



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**IDENTIFICACIÓN DE UNA PROTEÍNA DEL CANAL ANIÓNICO CIC-K EN CÉLULAS
DEL CONDUCTO COLECTOR DE LA MÉDULA INTERNA RENAL**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MÉNDEZ PÉREZ JUANA PATRICIA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JUAN JOSÉ BOLÍVAR GONZÁLEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. MARIA ELVIRA GALARRAGA PALACIO
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM
DRA. MARÍA DE LA LUZ NAVARRO ANGULO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., DICIEMBRE, 2017



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.


Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 14 de agosto de 2017, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **MÉNDEZ PÉREZ JUANA PATRICIA** con número de cuenta **300165614** con la tesis titulada **"IDENTIFICACIÓN DE UNA PROTEÍNA DEL CANAL ANIÓNICO CLC-K EN CÉLULAS DEL CONDUCTO COLECTOR DE LA MÉDULA INTERNA RENAL"**, realizada bajo la dirección del **DR. JUAN JOSÉ BOLIVAR GONZÁLEZ**:

Presidente: DR. JOSÉ BARGAS DÍAZ
Vocal: DRA. ELSA GUADALUPE ESCAMILLA CHIMAL
Secretario: DRA. MARÍA ELVIRA GALARRAGA PALACIO
Suplente: DRA. NORMA ARACELI BOBADILLA SANDOVAL
Suplente: DRA. MARÍA DE LA LUZ NAVARRO ANGULO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 09 de noviembre de 2017


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en Ciencias Biológicas (UNAM), por todo el apoyo recibido durante mi formación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca de maestría otorgada.

A mi Comité Tutorial, Dra. María Elvira Galarraga Palacio y Dra. María de la Luz Navarro Angulo por sus comentarios, sugerencias y asesorías durante el posgrado.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres María Esther Pérez Ramírez y Alberto Méndez Ramírez por todo su apoyo, amor, confianza, paciencia, enseñanza y su comprensión ya que la persona que soy es gracias a ustedes les agradezco por siempre impulsarme y apoyarme en mis decisiones. Los amo muchísimo

A mi esposo Javier Lara de Paz por siempre estar conmigo, apoyarme, amarme y por darme el más preciado tesoro de la vida que son nuestros hijos. Te amo mucho mucho Javicito.

A mis hijos Patricia Lara Méndez y al bebé que viene en camino por que deben saber que este trabajo es por ustedes y para ustedes, siempre luchen por lo que quieren.

A mis hermanos Alberto Méndez Pérez y Adrian Méndez Pérez que me han enseñado mucho de la vida. Los quiero mucho.

Y en especial a mi asesor Dr. Juan José Bolívar González por su asesoría, enseñanza, apoyo, amistad, confianza y todo lo que esta gran persona agregó a mi vida. Siempre lo recordaré como el mejor asesor que pude haber tenido ya que este trabajo se realizó gracias a su genialidad y empeño. Lo quiero y lo extraño mucho.

A la Facultad de Medicina (UNAM), por el uso de infraestructura y por el apoyo.

A la Dra. María Elvira Galarraga Palacio por todo el apoyo, consejos y cariño que me ha brindado para terminar este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de la Ciudad de México (UACM), por el uso de infraestructura y en especial al Dr. Mauricio Castañón Arreola por todo el apoyo técnico y asesoría que me brindó durante esta investigación.

A mi amiga Gabina Arenas por todo su apoyo y regaños que me hicieron aprender y madurar en esta etapa de mi vida.

Al Técnico Académico Dagoberto Tapia Ramírez por sus excelentes imágenes de fluorescencia.

A Rocío Chávez Trejo por todo el apoyo para realizar los trámites.

A mis amigos y compañeros Catalina Juárez, César Oliver Lara, Florencio Monroy, Raymundo, Bismarck, Jonathan, Fermín y Eduardo por su grandiosa amistad.

INDICE

I.	ABREVIATURAS	I
I.	RESUMEN	1
II.	ABSTRACT	2
III.	INTRODUCCIÓN	3
	Concentración Urinaria.....	4
	Concentración urinaria en médula interna	5
	Canales CIC-K en la médula interna.....	6
IV.	HIPOTESIS	8
V.	OBJETIVOS.....	9
VI.	ANTECEDENTES.....	10
VII.	METODOLOGÍA.....	13
	ELECTROFISIOLOGÍA- PATCH CLAMP	13
	INMUNOHISTOQUÍMICA.....	16
	BIOLOGIA MOLECULAR	17
VIII.	RESULTADOS	22
	RESULTADOS ELECTROFISIOLOGÍA	22
	RESULTADOS INMUNOHISTOQUIMICA.....	24
	RESULTADOS WESTERN BLOT	25
	RESULTADOS SECUENCIACION	26
	RESULTADOS SECUENCIACIÓN BANDA 1	28
	RESULTADOS SECUENCIACIÓN BANDA 2	30
	RESULTADOS DEL ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS	31
IX.	DISCUSIÓN.....	34
X.	CONCLUSIÓN	39
XI.	LITERATURA CITADA	40

I. ABREVIATURAS

ADH: Hormona antidiurética

Br⁻ : Bromuro

CaC: Canal dependiente de Ca²⁺ intracelular

CC: Conducto colector

CCD: Túbulo contorneado distal

CFTR: Canal de la fibrosis cística

Cl⁻: Cloruro

CIC-K1: Canal de cloruro específico del riñón de tipo 1

CIC-K2: Canal de cloruro específico del riñón de tipo 2

CP: Cultivo primario

CR: Corteza renal

DIDS: Sal disódica del ácido 4,4'-diisotiocianatostilbeno-2,2-disulfónico

HCN: Canal catiónico activado por hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos

HCO₃⁻: Bicarbonato

I⁻: Ioduro

IMCD: Conducto colector de la médula interna

EM: Médula externa renal

IM: Médula interna renal

NaCl: Cloruro de sodio

NO₃⁻: Nitrato

PCT: Túbulo contorneado proximal

tAHL: Porción ascendente delgada del asa de Henle

TAHL: Porción ascendente gruesa del asa de Henle

tDHL: Porción descendente delgada del asa de Henle

I. RESUMEN

En mamíferos, el riñón controla finamente el balance corporal de agua. Mientras que la dilución urinaria ocurre mediante un mecanismo bien entendido, el que media la concentración urinaria conserva aún varias interrogantes, en particular el de la médula interna. Cuando el riñón pasa agudamente de una fase de diuresis a una de antidiuresis, la osmolaridad del líquido intersticial de la médula interna aumenta gracias al transporte de NaCl desde la porción ascendente delgada del asa de Henle (tAHL). Para que este aumento en la osmolaridad intersticial pueda impulsar la reabsorción de agua en el conducto colector de la médula interna (IMCD), la osmolaridad en las células del IMCD tiene que aumentar. Sugerimos que esto ocurre gracias al transporte de NaCl del intersticio al conducto colector, mediado por canales iónicos localizados en la membrana basolateral de las células de cultivo primario de IMCD. Los canales involucrados serían canales HCN para el Na⁺ y CIC-K para el Cl⁻, el objetivo del presente trabajo fue identificar a la proteína del canal aniónico CIC-Kx que se expresa en la membrana basolateral de las células del conducto colector de médula interna renal de rata no descrito previamente. Se identificaron dos proteínas por Western blot con un peso alrededor de los 75KDa en IMCD que fueron secuenciadas. Se logró obtener el 34% de la secuencia de péptidos con identidad del 100% con CIC-K1 y un 5% con CIC-K2. Se concluye la existencia de un canal CIC-K (CIC-Kx) ubicado en la membrana basolateral de las células de IMCD, que muestra una conductividad similar a Cl⁻ y a HCO₃⁻ y que podría participar en el mecanismo de concentración urinaria.

II. ABSTRACT

In mammals, the kidney controls finely the body waters balance. As urinary dilution occurs by means a well understood mechanism, the one that mediates urinary concentration still keeps many questions, specially the inner medulla one. When the kidney goes sharply from a diuresis stage to an anti-diuresis phase, inner medulla interstitial fluid osmolality increases by means of NaCl transportation from the thin ascending portion of the Henle loop (tAHL). For this interstitial osmolality increase to be able to boost water reabsorption in the inner medulla collector duct (IMCD), the osmolality in the IMCD cells has to raise. It is suggested that this happens due to NaCl transportation from interstice to cells, mediated by ionic channels located in the IMCD cells basolateral membrane. Those involved channels shall be HCN channels for Na^+ and ClC-K channels for Cl^- , the objective of the present work was to identify the anionic (ClC-Kx) channel protein expressed in the basolateral membrane from the inner rats renal medulla collector duct cells not previously described. In IMCD, two proteins having a weight around 75KDa were identified by Western blot and sequenced as well. It was able to obtain 34% of peptides sequence with an 100% identity with ClC-K1 and a 5% with ClC-K2. It is concluded the existence of a ClC-K (ClC-Kx) channel located in the IMCD cells basolateral membrane, showing a similar conductivity to Cl^- and to HCO_3^- as well, being able to participate in the urinary concentration mechanism.

III. INTRODUCCIÓN

El riñón es un órgano que interviene en la regulación de numerosas funciones vitales. Al hacer un corte transversal podemos dividirlo en dos regiones principales, la corteza (CR) renal (capa exterior), y la médula renal (capa interna) que se divide en médula externa (ME) y médula interna (IM). Cada uno de los riñones contiene cerca de 1 millón de diminutas unidades funcionales llamadas nefronas. El extremo receptor de la nefrona es una protuberancia denominada cápsula de Bowman. En el otro extremo de la nefrona se encuentra el conducto colector (CC) el cual transporta la orina hacia la pelvis renal.

La cápsula de Bowman envuelve una bola de capilares llamado glomérulo. El glomérulo y la cápsula de Bowman forman la unidad de filtración de la sangre de la nefrona. El resto de la nefrona refina el filtrado. Existen tres secciones en el túbulo: el túbulo contorneado proximal (PCT) en la corteza; el asa de Henle formada por una porción delgada y una gruesa (la porción delgada descendente (tDHL) y la porción delgada ascendente (tAHL) en IM y la porción gruesa ascendente (TAHL) en ME) y el túbulo contorneado distal (CCD). El CCD vacía su filtrado en un conducto colector (IMCD) que se encuentra en IM el cual recibe el filtrado de varias nefronas y se transforma en la orina que posteriormente pasa a la pelvis renal y después al uréter (Uchida y Sasaki, 2005) (Figura 1)

La función de la médula interna es esencial para la concentración urinaria (mecanismo por el que se produce una orina hiperosmótica) durante el estado de antidiuresis. Persisten varios tópicos aun no aclarados sobre el mecanismo de concentración urinaria en la médula interna.

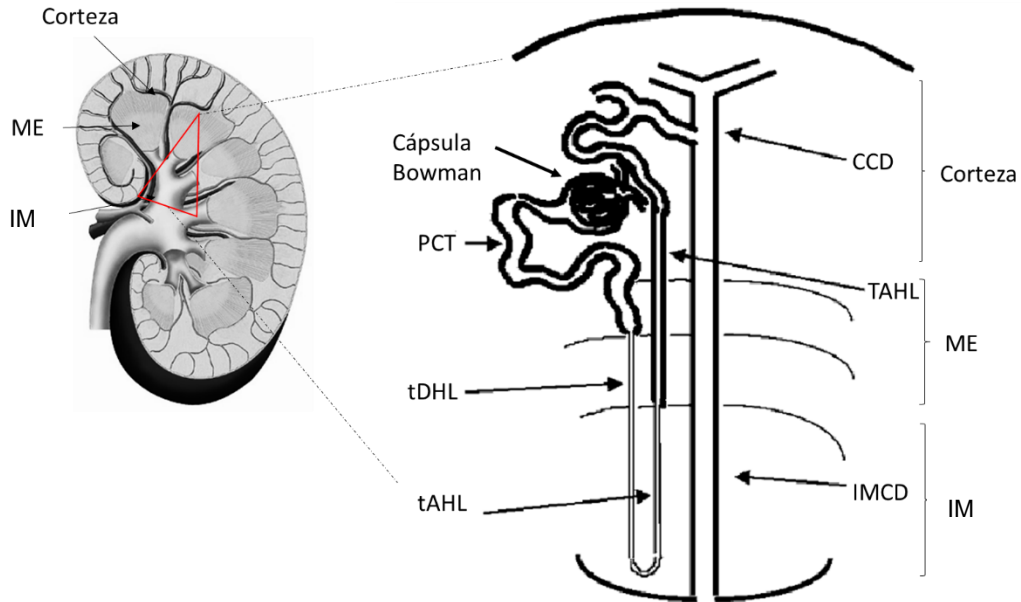


Figura 1. Estructura general del riñón: EM (Médula externa); IM (Médula interna); PCT (túbulo contorneado proximal); tDHL (porción descendente del asa de Henle); tAHL (porción ascendente delgada del asa de Henle); CCD (Conducto colector distal); TAHL (porción gruesa ascendente del asa de Henle) y IMCD (Conducto colector de la médula interna) (Imagen modificada Uchida y Sasaki, 2005).

