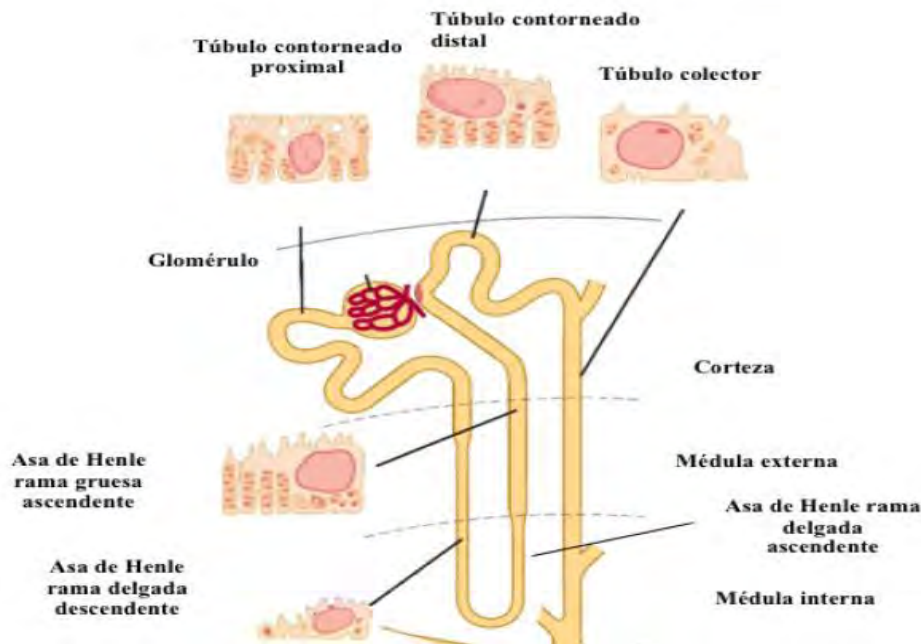
La nefrona es la unidad funcional del riñón. Está conformada por el túbulo renal el cual, a su vez, está constituido por varios segmentos y su glomérulo que se encuentra rodeado por la cápsula de Bowman. Hay tres tipos de nefronas según la ubicación de sus glomérulos en la corteza: superficiales, mediocorticales y yuxtamedulares; estas últimas se ubican en la corteza cercana a la médula, poseen asas largas extendiéndose hasta las pirámides medulares (Rhoades *et al.*, 2012).

La porción más cercana al glomérulo es el túbulo proximal, posteriormente este mismo se endereza para formar el asa de Henle, su región descendente y la parte proximal de la extremidad ascendente están constituidas por células permeables delgadas. Por otra parte, la porción gruesa de la rama ascendente está formada por células gruesas que contienen muchas mitocondrias (Ganong, 2010).

El extremo grueso de la rama ascendente del asa de Henle llega al glomérulo de la nefrona de la cual se origina el túbulo contorneado distal el cual se inicia desde la mácula (células especializadas originadas del asa Henle y que se encuentran en contacto con la arteriola aferente y eferente) y se continúa para formar los túbulos colectores que se encuentran constituidos por células principales e intercaladas (Fig. 3). Las primeras intervienen en la reabsorción de iones sodio y en la de agua estimulada por la vasopresina. Las segundas se ocupan de la secreción del ácido y del transporte de bicarbonato (Ganong, 2010).



El sistema completo de túbulos renales y colectores consta de una única capa de células epiteliales. Las células en cada segmento tienen una apariencia histológica característica. Cada segmento tiene propiedades transportadoras únicas (Rhoades *et al.*, 2012).



**Figura 3.** Diagrama de una nefrona yuxtaglomerular. Se muestran también las principales características histológicas de las células que constituyen cada porción del túbulo. (modificada de Ganong, 2010).

En la nefrona se llevan a cabo tres procesos básicos: filtración, reabsorción y secreción para la formación de la orina (Silverthorn, 2014).

**Filtración:** la filtración consiste en la ultrafiltración del plasma en el glomérulo, esto es el paso de la sangre de los capilares del glomérulo hacia el espacio de la cápsula de Bowman a través de la barrera de filtración glomerular (Rhoades *et al.*, 2012).

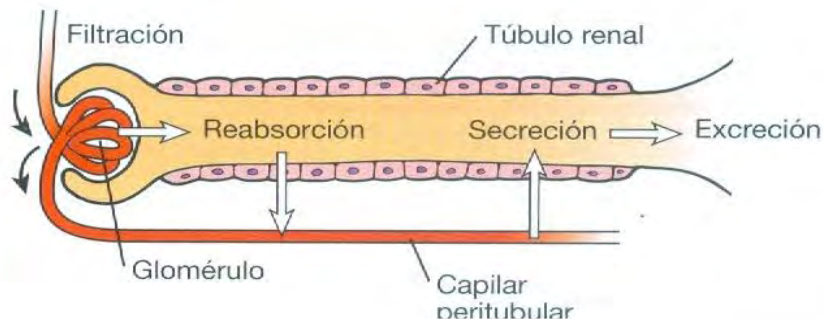
Esta barrera de filtración está constituida por el endotelio vascular y la membrana basal. Además los capilares glomerulares tienen alrededor una capa de células epiteliales llamadas podocitos (Alexanderson y Gamba, 2014).

El filtrado penetra en el espacio urinario de la cápsula de Bowman para desde allí, fluir por la luz del túbulo donde se da la reabsorción, disminuyendo el volumen y cambiando la composición del líquido en la luz del túbulo (Rhoades, 2012). Todo lo que se filtra dentro de la nefrona está destinado a ser eliminado a través de la orina, a menos que sea reabsorbido (Silverthorn, 2014).

**Reabsorción:** en la reabsorción, diversas sustancias regresan a la sangre capilar que rodea los túbulos renales. Las sustancias reabsorbidas incluyen muchos iones importantes ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$  y fosfatos), agua, metabolitos importantes (glucosa y aminoácidos) y hasta algunos productos de desecho (urea y ácido úrico) (Rhoades *et al.*, 2012).

**Secreción:** la secreción incluye transporte de sustancias hacia la orina del túbulo (Fig. 4). Por ejemplo, muchos aniones y cationes orgánicos son captados por el epitelio tubular de los vasos sanguíneos que rodean los túbulos e incorporados a la orina. Algunas sustancias (p.ej.,  $\text{H}^+$  y amoníaco) son producidas en las células tubulares y secretadas en la orina del túbulo. En los procesos de reabsorción y secreción participan mecanismos de transporte tanto pasivo como activo, dependiendo de cada sustancia en particular y otras condiciones (Rhoades *et al.*, 2012).

**La excreción:** la excreción se refiere entonces, al proceso último de la eliminación de sustancias a través de la orina (Rhoades *et al.*, 2012).



**Figura 4.** Procesos involucrados en la formación de orina. Gráfico muy simplificado de una nefrona y sus vasos sanguíneos ( tomada de Rhoades, 2012).

## **2.2. Mecanismo de formación de la orina**

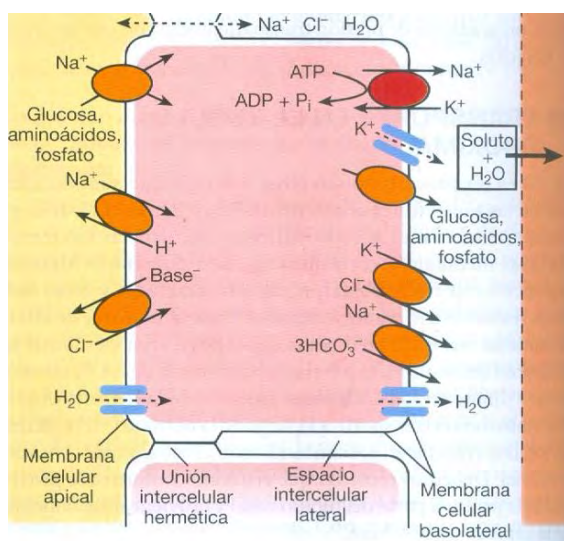
### **2.2.1. Transporte en túbulo proximal**

La filtración glomerular es un proceso no selectivo debido a que son filtradas sustancias tanto útiles como de desecho. Por el contrario, el transporte tubular es selectivo; diferentes sustancias son transportadas mediante mecanismos distintos. Algunas sustancias son reabsorbidas, otras secretadas y otras son tanto reabsorbidas como secretadas. El transporte de los diferentes solutos difiere en los distintos segmentos de la nefrona (Rhoades *et al.*, 2012). Los mecanismos de reabsorción en el túbulo difieren entre la primera y su segunda mitad. La mayor parte del  $\text{Na}^+$  se reabsorbe por cotransportadores acoplados a glucosa y aminoácidos. En la segunda mitad del túbulo proximal la mayor parte de reabsorción de  $\text{Na}^+$  se realiza junto con el  $\text{Cl}^-$  a través de contratransportadores (Alexanderson y Gamba 2014). Esto se abordará con detalle más adelante.

Empezaremos por describir el transporte en el túbulo contorneado proximal. Siendo la primera parte del túbulo renal, recibe el ultrafiltrado del glomérulo que pasa a través de las células epiteliales de la cápsula de Bowman (Rhoades *et al.*, 2012).

Este ultrafiltrado contiene diferentes electrolitos, tanto cationes como aniones así como glucosa y aminoácidos. En el túbulo proximal ocurre un proceso de reabsorción de  $\approx 75\%$  del ultrafiltrado. Substancias tales como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ , agua, glucosa, aminoácidos,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  son absorbidas desde el lumen del túbulo hacia el lumen del capilar para eventualmente incorporarse al sistema circulatorio (Best y Taylor, 2003).

La membrana apical desde donde se absorben las diversas sustancias, es de tipo de borde de cepillo lo que incrementa de manera notable la superficie de absorción. Asimismo, ocurre un proceso de secreción de sustancias tales como metabolitos y toxinas, como el ácido úrico y ciertos cetoácidos y creatinina, que pasan del capilar hacia el lumen de túbulo y que eventualmente serán eliminadas por vía de la orina. Se puede pensar que la principal función del túbulo proximal es la absorción de  $\text{Na}^+$ , ya que entre el 65-75 % del  $\text{Na}^+$  es absorbido hacia el sistema capilar (Alexanderson y Gamba, 2014).



**Figura 5.** Modelo celular de transporte en el túbulo proximal. La membrana celular (apical) en este segmento de la nefrona tiene una amplia superficie para transporte debido a las numerosas microvellosidades que forman un borde de cepillo (no se muestra). La glucosa, los aminoácidos, el fosfato y otras numerosas sustancias son transportadas por transportadores separados (tomada de Rhoades, 2012).

Primeramente, el  $\text{Na}^+$  entra a las células del túbulo proximal siguiendo su gradiente de concentración y utilizando mecanismos de co-transporte p.ej.,  $\text{Na}^+$ -glucosa o contra-transporte, como el de  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ . La fuerza impulsora del ión de  $\text{Na}^+$ , favorece el transporte de los demás solutos (aminoácidos y fosfatos) en contra de su gradiente de concentración. Desde el interior de la célula epitelial, el  $\text{Na}^+$  es expulsado hacia fuera por el lado basolateral mediante la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa (transporte activo primario). Una vez fuera de la célula el  $\text{Na}^+$  es absorbido por el sistema capilar pues entra fácilmente a los vasos sanguíneos siguiendo su gradiente de concentración. La importancia de este proceso es que la bomba ATPasa es electrogénica, pues expulsa 3  $\text{Na}^+$  e introduce 2  $\text{K}^+$  y esto crea una negatividad de -70mV en el interior de las células del túbulo proximal. Esta negatividad relativa es la fuerza impulsora para que otros iones positivos tales como el  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  pasen desde el lumen al interior de las células del túbulo proximal para luego ser absorbidas por el sistema capilar (Fig. 5). La glucosa, los aminoácidos y el fosfato son reabsorbidos por transporte activo secundario aprovechando la fuerza impulsora del  $\text{Na}^+$  (Howell-Fulton ,1989).

El  $\text{Cl}^-$  puede pasar desde el lumen al interior de las células del túbulo proximal mediante dos maneras: una es, difundiendo a favor de su gradiente de concentración a través de las uniones estrechas entre las células. Otra forma es por medio de transporte activo secundario, en donde el  $\text{Cl}^-$  ingresa a las células desde la luz tubular acoplado a hidrógeno o sodio, o bien en el intercambio por hidroxilos, bicarbonato, formiato u oxalato (Kelley, 1993).

Posteriormente, el  $\text{Cl}^-$  pasa al interior del sistema capilar utilizando un co-transportador  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ . El agua es absorbida y atraviesa el epitelio proximal a través de las células por medio de acuaporinas en las membranas celulares y

las uniones estrechas entre las células. El  $K^+$  bombeado hacia dentro de la célula difunde luego hacia afuera a través de la membrana basolateral por medio de canales de potasio. La glucosa, los aminoácidos y el fosfato que se acumulan en la célula debido al transporte activo secundario a través de la membrana celular luminal salen de la membrana basolateral por medio de mecanismo de difusión facilitada independientes del  $Na^+$  (Rhoades *et al.*, 2012).

Otro mecanismo muy importante en el túbulo proximal, es el ya mencionado contra-transporte ( $Na^+-H^+$ ). Este mecanismo no solo permite la entrada del  $Na^+$  al interior de las células sino que causa la excreción de protones ( $H^+$ ) hacia el lumen del túbulo proximal. Una vez en el lumen, el  $H^+$  se combina con el bicarbonato ( $HCO_3^-$ ) para formar ácido carbónico ( $H_2CO_3$ ) el cual se disocia en agua y dióxido de carbono ( $CO_2$ ) que pasan al interior de las células del túbulo en donde, por acción de la enzima anhidrasa carbónica se forma  $H_2CO_3$  nuevamente. Este a su vez se disocia para dar  $HCO_3^-$  y  $H^+$ . Como puede observarse este mecanismo permite la reabsorción de  $HCO_3^-$  el cual pasa al sistema capilar y funciona como amortiguador en el sistema de equilibrio ácido-básico. Mientras que por otra parte el  $H^+$  es secretado nuevamente al lumen del túbulo proximal para continuar con el proceso de reabsorción de  $HCO_3^-$  (Best y Taylor, 2003)

Por último el  $HCO_3^-$  sale junto con el  $Na^+$  por transportadores que llevan tres iones  $HCO_3^-$  por cada ion de  $Na^+$ . El paso final es la captación y reabsorción completa de solutos y agua por los capilares peritubulares y que es favorable debido a la alta concentración de proteínas en los capilares, es decir la presión hidrostática es baja (Rhoades *et al.*, 2012).

La osmolaridad no se modifica de manera detectable a lo largo del túbulo contorneado proximal aunque está claro que la concentración de solutos individuales varía ampliamente. Las concentraciones de algunas sustancias como la glucosa, aminoácidos y  $\text{HCO}_3^-$  disminuyen, mientras que otras como la urea y el  $\text{Cl}^-$  aumentan, por otra parte, el  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  se mantienen sin cambios. Hacia el final del túbulo contorneado proximal, alrededor de solo un tercio de  $\text{Na}^+$  agua y  $\text{K}^+$  filtrados permanecen en el túbulo; casi la totalidad de la glucosa, los aminoácidos y el  $\text{HCO}_3^-$  filtrados han sido reabsorbidos y muchos solutos que serán excretados como la urea, se han concentrado en el líquido tubular (Rhoades *et al.*, 2012).