Concentración Urinaria

La concentración urinaria es un mecanismo que permite adaptar la osmolaridad de la orina y, por lo tanto, la eliminación de agua a las necesidades del organismo, manteniendo constante el balance acuoso. En mamíferos, el riñón controla finamente el balance corporal de agua, cambiando su excreción urinaria dentro de un amplio rango en respuesta a la hormona antidiurética (ADH; Gamba y Knepper, 2004; Jamison y Gehring, 1992). Este ajuste fino de la excreción de agua se logra sin afectar la excreción urinaria de solutos, gracias a que el riñón puede, tanto diluir los solutos urinarios hasta una osmolaridad menor a la plasmática y producir una diuresis acuosa (cantidad mínima de ADH circulante), hasta concentrar los solutos urinarios a una osmolaridad mucho mayor que la del plasma y producir una antidiuresis (cantidad máxima de ADH circulante). Mientras que la dilución urinaria ocurre mediante un mecanismo bien entendido, el que media la concentración

urinaria conserva aún varias interrogantes, en particular el de la médula interna (Fenton et. al., 2004).

Durante la antidiuresis, la concentración urinaria se realiza mediante un aumento en la reabsorción osmótica de agua en los conductos colectores. La hormona antidiurética induce la inserción de la aquaporina 2 abundantemente en todos los segmentos del túbulo renal más allá de la DCT, incluido el túbulo de conexión (células del túbulo de conexión), el conducto colector externo cortical y externo (células principales) y el IMCD (células IMCD), esto resulta en que haya un aumento en la permeabilidad de agua de los conductos colectores (Gamba y Knepper, 2004; Jamison y Gehring, 1992; Nielsen, et al., 2002). La mayor parte de la reabsorción de agua estimulada por la ADH ocurre en CCD, la osmolaridad del líquido intratubular que abandona este conducto es similar a la plasmática. Cuando fluye el líquido intratubular por los conductos colectores medulares, la osmolaridad se incrementa poco a poco desde el inicio del conducto colector de la médula externa (OMCD) hasta el final del conducto colector de la IMCD, debido a que la reabsorción osmótica de agua supera a la reabsorción de solutos. La fuerza que impulsa el influjo osmótico de agua en la membrana apical de los conductos colectores medulares procede de una elevada osmolaridad en el líquido intersticial medular (Gamba y Knepper 2004; Jamison y Gehring 1992). Esta osmolaridad aumenta desde la unión cortico-medular hasta el extremo interno de la médula interna. En la médula externa, la hiperosmolaridad intersticial se debe al transporte activo de NaCl desde la porción gruesa ascendente del asa de Henle (Fenton y Knepper, 2007; Knepper, et al., 2003). En la médula interna, el origen del gradiente de osmolaridad intersticial no es muy claro, debido a la ausencia de transporte activo de NaCl en la porción delgada ascendente del asa de Henle (tAHL).

Concentración urinaria en médula interna

Un punto de mayor controversia ha sido la manera en que se genera el gradiente de concentración de NaCl en el intersticio de la médula interna (Knepper, et al., 2003; Fenton, et al., 2004). La hipótesis originalmente propuesta (hipótesis pasiva) plantea que este gradiente se debe al transporte pasivo de NaCl desde tAHL,

impulsado por la elevada concentración intersticial de urea, que, a su vez se deriva del transporte pasivo de urea (difusión facilitada) desde el IMCD. Sin embargo, cuando se bloqueó la expresión genética (knockout) de los transportadores responsables de la permeabilidad de urea de IMCD (Fenton, et al., 2004), no se alteró la capacidad de concentración urinaria durante la antidiuresis. Este resultado descarta la hipótesis pasiva original. Pero cuando se bloqueó la expresión genética del canal aniónico CIC-K1 de la tAHL, se abolió la elevada concentración de NaCl en el intersticio de la médula interna y se perdió la capacidad de concentración urinaria (Akisuki, et al., 2001; Matsmura, et al., 1999). Puesto que el canal CIC-K1 participa en el transporte pasivo de NaCl desde tAHL hacia el intersticio, se acepta actualmente que este transporte de NaCl genera y mantiene una elevada concentración de NaCl en el intersticio medular interno (Fenton, et al., 2007; Uchida y Sasaki 2005) pero no se conoce con certeza el origen de la fuerza que impulsa este transporte, ni se conoce el mecanismo de transporte involucrado en el transporte de Na⁺.

Canales CIC-K en la médula interna

Los canales CIC-K son predominantemente expresados en el riñón (Uchida y Sasaki 2005). Se han identificado dos isoformas llamadas CIC-K1 y CIC-K2 en rata que exhiben un alto grado de homología (>80%) entre ellas (Uchida, et al., 1993). Están formados por 687 aminoácidos y presentan un peso molecular de: **CIC-K1: 75, 569KDa y CIC-K2: 75, 218KDa.** Estas isoformas difieren en su distribución intrarrenal: CIC-K1 se expresa en médula interna, mientras que CIC-K2 se expresa en médula externa y corteza (Uchida y Sasaki 2005). Ambas isoformas forman canales homodiméricos. Los canales CIC-K median corrientes aniónicas que se estimulan al aumentar el pH o el Ca²⁺ extracelular, y se inhiben con los cambios opuestos (Uchida y Sasaki, 1995; Waldegger, et al., 2002; Waldegger, et al., 2000-Figura 2). Las corrientes mediadas por CIC-K1 y CIC-K2 se diferencian entre sí en sus secuencias de conductividad aniónica: CIC-K1: Br⁻>NO₃⁻>Cl⁻>I⁻ (Adachi, et al., 1994) y CIC-K2: Br⁻>I⁻>Cl⁻ (Waldegger, et al., 2000-Figura 3). En la médula interna, el canal CIC-K1 se localiza, exclusivamente, en la tAHL (Uchida y Sasaki, 1995),

donde participa como transportador de Cl^- en el transporte de NaCl desde tAHL al intersticio (Fenton, et al., 2007; Uchida y Sasaki, 2005). Pero se ha observado la presencia de una proteína CIC-K en la membrana basolateral de las célula de IMCD (in situ y en cultivo primario), que exhibe una secuencia de conductividad aniónica diferente a la observada en los canales CIC-K1 y CIC-K2, por lo que podría tratarse de un canal CIC-K de un tipo no previamente descrito. (Bolívar; 2011 No publicado) Por lo que este trabajo busca la identificación de una proteína del canal aniónico CIC-Kx en IMCD que podría participar en el mecanismo de concentración urinaria.

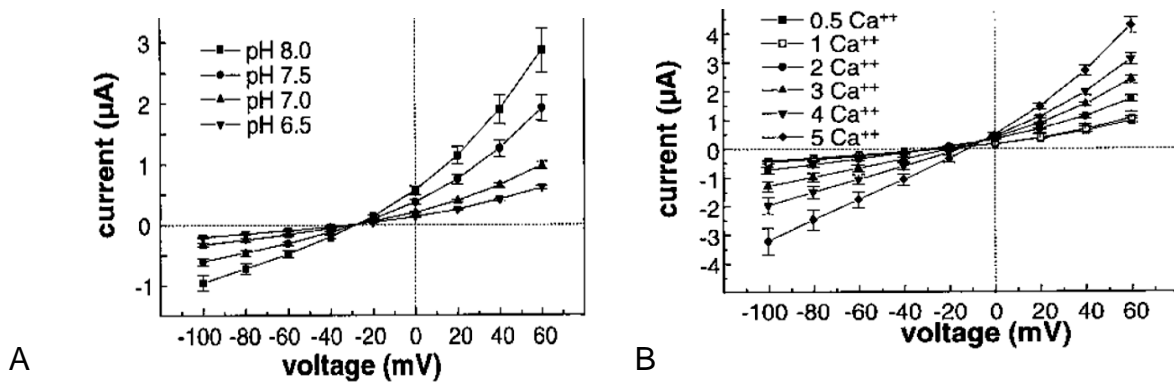


Figura 2. Curva corriente-voltaje del canal CIC-K1 en ovocitos de *Xenopus* que muestra sensibilidad a pH y Calcio. Se muestra la pendiente de la conductancia del canal CIC-K1 que disminuye al reducir el pH (A) y Ca^{2+} (B) y se incrementa al aumentar el pH y Ca^{2+} (Waldegger, et al., 2000).

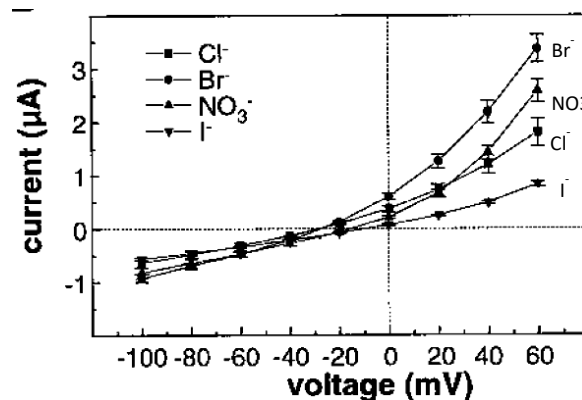


Figura 3. Curva corriente-voltaje que muestra la secuencia de conductividad del canal CIC-K1 en ovocitos de *Xenopus*. Se muestra la secuencia de conductividad del canal CIC-K1 que es $\text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{I}^-$ (Waldegger, et al., 2000)

IV. HIPOTESIS

Las células del IMCD presentan una corriente aniónica mediada por un canal CIC-Kx de un tipo no previamente descrito (¿CIC-K3?). Este canal CIC-Kx forma parte, junto con el canal CIC-K1 de la tAHL y HCN de IMCD, los mecanismos de transporte iónico involucrados en el mecanismo de concentración urinaria de la médula interna.

V. OBJETIVOS

1. Comprobar la presencia de un canal aniónico de tipo CIC-K en IMCD
2. Secuenciar la proteína identificada de tipo CIC-K

VI. ANTECEDENTES

Estudios electrofisiológicos en IMCD de rata y hámster (Stanton 1989, Imai y Yoshitomi, 1990), reportaron la presencia de una conductancia a HCO_3^- en la membrana basolateral del IMCD, estos estudios no encontraron evidencia de ninguna otra conductancia aniónica en las membranas apical o basolateral. Estudios posteriores, realizados en células del IMCD en cultivo primario (Husted, et al., 1995, Boese, et al., 2004) han reportado la presencia de una conductancia a Cl^- mediada por el canal transmembrana regulador de la fibrosis cística (CFTR) y de una conductancia a Cl^- mediada por un canal dependiente de Ca^{2+} intracelular (CaC), probablemente en la membrana apical. Sin embargo, ningún estudio ha intentado investigar la naturaleza de la conductancia a HCO_3^- descrita inicialmente.

Diversos estudios han mostrado la presencia de transcritos y proteínas compatibles con la presencia de un canal CIC-K en IMCD. (Uchida, et al., 1993; Vandewalle, et al., 1997; Waldegger, et al., 2002). Entre estos estudios un RT-PCR hecho en diferentes segmentos de la nefrona en riñón de rata reporta la presencia de un transcrito de CIC-K1 (Uchida, et al., 1993) en la porción ascendente del asa de Henle (tAHL) pero también observa expresión en IMCD. Figura 4. Mientras que haciendo estudios de Northern blot de CIC-K2 en diferentes segmentos de la nefrona del riñón de rata mostró expresión de CIC-K2 en IMCD. (Adachi, et al., 1994). Figura 5.

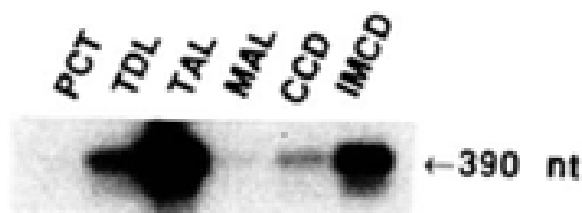


Figura 4. Análisis de CIC-K1 por Northern blot en diversos segmentos de la nefrona de riñón de rata, muestra expresión de CIC-K1 en tAHL e IMCD (Uchida, et al., 1993)

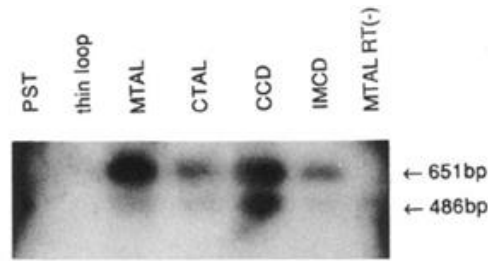


Figura 5. Análisis de CIC-K2 por Northern blot en diversos segmentos de la nefrona del riñón de rata, muestra expresión de CIC-K1 en tAHL e IMCD (Adachi, et al., 1994)

Posteriormente en estudios utilizando un anticuerpo policlonal anti-CIC-K, el cual no discriminaba entre proteínas CIC-K1–K2 se observó expresión tanto de CIC-K1 como de CIC-K2 en IMCD (Vandewalle, et al., 1997); Fig. 6-A. Este autor también identifica por inmunohistoquímica proteínas CIC-K expresadas en diferentes tipos de células epiteliales: en IMCD observa en verde inmunoreactividad de CIC-K1 en tAHL y en rojo *Dolichos biflorus agglutinin* (DBA) lectina usada para identificar las proteínas de membrana del conducto colector medular interno (Ming-Jiun Yu 2007), la colocalización de CIC-K y DBA se muestra en amarillo, lo que nos indica que hay inmunoreactividad de CIC-K1 en IMCD. (Figura 6-B)

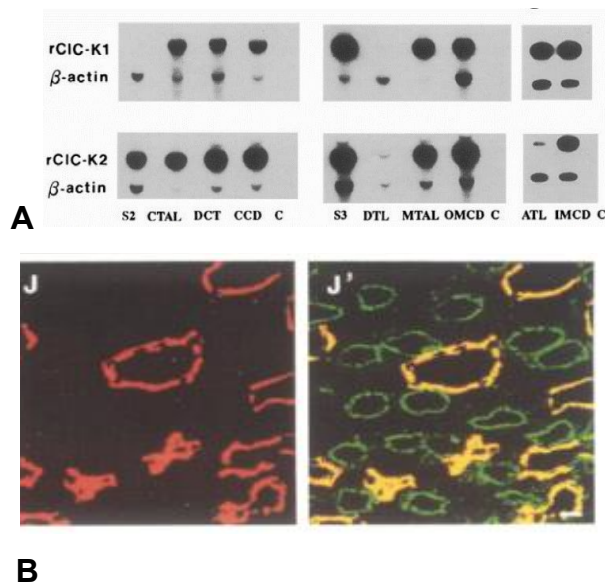


Figura 6. A. RT-PCR de túbulos renales mostrando la presencia de CIC-K1 y CIC-K2. **B.** Inmunofluorescencia que muestra identificación de proteínas CIC-K que se expresan en IMCD. En verde CIC-K en tAHL; rojo DBA en IMCD y amarillo colocalización CIC-K y DBA. Vandewalle, et al., 1997

En estudios de la expresión de CIC-K1 y CIC-K2 se reportó la expresión de CIC-K1 en IMCD (Waldegger, et al., 2002; Figura 7) Sin embargo Pannabecker, et al., en 2004 haciendo inmunohistoquímica en papila renal utilizando un anticuerpo policlonal anti CIC-K no encuentra inmunoreactividad en IMCD lo que nos lleva a una discrepancia con los resultados de RT-PCR. (Figura 8). Por lo que el siguiente trabajo busca comprobar la existencia de una proteína de tipo CIC-K que se expresa en la membrana basolateral de células de IMCD.

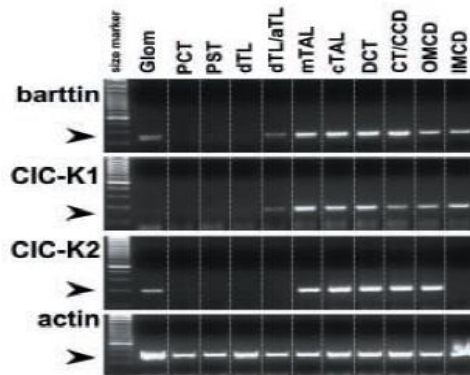


Figura 7. Análisis de expresión de CIC-K1 y CIC-K2 en segmentos tubulares renales por RT-PCR mostraron expresión de CIC-K1 en IMCD. (Waldegger, et al., 2002)

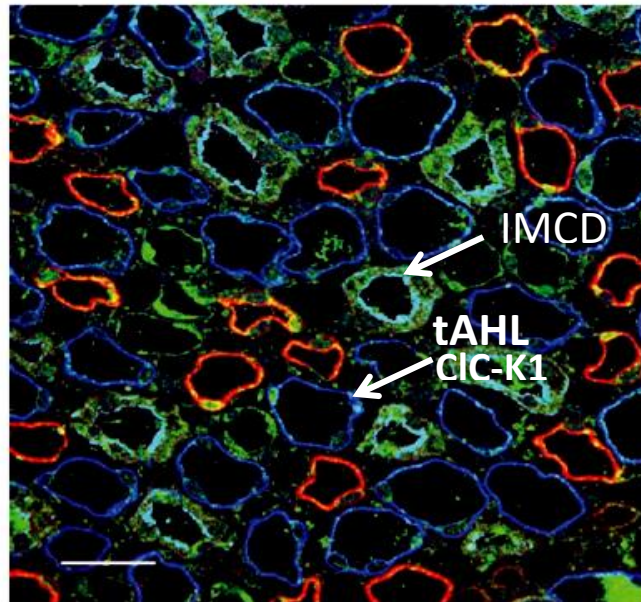


Figura 8. Inmunofluorescencia de IM que marca en azul a CIC-K1 exclusivamente en células de tAHL utilizando el anticuerpo policlonal anti-CIC-K (Chemicon) (Pannabecker, et al., 2004)

VII. METODOLOGÍA

ELECTROFISIOLOGÍA- PATCH CLAMP

Los riñones a utilizar en este proyecto se obtuvieron de ratas Wistar macho de 175 a 225g, de dos meses de edad, alimentadas diariamente a libre consumo con alimento balanceado para ratas hecho a base de maíz molido en condiciones de 12 horas de luz y 12hrs de oscuridad. Las ratas fueron sacrificadas en un horario matutino (9:00-10:00am)

Para la obtención de cultivo primario de túbulos de IMDC se utilizó el método de lisis hipotónica modificado (Escobar, et al., 2004). A partir de cinco ratas Wistar macho se obtuvieron las médulas internas de los riñones las cuales al hacer un corte transversal se observa en la zona medular una sección con un color más pálido, la médula interna renal. Figura 9. Las médulas fueron separadas, se cortaron y fraccionaron finamente y se incubaron a 37 ° C, durante 60 min. Después de la incubación, se indujo la lisis hipotónica agregando 1.75 volúmenes de agua desionizada y la mezcla fue centrifugada a 600 g x 6min, el pellet obtenido fue suspendido y centrifugado a 110 g x 2min. Este último procedimiento fue repetido tres veces. El pellet fue suspendido en medio DMEM (Gibco, Grand Island, NY) suplementado con 10% de suero bovino fetal e insulina, las células fueron incubadas a 37°C con una humedad de saturación en una atmosfera con 5% de CO₂, con cambios de medio cada segundo día.

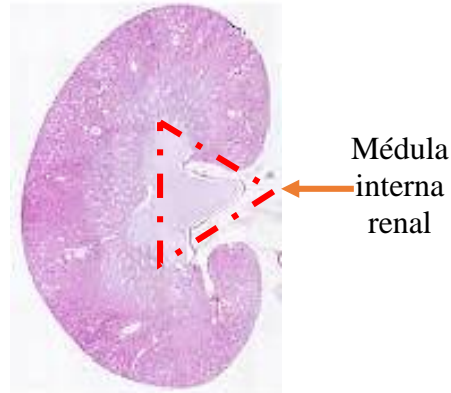


Figura 9. Se observa seleccionado un corte transversal del riñón y en el triángulo rojo se marca la sección de la médula interna renal la cual fue cortada y utilizada para la obtención de las muestras. (Imagen modificada de internet de Atlas de Histología Vegetal y Animal)

Los túbulos con cubreobjetos se colocaron dentro de una cámara de perfusión fijada a la platina de un microscopio invertido provisto con óptica de Hoffman. Las corrientes de membrana fueron mayormente estudiadas mediante la técnica de fijación de voltaje en célula completa (whole-cell clamp) en su variante parche perforado. Los túbulos fueron mantenidos a temperatura ambiente (20-25 °C) y se pusieron en un baño (baño control) con la siguiente composición (en mM): NaCl 135, KCl 5, citrato de calcio 0.4, MgCl₂ 1, glucosa 10, alanina 1, Na-HEPES 10, amilorida 3×10^{-7} M, rojo de fenol 16 mg/l; pH 7.4. La solución en las micropipetas fué la siguiente (en mM): KCl 135, NaCl 5, CaCl₂ 1.54, MgCl₂ 1, glucosa 10, tris-HEPES 10 y EGTA 2.5; pH 7.4.

Las corrientes de membrana fueron registradas a través de electrodos usando un amplificador Axopatch-1D con un cabezal CD4 (500mΩ). Las micropipetas se fabricaron en un estirador de pipetas de dos pasos (Sutter Ins. P97) y sus puntas serán flameadas con una microforja (Narishige MF9). Las micropipetas se llenaron desde la punta, hasta una distancia de 0.2-0.4 mm, con una solución compuesta de

(en mM): KCl 5, 151 ácido glucónico, 136 KOH, 10 NaOH, 1.54 Ca (OH)₂, 1 Mg (OH)₂, 2.3 EGTA, 10 HEPES, pH 7.4. El llenado de la pipeta se completó, desde la base, con una solución similar que contiene 200 µg/ml de anfotericina. Una vez llenas, las micropipetas tuvieron una resistencia de 2-4 mΩ. Después de que la punta de la micropipeta se puso en contacto con la membrana celular, se aplicó una ligera succión hasta obtener sellos de al menos 1 GΩ.

Para obtener la configuración de whole-cell clamp convencional, la membrana fue rota mediante succión. El potencial de membrana se fijó en -50 mV. La capacitancia de membrana y la resistencia en serie se compensaron, y midieron, mediante el sistema de compensación del Axopatch-1D. Los protocolos de fijación de voltaje fueron generados y las corrientes de membrana se adquirieron por el Axopatch-1D controlado por el programa pClamp (v.6, Axon Inst.) mediante una computadora y un conversor A/D Digidata 1200 (Axon).

Las células fueron inicialmente estudiadas mediante el siguiente protocolo básico de estimulación: a partir de un potencial de mantenimiento de -50 mV se aplicaron una serie de pulsos entre -160 y 80 mV, con incrementos de 20 mV entre un pulso y el siguiente; la duración de pulsos fue de 720 ms, con 4 s de intervalo entre ellos. Después de cada pulso, el potencial fue fijado a -150, durante 80 ms, para registrar las corrientes de cola.

A fin de determinar la sensibilidad de los canales ClC-K a los cambios de pH y de la [Ca²⁺] externos, su sensibilidad a inhibidores, así como su conductividad relativa a diversos aniones, se estudió la respuesta de la corriente a una rampa de voltaje.

La respuesta de ClC-K a la rampa de voltaje será estudiada a los siguientes pH externos: 7, 7.4 y 7.8; y a las siguientes concentraciones de Ca²⁺ externo: 0 y 2

mM. La composición de la solución de baño control fué modificada para ajustarla a estos requerimientos. Los inhibidores que se exploraron fueron: DIDS 1 mM y furosemida 1 mM. A fin de determinar la conductividad relativa de CIC-K a diversos aniones, 134 mM Cl⁻ de la solución de baño serán equimolarmente sustituidos por: Br⁻, I⁻, NO₃⁻ y gluconato⁻.

INMUNOHISTOQUÍMICA

Preparación de cortes de tejido para inmunofluorescencia: los riñones de rata macho de 200 ± 25 g fueron fijados mediante perfusión desde la aorta con 4% paraformaldehído en PBS, se extrajeron los riñones y se aisló la médula interna renal, la cual se fijó con paraformaldehído durante 12 h. Para la preparación de los cortes, el tejido fué crioprotegido mediante sacarosa al 30%. El tejido se cortó en rebanadas de 1 a 2 mm de grosor y se congeló en nitrógeno líquido. Se realizaron cortes seriales de 10 µm de grueso mediante un criostato. Estos cortes fueron incubados a 4 °C durante 24 h en PBS con el anticuerpo primario (conejo anti-HCNx) y 0.3% tritón. Posteriormente, las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario (FITC-conjugado) cabra anti-conejo IgG por una hora. Se prepararon controles negativos consistentes en cortes incubados solo con el anticuerpo secundario (pero no con el primario) y en cortes incubados con ambos anticuerpos, pero con el anticuerpo primario previamente preadsorbido con un exceso del péptido antigénico específico. Se hizo un marcaje simultáneo de HCNx y Na⁺-K⁺ ATPasa. Para esto se incubó también en las, condiciones descritas, con un anticuerpo (primario) ratón anti-Na⁺-K⁺ ATPasa, y posteriormente con el anticuerpo secundario (CY3-Conjugado) caballo anti-ratón. El propósito de este doble marcaje es el de

demostrar la colocalización del canal HCN y la Na⁺-K⁺ ATPasa, que demostraría que el canal HCN se localiza en la membrana basolateral de las células del IMCD y de tAHL. Además de los anticuerpos mencionados, se usará, para identificar la tAHL, un anticuerpo (primario) cabra anti CIC-K1, el cual fué visualizado mediante un anticuerpo secundario (CY5-conjugado) conejo anti-cabra. Las muestras fueron observadas mediante un microscopio con sistema confocal Olympus FV-1000.