### 2.2.2. Transporte tubular en el asa de Henle

El asa de Henle consiste en una rama gruesa descendente, una rama delgada descendente, continúa hacia arriba mediante la rama delgada ascendente y termina en la rama gruesa ascendente (nefronas yuxtamedulares) (Alexanderson y Gamba, 2014).

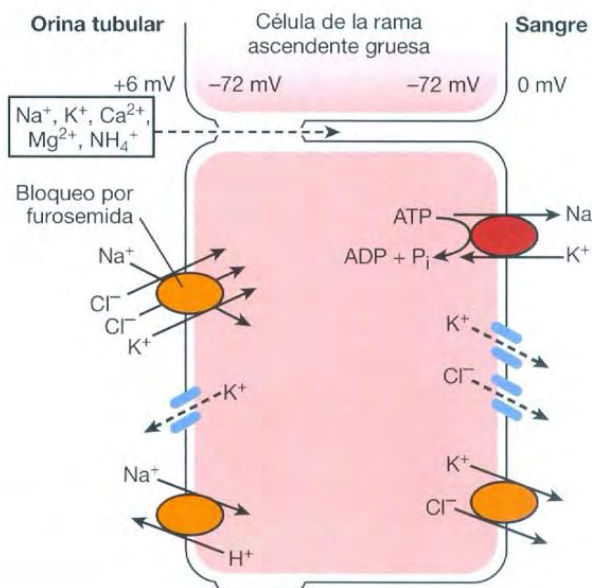
El asa de Henle esta involucrada en la reabsorción de electrolitos tales como el  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  así como la reabsorción de agua. Del ultrafiltrado del plasma que proviene del glomérulo aproximadamente un 25-30% llega a la rama gruesa ascendente. De esta fracción, cerca del 15-20% del  $\text{Na}^+$  es reabsorbido dentro de las células de la rama gruesa ascendente del asa de Henle y finalmente es reabsorbido por el sistema capilar (vasa recta) (Alexanderson y Gamba, 2014).

El  $\text{Na}^+$  penetra en las células de la rama gruesa ascendente a través de la membrana celular luminal mediante un cotransportador  $\text{Na-K-2Cl}$  (transporte activo secundario) el cual es eléctricamente neutro. El movimiento del  $\text{Na}^+$  hacia las células provoca el paso de un ion de  $\text{K}^+$  y dos iones de  $\text{Cl}^-$ . El  $\text{Na}^+$  es bombeado hacia fuera de la membrana de las células basolaterales por la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa (Rhoades *et al.*, 2012).

Esto mantiene baja la concentración de  $\text{Na}^+$  en el interior de las células con respecto al lumen del túbulo y este gradiente de  $\text{Na}^+$  es la fuerza impulsora que activa el cotransportador  $\text{Na-K-2Cl}$  (Fig. 6). El  $\text{K}^+$  es reciclado hacia el lumen tubular a través de un canal de  $\text{K}^+$  de la membrana de las células. El  $\text{Cl}^-$

pasa a través del lado basolateral por medio de cotransportadores de  $K^+Cl^-$  o a través de un canal del  $Cl^-$  (Rhoades *et al.*, 2012).

La unión del  $Cl^-$  es considerada la etapa de la tasa limitante en el funcionamiento del cotransportador. Por ejemplo, cuando la furosemida ocupa el sitio de unión del  $Cl^-$  inhibiendo el funcionamiento del cotransportador, el  $Na^+$  que normalmente es absorbido, continúa su paso a través del túbulo hasta que eventualmente es eliminado junto con una gran cantidad de agua en la orina. Es decir, actúa como un diurético y por tanto es utilizado en el tratamiento de la hipertensión (Best y Taylor, 2003).



**Figura 6.** Modelo celular para el transporte de iones en la rama ascendente (tomada de Rhoades, 2012).

La membrana de la células de la rama gruesa ascendente del asa de Henle es predominantemente permeable al  $K^+$ , mientras que la membrana de la células basolaterales es en su mayoría, permeable al  $Cl^-$ . La difusión de estos iones hacia afuera de la célula produce una diferencia de potencial transepitelial en la luz respecto al espacio intersticial que rodea a los túbulos. Esta diferencia de potencial conduce cationes pequeños ( $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  y  $NH_4^+$ ) fuera de la luz del túbulo, entre las células (Rhoades *et al.*, 2012).

La otra función importante del asa de Henle es generar el mecanismo multiplicador contracorriente. Como se mencionó anteriormente, el líquido que abandona el túbulo proximal es isoosmótico respecto al plasma (Rhoades *et al.*, 2012). Sin embargo, la rama descendente del asa de Henle (excepto en su porción terminal) tiene una alta permeabilidad al agua. De tal manera que, a medida que el túbulo desciende hacia la médula, los solutos en su interior aumentan gradualmente su concentración precisamente por la salida de agua hasta alcanzar una osmolaridad aproximada de 1200 mOsm en el punto de inflexión del asa de Henle. Por otra parte, la rama ascendente es impermeable al agua debido a la falta de acuaporinas. A causa de la retención de agua dentro del lumen de la porción ascendente del asa de Henle y a la expulsión de iones mediante transporte activo, sobre todo en la rama gruesa ascendente, la concentración de iones dentro del túbulo decreta gradualmente de tal manera que el fluido que abandona la rama ascendente es hipotónico, aproximadamente 100-200 mOsm/L. El transporte activo en el asa de Henle bombea siempre en contra de un gradiente que se mantiene constantemente pequeño. Por ejemplo, en la rama ascendente cerca del punto de inflexión, la osmolaridad dentro del túbulo es de  $\approx 1000$  mOsm contra 1200 mOsm fuera es decir, 200 mOsm a través de la membrana de las células (Best y Taylor, 2003).

Más arriba en la rama ascendente, la osmolaridad al interior del túbulo es de  $\approx 400$  mOsm mientras que exterior es de 600 mOsm. Otra vez, la diferencia es de 200 mOsm y así sucesivamente. Esto resulta en un fluido hipotónico en la salida de la rama ascendente, como se mencionó anteriormente, pero en la región de la médula se mantiene una hipertonicidad que, como se verá más adelante, va a permitir que el agua se reabsorba dentro del sistema capilar desde el túbulo colector por influencia de la hormona antidiurética (ADH) (Ganong, 2010).

### 2.2.3. Transporte tubular en túbulo distal

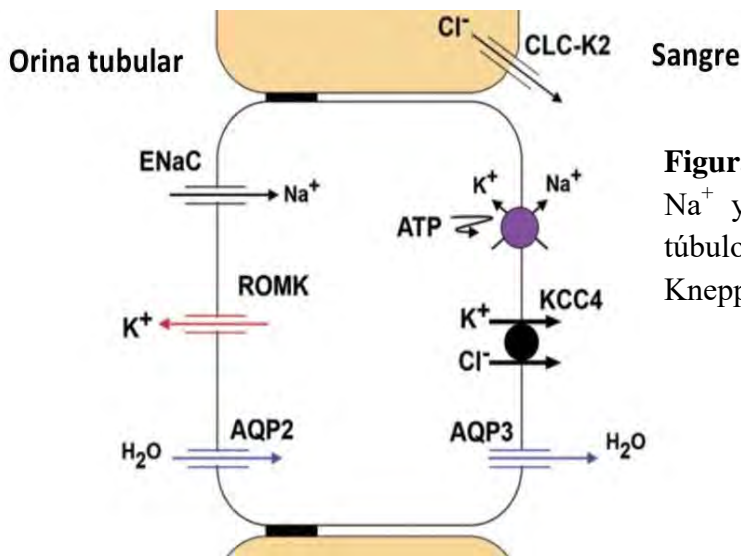
La denominada nefrona distal incluye un sistema de túbulos colectores p.ej., el túbulo contorneado distal, el túbulo conector. Sus células poseen una gran cantidad de mitocondrias teniendo así una actividad metabólica alta y es el sitio de la nefrona con mayor actividad de la bomba  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$ -ATPasa. Recibe el fluido hipotónico generado por el mecanismo multiplicador contracorriente en el asa de Henle y aproximadamente un 5% del ultrafiltrado total. La concentración de sal en el túbulo distal es alrededor de 50% respecto de la del plasma. A pesar de esto su reabsorción es muy activa por la vía del cotransportador de  $\text{Na}^+ - \text{Cl}^-$  que también se encuentra ligado a la reabsorción de  $\text{Ca}^{2+}$  (Alexanderson y Gamba, 2014). El transporte en la nefrona distal es un proceso más delicado y difiere del observado en el túbulo proximal en varios aspectos:

- Reabsorbe cantidades mucho menores de sales ( 5 a 10% del  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  filtrados) y 19 % agua.
- Puede establecer gradientes escalonados para las sales y el agua, refiriéndose a que la osmolaridad con respecto al plasma son diferentes.
- Posee un epitelio apretado, lo que permite que la nefrona distal pueda establecer fuertes gradientes para los iones pequeños y el agua, lo cual no ocurre en el túbulo proximal (Rhoades *et al.*, 2012).

Otra función de la nefrona distal es la secreción de fosfato por acción de la hormona paratiroidea, la cual también promueve la absorción de  $\text{Ca}^{2+}$  en el sistema capilar. La nefrona distal es considerada como un segmento conector entre el asa de Henle y los túbulos colectores (Alexanderson y Gamba, 2014).

## 2.2.4. Los túbulos colectores

Los túbulos colectores tienen varias funciones que incluyen la reabsorción y secreción de iones, la regulación del equilibrio ácido-básico y el balance de líquidos a través de la regulación de la absorción de agua. Anatómicamente, se pueden diferenciar entre los túbulos colectores corticales (localizados más superficialmente) y los túbulos colectores medulares. Los túbulos colectores corticales participan en la absorción de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$  y agua, además de la secreción de  $\text{H}^+$  y  $\text{K}^+$  (Fig. 7) Los túbulos colectores corticales están constituidos por las células principales (P) y las células intercaladas (I). Las células P están encargadas de la absorción de  $\text{Na}^+$  y la secreción de  $\text{K}^+$  (Windhanger, 1992).



**Figura 7.** Modelo para el transporte de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  por una célula principal del túbulo colector (modificada de Fenton y Knepper, 2007).

Esto está regulado por la hormona aldosterona secretada por la glándula adrenal, que promueve la absorción de  $\text{Na}^+$  desde el fluido tubular hacia el sistema capilar. A medida que ocurre la absorción de  $\text{Na}^+$  se produce la secreción de  $\text{K}^+$  desde el sistema capilar hacia el fluido tubular a través de un mecanismo de transporte activo secundario (Alexanderson y Gamba, 2010).

Las células I están involucradas en la reabsorción de bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) y la secreción de  $\text{H}^+$ . Esto involucra una bomba ATPasa que expulsa el  $\text{H}^+$  al lumen del túbulo y al igual que en el túbulo proximal, el  $\text{H}^+$  se combina con el bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) para formar ácido carbónico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) el cual se disocia en agua y  $\text{CO}_2$  que fácilmente atraviesan la membrana y llegan al interior de las células intercaladas en donde, por acción de la enzima anhidrasa carbónica, se forma  $\text{H}_2\text{CO}_3$  nuevamente. Este a su vez se disocia para dar  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{H}^+$ . El  $\text{HCO}_3^-$  es reabsorbido en el sistema capilar para regular el balance ácido-básico (Ganong, 2010). Por otra parte, los túbulos colectores medulares regulan la reabsorción de agua. Esto ocurre por acción de la hormona antidiurética o vasopresina, la cual promueve la transcripción e inserción de acuaporina-2 en las células epiteliales del túbulo colector. El mecanismo de acción de la vasopresina es a través de la estimulación de receptores V2, lo cual activa a la adenilato ciclasa e incrementa los niveles de AMPc promoviendo la expresión de moléculas de acuaporina. La acuaporina dota de permeabilidad al agua a la membrana celular y por lo tanto el agua, que normalmente sería excretada del tubo colector en la orina, ahora es reabsorbida en sistema capilar (Olesen, 2015). El ambiente hipertónico en la porción medular generada por el mecanismo multiplicador contracorriente, favorece el paso del agua a través de los canales de acuaporina al sistema circulatorio, aumentando el volumen sanguíneo y la presión arterial. Se puede decir, que los dos principales efectos de la vasopresina en el túbulo colector es decrementar la excreción de agua e incrementar la concentración (osmolaridad) de la orina (Ganong, 2010).

### **2.2.5. Transporte y secreción de potasio en el túbulo colector cortical**

La secreción de  $K^+$  parece ser una función primordial de las células del túbulo colector cortical. La difusión de  $K^+$  hacia fuera de la célula se ve favorecida por gradientes de concentración y se le oponen gradientes eléctricos. El gradiente eléctrico que se opone a la salida de la célula es menor a través de la membrana luminal celular que de la membrana basolateral con lo que se favorece el movimiento de  $K^+$  hacia la luz y no de regreso hacia la sangre. La diferencia de potencial de la membrana luminal es bajo debido a que esta membrana tiene una alta permeabilidad al  $Na^+$  (Best y Taylor, 2003). La aldosterona promueve la secreción de  $K^+$  mediante varias acciones. El  $Na^+$  entra a las células del túbulo colector por difusión a través de un canal de sodio. La entrada de  $Na^+$  a través de este canal está limitada por la reabsorción global de  $Na^+$  y se incrementa por la aldosterona (Ganong, 2010). Las células intercaladas están dispersas entre las células principales del túbulo colector; son importantes en el transporte ácido-básico. Una  $H^+/K^+$ -ATPasa está presente en la membrana celular luminal de las células intercaladas y contribuye a conservar el  $K^+$  renal cuando la ingesta de  $K^+$  en la dieta es deficiente (Alexanderson y Gamba, 2014).



### 2.3. Canales iónicos

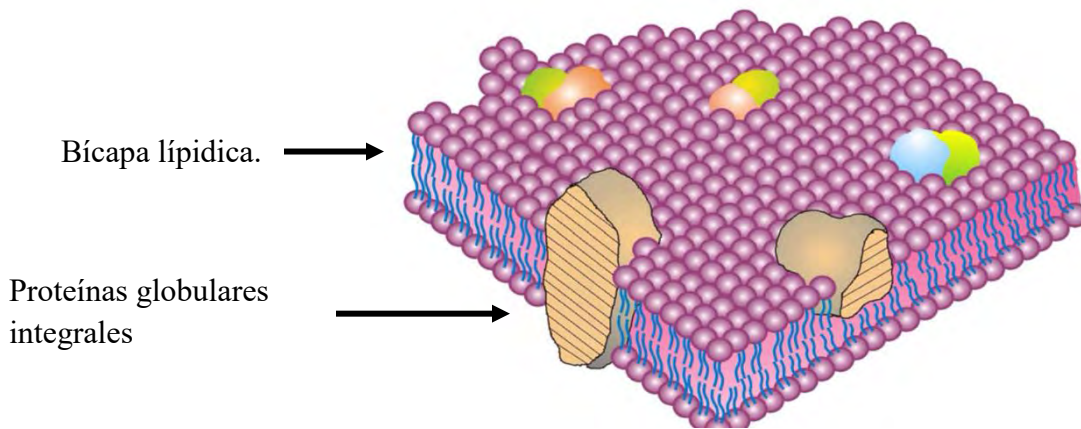
Los canales iónicos son proteínas complejas que abarcan la bicapa de la membrana celular, permitiendo el paso de iones cargados a través de una barrera naturalmente impermeable a dichos iones. El dominio protéico membranal del canal forma el poro, permitiendo que iones como el  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Cl}^-$  fluyan bajo su gradiente electromi químico. Los canales iónicos son usualmente formados de una subunidad alfa que comprende el poro y el filtro selectivo de ese canal y muchos de ellos poseen una “compuerta” que permite el cierre y la apertura en respuesta a un estímulo. Muchos de estos canales muestran selectividad, permitiendo solo el paso de iones de una carga y tamaño determinados a través de ellos. Para atravesar el poro, los iones tienen que deshacerse de la mayor parte de las moléculas de agua asociadas con ellos con el fin de pasar en una sola fila a través de la parte más estrecha del canal, a menudo referido como el filtro de selectividad. La mayoría de los canales permiten el movimiento de los iones en cualquiera de las dos direcciones pero la dirección del flujo a través del canal es dictado por el gradiente electroquímico (Fermini y Priest, 2008).

La mayoría de los canales no están continuamente abiertos, más bien están sometidos a cambios conformacionales de estados abiertos ó cerrados, activados e inactivados. Estas propiedades distinguen a los canales entre sí. Una vez abiertos permiten el pasaje de 100 millones de iones por segundo. Canales como el sodio están abiertos por menos de un milisegundo antes de que se cierren de nuevo por un proceso de inactivación (Fermini y Priest, 2008). Existen varios tipos de canales iónicos que han sido ampliamente descritos. Entre estos se encuentran los canales dependientes de voltaje como son los canales de sodio, calcio y potasio que responden a cambios en el

potencial de membrana y son encontrados en varios tipos de tejido incluyendo células nerviosas, músculo esquelético y músculo cardíaco. Otra gran familia de los canales la constituyen los canales activados por ligando, los cuales son regulados por varios ligandos p.ej., neurotransmisores u hormonas los cuales por lo general se unen a un sitio extracelular específico, activando el canal. Existen además canales activados por pH, por CO<sub>2</sub> o diferentes factores metabólicos y canales activados por estímulos químicos y mecánicos como en los sistemas sensoriales. Los canales iónicos participan en funciones fisiológicas básicas tales como la generación de la actividad eléctrica en células nerviosas y músculo aunque también en otros tejidos excitables. Juegan un papel importante en el control de la excitabilidad, señalización intracelular, secreción de hormonas, proliferación celular, regulación del volumen celular y muchos otros procesos biológicos. Su prevalencia es crítica ya que se encuentran virtualmente en todos los tipos de tejidos y órganos (Fermini y Priest, 2008). Para el caso de células no excitables, muchas señales transitorias de calcio son claves en determinados eventos, incluyendo exocitosis, expresión de genes e incluso división celular ( Yu *et al*, 2005).

### 2.3.1. Membranas celulares

Las membranas son estructuras dinámicas y fluidas que envuelven a la célula, definiendo un límite, manteniendo las diferencias entre su contenido y el entorno. Todas las membranas biológicas comparten una estructura básica común: están constituidas por una bicapa lipídica hecha de triglicéridos fosfolípidos. Uno de los acilos contiene fosfatos cargados que colindan con la fase acuosa, mientras que los acilos hidrofóbicos dan al interior de la fase lipídica. Un acilo es polar, de ácido fosfatídico, unido mediante hidroxilos a la colina, etanolamina, serina, inositol, etc. y dos colas o acilos no polares (Fig. 8). El agua y las sustancias hidrofílicas sólo pueden pasar la membrana por difusión a través de canales hidrofílicos o transportadores pero pueden pasar



**Figura 8.** Modelo de mosaico fluido, estructura de las membranas celulares, corte transversal. Los cuerpos sólidos embebidos en la superficie representan las proteínas globulares integrales de tamaño medio, las cuales están aleatoriamente distribuidas en el plano de la membrana. En un corto rango, algunas pueden formar agregados como se muestra en la figura. Las proteínas integrales se encuentran en una doble capa lipídica en una fase fluida (tomada de Nicolson, 2014).

libremente, todas las sustancias lipofílicas como las grasas, el glicerol, los esteroides. Las membranas poseen una permeabilidad selectiva asegurando que las sustancias esenciales entren en la célula con facilidad y que los compuestos de desecho la abandonen (Lodish *et al.*, 2005).

Las membranas contienen proteínas integrales que están embebidas en la fase lipídica gracias a sus dominios hidrofóbicos, mientras que sus dominios hidrofílicos se asoman por ambos lados de la membrana. Las proteínas periféricas flotan en uno de los lados.

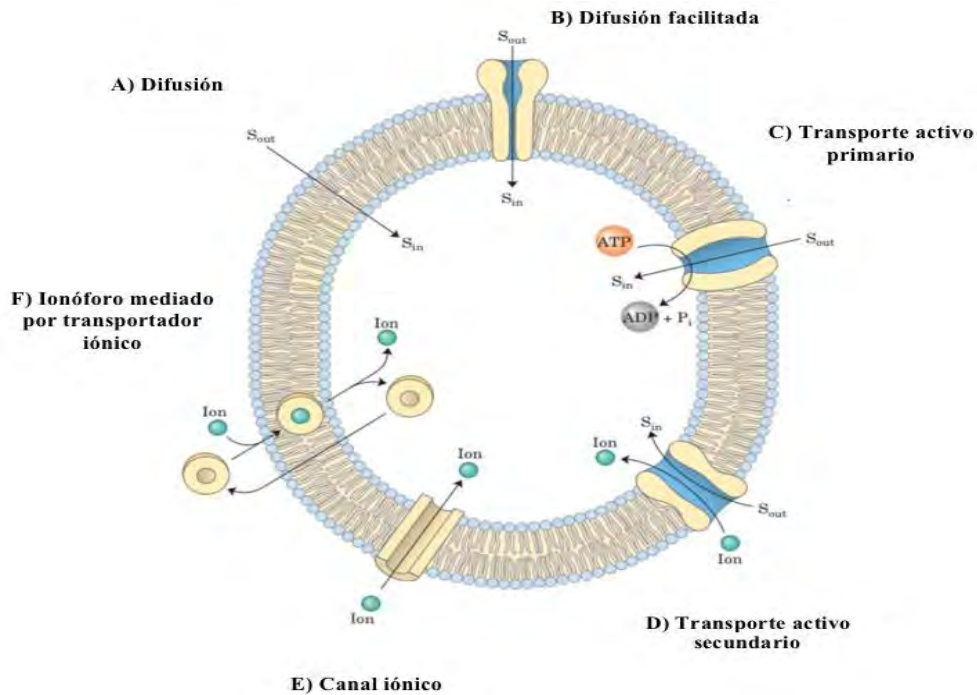
Las proteínas que residen en ella son mediadoras de diversas funciones características de la propia membrana ya que pueden ser utilizadas como bombas, canales, poros y transportadores dirigiendo el movimiento transmembranal de diferentes solutos y estableciendo gradientes a través de ella y que son utilizados para diversos fines, como la producción de señales eléctricas, como es el caso de las células musculares y nerviosas, activación o síntesis de nuevas proteínas, exocitosis, etc. (Alberts *et al.*, 2005). Por otro lado estas proteínas también pueden funcionar como receptores, transductores de energía y enzimas (Berg *et al.*, 2008).

### **2.3.2. Tipos de transporte**

Ósmosis: es el movimiento de agua a través de una membrana semipermeable impulsado por diferencias en la presión osmótica (Lehninger y Cox, 2006).

Difusión facilitada: es el paso de un soluto en favor de su gradiente de concentración y que es mediado por un transportador.

Transporte activo: es el desplazamiento de un soluto en contra de su gradiente de concentración requiriendo el aporte acoplado de energía.



**Figura 9.** Resumen de tipos de transporte. A) Difusión simple; los compuestos no polares pasan a favor de su gradiente de concentración. B) Difusión facilitada; las sustancias pasan a favor su gradiente de concentración mediante una proteína transportadora. C) Transporte activo primario; en contra de su gradiente de concentración dependiente de ATP. D) Transporte activo secundario; en contra de su gradiente de concentración impulsado por un ión moviéndose a favor de su gradiente. E) Canales iónicos; difusión simple. El canal puede ser activado por ligando o voltaje. F) Ionóforo, sustancias liposolubles moviéndose a favor de su gradiente de concentración (modificada de Lehninger y Cox, 2006 ).

Transporte activo primario: Está acoplado a la hidrólisis de ATP que impulsa el movimiento del soluto en contra de su gradiente electroquímico (Karp, 2001).

Transporte activo secundario: Ocurre cuando se establece un gradiente de un determinado ion (p.ej.,  $\text{Na}^+$ ), por un proceso de transporte activo primario; el movimiento de este ion impulsa el movimiento de un segundo soluto en contra de su gradiente electroquímico (Nelson y Cox, 2001). Cuando ambos solutos se mueven en el mismo sentido se llama cotransportador (Fig. 9). En cambio cuando un soluto se mueve en un sentido mientras que el otro lo hace en sentido opuesto a través de la membrana se llama intercambiador (Stryer *et al.*, 2008).

## 3. Antecedentes

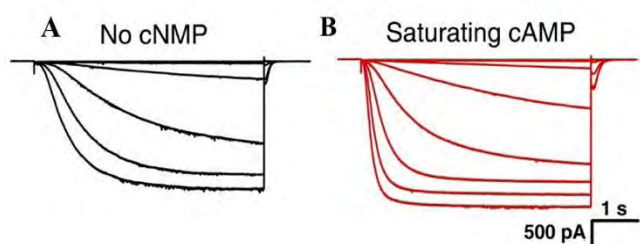
### 3.1. Los canales HCN

Los canales HCN forman parte de la superfamilia de canales dependientes de voltaje (Yu *et al.*, 2005) y fueron descritos por primera vez en el año de 1979 en células del nodo sinoatrial. Existen cuatro isoformas de las subunidades HCN (HCN1-HCN4) que comparten el 80% de homología y sus principales diferencias son su cinética de activación y la sensibilidad al AMPc (Calejo *et al.*, 2014).

Las diversas subunidades se combinan para formar canales tetraméricos, tanto en corazón como en el sistema nervioso. La corriente generada a través de los canales HCN se denomina corriente h ( $I_h$ ) y es activada por hiperpolarización de la membrana además de que la activación es facilitada por nucleótidos cíclicos. Se ha observado que concentraciones saturantes de GMPc o AMPc incrementan la probabilidad de apertura de los canales HCN a potenciales de membrana hiperpolarizados, aceleran la cinética de activación e incrementan la corriente máxima (Fig. 10).

Además, desplazan la dependencia de voltaje de activación hacia voltajes de membrana más despolarizados ( $\approx 15\text{mV}$ ) (Craven y Zagotta, 2004; Wang *et al.*, 2001; Zagotta *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2004) siendo más eficiente el AMPc que el GMPc para producir estos cambios (DiFrancesco y Tortora, 1991). El AMPc estabiliza el estado abierto del canal HCN en relación al estado cerrado (Zagotta *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2004). Se ha sugerido que tanto el voltaje como el AMPc abren la misma compuerta intracelular produciendo por tanto el mismo cambio conformacional del canal (Rothberg *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2004).

De tal manera que la compuerta debe de estar acoplada tanto al sensor de voltaje como al dominio de unión de los nucleótidos cíclicos (CNBD, por sus siglas en inglés) para abrirse en respuesta a estos estímulos. Otras características importantes de los canales HCN es que son activados más lentamente (0.2-2 sec) que la mayoría de los canales de  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje y a diferencia de los canales CNG no son bloqueados por altas concentraciones de cationes divalentes. Una de las funciones principales de la corriente  $I_h$ , mediada a través de los canales HCN es la de generar actividad marcapaso. En el corazón, la corriente  $I_h$  despolariza a la célula hasta el umbral de activación de los canales de calcio dependientes de voltaje produciéndose el disparo de otro potencial de acción cardiaco. De esta manera es generado el disparo rítmico (DiFrancesco, 1991; Altomare *et al.*, 2003).



**Figura 10.** A) Registro de la corriente  $I_h$  del canal HCN2. B) La corriente  $I_h$  en concentraciones saturantes de cAMP (modificada de Craven y Zagotta 2004).

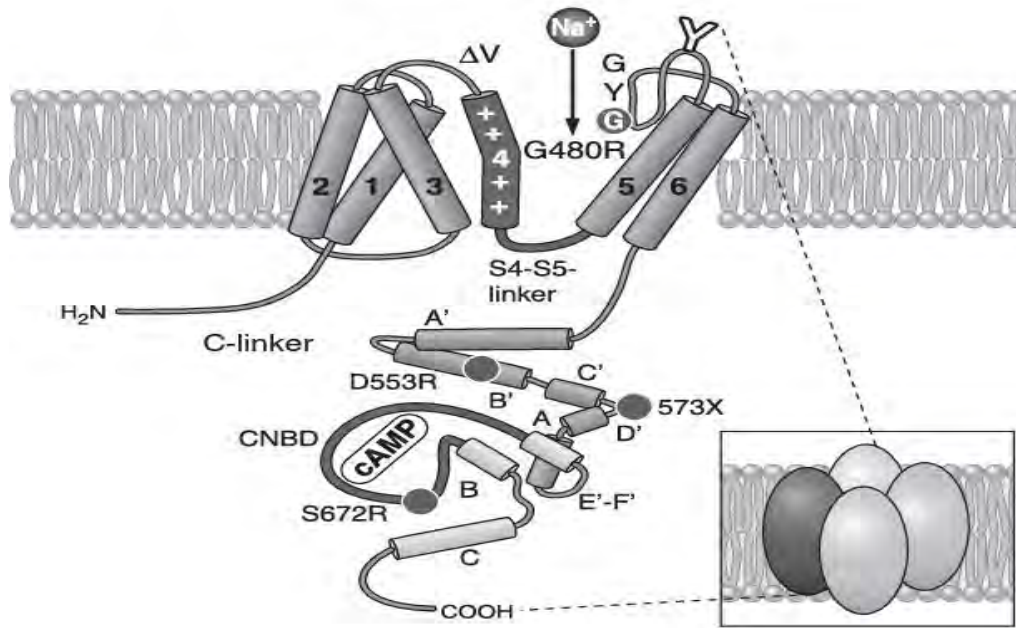


Neurotransmisores como la norepinefrina ó agentes farmacológicos tales como los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, pueden elevar los niveles de AMPc y acelerar la tasa cardiaca (Guth y Dietze, 1995; Mangoni y Nargeot, 2001). Los canales HCN también median la actividad marcapaso en el sistema nervioso mediante un mecanismo similar al del corazón. Sin embargo, las cinéticas de activación de estos canales son mas rápidas ya que los potenciales de acción neuronales son más rápidos que los del corazón (Ono, *et al.*, 2003; Stein, *et al.*, 2005). Además de actuar como marcapaso, la corriente  $I_h$  actúa como regulador del potencial de reposo y la resistencia de la membrana. Mas aún, los canales HCN regulan la transmisión sináptica y contribuyen al desarrollo del sistema nervioso. La corriente  $I_h$  estabiliza el potencial de reposo de la membrana debido a que pequeñas hiperpolarizaciones activan los canales HCN cuya corriente entrante despolariza la célula. Esta despolarización, a su vez, desactiva los canales HCN impidiendo que el voltaje se aleje más del potencial de reposo (Moosmang *et al.*, 2001; Biel *et al* 2009).