BIOLOGIA MOLECULAR

Obtención de la fracción enriquecida de proteínas de membrana de IM

Ratas macho Wistar entre 175-225gr fueron anestesiados con cloroformo y sacrificados, posteriormente fueron removidos los riñones asépticamente y fraccionados para obtener la médula interna.

Para obtener la fracción de proteínas de membrana, las medulas internas seccionadas fueron puestas en buffer de lisis (Tris•HCl, 10mM pH 7.6; EDTA 0.1mM y sacarosa 2.5 mM) al cual se le adicionó un cóctel de inhibidores de proteasas (Complete EDTA free; Roche) a una dilución final de 1:50. Se llevó acabo la lisis aplicando 6 ciclos de pulsos de ultrasonido de 10s con un homogeneizador de ultrasonido (Cole Parmer) utilizando una potencia de salida del 60%, los cuales fueron alternados con periodos de 15s de enfriamiento en hielo. Posteriormente se obtuvieron las fracciones ricas en proteína de membrana inicialmente centrifugando a 1,000 g x 10 min para quitar los restos de tejido, el sobrenadante fue recuperado y centrifugado a 17,000 g x 20 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante el cual fue centrifugado a 22,000 g x 1hra a 4°C.

La fracción enriquecida de membranas obtenida fue resuspendida en agua bidestilada estéril y se determinó la concentración de proteínas por método de Bradford.

Obtención de la fracción enriquecida de proteínas de membrana de Cultivo primario (CP) e IMCD.

Para la obtención de CP de células de IMDC se utilizó el método de lisis hipotónica modificado (Escobar, 2004). Las médulas se cortaron finamente y se incubaron a 37 ° C, durante 60 min. Después de la incubación, se indujo la lisis hipotónica agregando 1.75 volúmenes de agua desionizada y la mezcla fue centrifugada a 600 g x 6min, el pellet obtenido fue suspendido y centrifugado a 110 g x 2min. Este último procedimiento fue repetido tres veces. El pellet fue suspendido en medio DMEM (Gibco, Grand Island, NY) suplementado con 10% de suero bovino fetal e insulina, las células fueron incubadas a 37°C con una humedad de saturación en una atmosfera con 5% CO₂, con cambios de medio cada segundo día.

La preparación de células de IMCD se obtuvo usando un método previamente descrito (Stokes 87), similar al método para obtener los cultivos pero sin aplicar una lisis hipotónica (obteniendo una preparación enriquecida (mayor 90%) en conductos colectores)

La muestra de CP de IMCD y células de IMCD fueron lavadas tres veces con PBS a 500 g x 2min y puesta en buffer de lisis. Ambas muestras fueron lisadas aplicando 4 ciclos de pulsos de ultrasonido de 10s con un homogeneizador de ultrasonido utilizando una potencia de salida del 50%, los cuales fueron alternados con periodos de 15s de enfriamiento en hielo. A partir de estas muestras se obtuvieron las

fracciones ricas en proteína de membrana como ya se mencionó y resuspendidas en agua bidestilada estéril.

Western blot con anticuerpo policlonal anti CIC-K1 (Santa Cruz Laboratories)

Utilizando 15µg de la fracción enriquecida de membrana de IM, IMCD y CP, las proteínas fueron separadas electroforéticamente en minigeles de acrilamida (BioRad) al 10% y transferidas a membranas de nitrocelulosa de 0.22µm en un equipo trans-blot semiseco (Bio-Rad) a 15Volts por 25min (Millipore) y se comprobó la calidad de transferencia tiñendo el gel después de la transferencia con azul de Coomassie y tiñendo la membrana con Rojo de Ponceau.

Posteriormente la membrana fue bloqueada, usando una solución de albúmina de suero bovino (BSA) al 1.5% (Termo) diluido en agua bidestilada por toda la noche a temperatura ambiente en agitación. La membrana fue lavada 3 veces con PBS más Tween 20 al 1% (Bio-Rad)

Se llevó a cabo la inmunodetección utilizando el anticuerpo policlonal hecho en cabra anti CIC-K1 (Santa Cruz Laboratories), usando una dilución de 1:500 diluido en PBS más Tween 20 (.5%) incubando toda la noche a 4°C, posteriormente se hicieron 3 lavados con PBS más Tween 20 al 1% para quitar el exceso de anticuerpo primario. Se utilizó un anticuerpo secundario anti cabra marcado con HRP (Sigma) en una dilución 1: 10 000 por 2 h. Las bandas fueron visualizadas utilizando un sustrato (crescendo-BIO-RAD) por quimioluminiscencia en un equipo ChemiDoc (Bio-Rad).

Western blot con anticuerpo policlonal anti CIC-K Chemicon-Alomone.

Utilizando 15µg de la fracción enriquecida de membrana de MI, IMCD y CP, las proteínas fueron separadas electroforéticamente en minigeles de acrilamida (BioRad) como se mencionó anteriormente.

Posteriormente la membrana fue bloqueada y se llevó a cabo la inmunodetección utilizando el anticuerpo policlonal hecho en conejo anti-CLC-K (Chemicon), iniciando con una dilución 1:1000, 1:500, 1: 200 y 1:100 hasta estandarizarlo en 1:500. El experimento con este anticuerpo no pudo ser reproducido debido a que fue discontinuado por lo que fue sustituido por el anticuerpo hecho en conejo anti CIC-K (Alomone) el cual comparte el mismo epítotope que el anticuerpo de Chemicon 673- 687aa.

El anticuerpo anti-CIC-K (Alomone) fue diluido en PBS más Tween 20 (0.5%) incubando toda la noche a 4°C, se hicieron 3 lavados con PBS más Tween 20 al 1% y fue utilizado el anticuerpo secundario anti conejo marcado con HRP (Sigma) en una dilución 1: 10 000 por 2 h. Las bandas fueron visualizadas utilizando un sustrato (crescendo-BIO-RAD) por quimioluminiscencia en un equipo ChemiDoc (Bio-Rad).

IDENTIFICACIÓN DE LAS BANDAS CANDIDATAS A SECUENCIAR EN IMCD

Después de lograr la reproducibilidad de los Western blots utilizando los anticuerpo de Santa Cruz y Alomone, se determinó que las bandas observadas alrededor de los 75KDa en muestras de IMCD visualizadas usando el anticuerpo anti CIC-K1 Santa Cruz, serían las candidatas a secuenciar, por lo que 30µg de la fracción de proteínas de membrana de IMCD fue separada en una cámara vertical (Hoffer) en

geles de 18cm al 10%, el gel fue teñido según las especificaciones del servicio de secuenciación. Las bandas candidatas fueron cortadas y puestas en agua miliQ en tubos Eppendof de 1.5ml y fueron enviadas al Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Canada para su análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrómetros de masas (LC-MS/MS)

VIII. RESULTADOS

RESULTADOS ELECTROFISIOLOGÍA

Usando la técnica de fijación de voltaje en célula completa (parche perforado) se estudiaron las corrientes aniónicas presentes en células del IMCD en cultivo primario. Se observó una corriente (I_{ovt}) que se activa a potenciales despolarizantes en forma dependiente de tiempo. Estudiando la conductancia de I_{ovt} a una rampa de voltaje (de -60 a 60 mV) se observó que la conductancia que la origina muestra similar conductividad a los iones Cl^- y a HCO_3^- (Gráfica 10) I_{ovt} mostró una sensibilidad a pH y Ca^{2+} extracelulares similar a la descrita para conductancias mediadas por canales CIC-K: su conductancia pendiente disminuye al reducir el pH o el Ca^{2+} extracelular, y se incrementa al aumentar el pH (esta respuesta a pH es contraria a la descrita para canales CaC (Uchida y Sasaki, 1995, Waldegger, et al., 2000) Figura 11. Además en la secuencia de conductividad se observó que en ausencia de bicarbonato, la sustitución parcial de Cl^- extracelular por Br^- , I^- y NO_3^- mostraba una secuencia de ($\text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{I}^- > \text{NO}_3^-$), que es diferente a la observada en las corrientes mediadas por canales CIC-K1 ($\text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{I}^-$; Waldegger, et al., 2000) y CIC-K2 ($\text{Br}^- > \text{I}^- > \text{Cl}^-$; Adachi, et al., 1994) por lo que puede ser mediado por un canal tipo CIC-K no descrito previamente Figura 12.

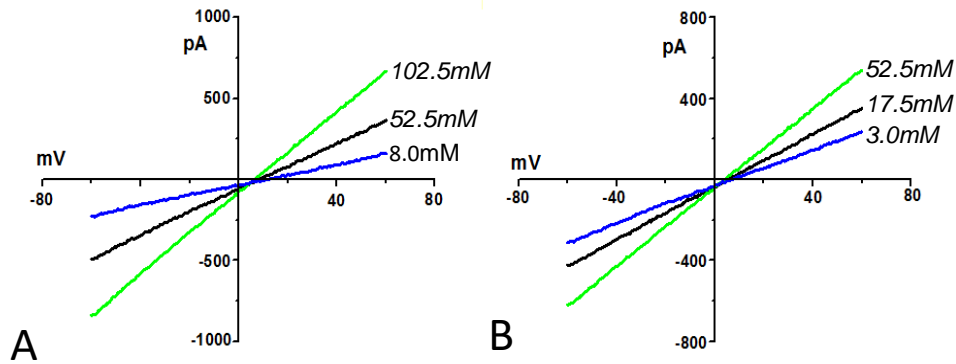


Figura 10. Curva corriente voltaje que muestra la conductividad pendiente de I_{olt} a tres diferentes concentraciones de Cl^- y HCO_3^- en células de cultivo primario de IMCD de riñón de rata (*Rattus norvergicus*). Estudio de la Respuesta de I_{olt} a una rampa de voltaje (de -60mV a 60mV) mostró que la conductancia que la origina muestra similar conductividad a los iones Cl^- y HCO_3^- . Registros a tres diferentes concentraciones: **A Cl^- : Concentración control 52.5mM; alta concentración 102.5mM y baja concentración 8.0mM. **B** HCO_3^- : Concentración control 17.5Mm; alta concentración 52.5mM y baja concentración 3.0mM.**

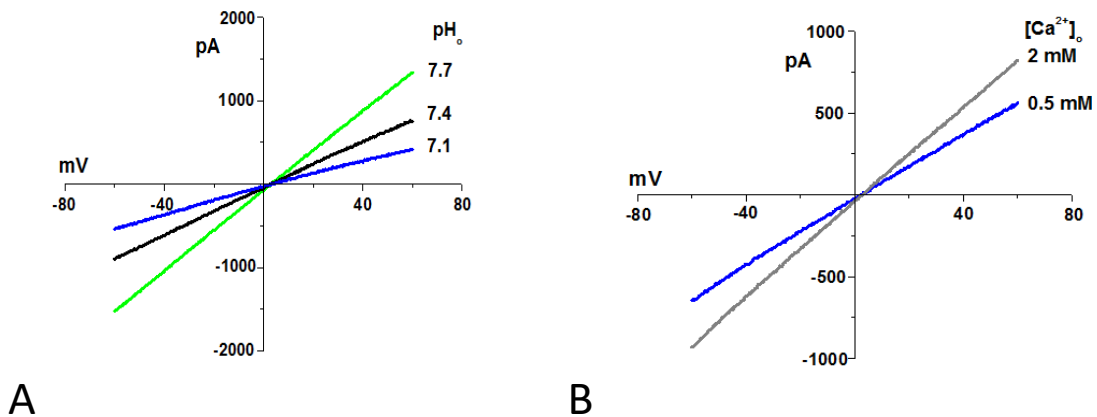


Figura 11. Curvas corriente-voltaje que muestra la sensibilidad de I_{olt} a pH y Calcio en células de cultivo primario de IMCD de riñón de rata (*Rattus norvergicus*). Se muestra que la pendiente de la conductancia disminuye al reducir el pH (A) y Ca^{2+} (B) y se incrementa al aumentar el pH y Ca^{2+} extracelular, comportamiento característico de canales tipo ClC-K.

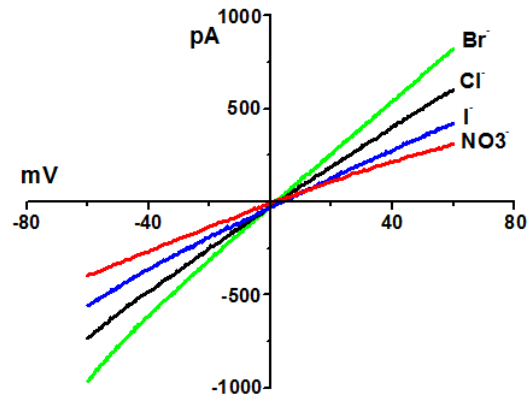


Figura 12. Curva corriente voltaje que muestra la secuencia de conductividad obtenida de I_{ovt} en células de cultivo primario de IMCD de riñón de rata (*Rattus norvergicus*). Se muestra la secuencia de conductividad obtenida de I_{ovt} ($Br^- > Cl^- > I^- > NO_3^-$) que muestra diferencias con los canales de tipo CIC-K descritos.

RESULTADOS INMUNOHISTOQUIMICA

En estudios de inmunofluorescencia en médula interna renal se hizo una colocalización de la Bomba $Na^+/K^+-ATPasa$ con HCN2 y CIC-K1, para marcar CIC-K1 se utilizó el anticuerpo policlonal comercial anti-CIC-K1 de Santa Cruz Laboratorios. Los resultados obtenidos mostraron inmunoreactividad inesperada de CIC-K1 en la membrana basolateral en células del IMCD (Figura 13) "in situ", lo cual no está descrito.

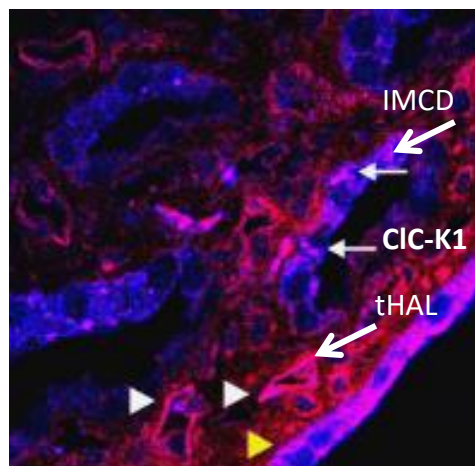


Figura 13. Inmunofluorescencia en médula interna renal de rata (*Rattus norvergicus*). Se marca en rojo a la $Na^+/K^+-ATPasa$ y en azul a CIC-K1 en IMCD utilizando el anticuerpo policlonal anti-CIC-K1 (Sta. Cruz). La colocalización de $Na^+/K^+-ATPasa$ y CIC-K1 da un tono morado en IMCD lo cual muestra inmunoreactividad de CIC-K1 en IMCD no descrito previamente.

RESULTADOS WESTERN BLOT

Los resultados obtenidos utilizando el anticuerpo policlonal anti CIC-K (Alomone) mostraron dos bandas alrededor de los 75KDa que es el peso molecular de las proteínas CIC-K1 y K2 en muestras de IM e IMCD, se observa bloqueo de la marca de 75KDa cuando se preincuba el anticuerpo con péptido control. (Figura 14)

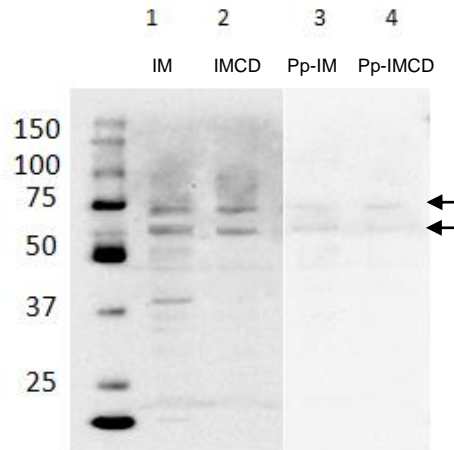


Figura 14. Western blot en células de la IM e IMCD usando el anticuerpo policlonal anti-CIC-K (Alomone) de riñón de rata (*Rattus norvegicus*); Carril 1 se muestra IM y en carril 2 se muestra IMCD donde se observan dos bandas alrededor de los 75KDa marcadas con dos flechas. Carril 3 se muestra control negativo en IM (anticuerpo Alomone preincubado con péptido control; Pp-IM) Carril 4 control negativo en IMCD (Pp-IMCD)

Los resultados del Western Blot obtenidos utilizando el anticuerpo anti CIC-K1 (Santa Cruz) mostraron dos bandas alrededor de los 75KDa en muestras de IM y CP (Figura 15; Carril 1 y 2), se observa bloqueo de la marca de 75KDa cuando se preincuba el anticuerpo con péptido control (Figura 15; carril 3 y 4)

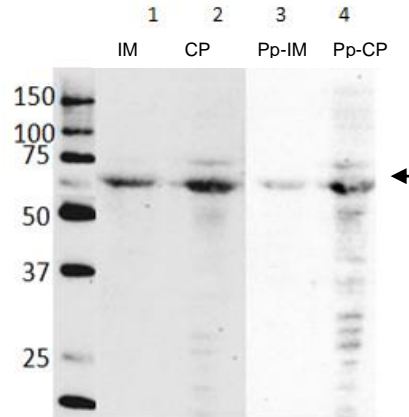


Figura 15. Western Blot en células de la IM y CP usando el anticuerpo anti-CIC-K1 (Santa Cruz) de riñón de rata (*Rattus norvegicus*); Carril 1 se muestra IM y en carril 2 se muestra CP donde se observan dos bandas alrededor de los 75Kda marcadas con dos flechas. Carril 3 se muestra control negativo en IM (anticuerpo Santa Cruz preincubado con péptido control; Pp-IM) Carril 4 control negativo en CP (Pp-CP)

RESULTADOS SECUENCIACION

Las bandas observadas alrededor de los 75KDa que mostraron inmunoreactividad usando el anticuerpo policlonal anti CIC-K1 de Santa Cruz Laboratories fueron las candidatas a ser secuenciadas (Figura 16). A la par se hizo otra separación electroforética de las proteínas obtenidas del cultivo primario de células de IMCD y las bandas candidatas fueron cortadas y enviadas a secuenciar. (Figura 17)

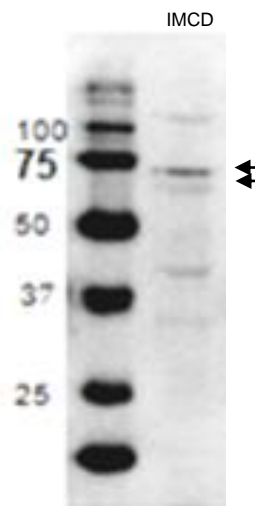


Figura 16. Western Blot de IMCD utilizando anticuerpo policlonal CIC-K1 (Santa Cruz) mostrando con flechas las bandas candidatas a secuenciar.

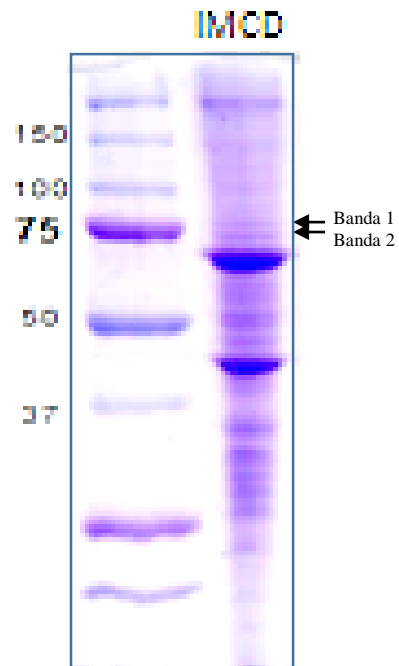


Figura 17. Se muestran proteínas de IMCD separadas en gel acrilamida teñidas con azul de Coomassie-g250, donde se marcan bandas candidatas a secuenciar observadas alrededor de los 75KDa.

RESULTADOS SECUENCIACIÓN BANDA 1

En banda 1 se logró secuenciar el 34% de la secuencia de CIC-K1 (Figura 18) y el 5% de la secuencia de CIC-K2 (Figura 19). Los péptidos secuenciados en total fueron 41 de los cuales 40 corresponden totalmente a CIC-K1 mientras que 8 corresponden a CIC-K2 (Tabla 1)

PEPTIDO	COPIAS SECUENCIADAS	CIC-K1	CIC-K2
1. ⁸ EGSSGKPVTLQELWGPCPR ²⁷	2	100%	
2. ³⁴ RGLEWLKER ⁴²	1	100%	
3. ¹²⁸ TMLSGVVLEDYLDIKNFGAK ¹⁴⁷	4	100%	
4. ³¹⁹ LLATSKPSYAALVALVLASITYPPGVGR ³⁴⁶	6	100%	
5. ⁵²⁸ KLPYLPWIR ⁵³⁷	2	100%	100%
6. ⁵⁴⁰ QIGSYPVTVVEHFMCNLTTLAK ⁵⁶⁰	2	100%	
7. ⁵⁶¹ DTPLEEVVK ⁵⁶⁹	1	100%	
8. ⁵⁶¹ DTPLEEVVKVVTSTEVVSQYPLVETR ⁵⁸⁵	4	100%	
9. ⁵⁶⁸ VVTSTEVVSQYPLVETR ⁵⁸⁵	4	100%	
10. ⁵⁸⁷ ESQTLVGIVER ⁵⁹⁷	2	100%	
11. ⁵⁹⁸ THLVQALQTQPASWAPGQER ⁶¹⁷	4	100%	
12. ⁶¹⁸ FLQDILAGGCPVTLQLSPETSLYQAHS�FER ⁶⁵⁰	2	100%	
13. ⁶⁵¹ LTLQSLFVTSRG ⁶⁶²	2	100%	
14. ⁶⁶¹ GKAVGSVSWAELKK ⁶⁷⁴	1	100%	
15. ⁶⁶⁴ AVGSVSWAELKK ⁶⁷⁴	1	100%	
16. ⁶⁷⁶ AISTLINPPAPK ⁶⁸⁷	2	100%	
17. ³¹⁹ LLATSKPLYSALAAVVLASITYPPGVGR ³⁴⁶	6		100%

TABLA 1. En la columna 1 se muestra la secuencia de los péptidos secuenciados y la posición que tienen en la secuencia completa de la proteína en columna 2 aparece el número de copias secuenciada de cada péptido y en columna 3 la similitud en porcentaje que tienen con la proteína CIC-K1 y CIC-K2. El péptido 17 es una secuencia que se encuentra tanto en CIC-K1 como en K2 con la diferencia de 4 aminoácidos puestos en color rojo

CIC-K1_Rat (100%) 75.57KDa

Proteína del canal de cloruro CIC-K1 *Rattus Norvegicus*

16 péptidos, 34% cobertura

MEELVGLREG	SSGKPVTLQE	LWGPCPRIRR	GVRRGLEWLK	ERLFRVGEDW	HFLVALGVLM
ALISYAMNFA	IGRVVRAHKW	LYREVDGHL	LRYLSWTVYP	VALLSFSSGF	SQSI SPFSGG
SGLPELKTML	SGVVLEDYLD	IKNFGAKVVG	LSCTLATGST	IFLGKVGPFV	HLSVMISAYL
GRVRAKTIGE	TENKAKEIEM	LSAAAAGVVA	TVFAAPFSGV	LFSIEVMSSH	FSVWNYWRGF
FAATCGAFMF	RLLGVFNSEQ	ETITTSIYKTR	FRVDVPFDLP	EIFFFVALGF	ICGVLSCAYL
FCQRTFLRFI	KTNRYTSRLL	ATSKPSYAAL	VALVLASITY	PPGVGRFMAS	RLSMAEHLHS
LFDNNSWALM	TRNSSPPWPA	EPDPQNLWLE	WCHPRFTIFG	TLAFFLVMKF	WMLILATTIP
MPAGYFMPIF	IIGAAIGRLL	GEALSVAFPE	GIVAGREVNP	IMPGGYALAG	AAAFSGAVTH
TISTALLAFE	LTGQIVHALP	VLMAVLAANA	ISQNCQPSFY	DGTIMAKKLP	YLPWIRGRQI
GSYPVTVVEHF	MNCNLTTLAK	DTPLEEVVKV	VTSTEVVSQYP	LVETRESQTL	VGIVERTHLV
QALQTQPASW	APGQERFLQD	ILAGGCPTQP	VTLQLSPETS	LYQAHS�FER	LTLQSLFVTS
RGKAVGSVSW	AELKKAISTL	INPPAPK			

Figura 18. Se muestra secuencia completa de la proteína CIC-K1 de *Rattus Norvegicus*, en amarillo la cobertura del 34% que tuvieron los 16 péptidos secuenciados.