### 3.2. Estructura y función

Los canales HCN son proteínas tetraméricas cuyas subunidades están arregladas alrededor de un poro central. Cada subunidad esta constituida por seis dominios transmembranales y los segmentos amino y carboxilo dan al interior celular. Cada canal posee dos módulos estructurales que consisten en una parte citosólica que se encarga de la regulación por nucleótidos cíclicos y una parte transmembranal que contiene la maquinaria conductora de iones, ambos módulos cooperan alostéricamente durante su activación.

La parte transmembranal de los HCN es poseedora de seis segmentos alfa-hélices (S1-S6), el poro conductor de iones se forma entre los segmentos S5 y S6. Un residuo altamente conservado de asparagina es glicosilado mostrando ser crucial para su expresión en la superficie de la membrana y su estabilización con otras subunidades en la formación del canal (Zha *et al.*, 2008). El sensor de voltaje esta formado por el segmento S4, el cual contiene nueve argininas o lisinas. Es permeable para los iones de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  en relación 1:4 y es bloqueado por  $\text{Cs}^+$ . Contiene un motivo de GYG que es el filtro selectivo de canales  $\text{K}^+$  (Biel *et al.*, 2009).



**Figura 11. Estructura de los canales HCN.** Un monómero está compuesto de seis segmentos transmembranales incluyendo el sensor de voltaje (S4) y la región del poro que es S5 y S6. La región del poro contiene el filtro selectivo que lleva el motivo GYG. El dominio COOH del canal está compuesto por el C-linker y el CNBD. El C-linker consiste en seis Alfa-hélices designadas A' y F'. El CNBD prosigue del C-linker está compuesto Alfa-hélices A-C y Beta-roll. El sitio de glicosilación se encuentra entre S5 y el poro indicado como Y (tomada de Biel *et al.*, 2009).

La sensibilidad de los HCN al AMPc es mediada por la porción citosólica conocida como residuo C-terminal constituido por 120 aminoácidos, 80 de ellos construyen el C-líncer que es la región que conecta la S6 con el CNBD; esta última estructura tiene la propiedad de cambiar el valor del voltaje de activación a uno más positivo por la unión de nucleótidos cíclicos, acelerando su apertura (Wahl-Schott, 2008). El CNBD está constituido por una alfa-hélice inicial seguida por ocho hebras antiparalelas beta-roll continuas con hélice-B corta y una hélice-C, la interfase de esta última cadena y las hebras beta forman el sitio de unión para el AMPc constituida por un grupo de tres aminoácidos. El C-linker se construye a partir de seis alfa-hélices (Fig.11). El módulo citosólico está ensamblado en un eje con una simetría tetramérica (Wahl-Schott, 2008).

### 3.3. Patrones de expresión

Los canales HCN han sido caracterizados en cerebro y corazón pero pueden exhibir una amplia distribución en diferentes órganos, aunque sus niveles de expresión son variables y complejos (Calejo *et al.*, 2014).

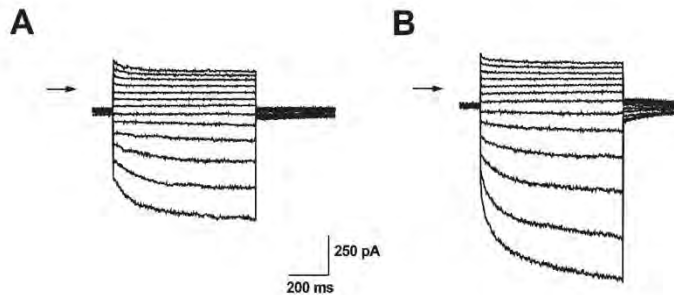
La expresión del canal HCN1 se restringe al bulbo olfatorio, corteza cerebral, hipocampo y cerebelo, el HCN2 se presenta en bulbo olfatorio, hipocampo, tálamo y tronco cerebral, el HCN3 se manifiesta de manera uniforme a lo largo de todo el cerebro en niveles bajos. Finalmente el HCN4 se ha localizado de manera selectiva en el tálamo y el bulbo olfatorio. Algunas neuronas expresan dos o más canales y cada uno tiene una distribución y nivel único de expresión (Moosmang, 1999). En el nodo sinoatrial HCN2 y HCN1 son detectados a niveles moderadamente bajos, mientras tanto el HCN4 se encuentra de manera prominente al igual que en el atrioventricular y fibras de purkinje. En células fotorreceptoras de la retina el canal HCN1 se expresa en niveles altos, los canales HCN2-4 permanecen ausentes. Por otra parte en células del ganglio espinal (DRG) HCN1 es el transcrito dominante seguido por el HCN2 (Moosmang, 2001). También están presentes en miocitos de la región atrioventricular. En estas células, HCN2 es la isoforma dominante exhibiendo una distribución ubicua. Los transcritos de los canales 1, 3 y 4 también han sido detectados en músculo cardíaco. Por último se han encontrado en otras líneas de células excitables como son las células alfa y beta pancreáticas, donde con base en resultados experimentales se ha sugerido que su función puede estar involucrada en la regulación de la secreción del glucagón (Zhang *et al.*, 2008). Por otra parte, en células MIN6 se encontraron las isoformas HCN2 y HCN1 de forma numerosa pero su función aún es desconocida (El-Kholy *et al.*, 2007).

### 3.4. Los canales HCN en tejidos no excitables

La familia de los canales HCN ha sido ampliamente caracterizada en tejidos excitables donde, como ya se mencionó, funciona principalmente regulando la actividad marcapaso (Luthi y McCormick, 1998; Santoro y Tibbs, 1999). Sin embargo, en los últimos años se han encontrado algunos transcritos de isoformas HCN en células de tejidos no-excitables como hígado (Santoro *et al.*, 1998; Santoro y Tibbs, 1999) y riñón (Bolívar *et al.*, 2008; Uawithya *et al.*, 2008). Proteínas de expresión de las cuatro isoformas (HCN1-HCN4) han sido reportadas en el páncreas (El-Kholy *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008) y en el ovario incluyendo células granulosas, de la teca, lúteas y oocitos. La isoforma HCN4 solo se encuentra en estos últimos. Sus patrones de expresión son diferenciales y disminuyen de manera pronunciada con el envejecimiento (Yeh *et al.*, 2008). Estudios recientes han demostrado también la presencia de isoformas HCN en células troncales. A este respecto, se ha propuesto que los canales HCN en estas células podrían jugar un papel importante en el ciclo de progresión y proliferación celular ya que cuando son bloqueados, se ha observado una atenuación en la proliferación celular en la fase G0/G1 y un incremento en la proporción de la células de la fase S (Lau *et al.*, 2011). La expresión de los canales HCN en los diversos tejidos exhiben una gran complejidad y diversidad debido principalmente a la formación de diferentes heterotetrámeros producidos por el co-ensamble de las distintas isoformas. Además, en muchos casos ocurren modificaciones post-transduccionales (p.ej., glicosilación) y también hay asociaciones con otras proteínas (Calejo *et al.*, 2014).

### 3.5. Los canales HCN en el tejido renal

Para el presente trabajo es de particular importancia la expresión de isoformas HCN en el tejido renal. La presencia de ARN mensajero (ARNm) codificando HCN2 y HCN3 fue reportada en células HEK-293, derivadas de células epiteliales embrionarias de riñón humano (Varghese *et al.*, 2006). Posteriormente, la detección de transcritos correspondientes a los genes que expresan los canales HCN1, HCN2 y HCN4 fue reportada en preparaciones de cultivo del túbulo colector utilizando la técnica de PCR (Bolívar *et al.*, 2008). En este mismo estudio, se utilizaron las técnicas de registro electrofisiológico convencional y de parche perforado en célula completa y por primera vez se registró, en la membrana basolateral de las células del túbulo colector medular, una corriente rectificadora entrante activada por hiperpolarización. Esta corriente catiónica, no selectiva y activada por nucleótidos cíclicos, exhibió gran similaridad con la  $I_h$  y se le denominó  $I_{vti}$  (Fig. 12).



**Figura 12.  $I_{vti}$  es modulada por cAMP**  
Registros obtenidos de células de IMCD, A) antes y B) durante la exposición a 8-bromo-cAMP (tomada de Bolívar *et al.*, 2008).

Más recientemente, el canal HCN2 ha sido reportado en la membrana basolateral de las células intercaladas donde se especula que participa en la excreción de amonio y regulación del equilibrio ácido-básico (Carrizosa *et al.*, 2011).

Por otra parte, también se han identificado las isoformas HCN1 y HCN3 en la parte apical del túbulo proximal y HCN3 en la membrana basolateral de las células de la rama gruesa ascendente del Asa de Henle en la rata (López-González *et al.*, 2016).

El presente trabajo de tesis tiene como objetivo principal determinar la expresión de la proteína HCN4 en médula interna renal, conducto colector y cultivo primario de conducto colector mediante la técnica de Western Blot.

En un trabajo previo, utilizando la técnica de PCR en tejido de médula interna, nuestro grupo de trabajo ha sugerido la presencia de ARNm que codifica la isoforma HCN4 en el riñón (Bolívar *et al.* 2008). Sin embargo, hasta la fecha no se ha demostrado la presencia de la proteína en el túbulo colector. Es importante aclarar que la presencia de ARNm en un tejido no garantiza la expresión de la proteína y menos aún su funcionalidad. Por lo tanto, la pregunta de la cual parte este trabajo, es si la subunidad HCN4 se expresa en el túbulo colector del riñón. Para responder a esta pregunta, en el presente estudio se utilizaron dos anticuerpos provenientes de distintas fuentes para la identificación de la proteína mediante la técnica de Western blot.

## 4. Justificación

Diversas proteínas que constituyen el canal HCN han sido encontradas en diferentes partes del tejido renal incluyendo el túbulo proximal, la rama gruesa ascendente y las células intercaladas. Adicionalmente, se ha demostrado la expresión de la proteína HCN2 en células del túbulo colector. Estos datos sugieren que los canales HCN tienen un papel importante en el tejido renal. Este trabajo se encarga de demostrar la expresión de la proteína HCN4 en el túbulo colector. Normalmente las proteínas HCN se encuentran asociadas a un tipo de tejido excitable, formando canales que generan una corriente catiónica activada por hiperpolarización llamada corriente h (I<sub>h</sub>). En el riñón, se han descrito una gran cantidad de canales iónicos que participan de manera directa o indirecta en los procesos de absorción y secreción de diversas sustancias. La I<sub>h</sub> (I<sub>vti</sub>) fue primeramente descrita en nuestro laboratorio y aunque aún no se entiende por completo su función, podría estar jugando un papel importante en el intercambio iónico el cual es crucial en la fisiología renal. Por esta razón, la detección de los transcritos de proteínas HCN en el riñón merecen una especial atención. Este es el primer trabajo que muestra la presencia de la subunidad HCN4 en el túbulo colector y constituye el primer paso para entender su función en el sistema renal.



## **5. Hipótesis**

Si los experimentos de PCR han demostrado la presencia de ARNm para la subunidad HCN4, entonces la proteína HCN4 se expresa en las células del túbulo colector.

## **6. Objetivos**

### **Objetivo general**

- Determinar la expresión de la proteína HCN4 en médula interna renal, conducto colector y cultivo primario de células de conducto colector mediante la técnica de Western blot.

### **Objetivos particulares**

- Establecer las condiciones óptimas que permitan la detección de la proteína HCN4 por medio de Western blot.
- Usar dos anticuerpos de diferentes laboratorios: Santa Cruz Biotechnology y Alomone Labs para determinar con cual de ellos se obtiene una mejor detección de canal HCN4.
- Detectar la presencia de los canales HCN 1, 2, 3 y 4 mediante la técnica de ELISA en médula interna y cultivo primario
- Detectar la presencia de inmunoreactividad en fracciones celulares de todas las muestras incluyendo médula interna renal, conducto colector y cultivo primario.
- Utilizar los péptidos inhibitorios de los anticuerpos para determinar su especificidad.

## **7. Metodología**

### **7.1. Animales de experimentación**

Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo a las especificaciones de la NOM-062-ZOO-1999 para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio y fueron aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Los tejidos y células usados en este proyecto fueron obtenidos a partir de ratas macho Wistar (175–225 g) las cuales comprendieron un control positivo (cerebro), médula interna (MI), conducto o túbulo colector (IMCD) y cultivo primario de conducto colector (CP).

Los animales fueron inyectados con furosemida (Lasix; 1 mg/100 g; Hoechst, Mexico) 20 min antes de ser sacrificados para disminuir la osmolaridad del tejido y posteriormente fueron anestesiados con una dosis letal de pentobarbital sódico (165 mg/Kg, intraperitoneal).

### **7.2. Obtención de médulas interna renal**

Los riñones se extrajeron en condiciones asépticas. A partir de ellos, se separó la médula interna renal con una navaja de acero inoxidable. Posteriormente, se transfirieron a una solución fisiológica de PBS. Dependiendo de la muestra, se siguió una metodología específica para su obtención. Además, se procesó una muestra de cerebro obtenida bajo las mismas condiciones.

### **7.3. Obtención de médula interna**

Las médulas internas se resuspendieron en 500 µl de solución de lisis en Tris·HCl 10mM, pH 7.6 a la cual se agregó (en mM): 250 sacarosa, 1 EDTA, 0.1 phenylmethylsulfonyl fluoride y un coctel de inhibidores de proteasas (Protease inhibitor cocktail tablets, Roche). La suspensión fue homogeneizada con un sonicador (QSonica,) alternando 30s de sonicación y 30s de mantenimiento en hielo.

### **7.4. Obtención de cultivos primarios y conductos colectores**

Los cultivos primarios fueron obtenidos por el método de lisis hiposmótica modificado por Escobar *et al.*, (2004). Para esta muestra, las médulas fueron fragmentadas y se transfirieron a 2.5 ml de solución enzimática de PBS (GIBCO) a la cual se le agregó: albúmina bovina, 10 g; glucosa, 90 mg; alanina, 45 mg; inhibidor de tripsina, 5 mg; colagenasa, 100 mg; DNAasa I, 4mg y rojo de fenol, 1.2 mg.

Esta suspensión de fragmentos fue incubada a 37°C por una hora. Durante la incubación, los fragmentos de tejido se resuspendieron cada 15 minutos con una pipeta con la finalidad de incrementar la disgregación celular. Posteriormente, se adicionaron 1.5 ml de agua destilada estéril y la suspensión se centrifugó a 1200 g por 6 min. Se desechó el sobrenadante y el sedimento celular se lavó con una solución similar a la solución enzimática sin colagenasa, y con albúmina (2 g/100ml) y DNAsa (2mg/100ml). Los lavados de las células se realizaron con 3 ml de la solución y la suspensión celular se centrifugó a 700 g por 2 minutos; este procedimiento se repitió tres veces.

Para la obtención de cultivos celulares, el sedimento celular fue suspendido en un medio de cultivo (DMEM, GIBCO, Grand Island, NY) suplementado con suero al 10 %, insulina rápida (100 U.I./ml) al 1% y una mezcla de antibióticos que contenía: penicilina 10,000 U.I., estreptomina 10 mg/ml y anfotericina B (25 µg/mL) al 1 %. Las células se sembraron en cajas petri de 35 mm de diámetro y se incubaron a 37°C en un ambiente de aire humidificado y CO<sub>2</sub> al 5%. El medio de cultivo se cambió cada 48 horas. En estas condiciones, los cultivos formaron monocapas de células a los 7 días aproximadamente. Para obtener los lisados de cultivo primario, las monocapas fueron lavadas dos veces con PBS para ser resuspendidas en 500 µl de solución de lisis. A diferencia de la muestra de cultivo primario, para la obtención de conductor colector, el paso que se omite es la resuspensión de las células en medio de cultivo, en lugar de ello se contienen en buffer de lisis y se almacenan a -70 ° C.