CIC-K2_Rat (100%) 75.21KDa
Proteína del canal de cloruro CIC-K2 *Rattus Norvegicus*
2 péptidos, 5% cobertura

MEEIVGLREG	SPRKPVPLQE	LWRPCPRIRR	NIQGSLEWLK	ERLFRVGEDW	YFLVALGVLM
ALISYAMNFA	IGRVVRAHKW	LYREIGDGHL	LRYLSWTVYP	VALLSFSSGF	SQSITPSSGG
SGIPEVKTIL	TGVILEDYLD	IKNFGAKVVG	LSCTLATGST	IFLGKLGPFV	HLSVMIAAYL
GRVRTKTVGE	PENKTKEMEL	LAAGAAVGVA	TVFAAPISGV	LFSIEVMSSH	FSVWDYWRGF
FAATCGAFMF	HLLAVFNSEQ	ETITSIYKTS	FPVDIPFDLP	EIFFFVALGA	ICGILSCGYN
YCQRTSLFFL	KSNGFTSKLL	ATSKPLYSAL	AAVVLASITY	PPGVGRFMAS	RLSMSEYLET
LFDNNSWALM	TKNSSPPWSA	EPDPQNLWLE	WCHPQMTVFG	TLVFFLVMKF	WMLILATTIP
IPAGYFLPIF	VYGAAIGRLF	GEVLSLAFPE	GIVAGKVSP	IMPGAYALAG	AAAFSGAVTH
TLSTALLAFE	VSGQIVHALP	VLMAVLAANA	ICQSYQPSFY	DGTIIVK KLP	YLPWIRGRKI
GSHLVTVGHF	MNCTLTTLAK	DMPLEEVIVK	VISTDVTQYP	LVETTESQVL	VGIVKRTHLV
QSLHTDSASW	APGQQPCLQD	ILANGCPTQP	VTLQLSTETS	LHETHNLFEL	LNLQLLFVTS
RGRAVGSVSW	VELKKAISTL	TNPPAPK			

Figura 19. Secuencia completa de la proteína CIC-K2 de *Rattus Norvegicus*, en verde la cobertura del 5% que tuvieron los 2 péptidos secuenciados.

RESULTADOS SECUENCIACIÓN BANDA 2

En banda 2 se logró secuenciar el 30% de la secuencia de CIC-K1 (Figura 20) y el 6.5% de la secuencia de CIC-K2 (Figura 21). Los péptidos secuenciados en total fueron 46 de los cuales 37 corresponden totalmente a CIC-K1 mientras que 10 corresponden a CIC-K2 (Tabla 2)

PEPTIDO	COPIAS SECUENCIADAS	CIC-K1	CIC-K2
1. ⁸ EGSSGKPVTLQELWGPCPR ²⁷	2	100%	
2. ³¹⁹ LLATSKPSYAALVALVLASITYPPGVGR ³⁴⁶	8	100%	
3. ⁴³⁹ LLGEALSVAFPEGIVAGR ⁴⁵⁶	1	100%	
4. ⁵²⁸ KLPYLPWIR ⁵³⁷	1	100%	100%
5. ⁵⁴⁰ QIGSYPVTVEHFMCNLTTLAK ⁵⁶⁰	2	100%	
6. ⁵⁶⁰ VVTSTEVSYPLVETR ⁵⁸⁶	4	100%	
7. ⁵⁸⁷ ESQTLVGIVER ⁵⁹⁷	2	100%	
8. ⁵⁶¹ DTPLEEVVK ⁵⁶⁹	2	100%	
9. ⁵⁶¹ DTPLEEVVKVVTSTEVSYPLVETR ⁶⁸⁵	4	100%	
10. ⁵⁹⁸ THLVQALQTQPASWAPGQER ⁶¹⁷	3	100%	
11. ⁶¹⁸ FLQDILAGGCPTQPVTLQLSPETSLYQAHS�FER ⁶⁵⁰	4	100%	
12. ⁶⁵¹ LTQLSLFVTSRG ⁶⁶²	2	100%	
13. ⁶⁷⁶ AISTLINPPAPK ⁶⁸⁷	2	100%	
14. ¹⁸⁷ TVGEPENKTK ¹⁹⁶	1		100%
15. ³¹⁹ LLATSKPLYSALAAVVLASITYPPGVGR ³⁴⁶	8		100%

TABLA 2. En la columna 1 se muestra la secuencia de los péptidos secuenciados y la posición que tienen en la secuencia completa de la proteína en columna 2 aparece el número de copias secuenciada de cada péptido y en columna 3 la similitud en porcentaje que tienen con la proteína CIC-K1 y CIC-K2. El péptido 17 es una secuencia que se encuentra tanto en CIC-K1 como en K2 con la diferencia de 4 aminoácidos puestos en color rojo

CIC-K1_Rat (100%) 75.57KDa

Proteína del canal de cloruro CIC-K1 *Rattus Norvegicus*

13 péptidos únicos, 30% cobertura

MEELVGLREG	SSGKPVTLQE	LWGPCPRIRR	GVRRGLEWLK	ERLFRVGEDW	HFLVALGVLM
ALISYAMNFA	IGRVVRAHKW	LYREVDGHL	LYRLSWTVYP	VALLSFSSGF	SQSISPFSSG
SGLPELKTML	SGVVLEDYLD	IKNFGAKVVG	LSCTLATGST	IFLGKVGPFV	HLSVMISAYL
GRVRAKTIGE	TENKAKEIEM	LSAAAAGVVA	TVFAAPFSGV	LFSIEVMSSH	FSVWNYWRGF
FAATCGAFMF	RLLGVFNSEQ	ETITSIYKTR	FRVDVPFDLP	EIFFFVALGF	ICGVLSCAYL
FCQRTFLRFI	KTNRYTSRLL	ATSKPSYAAL	VALVLASITY	PPGVGRFMAS	RLSMAEHLHS
LFDNNSWALM	TRNSSPPWPA	EPDPQNLWLE	WCHPRFTIFG	TLAFLVMKF	WMLILATTIP
MPAGYFMPIF	IIGAAIGRLL	GEALSVAFPE	GIVAGREVN	IMPGGYALAG	AAAFSGAVTH
TISTALLAFE	LTGQIVHALP	VLMAVLAANA	ISQNCQPSFY	DGTIMAKKLP	YLPWIRGRQI
GSYPVTVEHF	MNCNLTTLAK	DTPLEEVVKV	VTSTEVSYPLVETR	LVETRESQTL	VGIVERHLV
QALQTQPASW	APGQERFLQD	ILAGGCPTQP	VTLQLSPETS	LYQAHS�FER	LTQLSLFVTS
RGKAVGSVSW	AELKKAISTL	INPPAPK			

Figura 20. Secuencia completa de la proteína CIC-K1 de *Rattus Norvegicus*, en amarillo la cobertura del 30% que tuvieron los 13 péptidos secuenciados.

CIC-K2_Rat (100%) 75.21KDa
Proteína del canal de cloruro CIC-K2 *Rattus Norvegicus*
3 péptidos únicos, 6.5% cobertura

MEEIVGLREG	SPRKPVPLQE	LWRPCPRIRR	NIQGSLEWLK	ERLFRVGEDW	YFLVALGVLM
ALISYAMNFA	IGRVVRAHKW	LYREIGDGHL	LRYLSWTVYP	VALLSFSSGF	SQSITPSSGG
SGIPEVKTIL	TGVILEDYLD	IKNFGAKVVG	LSCTLATGST	IFLGKLGPFV	HLSVMIAAYL
GRVRTKTVGE	PENKTKEMEL	LAAGAAVGVA	TVFAAPISGV	LFSIEVMSSH	FSVWDYWRGF
FAATCGAFMF	HLLAVFNSEQ	ETITSIYKTS	FPVDIPFDLP	EIFFFVALGA	ICGILSCGYN
YCQRTSLFFL	KSNGFTSKLL	ATSKPLYSAL	AAVVLASITY	PPGVGRFMAS	RLSMSEYLET
LFDNNSWALM	TKNSSPPWSA	EPDPQNLWLE	WCHPQMTVFG	TLVFFLVMKF	WMLILATTIP
IPAGYFLPIF	VYGAAIGRLF	GEVLSLAFPE	GIVAGKVSP	IMPGAYALAG	AAAFSGAVTH
TLSTALLAFE	VSGQIVHALP	VLMAVLAANA	ICQSYQPSFY	DGTIIVK KLP	YLPWIRGRKI
GSHLVTVGHF	MNCTLTTLAK	DMPLEEVIVK	VISTDVTQYP	LVETTESQVL	VGIVKRTHLV
QSLHTDSASW	APGQQPCLQD	ILANGCPTQP	VTLQLSTETS	LHETHNLFEL	LNLQLLFVTS
RGRAVGSVSW	VELKKAISTL	TNPPAPK			

FIGURA 21. Secuencia completa de la proteína CIC-K2 de *Rattus Norvegicus*, en verde la cobertura del 6.5% que tuvieron los 3 péptidos secuenciados.

RESULTADOS DEL ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS

Se hizo un BLAST (Herramienta básica de búsqueda de alineación local) para alinear y comparar las secuencias de CIC-K1 (Adachi 1994; CIC-K1¹), la variante de la proteína CIC-K1 (Kieferle 1994; CIC-K1²) y la secuencia de la proteína CIC-K2 (Adachi 1994) con los péptidos obtenidos (Figura 22)

C1C-K1¹ MEELVGLREG SSGKPVTLQE LWGPCPRIRR GVRRGLEWLK ERLFRVGEDW HFLVALGVLM ALISYAMNFA
 C1C-K1² MEELVGLREG SSGKPVTLQE LWGPCPRIRR GVRRGLEWLK ERLFRVGEDW HFLVALGVLM ALISYAMNFA
 C1C-K2 MEEIVGLREG SPRKPVPLQE LWRPCPRIRR NIQGSLEWLK ERLFRVGEDW YFLVALGVLM ALISYAMNFA
 1 DA DB 70

C1C-K1¹ IGRVVRAHKW LYREVGDGHL LRYLSWTVYP VALLSFSSGF SQSISPFSSG SGLPELKTML SGVVLEDYLD
 C1C-K1² IGRVVRAHKW LYREVGDGHL LRYLSWTVYP VALLSFSSGF SQSISPFSSG SGLPELKTML SGVVLEDYLD
 C1C-K2 IGRVVRAHKW LYREIGDGHL LRYLSWTVYP VALLSFSSGF SQSITPSSGG SGIPEVKTIL TGVILEDYLD
 71 DC DD 140

C1C-K1¹ IKNFGAKVVG LSCTLATGST IFLGKVGPFV HLSVMISAYL GRVRAKTIGE TENKAKEIEM LSAAAAVGVA
 C1C-K1² IKNFGAKVVG LSCTLATGST IFLGKVGPFV HLSVMISAYL GRVRAKTIGE TENKAKEIEM LSAAAAVGVA
 C1C-K2 IKNFGAKVVG LSCTLATGST IFLGKLGPFV HLSVMIAAYL GRVRTKTIVGE PENKTKEMEL LAAGAAGVA
 141 DE DF DG 210

C1C-K1¹ TVFAAPFSGV LFSIEVMSSH FSVWNYWRGF FAATCGAFMF RLLGVFNSEQ ETITSYKTR FRVDVPFDLP
 C1C-K1² TVFAAPFSGV LFSIEVMSSH FSVWNYWRGF FAATCGAFMF RLLGVFNSEQ ETITSYKTR FRVDVPFDLP
 C1C-K2 TVFAAPISGV LFSIEVMSSH FSVWDYWRGF FAATCGAFMF HLLAVFNSEQ ETITSYKTS FPVDIPFDLP
 211 DR DI 280

C1C-K1¹ EIFFFVALGF ICGVLSLAYL FCQRTFLRFI KTNRYTSRLL ATSKPSYAAL VALVLAITY PPGVGRFMAS
 C1C-K1² EIFFFVALGF ICGVLSLAYL FCQRTFLRFI KTNRYTSRLL ATSKPSYAAL VALVLAITY PPGVGRFMAS
 C1C-K2 EIFFFVALGA ICGILSCGYN YCQRISLFFL KSNQFTSKLL ATSKPLYSAL AAVVLAITY PPGVGRFMAS
 281 DJ DK 350

C1C-K1¹ RLSMAEHLHS LFDNNSWALM TRNSSPPWPA EDDPQNLWLE WCHPRFTIFG TLAFFLVMKF WMLILATTIP
 C1C-K1² RLSMAQHLHS LFDNNSWALM TRNSSPPWPA DADDPQNLWLE WCHPRFTIFG TLAFFLVMKF WMLILATTIP
 C1C-K2 RLSMSEYLET LFDNNSWALM TKNSSPPWSA EPDPQNLWLE WCHPQMTVFG TLVFFLVMKF WMLILATTIP
 351 DL DM 420

C1C-K1¹ MPAGYFMPIF IIGAAIGRLL GEALSVAFPE GIVAGREVNP IMPGGYALAG AAAPSGAVTH TISTALLAFE
 C1C-K1² MPAGYFMPIF IIGAAIGRLL GEALSVAFPE GIVAGREVNP IMPGGYALAG AAAPSGAVTH TISTALLAFE
 C1C-K2 IPAGYFLPIF VYGAAIGRLF GEVLSLAFPE GIVAGGKVP IMPGAYALAG AAAPSGAVTH TLSTALLAFE
 421 DN DO DD DF 490

TLLAK
 C1C-K1¹ LTGQIVHALP VLMAVLAANA ISQNCQPSFY DGTIMAKKLP YLPRIIRGRQI GSYPTVEHF MNCNLITLAK
 C1C-K1² LTGQIVHALP VLMAVLAANA ISQNCQPSFY DGTIMAKKLP YLPWIRGRQI GSYPTVEHF MNCNLITLAK
 C1C-K2 VSGQIVHALP VLMAVLAANA ICQSYQPSFY DGTIIVKKLP YLPWIRGRKI GSHLVTVGHF MNCTLITLAK
 491 DQ DR 560

DTPLEEVVKV VISTEVSQYP LVETRESQTL VGIVERTHLV QALQTOP
 DTPLEEVVKV VISTEVSQYP LVETRESQTL VGIVERTHLV QALQTOP QALQTOP APGQERFL
 C1C-K1¹ DTPLEEVVKV VISTEVSQYP LVETRESQTL VGIVERTHLV QALQTOP APGQERFLQD ILAGGCPTQP
 C1C-K1² DTPLEEVVKV VISTEVSQYP LVETRESQTL VGIVERTHLV QALQTOP ASW APGQERFLQD ILAGGCPTQP
 C1C-K2 DMPLEEVKIV VISTDVTQYP LVETTESQVL VGIVKRTHLV QSLHTDSASW APGQPCLOD ILANGCPTQP
 561 630

LQLSPETS LYQAHSLFER LTLQSLFVTS RGVAVGSVSW AELKKAISTL IN
 VIKKAISTL INPPAPK
 C1C-K1¹ VTLQSPETS LYQAHSLFER LTLQSLFVTS RGVAVGSVSW AELKKAISTL INPPAPK
 C1C-K1² VTLQSPETS LYQAHSLFER LTLQSLFVTS RGVAVGSVSW AELKKAISTL INPPAPK
 C1C-K2 VTLQLSTETS LHETHNLFEL LNLQLLFVTS RGRAVGSVSW VELKKAISTL INPPAPK
 631 687

Figura 22. Se muestra alineación de la primera secuencia obtenida de la proteína CIC-K1 (Adachi 1994; CIC-K1¹), la variante de la proteína CIC-K1 (Kieferle 1994; CIC-K1²) y la secuencia de la proteína CIC-K2 (Adachi 1994). Las diferencias entre las secuencias obtenidas por Adachi y Kieferle es de 9 aminoácidos subrayados en

amarillo. Los péptidos secuenciados que mostraron una similitud del 100% con CIC-K1² se muestran en color rojo. Los péptidos con similitud del 100% con CIC-K2 se muestran en color azul. Dorado; epítipo de anticuerpo anti CIC-K1 (Santa Cruz) 549-600. Morado; epítipo de anticuerpo anti CIC-K (Chemicon- Alomone; similar al usado por Vandevale 1997) 674-687. Amarillo; epítipo usado por Uchida 93 604-618.

IX. DISCUSIÓN

Este trabajo se enfocó en dilucidar la existencia de un canal aniónico CIC-K en IMCD. La pregunta se generó haciendo experimentos con el canal catiónico activado por hiperpolarización y modulado por nucleótidos cíclicos (HCN2) (Bolivar 2008) en cultivos celulares de IMCD renal, donde al hacer una colocalización de HCN2 con la Bomba Sodio-Potasio-ATPasa y CIC-K1 en papila de la médula interna se observó un resultado inesperado; la existencia de inmunoreactividad de CIC-K1 en IMCD no descrita previamente (Figura 13). Este resultado de reactividad de CIC-K1 en IMCD fue la primera pista de la presencia de un canal CIC-K que se expresaba en IMCD, por lo que, basados en esta observación y teniendo en cuenta que CIC-K1 es un canal que tiene conductividad a HCO_3^- remontamos a las observaciones dos décadas atrás en la membrana basolateral en células de IMCD donde Stanton;1989, Imai y Yoshitomi; 1990 observan una conductancia a HCO_3^- en la membrana basolateral y apical en IMCD, posteriormente a estas observaciones en nuestros estudios electrofisiológicos en cultivos primarios de IMCD se encontró una corriente aniónica (I_{ovt}) que mostraba una similar conductancia a HCO_3^- y a Cl^- como lo habían observado Stanton, Imai y Yoshitomi. Esta corriente no era mediada por el canal transmembrana regulador de la fibrosis quística (CFTR) a pesar de ser permeable a HCO_3^- ya que en células de IMCD muestran corrientes salientes y no son sensibles a bloqueo por DIDS externo. Tampoco parece ser mediadas por canales de calcio (CaC) aunque estos en células de cultivo primario de IMCD, median corrientes salientes pero son pobremente conductoras a HCO_3^- . I_{ovt} pudo ser bloqueada por DIDS (Sal disódica del ácido 4,4'-diisotiocianatostilbena-2,2-disulfónico) (1mM) o por furosemida (1 mM), que se ha descrito bloquean a los canales CIC-K1 y a los canales CaC (Uchida 1995; Waldegger 2000-2002). Pero se observó que en la secuencia de conductividad en ausencia de HCO_3^- la sustitución parcial de Cl^- extracelular por Br^- , I^- y NO_3^- mostraba una secuencia de conductividad $\text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{I}^- > \text{NO}_3^-$, que es diferente a la observada en las corrientes mediadas por canales CaC, las cuales exhiben una secuencia de conductividad $\text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^-$ (Boese, 2000). Sumado a esto,

las corrientes de CaC muestran una sensibilidad opuesta a pH externo, opuesta a lo observado en I_{ovt} . Debido a esto, I_{ovt} no podía ser mediada por canales CaC ni CFTR, ya que las corrientes generadas por los canales CFTR son corrientes independientes tanto del tiempo como del voltaje, además exhiben una secuencia de conductividad I->Br->Cl- (Husted, 1995). Por otro lado, mientras que la dependencia al voltaje en el tiempo y la sensibilidad a pH, Ca^{2+} (Figura 11), DIDS y furosamida de I_{ovt} asemejan a corrientes mediadas por el canal CIC-K1 (Uchida et al, 1993; 1995; Waldegger y Jentsh, 2000; Uchida y Sasaki, 2005). I_{ovt} difiere de la corriente de CIC-K1 en la secuencia de conductividad (Br->NO₃⁻>Cl->I-) (Figura 12). Sin embargo, basados en su sensibilidad a pH y Ca^{2+} externo (Gráfica 2) se propuso que I_{ovt} es mediado por un canal CIC-Kx no descrito previamente.

Los resultados inmunocitoquímicos y electrofisiológicos nos sugieren la existencia de un canal con características del tipo CIC-K en la membrana basolateral de IMCD por lo que para dilucidar estos resultados diseñamos una serie de experimentos de Western Blot utilizando el anticuerpo comercial policlonal anti CIC-K1 (Santa Cruz Laboratories) en muestras de células de cultivo primario de IMCD, médula interna e IMCD. Los resultados obtenidos mostraron dos bandas alrededor de 75KDa (Figura 8) siendo este el peso molecular de las proteínas tipo CIC-Ks (Uchida, 2005). Estos resultados contrastan con los de Pannabecker (Pannabecker, 2004), que haciendo estudios de inmunohistoquímica en papila renal utilizando un anticuerpo policlonal comercial anti-CIC-K (Alomone), no observa inmunoreactividad de CIC-K en IMCD (Figura 8). Para aclarar esta discrepancia en los resultados hicimos un Western Blot de IMCD utilizando el mismo anticuerpo que había usado Pannabecker en 2004 y el resultado fue la observación de dos bandas alrededor de los 75KDa (Figura 14) lo que nos hace suponer que Pannabecker no logró ver reactividad de CIC-K en IMCD debido a que el corte que hace podría ser en una zona muy apical de la papila renal en IM. Esta discrepancia en las observaciones también fue vista en resultados de RT-PCR (Uchida, 1993; Adachi, 1994; Vandewalle, 1997) donde muestran expresión de CIC-K1 y CIC-K2 en IMCD pero no dan una discusión de la observación (Figura 4, 5, 6 y 7).

Para confirmar la presencia del canal CIC-K en IMCD cortamos las 2 bandas (Figura 16 y 17) que mostraron reactividad alrededor de los 75KDa con el anticuerpo anti-CIC-K1 (Santa Cruz) y fueron llevadas a secuenciar esperando se encontraran secuencias de péptidos pertenecientes a las proteínas de tipo CIC-K. De la banda 1 (Tabla 1; Figura 18 y 19) se lograron secuenciar 16 péptidos que poseen una identidad del 100% con CIC-K1 pero también se obtuvo 1 péptido que presenta una identidad del 100% con CIC-K2 (Tabla 1). El péptido que tiene coincidencia del 100% con CIC-K2 difiere en 4 aminoácidos con CIC-K1 (³¹⁹LLATSKPLYSALAAVVLASITYPPGVGR³⁴⁶). También se obtuvo la secuencia del epítipo que corresponde al anticuerpo anti CIC-K de Santa Cruz (549-600aa) y el epítipo del anticuerpo anti CIC-K de Alomone, éste altamente específico contra un epítipo de CIC-K2 de rata (674-687aa). El epítipo es casi homólogo al canal CIC-K1, por lo que el anticuerpo reconoce ambas isoformas de CIC-K (<http://www.alomone.com/p/anti-clc-k/acl-004/681>) (Figura 16). En total se logró una cobertura del 34% de la secuencia de la proteína CIC-K1 (UniProtKB-Q06393-CLCKA_RAT) y un 5% de la secuencia de la proteína CIC-K2 (UniProtKB - P51802-CLCKB_RAT). De la Banda 2 (Tabla 2; Figura 20 y 21) logramos obtener 13 péptidos que tienen identidad del 100% con CIC-K1 y 3 péptidos que presentan 100% de identidad con CIC-K2 (¹⁸⁷TVGEPENKTK¹⁹⁶³¹⁹LLATSKPLYSALAAVVLASITYPPGVGR³⁴⁶⁵²⁸KLPYLPWIR⁵³⁷). En total se logró una cobertura del 30% de la secuencia de la proteína CIC-K1 y un 6.5% de la secuencia de la proteína CIC-K2. Como en Banda 1 también se lograron obtener las secuencias epítipo de los anticuerpos anti CIC-K1 (Santa Cruz) y anti CIC-K (Alomone) (Figura 22)

Si, en médula interna renal, el único canal CIC-K que se expresa es CIC-K1 en tAHL (Uchida, 1993; Mejia, 2002; Pannabecker, 2004) los resultados obtenidos hablan de la existencia de un canal CIC-Kx que se expresa en la membrana basolateral de las células en cultivo primario de IMCD que sugerimos podría estar formado por péptidos tanto de CIC-K1 como de CIC-K2 pudiendo ser un nuevo canal CIC-K. Tanto por estos resultados, como por la diferencia que existe en la secuencia de

conductividad grabada en IMCD que no correspondía ni a CIC-K1 ni a CIC-K2, se propone la presencia de un nuevo canal no identificado **CIC-Kx** que podría estar involucrado en el mecanismo de concentración urinaria.