Tres de los cuatro lisados se sometieron a tres centrifugaciones una a 1000g por 5 minutos una segunda centrifugación de 17,000 g por 20 minutos y 22,000 g recuperando el sobrenadante en cada una de ellas.

Las muestras obtenidas se cuantificaron por el método de Bradford y se analizaron posteriormente por Western Blot. Estas condiciones fueron adecuadas para detectar reactividad en todas las muestras excepto en muestras de cultivo primario. Por lo que se realizó a una cuarta centrifugación a 100,000 g durante 1 hora para obtener una fracción rica en membranas. El sedimento obtenido se resuspendió en 800µl de buffer de lisis y se dividió en alícuotas de 40 µl y se mantuvieron a -70°C hasta su uso. La cuantificación de proteínas en todas las muestras se determinó por medio del ensayo de Bradford (Bradford, 1976; Protein Assay, Bio- Rad).

## **7.5. Detección de los canales HCN1-4 en extractos proteicos de cerebro, médula interna y cultivo primarios por ELISA**

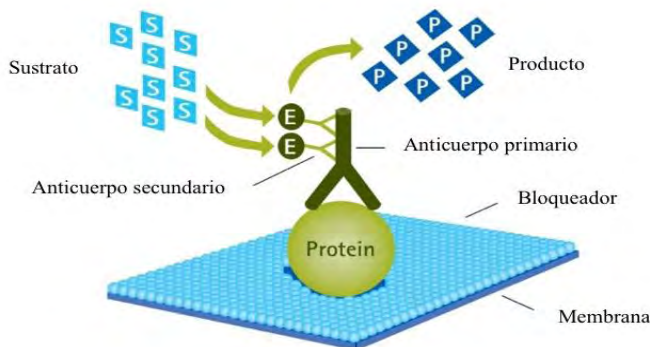
Para realizar un escrutinio de la presencia de canales HCN 1-4 en lisados totales de médula interna, cerebro y células de cultivos primarios se realizaron determinaciones con pruebas de ELISA con anticuerpos policlonales Anti HCN 1-4 de cabra (Santa Cruz Biotechnology).

El contenido protéico de las muestras se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976). Los antígenos protéicos de los lisados se fijaron en pozos de placas de microtitulación con 100  $\mu$ l de proteína (3 $\mu$ g/ml) en amortiguador de carbonato/bicarbonato 0.05 M, pH 9.6, durante toda la noche. Las placas se lavaron seis veces con solución de lavado (PBS/Tween 20) al 0.05%. Posteriormente se agregaron 200  $\mu$ l de albúmina al 3 % en PBS durante toda la noche para bloquear el pegado inespecífico del anticuerpo.

Luego se adicionaron 100  $\mu$ l de anticuerpo primario (dilución 1:1000) y las placas se incubaron por 24 horas a 4°C. Nuevamente se lavó en las mismas condiciones anteriores y se adicionaron 100  $\mu$ l del anticuerpo secundario de conejo anti-cabra (dilución 1:10000) conjugado a peroxidasa por una hora a 37°C. Las placas se lavaron y se adicionó el sustrato de la peroxidasa (o-fenilenediamina OPD, Sigma). Se incubó durante 20 minutos y se detuvo la reacción agregando 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1N) por pozo. Finalmente, se determinó la densidad óptica (DO) utilizando un lector de microplacas (Microplate Reader, Bio-Rad) a 490 nm de longitud de onda.

## 7.6. Técnica de Western Blot

El Western blot es una de las técnicas más comunes utilizadas en bioquímica para detectar una proteína específica de una mezcla de ellas, tal como un extracto de tejido. Esta técnica es muy sensible y eficiente para la detección y caracterización de proteínas, incluso en pequeñas cantidades. En combinación con otras técnicas, también es usado para determinar cantidad, modificaciones post- transduccionales, vida media y peso molecular, de las proteínas. Esta metodología consiste en cuatro partes, extracción de las muestras, gel de electroforesis, electrotransferencia y detección. La mezcla de proteínas es resuelta por un gel de SDS-PAGE, donde son cargadas negativamente por el dodecil sulfato sódico y migran en relación a su masa. Posteriormente, son transferidas a una membrana de nitrocelulosa o PVDF por un campo eléctrico en un sistema húmedo o semiseco. El paso final es la detección del antígeno que previamente fue inmobilizado y es específicamente reconocido por un anticuerpo primario, el cual también es asociado con un segundo anticuerpo (Fig.13); este último es conjugado con la enzima peroxidasa de rábano la cual cataliza la reacción del reactivo quimiolumincente, produciendo luz que puede ser captada por un aparato (Rosato, 2007).



**Figura 13.** Inmunodetección (Protein Blotting Handbook, tips and trucks, Millipore).

## 7.7. Análisis Western Blot

El análisis por Western Blot de la expresión de la proteína HCN4 se realizó en lisados totales de cerebro (C+), médula interna (MI), conducto colector de médula interna (IMCD) y cultivo primario (CP).

La integridad de las proteínas se analizó al separarlas mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7.5 % y teñidos con Azul de Coomasie. Primeramente, se determinó la concentración óptima de proteína que permitiera detectar la banda correspondiente al canal HCN4. Las concentraciones de proteína probadas fueron: 20, 40, 60 y 80  $\mu\text{g}$  de proteína/carril. En los experimentos se utilizó una concentración 80  $\mu\text{g}$  proteína debido a que se comprobó que era la cantidad idónea para su detección.

Posteriormente se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa en un ambiente semi-seco, utilizando un equipo de transferencia (Trans-Blot SD semi-dry electrophoretic transfer cell, Bio-Rad) de acuerdo al protocolo descrito por el proveedor. Las condiciones de la transferencia fueron de 15 V durante 2 horas en todos los experimentos. Las proteínas transferidas a las membranas se tiñeron con Rojo de Ponceau S y el gel que se utilizó en la transferencia se tiñó con Azul de Coomasie. Con la finalidad de determinar la ausencia de proteínas en el gel, éste se tomó como control experimental de la inmudetección.

El pegado inespecífico a las membranas fue bloqueado con una solución de leche descremada al 10 % en PBS a 4°C durante una hora. Posteriormente, la inmunoreactividad de proteína HCN4 fue probada con dos anticuerpos policlonales comerciales: anticuerpo de cabra anti-HCN4 (Santa Cruz,



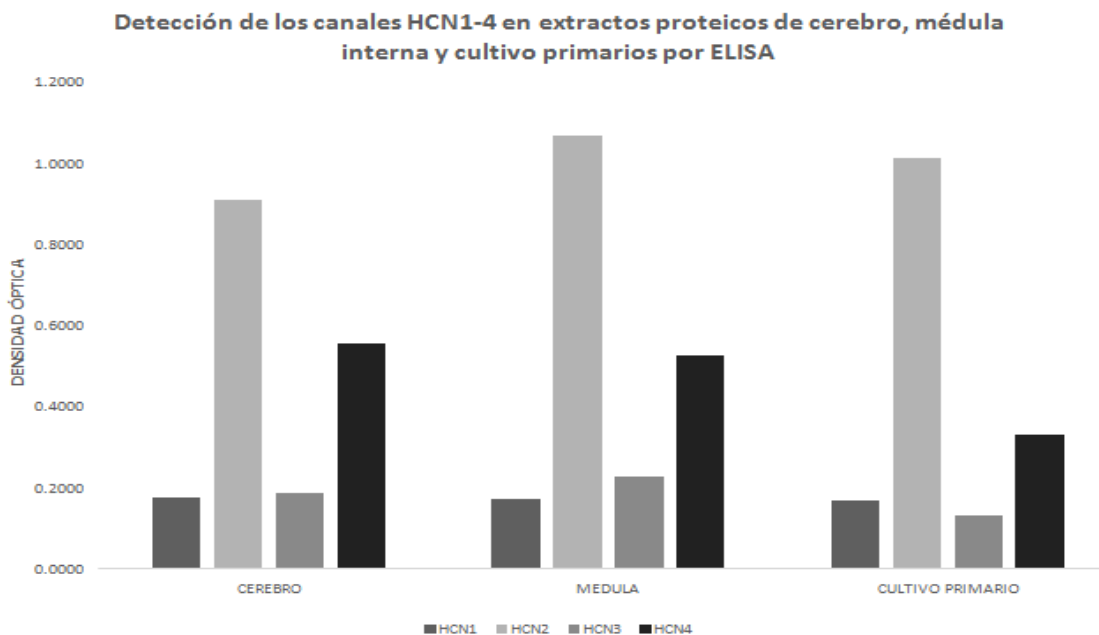
Biotechnology) y anticuerpo de conejo anti-HCN4 (Alomone Labs). La dilución usada fue de 1: 400 y 1:200 respectivamente. La incubación en los anticuerpos primarios se llevó a cabo a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, las membranas se lavaron 3 veces con PBS/Tween 20 y se incubaron por una hora a temperatura ambiente, con el anticuerpo secundario anti-cabra o anti-conejo a una dilución (1:10,000). Después de la incubación en el anticuerpo secundario, las membranas se lavaron nuevamente con PBS/Tween 20 durante 10 minutos por 3 veces. Las proteínas reactivas fueron visualizadas utilizando un equipo de quimioluminiscencia (ChemiDoc, BioRad). El sustrato de la peroxidasa utilizado fue (Luminata Crescendo Western HRP Substrate, Millipore). La densidad óptica (DO) de las bandas fueron determinados con el programa (Imagen lab – BioRad).

### **7.8. Péptido de inhibición**

El Western blot con el péptido de inhibición, solo se llevó a cabo en las muestras de de cerebro (C+) y médula interna (MI). El bloqueo se realizó con previa incubación entre el anticuerpo y péptido a 25 °C durante 30 minutos en agitación constante y en un volumen de 250 µl de PBS, a una relación de 1:5 (anticuerpo-péptido) finalmente se resuspendió en el volumen necesario para llegar a la dilución 1:200 (Alomone) y 1:400 (Santa Cruz Biotechnology) respectivamente para cada anticuerpo y se prosiguió con la metodología del Western blot anteriormente mencionada.

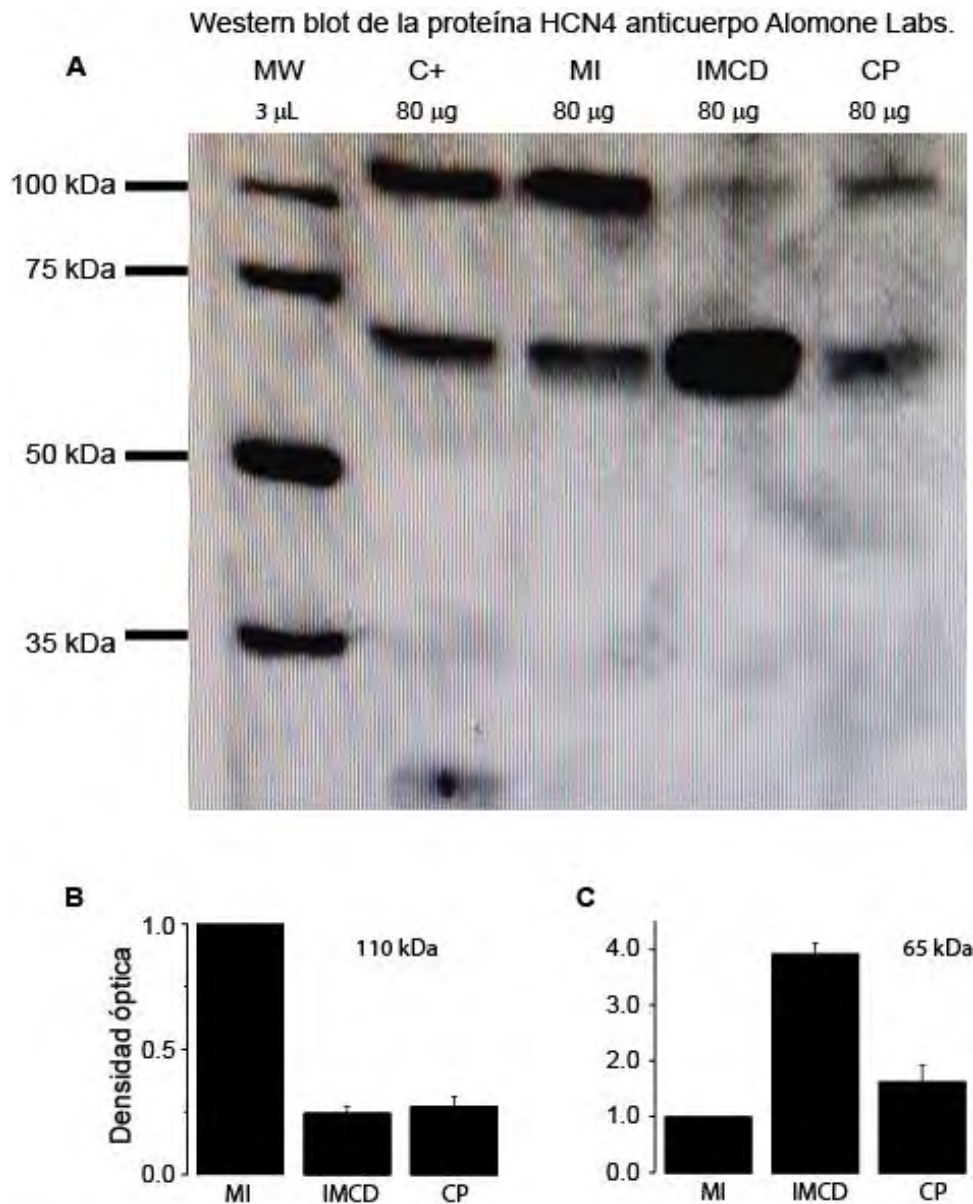
## 8. Resultados

Durante la primera fase del trabajo, se realizó un escrutinio de las proteínas HCN1-4 en lisados de médula interna renal y cultivos primarios del túbulo colector mediante la técnica de ELISA. Paralelamente, se analizó la presencia de estas mismas proteínas en una muestra de cerebro (control positivo). Esta prueba permitió determinar la presencia de las cuatro proteínas. Como puede observarse, los valores de densidad óptica mostraron variación de los niveles de expresión. La expresión detectada en orden decreciente fue: HCN2>HCN4> HCN1>HCN3. La proteína HCN2 fue la más abundante con un valor de densidad óptica del doble con respecto a la expresión de HCN4, las menos abundantes fueron las proteínas HCN1 y HCN3 (Fig. 14).