Cuando el riñón pasa de un estado de diuresis a un estado de antidiuresis, la concentración de solutos en el intersticio medular interno aumenta continuamente durante pocas horas (Gamba 2004; Jamison 1992). Puede proponerse que el transporte de Na^+ y Cl^- desde tAHL proporciona la base para un incremento temprano en la concentración de Na^+ y Cl^- del intersticio medular interno (Fenton 2007). Por lo que, durante la fase temprana de una antidiuresis aguda, las células del IMCD son expuestas a una osmolaridad intersticial que se incrementa lentamente (Beck 1992; Sone 1993). Se ha propuesto que, en esta situación, ocurre un influjo de Na^+ y Cl^- a través de la membrana basolateral de las células de IMCD que permite un rápido equilibrio osmótico células-intersticio, con cambios mínimos y pasajeros en el volumen celular (Grunewald 1994; Sone 1993; Sun 1989). Este influjo de Na^+ y Cl^- puede proporcionar, a las células del IMCD, la fuerza osmótica necesaria para impulsar el influjo osmótico de agua estimulado por ADH, que ocurre a nivel de la membrana apical. Se propone que el influjo de Na^+ mencionado puede ser mediado por un canal HCN localizado en la membrana basolateral de las células del IMCD y que dicho influjo de Na^+ es acompañado por un influjo aniónico mediado por una conductancia a HCO_3^- mediada por una canal CIC-K de un tipo no descrito (CIC-Kx), localizado en la membrana basolateral de las células del IMCD.

Las evidencias electrofisiológicas, inmunohistoquímicas y los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten proponer la existencia de un canal de tipo CIC-K que se expresa en la membrana basolateral de células del IMCD “in situ” y que muestra una conductividad similar a Cl^- y a HCO_3^- . (Figura 23)

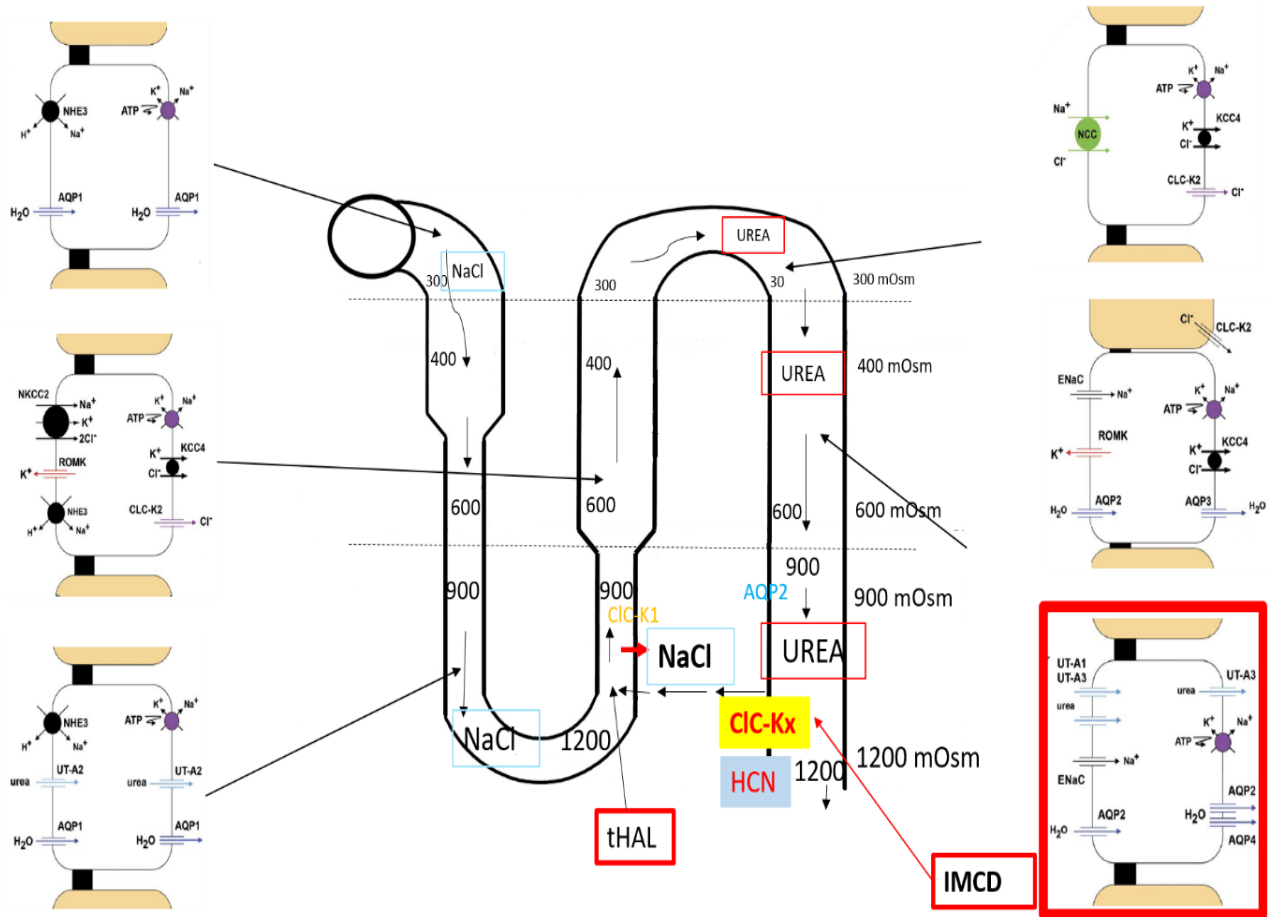


Figura 23. Visión general esquemática de los túbulos renales en el riñón de mamíferos. Se muestra el cuadro azul con letras rojas un canal de tipo HCN y en el cuadro amarillo con letras rojas la localización del canal CIC-Kx. Se propone que el transporte de Na^+ a través de la tHAL es mediado por un canal catiónico tipo HCN, y que el transporte de Na^+ y Cl^- a través de la membrana basolateral del IMCD es mediado por un canal HCN para Na^{2+} (Bolívar, 2011; No publicado) y por el canal aniónico tipo CIC-Kx para Cl^- que se identificó en esta investigación. (Imagen modificada de Fenton 2007)

X. CONCLUSIÓN

Se concluye la presencia de un canal tipo CIC-K ubicado en la membrana basolateral de las células de IMCD, que muestra una conductividad similar a Cl^- y a HCO_3^- y que podría participar en el mecanismo de concentración urinaria.

Los péptidos secuenciados en esta investigación de la proteína CIC-Kx prueban la existencia de un canal CIC-K en IMCD pero si se logra obtener la secuencia completa de la proteína podríamos comprobar la presencia de un tipo no descrito de proteína CIC-K, pudiendo llegar a ser una proteína CIC-K3. Por lo que este proyecto puede ser el inicio para ampliar el conocimiento sobre la diversidad de proteínas CIC-K que se expresan en el riñón de mamíferos.

XI. LITERATURA CITADA

Adachi S, Uchida S, Ito H, Hata M, Hiroe M, Marumo F, Sasaki S. Two isoforms of a chloride channel predominantly expressed in thick ascending limb of Henle's loop and collecting ducts of rat kidney. *J Biol Chem* 269: 17677-17683, 1994.

Akizuki N, Uchida S, Sasaki S, Marumo F. Impaired solute accumulation in inner medulla of *Clenk1*^{-/-} mice kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 280:F79-F87, 2001.

Beck FX, Schmolke M, Guder WG, Dörge A, Thurau K. Osmolytes in renal medulla during rapid changes in papillary tonicity. *Am J Physiol. Renal Physiol* 262:F849-F856, 1992.

Boese SH, Aziz O, Simmons NL, Gray MA. Kinetics and regulation of a Ca²⁺-activated Cl conductance in mouse renal inner medullary collecting duct cells. *Am J Physiol Renal Physiol*.286: F682-F692. 2004.

Bolivar JJ, Tapia D, Arenas G, Castañon-Arreola M, Torres H y Galarraga E. A hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated, (I_h-like) cationic current and HCN gene expression in renal inner medullary collecting duct cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008.

Bolívar JJ, Lara-Figueroa CO, Arenas G, Tapia D, Martínez-Mayorquin RH, Monroy-Romero F, Méndez-Pérez P, Malagón J, Galarraga E. A chloride conductance exhibiting bicarbonate conductivity in renal inner medullary collecting duct cells. *Pflügers Arch* (not submitted), 2011.

Escobar LI, Martínez-Téllez JC, Salas M, Castilla SA, Carrisoza R, Tapia D, Vázquez M, Bargas J, Bolívar JJ. A voltage-gated K_v current in renal inner medullary collecting duct cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C965–C974, 2004.

Fenton RA and Knepper MA. Urea and renal function in the 21st century: insights from Knockout mice. *J Am Soc Nephrol* 18:679-688, 2007.

Fenton RA, Fou CL, Steward GS, Smith CP, Knepper MA. Urinary concentrating defect in mice with selective deletion of phloretin-sensitive urea transporters in the renal collecting duct. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:7469-7474, 2004.

Gamba G, Knepper MA. Urine concentration and dilution. In: Brenner and Rector's *The Kidney (7th Ed.)*. Brenner BM (Ed.). Saunders, Philadelphia p. 599-636.2004.

Grunewald JM, Grunewald RW, Kinne RKH. Regulation of ion content and cell volume in isolated rat renal IMCD cells under hypertonic conditions. *Am J Physiol Renal Physiol* 267:F13-F19, 1994.

Husted RF, Volk KA, Sigmund RD, Stokes JB. Anion secretion by the inner medullary collecting duct. Evidence for involvement of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Clin Invest.* 95:644-650.1995.

Imai M and Yoshitomi K. Electrophysiological study of inner medullary collecting duct of hamsters. *Pflügers Arch* 416: 180-188, 1990.

Jamison RL, Gehring JJ. Urinary concentration and dilution. IN: *Handbook of Physiology. Renal Physiology*. Windhager EE (Ed.). Oxford University Press, New York, 1992, p. 1217-1279.

Knepper MA, Saidel GM, Hascall VC, Dwyer T. Concentration of solutes in the renal inner medulla: interstitial hyaluronan as a mechano-osmotic transducer. *Am J Physiol Renal Physiol* 284:F433-F446,2003.

Kristen Y. Westrick, Bradley Serack, William H. Dantzler, Thomas L. Pannabecker. Axial compartmentation of descending and ascending thin limbs of Henle's loops. *Am J Physiol Renal Physiol*.F308–F316. 2013.

Matsumura Y, Uchida S, Kondo Y, Miyazaki H, Ko SB, Hayama A, Morimoto T, Liu W, Arisawa M, Sasaki S, Marumo F. Overt nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking the CLC-K1 chloride. 1999.

Markovic S., Dutzler R. The structure of the cytoplasmic domain of the chloride channel ClC-ka reveals a conserved interaction interface. *Structure* 15 715–725. (2007).

Mejia R,Wade JN (2002). Immunomorphometric study of rat renal inner medulla. *Am J Physiol Renal Physiol*.282: F553–F557. 2002.

Nielsen S, Frokiaer F, Marples D, Kwon T-H, Agre P and Knepper MA. Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. *Physiol Rev* 82:205-244, 2002.

Pannabecker TL, Abbot DE, Dantzler WH. Three-dimensional functional reconstruction of inner medullary thin limbs of Henle's loop. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: F38-F45. 2004.

Sone M, Albrecht GJ, Dörge A, Thurau K, Beck FX. Osmotic adaptation of renal medullary cells during transition from chronic diuresis to antidiuresis. *Am J Physiol Renal Physiol* 264:F722-F729, 1993.

Sun A and Hebert SC. Rapid hypertonic cell volume regulation in the perfused inner medullary collecting duct. *Kidney Int* 36:831-842, 1989.

Stanton B. Characterization of apical and basolateral membrane conductances of rat inner medullary collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 256: F862-F868, 1989.

Uchida S and Sasaki S. Function of chloride channels in the kidney. *Annu Rev Physiol* 67:759-778, 2005.

Uchida S, Sasaki S, Furukawa T, Hiraoka M, Imai T, Hirata Y, and Marumo F. Molecular cloning of a chloride channel that is regulated by dehydration and expressed predominantly in kidney medulla. *J Biol Chem* 268:3821-3824, 1993.

Uchida S, Sasaki S, Nitta K, Uchida K, Horita s, Nihei H and Marumo F. Localization and functional characterization of rat kidney-specific chloride channel, ClC-K1. *J Clin Invest* 95:104-113, 1995.

Vandewalle A, Cluzeaud F, Bens M, Kieferle S, Steinmeyer K, Jentsch TJ. Localization and induction by dehydration of ClC-K chloride channels in the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 272:F678-F688.1997.

Waldegger S and Jentsch TJ. Functional and structural analysis of ClC-K chloride channels involved in renal disease. *J Biol Chem* 275:24527-24533, 2000.

Waldegger S, Jeck N, Barth P, Peters M, Vitzthum H, Wolff K, Kurtz A, Konrad M and Seyberth HW. Barttin increases surface expression and change current properties of ClC-K channels. *Pflugers Arch* 444: 411-418, 2002.