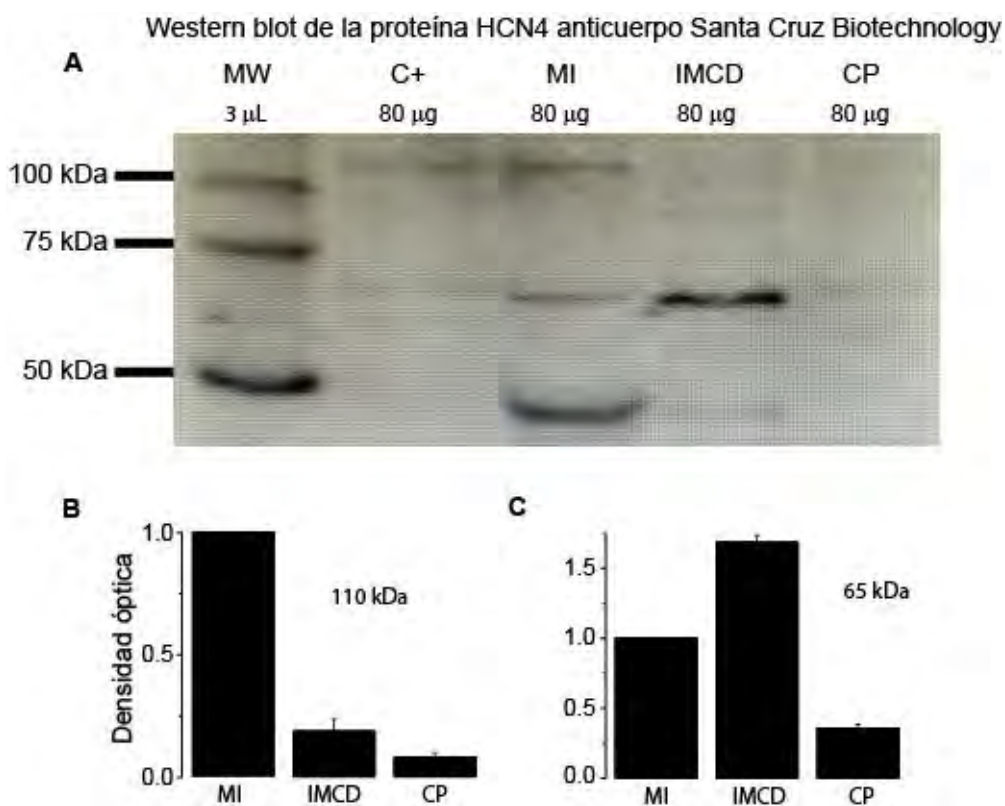
**Figura 14.** Mediante la técnica de ELISA se detectaron los cuatro tipos de canales HCN1-4. El canal que más se expresa es el HCN2 seguido del HCN4, mostrando cantidades muy similares en cerebro y médula. También se pueden observar niveles bajos de HCN3 y HCN1 en todos los tejidos.

Posteriormente se realizaron los experimentos mediante el análisis de Western blot utilizando el anticuerpo anti-HCN4 adquirido de los laboratorios de Alomone. El análisis de Western blot reveló bandas de inmunoreactividad correspondientes a proteínas con masas de 110 kDa y 65 kDa en todos los tejidos analizados incluyendo cerebro (C+), médula interna (MI), conducto colector de médula interna (IMCD) y cultivo primario (CP) (Fig. 15A). Estos datos sugieren que hay un procesamiento enzimático a partir de la proteína de 110 kDa (Calejo et al., 2014). Como puede observarse, la banda de 110 kDa es más débil en el túbulo colector y en el cultivo primario al compararse con la banda equivalente en médula interna y cerebro. Por otra parte, la banda de 65 kDa es más evidente en el túbulo colector y más débil en el cultivo primario. Una banda de 26 kDa fue encontrada únicamente en la muestra de cerebro. A partir de las imágenes obtenidas por Western blot, se realizó un análisis de densidad óptica (Fig. 15B,C). Este análisis permitió ver los niveles de expresión de las diferentes variantes de la proteína HCN4 en las distintas muestras de tejido renal, para compararlos entre sí. El análisis de densidad óptica reveló que la proteína con masa de 65 kDa se expresa mayormente en el túbulo colector. La expresión de esta proteína en el túbulo colector es  $292 \pm 14\%$  mayor que en la médula interna y normalizado con respecto a ésta (n=4). Por otra parte, su expresión en cultivo primario fue de  $60 \pm 30\%$  mayor que en médula interna (n=2). Cuando se comparó con el cultivo primario, se encontró que en el túbulo colector, la expresión de la proteína con masa de 65 kDa fue de un  $140 \pm 10\%$  mayor. Como puede observarse en la figura 10B, ocurre lo inverso para la proteína con masa de 110 kDa, cuya expresión en el túbulo colector y el cultivo primario fue  $24 \pm 3\%$  y  $27 \pm 4\%$  respectivamente, de la expresada en la médula interna. Esto sugiere que el procesamiento proteolítico es diferente en cada muestra de tejido renal, lo cual se discutirá más adelante.



**Figura 15.** En (A), Western blot análisis de la proteína HCN4 en cerebro (C+), médula interna (MI), túbulo colector de la médula interna (IMCD) y cultivo primario de túbulo colector (CP). Densidad óptica en IMCD y CP normalizada con respecto a la calculada en MI para la proteína de 110 kDa (B) y 65 kDa (C). Anti-HCN4, Alomone labs.

Para confirmar estos resultados, el análisis de Western blot se repitió utilizando un anticuerpo anti-HCN4 adquirido de los laboratorios Santa Cruz Biotechnology. Basicamente, los resultados son parecidos a los obtenidos con el anticuerpo de Alomone. Se obtuvieron bandas de inmunoreactividad correspondientes a proteínas con masas de 65 kDa y 110 kDa en todas las muestras de tejido, aunque la banda de 110 kD dió un marcaje débil en las muestras de túbulo colector y cultivo primario. En cambio, la banda de 65 kDa fue más fuerte en el túbulo colector y más débil en el cultivo primario (Fig. 16A).



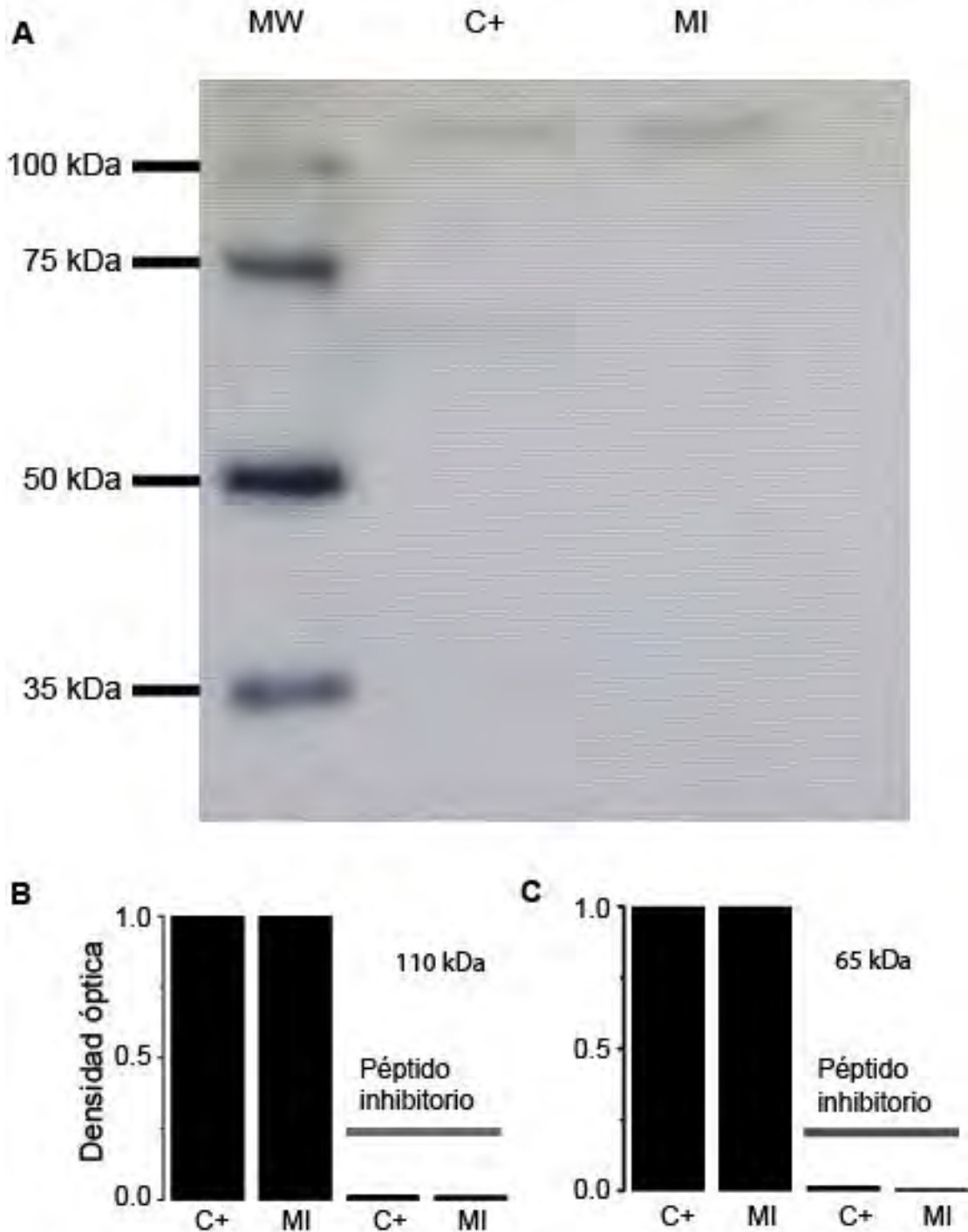
**Figura 16.** En (A), Western blot análisis de la proteína HCN4 en cerebro (C+), médula interna (MI), túbulo colector de la médula interna (IMCD) y cultivo primario de túbulo colector (CP). Densidad óptica en IMCD y CP normalizada con respecto a la calculada en MI para la proteína de 110 kDa (B) y 65 kDa (C). Anti-HCN4 Santa Cruz Biotechnology.

En general estos resultados son muy semejantes a los obtenidos con el anticuerpo anti-HCN4 de Alomone. Sin embargo, en muestras de médula interna se obtuvo una banda de 47 kDa que no fue detectada con el anticuerpo de alomone (Fig.16A).

El análisis de densidad óptica también mostró que la expresión de la proteína con masa de 65 kDa fue muy abundante en el túbulo colector ( $68 \pm 5\%$  mayor con respecto a su expresión en la médula interna,  $n=3$ ). Por su parte, en cultivo primario fue de  $36 \pm 3\%$  de la expresada en la médula interna ( $n=3$ ) (Fig.16C). Cuando se comparó con el cultivo primario, el túbulo colector presentó  $343 \pm 13\%$  más expresión de la proteína con masa de 65 kDa. En contraste, la banda correspondiente a la proteína con masa de 110 kDa fue más abundante en la médula interna. En el túbulo colector y en el cultivo primario fue de  $18 \pm 5\%$  y  $7 \pm 2\%$  respectivamente de la expresada en la médula interna (Fig.16B). Tomados juntos, estos datos sugieren que ambos anticuerpos utilizados tienen especificidad por la proteína HCN4.

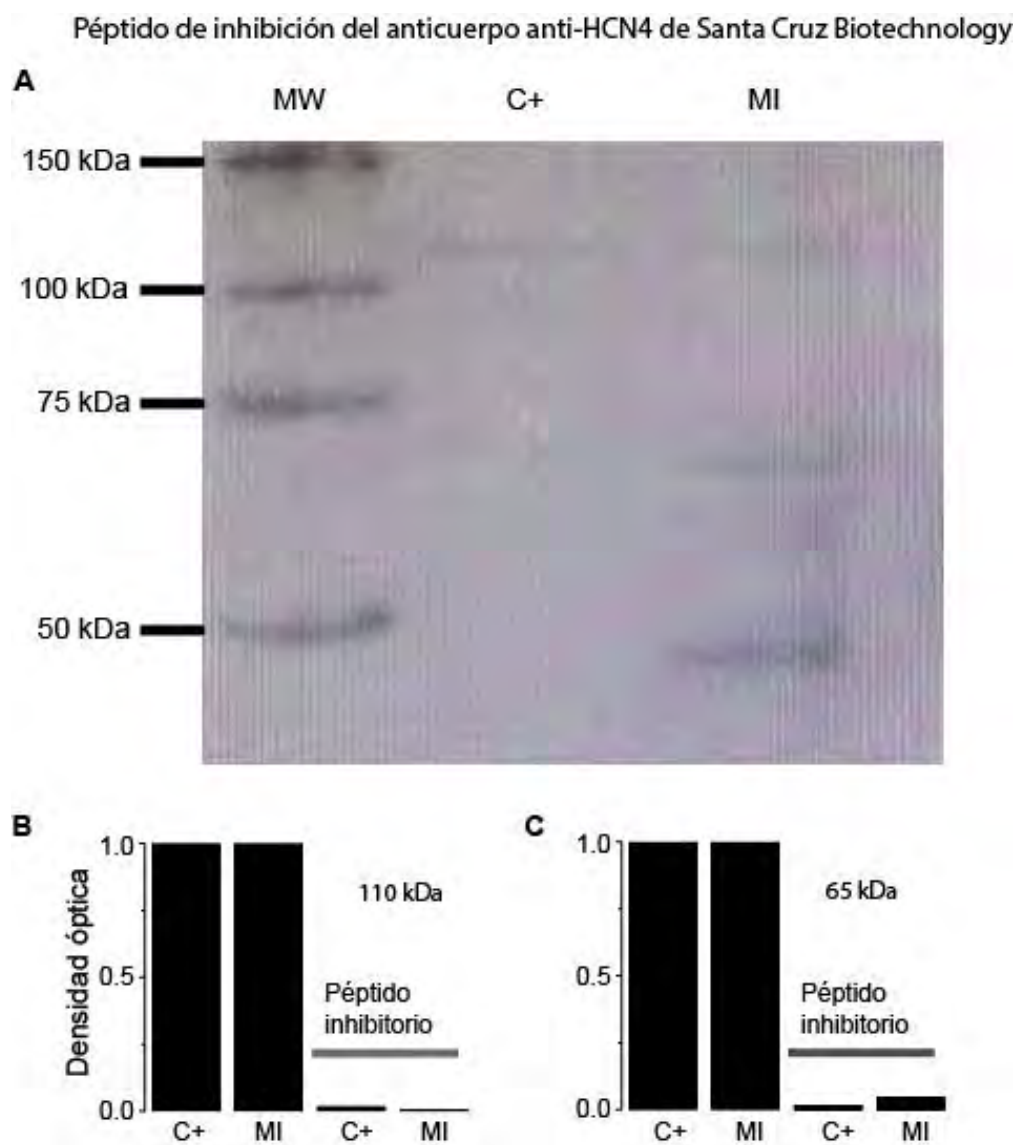
Para confirmar la especificidad de los anticuerpos por la proteína HCN4, se utilizaron péptidos de inhibición obtenidos de ambos laboratorios para bloquear el pegado del anticuerpo primario al antígeno. Estos péptidos fueron probados en muestras de cerebro y médula interna. La figura 17 A muestra los resultados para el anticuerpo anti-HCN4 y su péptido inhibitorio adquiridos de Alomone. Puede observarse que el péptido inhibitorio decrementó drásticamente la intensidad de las bandas de inmunoreactividad para las proteínas de 110 y 65 kDa en ambas muestras de tejido (Fig.17B,C).

Péptido de inhibición del anticuerpo anti-HCN4 de Alomone Labs.



**Figura 17.** En (A), Western blot análisis de la proteína HCN4 en C+ y MI con Anticuerpo primario Anti-HCN4 de Alomone Labs junto con el péptido de inhibición. En (B) y (C) densidad óptica normalizada en C+ y MI para las proteínas de 110 y 65 kDa en condiciones control y en presencia del péptido inhibitorio (barra gris).

Esto mismo ocurrió para el anticuerpo anti-HCN4 y el péptido inhibitorio adquiridos de Santa Cruz Biotechnology (Fig.18A). El análisis de densidad óptica muestra los porcentajes de decremento de la intensidad de las bandas correspondientes a las dos proteínas en cerebro y médula interna producido por los péptidos inhibitorios (Fig.18B,C).



**Figura 18.** En (A), Western blot análisis de la proteína HCN4 en C+ y MI con Anticuerpo primario Anti-HCN4 de Santa Cruz Technology junto con el péptido de inhibición. En (B) y (C) densidad óptica normalizada en C+ y MI para las proteínas de 110 y 65 kDa en condiciones control y en presencia del péptido inhibitorio (barra gris).



## 9. Discusión

La principal aportación del presente estudio fue la demostración de que la proteína del canal HCN4 se encuentra presente en las células epiteliales del túbulo colector de la médula interna. La banda detectada, mediante la técnica de Western Blot, corresponde a una proteína con una masa de 110 KDa como se esperaría para el canal HCN4 (Much, 2003). Asimismo, fue detectada otra banda de 65 KDa que probablemente corresponde a una variante modificada por procesamiento proteolítico de la proteína HCN4 (Calejo, 2014). Nuestro estudio demuestra que el gen HCN4 es capaz de expresar la proteína y además sugiere que posiblemente hay una variante transcripcional de la misma o bien que el polipéptido sufre un proceso proteolítico o una modificación post-transduccional. La proteína de 65 kDa fue muy abundante en el túbulo colector al compararla con su expresión en la médula interna. En contraste, la expresión de la proteína de 110 kDa fue mucho mayor en médula interna que en lisados de túbulo colector y en cultivo primario. Puesto que los lisados de médula interna incluyen otras regiones aparte del túbulo colector, estos resultados sugieren que el procesamiento enzimático de la proteína original de 110 kDa es diferente en cada segmento de la nefrona. Siguiendo esta línea de razonamiento, éste procesamiento proteolítico debe ser más eficiente en el túbulo colector puesto que éste exhibe una mayor expresión de la proteína

resultante de la división enzimática, esto es, la proteína de 65 kDa (Calejo, 2014). Otro resultado que aporta el presente estudio, es que la expresión de la proteína de 65 kDa fue mucho mayor en lisados de tejido nativo que en lisados de cultivos primarios del túbulo colector. Una posible explicación a esto es que probablemente, en cultivo primario haya deficiencias en la maquinaria enzimática lo cual resulte en una expresión menor de la proteína esperada. Un resultado semejante ha sido reportado al comparar la expresión de la subunidad HCN3 en lisados de tejido nativo de médula externa con cultivo primario (Lopez-Gonzalez *et al.*, 2016). Las diferencias de expresión en tejido nativo y en cultivo no se puede atribuir a la inespecificidad de los anticuerpos anti-HCN4 ya que ambos (el anticuerpo de Alomone y el de Santa Cruz Biotechnology) dieron resultados muy semejantes aunque el marcaje de las bandas de inmunoreactividad con el anticuerpo de Alomone fue mas intenso (ver figuras 15 y 16).

Por otra parte, con el anticuerpo anti-HCN4 de Santa Cruz Biotechnology se obtuvo, en lisados de médula externa, una banda de inmunoreactividad que corresponde a una proteína con masa de 47 kDa que no se observó en las otras muestras de tejido. Este resultado concuerda con datos reportados previamente en lisados de tejido renal (Calejo *et al.*, 2014) y confirma que hay un procesamiento proteolítico diferente en cada región de la nefrona. En este

punto se puede concluir que la subunidad HCN4 es expresada en el túbulo colector y que los anticuerpos probados tienen especificidad muy parecida ya que ambos detectan las principales proteínas esperadas asociadas a dicha subunidad.

En un ensayo preliminar utilizando la técnica de ELISA, mostramos la presencia de las proteínas correspondientes a los canales HCN1-4 en el túbulo colector de la médula interna. Los niveles de expresión fueron mayores para las proteínas HCN2 y HCN4 lo cual sugiere que estas proteínas constituyen los canales HCN en esta región de la nefrona. Esto es congruente con datos obtenidos mediante la técnica de PCR que previamente demostraron también la presencia transcritos correspondientes a los genes de los canales HCN1, HCN2 y HCN4 en cultivos de células del túbulo colector y en la médula interna (Bolívar *et al.*, 2008).

Nuestros resultados respaldan trabajos electrofisiológicos previos que han reportado la presencia de una corriente catiónica entrante no-selectiva activada por hiperpolarización en el túbulo colector (Bolívar *et al.*, 2008; Carrizosa *et al.*, 2011). Esta corriente fue descrita por primera vez en nuestro laboratorio y se le denominó  $I_{vti}$  (Bolívar *et al.*, 2008). La  $I_{vti}$  se activa lentamente a potenciales hiperpolarizantes de una manera dependiente del tiempo. Aunque la corriente es mediada por iones de  $Na^+$  y  $K^+$ , la permeabilidad al  $K^+$  es

mayor. Adicionalmente, la  $I_{vti}$  se ve potenciada al incrementar las concentraciones extracelulares de  $K^+$ . El potencial de activación de la  $I_{vti}$  es cercano a -40 mV sin embargo, en presencia de altas concentraciones de AMPc el potencial de activación se desplaza a valores cercanos a 0 mV. Todas estas características son semejantes a las de las corrientes h y f ( $I_h$ - $I_f$ ) que son activadas por hiperpolarización y moduladas por nucleótidos cíclicos y que han sido descritas en el cerebro y el corazón (Terreros et al., 1981; DiFrancesco et al., 1986; Vasilyev y Barish, 2002; Funahashi *et al.*, 2003). Sin embargo, también se observaron diferencias de la  $I_{vti}$  con respecto a la  $I_h$ . Por ejemplo, está bien demostrado que la  $I_h$  es bloqueada por cesio ( $Cs^+$ ) y por ZD-7288 un antagonista selectivo de los canales HCN (DiFrancesco et al., 1986; Oertel y Bal, 2000; Funahashi et al., 2003; Rateau y Ropert, 2006). La  $I_{vti}$ , por su parte, fue insensible al  $Cs^+$  y el ZD-7288 no tuvo un efecto inhibitorio significativo sobre esta corriente.

En cambio, concentraciones milimolares de cadmio ( $Cd^+$ ) provocaron un rápido bloqueo de dicha corriente (Bolívar *et al.*, 2008). Como se sabe, las proteínas HCN pueden formar canales heterómeros con una estructura tetramérica a partir de las distintas subunidades (Ulens y Tytgat, 2001; Altomare et al., 2003; Michels *et al.*, 2005). Por lo tanto, es posible que el canal responsable de la corriente  $I_{vti}$  sea un heteromultímero constituido por

las diversas subunidades  $\alpha$  de las proteínas HCN1-4 presentes en el túbulo colector. Una composición determinada, a partir de las distintas subunidades le daría al canal sus propiedades biofísicas. Esto además, permite explicar por qué la  $I_{v_{ti}}$  tiene algunas propiedades biofísicas distintas a la  $I_h$ , en las células epiteliales del túbulo colector. Esta idea se ve reforzada por los datos de los experimentos de ELISA, que revelaron distintos niveles de expresión de las diferentes proteínas del canal HCN. Asimismo, variantes transcripcionales y post-translacionales del péptido pueden explicar ciertas características específicas observadas en la  $I_{v_{ti}}$ . Por ejemplo, se sabe que la adición de residuos de cisteína al poro del canal aumenta su sensibilidad al bloqueo por  $Cd^+$  (Gauss et al., 1998; Rothberg *et al.*, 2002; Giorgetti *et al.*, 2005). Es poco probable que la  $I_{v_{ti}}$  sea una mezcla de corrientes que fluyen a través de los distintos canales HCN1-HCN4 ya que en ese caso uno esperaría variaciones en las propiedades biofísicas de la corriente, lo cual no fue observado (Bolívar et al., 2008). Por lo anterior, es razonable asumir que la  $I_{v_{ti}}$  es una corriente semejante a la  $I_h$  sensible a  $Cd^+$  e insensible a  $Cs^+$  y que fluye a través de un canal constituido por las cuatro distintas proteínas HCN. Nuestros resultados permiten asumir que la subunidad HCN4 forma parte de este canal.

## 10. Implicaciones Fisiológicas

Experimentos de inmunocitoquímica utilizando doble marcaje han demostrado que las proteínas de los canales HCN co-localizan con la bomba  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$  en las células epiteliales del túbulo colector (Bolívar *et al.*, 2008; Carrizosa *et al.*, 2011) lo cual se interpreta como evidencia de que dichos canales están localizados en la membrana basolateral (Pu *et al.*, 2001; Wetzel y Sweadner, 2001). Se ha propuesto que la corriente catiónica entrante a través de los canales HCN podrían participar en el mantenimiento del equilibrio osmótico entre el intersticio y las células epiteliales del túbulo colector (Bolívar *et al.*, 2008). Durante la fase temprana de la antidiuresis aguda las células del IMCD están expuestas a una hipertonicidad que se desarrolla lentamente en el intersticio. En estas condiciones, la vasopresina y su segundo mensajero, el AMPc influyen las propiedades de transporte de la membrana de las células epiteliales (Hai y Thomas, 1969; Star *et al.*, 1988; Beck *et al.*, 1992; Sone *et al.*, 1993). Se sabe que en este punto crítico, el influjo de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  permite un rápido equilibrio osmótico célula-intersticio con un cambio de volumen muy pequeño y transitorio (Sun y Hebert, 1989; Beck *et al.*, 1992; Sone *et al.*, 1993; Grunewald *et al.*, 1994).

Una hipótesis que se ha formulado es que el influjo de  $\text{Na}^+$  puede ocurrir en parte mediante la corriente  $I_{\text{vti}}$  a través de los canales HCN que serían estimulados por el incremento de AMPc (Bolívar *et al.*, 2008). Cabe señalar que aunque los canales HCN exhiben mayor conductancia para el  $\text{K}^+$  que para el  $\text{Na}^+$ , bajo condiciones fisiológicas la corriente predominante es mediada por  $\text{Na}^+$  debido a que el gradiente electroquímico favorece la entrada de este ión.

Otra propuesta del papel funcional de los canales HCN es que la entrada de  $\text{Na}^+$  a través de estos canales es acompañada de aniones ( $\text{HCO}_3^-$ ) en la membrana basolateral, como previamente se ha descrito (Stanton, 1989; Imai y Yoshitomi, 1990). El incremento de  $\text{Na}^+$  y  $\text{HCO}_3^-$  en el interior celular estimula la actividad de los intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  en la membrana basolateral decrementando la alcalinización. La entrada de  $\text{Na}^+$  puede, a su vez activar la bomba  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$  incrementando el  $\text{K}^+$  intracelular como se ha descrito anteriormente (Beck *et al.*, 1992; Grunewald *et al.*, 1994). En congruencia con esta hipótesis, previamente se ha reportado que existe un influjo de  $\text{HCO}_3^-$  dependiente de  $\text{Na}^+$  en la membrana basolateral de las células del túbulo colector de la médula interna (Hart y Nord, 1991; Praetorius *et al.*, 2004). De manera que mediante este mecanismo los canales HCN estarían contribuyendo al mecanismo de equilibrio ácido-básico.

Alternativamente, es posible proponer que los canales HCN podrían participar regulando el mecanismo de homeostasis ácido-base mediante el transporte de  $\text{NH}_4^+$  a través de la membrana basolateral, para su posterior excreción en la orina, como se ha descrito en las células intercaladas (Carrizosa *et al.*, 2011).

Esta idea se apoya en datos experimentales que mostraron que el influjo de  $\text{NH}_4^+$  a través de canales HCN2 expresados de manera heteróloga en ovocitos de rana (*Xenopus laevis*) (Carrizosa *et al.*, 2011).



## 11. Conclusiones

Dos variantes de la proteína del canal HCN4 son expresadas en las células epiteliales del túbulo colector de la médula interna, con un peso de 110kDa y 65 kDa

Se propone que los canales HCN en el túbulo colector podrían ser tetrámeros conformados por una combinación de las subunidades  $\alpha$  de las proteínas HCN1, HCN2, HCN3 y HCN4.

La corriente  $I_{vti}$ , activada por hiperpolarización y modulada por nucleótidos cíclicos es una corriente semejante a la  $I_h$  y es mediada por los canales HCN en el túbulo.

## 12. Referencias

Alberts, B., Bray., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. (2005) Estructura de la membrana. En E. Leffcock. *Biología molecular de la célula*. (617-30) Barcelona: Omega.

Alexanderson, R.E., Gamba, A.G. (2014). Función de los túbulos renales. En J. M. Saavedra. *Fisiología cardiovascular, renal y respiratoria*. (173-80) Colombia: Manual moderno.

Altomare C, Terragni B, Brioschi C, Milanesi R, Pagliuca C, Viscomi C, Moroni A, Baruscotti M y DiFrancesco D. Heteromeric HCN1-HCN4 channels: a comparison with native pacemaker channels from the rabbit sinoatrial node. *J. Physiol.* 549, 347–59 (2003).

Bal R y Oertel D. Hyperpolarization-activated, mixed-cation current (I<sub>h</sub>) in octopus cells of the mammalian cochlear nucleus. *J. Neurophysiol.* 84, 806–17 (2000).

Beck X, Schmolke M, Guder G, Dörge A, Thureau K. Osmolytes in renal medulla during rapid changes in papillary tonicity. *Am. J. Physiol.* 262, F849–56 (1992).

Best y Taylor (2003) Filtrado glomerular y Función tubular. En M. A. Dvorkin. D.P. Carninali, *Bases Fisiológicas de la práctica humana*. (433-64). Buenos Aires: Médica Panamericana.

Berg, M.J., Tymoczko. L. J., Stryer, L.(2008) W. H. Freeman., Company, New York y Basingstoke. Lípidos y membranas celulares. (326-351) Bioquímica. Barcelona: Reverte.

Biel M, Wahl-Schott C, Michalakis S y Zong X. Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiol. Rev.* 89, 847–85 (2009).

Bolívar J, Tapia D, Arenas G, Castañón M, Torres H y Galarraga E. A hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated, (I<sub>h</sub>-like) cationic current and HCN gene expression in renal inner medullary collecting duct cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 294, C893–906 (2008).

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72(1-2):248-254.

Calejo A, Reverendo M Silva V. Pereira P, Santos M, Zorec R y Gonçalves P Differences in the expression pattern of HCN isoforms among mammalian tissues: sources and implications. *Mol. Biol. Rep.* 41, 297–307 (2014).

Carrisoza R. Rangel C, Salvador C, Saldaña-Meyer R, Escalona C, Satlin LM, Liu W, Zamilowitz B, Trujillo J, Bobadilla NA, Escobar LI. The hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated HCN2 channel transports ammonium in the distal nephron. *Kidney Int.* 80, 832–40 (2011).

Chung, S-H. Andersen, O.S. Krishnamurthy, V. (2007) Biological Membranes Ion Channels. Recuperado de <http://link.springer.com/book/10.1007%2F0-387-68919-2>

Craven B, y Zagotta N. Salt bridges and gating in the COOH-terminal region of HCN2 and CNGA1 channels. *J. Gen. Physiol.* 124, 663–77 (2004).

DiFrancesco, D., Ferroni, A., Mazzanti, M. & Tromba, C. Properties of the hyperpolarizing-activated current (if) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node. *J. Physiol.* 377, 61–88 (1986).

DiFrancesco, D. The contribution of the ‘pacemaker’ current (if) to generation of spontaneous activity in rabbit sino-atrial node myocytes. *J. Physiol.* 434, 23–40 (1991).

El-Kholy W, MacDonald P, Fox J, Bhattacharjee A, Xue T, Gao X, Zhang Y, Stieber J, Li R, Tsushima R, y Wheeler M. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels in pancreatic beta-cells. *Mol. Endocrinol.* 21, 753–64 (2007)

Escobar I, Martínez-Tellez C, Salas M, Castilla A, Carrisoza R, Tapia D, Vázquez M, Vargas J, Bolívar JJ. A voltage-gated K<sub>v</sub> current in renal inner medullary collecting duct cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C965–C974, 2004.

Fenton A, y Knepper A. Mouse models and the urinary concentrating mechanism in the new millennium. *Physiol. Rev.* 87, 1083–112 (2007)

Fermini, B y Priest, B.T.( 2008) Ion Channels. Recuperado de <http://link.springer.com/book/10.1007%2F978-3-540-79729-6>

Funahashi M, Mitoh Y, Kohjitani A, y Matsuo R. Role of the hyperpolarization-activated cation current (I<sub>h</sub>) in pacemaker activity in area postrema neurons of rat brain slices. *J. Physiol.* 552, 135–48 (2003).

Hart D y Nord P. Polarized distribution of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport and Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransport in primary cultures of renal inner medullary collecting duct cells. *J. Biol. Chem.* 266, 2374–82 (1991).

GANONG (2010) Función renal y micción, Regulación de la composición y el volumen del líquido extracelular. En E.K., Barret, M.S. Barman., S. Boitano, L.H. Brooks, (639-65) *Fisiología médica*. México: McGaw Hill

Gauss R, Seifert R, y Kaupp B. Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature* 393, 583–587 (1998).

Giorgetti A, Carloni P, Mistrik P y Torre A. Homology Model of the Pore Region of HCN Channels. *Biophys. J.* 89, 932–944 (2005).

Grunewald M, Grunewald W y Kinne K. Regulation of ion content and cell volume in isolated rat renal IMCD cells under hypertonic conditions. *Am. J. Physiol.* 267, F13–9 (1994).

Guth D. y Dietze T. I(f) current mediates beta-adrenergic enhancement of heart rate but not contractility in vivo. *Basic Res. Cardiol.* 90, 192–202.

Hai A, y Thomas S. The time-course of changes in renal tissue composition during lysine vasopressin infusion in the rat. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 310, 297–319 (1969).

Imai M. y Yoshitomi K. Electrophysiological study of inner medullary collecting duct of hamsters. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 416, 180–188 (1990).

Karp, G. C. (2001) Sistema de membrana citoplasmática: estructura, función y tránsito de la membrana. En J. L. Fraga. *Biología Celular y Molecular conceptos y experimentos*. (264-80) México: Mc Graw Hill.

Kelley. N.W., (1993) Principios de la regulación renal de líquidos y electrolitos. D.H. Humes. *Medicina interna kelley*. (743-50) Buenos Aires: Médica Panamericana.

Lau T, Wong K, Luo J, Leung H, Tsang F, Bian X, Tsang Y. Effects of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channel blockers on the proliferation and cell cycle progression of embryonic stem cells. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 461, 191–202 (2011).

Lehninger, A. L., Cox M.M.(2006) Biological membranes and transport. W. H. Freeman., Company, New York y Basingstoke. *Lehninger Principles of Biochemistry* (369-90) Barcelona: Omega.

Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, A.C., Krieger, M., Scott, P.M., Lawrence, Z., M., Darnell, J.(2005). Biomembranas y arquitectura celular. En O. Giovannello., A. Méndez., S. Rondinone. *Biología Celular y Molecular*. (147-56) Buenos Aires: Médica Panamericana.

López-González Z, Aguilera C, Morales F, Cruz O, Hernández C, Chaverri J, Medeiros M, Hernández A, Escobar L. Immunolocalization of hyperpolarization-activated cationic HCN1 and HCN3 channels in the rat nephron: regulation of HCN3 by potassium diets. *Histochem. Cell Biol.* 145, 25–40 (2016).

Luthi A, y McCormick A. H-Current: Minireview Properties of a Neuronal and Network Pacemaker. *Neuron* 21, 9–12 (1998).

Mangoni E, y Nargeot J. Properties of the hyperpolarization-activated current (I<sub>f</sub>) in isolated mouse sino-atrial cells. *Cardiovasc. Res.* 52, 51–64 (2001).

Michels G, Er F, Khan I, Südkamp M, Herzig S, Hoppe C . Single-channel properties support a potential contribution of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels and If to cardiac arrhythmias. *Circulation* 111, 399–404 (2005).

Millipore, 6<sup>a</sup> ed. Protein Blotting Handbook, tips and trucks. Recuperado [http://iris.fishersci.ca/LitRepo.nsf/0/029DE90E3A5A41E985257AA1005B29E5/\\$file/23067759.pdf](http://iris.fishersci.ca/LitRepo.nsf/0/029DE90E3A5A41E985257AA1005B29E5/$file/23067759.pdf) (25-6)

Moosmang S, Moosmang S, Stieber J, Zong X, Biel M, Hofmann F, Ludwig A. Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *Eur. J. Biochem.* 268, 1646–1652 (2001).

Moosmang S, Biel M, Hofmann F y Ludwig A. Differential Distribution of Four Hyperpolarization-Activated Cation Channels in Mouse Brain. *Biol. Chem.* 380, 975-80 (1999).

Much B, Wahl-Schott C, Zong X, Schneider A, Baumann L, Moosmang S, Ludwig A, Biel M . Role of subunit heteromerization and N-linked glycosylation in the formation of functional hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *J. Biol. Chem.* 278, 43781–6 (2003).

Nicolson L. The Fluid—Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40years. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1838, 1451–1466 (2014).

Olesen, E. T. B., Kortenoeven, M. L. A. & Fenton, R. A. in *Sodium Water Homeost.* 43–72 (Springer New York, 2015). doi:10.1007/978-1-4939-3213-9\_3

Ono K, Shibata S. y Iijima T. Pacemaker mechanism of porcine sino-atrial node cells. *J. Smooth Muscle Res.* 39, 195–204 (2003).

Howell-Fulton (1989) En J. Dyson., *The Kidney and Body Fluids. Textbook of Physiology Circulation, Respiration, Body Fluids, Metabolism, and Endocrinology.* (345-56) United state of America: W.B Saunders Company.

Praetorius J, Kim H, Bouzinova V, Frische S, Rojek A, Aalkjaer C, Nielsen S. NBCn1 is a basolateral Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter in rat kidney inner medullary collecting ducts. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 286, F903–12 (2004).

Pu X, Cluzeaud F, Goldshleger R, Karlsh S, Farman N and Blostein R. Functional Role and Immunocytochemical Localization of the  $\gamma_a$  and  $\gamma_b$  Forms of the Na,K-ATPase  $\gamma$  Subunit. *J. Biol. Chem.* 276, 20370–20378 (2001).

Rateau Y. y Ropert N. Expression of a functional hyperpolarization-activated current (I<sub>h</sub>) in the mouse nucleus reticularis thalami. *J. Neurophysiol.* 95, 3073–85 (2006).

Rhoades R.A., Bell, R.D.(2012) Fisiología renal y líquidos corporales. *Fisiología Médica*. España: Lippincott Williams & Wilkins.

Rosato, E. (2007) Circadian Rhythms, Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology*. Recuperado de <http://link.springer.com/book/10.1007%2F978-1-59745-257-1>

Rothberg S, Shin S, Phale S y Yellen G. Voltage-controlled gating at the intracellular entrance to a hyperpolarization-activated cation channel. *J. Gen. Physiol.* 119, 83–91 (2002).

Santoro B, y Tibbs R. The HCN gene family: molecular basis of the hyperpolarization-activated pacemaker channels. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 868, 741–64 (1999).

Shin S, Maertens C, Proenza C, Rothberg S. y Yellen G. Inactivation in HCN channels results from reclosure of the activation gate: desensitization to voltage. *Neuron* 41, 737–44 (2004).

Silverthorn, U.D., Johnson, R.B., Ober, C.W., Garrison, W. C., Silverthorn, C.A.,(2014) F. Campana., A. Fernández., M de A. Gutiérrez., E. Más. Los riñones. (626-50) *Fisiología humana un enfoque integrado*. Buenos Aires. Médica Panamericana.

- Sone M, Albrecht J, Dörge A, Thureau K y Beck X. Osmotic adaptation of renal medullary cells during transition from chronic diuresis to antidiuresis. *Am. J. Physiol.* 264, F722–9 (1993).
- Stanton A. Characterization of apical and basolateral membrane conductances of rat inner medullary collecting duct. *Am. J. Physiol.* 256, F862–8 (1989).
- Star A, Nonoguchi H, Balaban R. y Knepper A. Calcium and cyclic adenosine monophosphate as second messengers for vasopressin in the rat inner medullary collecting duct. *J. Clin. Invest.* 81, 1879–88 (1988).
- Stein B, Gossen R y Jones E. Neuronal variability: noise or part of the signal? *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 389–397 (2005).
- Sun A, y Hebert C. Rapid hypertonic cell volume regulation in the perfused inner medullary collecting duct. *Kidney Int.* 36, 831–42 (1989).
- Terreros A, Tarr M y Grantham, J. Transmembrane electrical potential differences in cells of isolated renal tubules. *Am. J. Physiol.* 241, F61–8 (1981).
- Ulens C, Tytgat J. Functional heteromerization of HCN1 and HCN2 pacemaker channels. *J Biol Chem* 276: 6069–6072, 2001.
- Uawithya P, Pisitkun T, Ruttenberg E y Knepper A. Transcriptional profiling of native inner medullary collecting duct cells from rat kidney. *Physiol. Genomics* 32, 229–53 (2008).
- Vasilyev V y Barish E. Postnatal development of the hyperpolarization-activated excitatory current  $I_h$  in mouse hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 22, 8992–9004 (2002).
- Varghese A, Tenbroek M, Coles J, Sigg C. Endogenous channels in HEK cells and potential roles in HCN ionic current measurements. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 90, 26–37
- Wahl-Schott C. Y Biel M. HCN channels: Structure, cellular regulation and physiological function. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 470–494 (2009).



Wang J, Chen S y Siegelbaum A. Regulation of hyperpolarization-activated HCN channel gating and cAMP modulation due to interactions of COOH terminus and core transmembrane regions. *J. Gen. Physiol.* 118, 237–50 (2001).

Wetzel K y Sweadner J. Immunocytochemical localization of Na-K-ATPase alpha- and gamma-subunits in rat kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 281, F531–45 (2001).

Windhager, E.E., (1992) Principles of Electrolyte Transport across Plasma Membranes of Renal Tubular Cells *Handbook of physiology section 8 Renal Physiology Volumen 1.* (639-58) United state of America: Oxford University Press.

Yeh J, Kim B, Gaines L, Peresie J, Page C y Arroyo A. The expression of hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated (HCN) channels in the rat ovary are dependent on the type of cell and the reproductive age of the animal: a laboratory investigation. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 6, 35 (2008).

Yu H, Yarov-Yarovoy V, Gutman A y Catterall A. Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacol. Rev.* 57, 387–95 (2005).

Zagotta N, Olivier B, Black D, Young C, Olson R, Gouaux E . Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. *Nature* 425, 200–5 (2003).

Zha Q, Brewster L, Richichi C, Bender A, y Baram Z. Activity-dependent heteromerization of the hyperpolarization-activated, cyclic-nucleotide gated (HCN) channels: role of N-linked glycosylation. *J. Neurochem.* 105, 68–77 (2008).

Zhang Y, Zhang N, Gyulkhandanyan V, Xu E, Gaisano Y, Wheeler B, Wang Q. Presence of functional hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-gated channels in clonal alpha cell lines and rat islet alpha cells. *Diabetologia* 51, 2290–2298 (2008).

Zhou L, Olivier B, Yao H, Young C. y Siegelbaum A. A conserved tripeptide in CNG and HCN channels regulates ligand gating by controlling C-terminal oligomerization. *Neuron* 44, 823–34 (2004).

## **Soluciones:**

### **Solución de monómeros de acrilamida:**

29,2 g acrilamida; 0,8 g bis-acrilamida; disolver en agua desionizada y aforar a 100 ml.

Filtrar y guardar en botella ámbar de vidrio, en refrigeración (<1 mes)

### **Amortiguador del gel separador (inferior):**

18,15 g Tris; disolver en ~60 ml de agua, ajustar a pH 8,8 con HCl, aforar a 100 ml.

Guardar en refrigeración.

### **Amortiguador del gel compactador (superior):**

3,0 g Tris; disolver en ~60 ml de agua, ajustar a pH 6,8 con HCl, aforar a 100 ml.

Guardar en refrigeración.

### **Amortiguador de la cámara (solución concentrada 10x):**

12 g Tris; 57,6 g glicina; 4 g SDS; disolver en ~300 ml de agua. El pH debe quedar entre 8,3-8,4 si las pesadas son correctas (debe evitarse el ajuste del pH para no alterar la fuerza iónica de esta solución). Aforar a 400 ml. Guardar a temperatura ambiente. Diluir 10 veces al momento de utilizar.

### **Persulfato de amonio:**

Preparar al momento una solución al 10%. Este reactivo es muy higroscópico (sellar bien el frasco y mantener en desecador). Una alternativa es preparar alícuotas (ej. 200 ul) en viales pequeños y congelarlas.

### **Solución de SDS:**

1,0 g duodecilsulfato de sodio; disolver en 10 ml de agua. Guardar en botella de vidrio a temperatura ambiente.

### **Amortiguador de muestras no reductor (solución concentrada 2x):**

10,0 ml amortiguador del gel superior; 16,0 ml solución de SDS; 50 mg azul de bromofenol; 12,0 ml glicerol; 4,0 ml agua; mantener a temperatura ambiente (<2 meses)

### **Amortiguador de muestras reductor (solución concentrada 2x):**

El mercaptoetanol es inestable en esta solución, por lo que se prepara una pequeña cantidad del reactivo para una semana. Agregar 0,2 ml de 2-mercaptoetanol a 4,2 ml del amortiguador no reductor. Guardar a temperatura ambiente. Las concentraciones finales de los agentes son 4% SDS y 5% 2-Me. El 2-Me es tóxico y de olor desagradable (usar en campana de extracción).

**Fijador:**

500 ml metanol; 70 ml ácido acético glacial; 430 ml agua; Guardar a temperatura ambiente en recipiente hermético. Importante: Evitar el contacto y la inhalación de vapores de metanol.

**Colorante Coomassie Blue R-250:**

0,25 g Coomassie blue R-250; 225 ml metanol; 46 ml ácido acético; 230 ml agua; disolver el colorante en el metanol, luego agregar el ácido, y finalmente el agua. Mezclar durante 15 min, filtrar y guardar a temperatura ambiente. Aunque el colorante puede ser reusado varias veces para ciertos fines, la sensibilidad declina (usualmente es del orden de 0,5 mg de proteína), por lo que se prefiere usar una pequeña cantidad y descartarla cada vez. Otro tipo de Coomassie, el G-250, puede ser utilizado como colorante para geles, aunque su sensibilidad es menor.

**Decolorador:**

200 ml metanol; 100 ml etanol; 50 ml ácido acético; 650 ml agua; guardar a temperatura ambiente