



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Regulación de canales HCN por dietas de potasio en el riñón  
y su identificación en mitocondrias**

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**Doctora en Ciencias**

PRESENTA

**Guadalupe Teresa Padilla Flores**

DIRECTORA DE TESIS  
**Dra. Laura Escobar Pérez**  
Facultad de Medicina, UNAM

COMITÉ TUTOR  
**Dra. Claudia Treviño Santa Cruz**  
Instituto de Biotecnología, UNAM  
**Dr. Armando Tovar Palacio**  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas  
y Nutrición Salvador Zubirán

Ciudad Universitaria, CD. MX. Abril de 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

---

## RECONOCIMIENTOS

---

### JURADO

PRESIDENTE	Dra. Yolanda Irasema Chirino López
SECRETARIO	Dra. Leonila Irma Laura Escobar Pérez
VOCAL	Dr. José Ramón Paniagua Sierra
VOCAL	Dra. Ma. del Carmen Beltrán Núñez
VOCAL	Dra. Ana Cecilia Zazueta Mendizábal

El presente proyecto se realizó en el Laboratorio de Canales Iónicos de la Dra. Laura Escobar Pérez, perteneciente al Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina, UNAM.

El financiamiento para el desarrollo de esta tesis fue proporcionado por:

- Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM, proyecto de investigación PAPIIT IN224919.
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), proyecto de investigación A1-S-8731 y beca de doctorado 289190.

---

## AGRADECIMIENTOS

---

A mi tutora, Dra. Laura Escobar Pérez, por su confianza y apoyo para el desarrollo de este proyecto, así como por las lecciones de vida.

A los miembros de mi Comité tutor, Dra. Claudia Treviño y Dr. Armando Tovar, por supervisar mi progreso y motivarme para mejorar mi trabajo de investigación.

A la M. en C. Carolina Salvador Hernández, técnico de nuestro laboratorio, por su asesoría y gran disposición para facilitar nuestro trabajo.

A la Dra. Zinaeli López González, la M. en C. Erika Gutiérrez Vásquez, el Dr. Daniel León Aparicio y la M. en C. Carolina Salvador Hernández, por su asistencia experimental en alguna etapa del proyecto y por motivarme a seguir adelante a pesar de los obstáculos.

A la M. en C. María José Gómora, por su supervisión técnica durante el uso del microscopio confocal ubicado en el laboratorio del Dr. Enrique Pedernera en la Facultad de Medicina.

Al Dr. Emiliano Aparicio Trejo y al Dr. Alfredo Briones Herrera, por su ayuda durante los experimentos de función mitocondrial, realizados en el Laboratorio del Dr. José Pedraza Chaverri en la Facultad de Química.

Al Dr. Dario Alessi por permitirme realizar una estancia de investigación en su laboratorio.

A los investigadores que me inspiraron y apoyaron de alguna manera para hacer realidad el sueño de concluir mis estudios de doctorado: Dr. José Pedraza Chaverri, Dr. Luis Vaca Domínguez, Dra. Maricarmen Cárdenas Aguayo.

A mis compañeros presentes y pasados de laboratorio, con quienes compartí momentos de trabajo, convivencia y aprendizaje: Zina, Caro, Clau, Eri, Dani, Bety, Lili y Rolando.

A la familia Herroz: Estelita, Azu y Paty, por acogerme en su hogar durante todos estos años. Gracias por su cariño y paciencia.

---

## DEDICATORIA

---

A mi querida mamá, Concepción Padilla Flores

A mi gran maestro y amigo, Salvador Valencia Valencia

---

## ÍNDICE

---

<b>Abreviaturas</b> .....	<b>7</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>8</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>10</b>
1. Homeostasis de potasio .....	10
1.1. Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPasa.....	12
1.2. Canales de potasio .....	14
1.3. Cotransportadores NKCC y KCC.....	18
1.4. Alteraciones de la homeostasis de potasio.....	19
1.5. Importancia del potasio en la dieta .....	23
2. Fisiología renal.....	25
2.1. Transporte renal relacionado con sodio y potasio.....	29
2.1.1. Túbulo proximal	
2.1.2. Rama gruesa ascendente del asa de Henle	
2.1.3. Túbulo contorneado distal	
2.1.4. Nefrona distal sensible a aldosterona	
2.2. Balance ácido-base y transporte renal de amonio.....	36
2.3. Papel del riñón en la homeostasis de potasio .....	40
2.3.1. Respuestas renales ante una dieta con potasio alto	
2.3.2. Respuestas renales ante una dieta con potasio deficiente	
3. Canales iónicos.....	45
3.1. Canales HCN .....	46
3.1.1. Estructura, propiedades biofísicas y regulación	
3.1.2. Canales HCN en corazón	
4. Mitocondrias .....	51
4.1. Funciones mitocondriales .....	51
4.1.1. Fosforilación oxidativa	
4.1.2. Producción de especies reactivas del oxígeno	
4.2. Mitocondrias de corazón .....	55
4.2.1. Canales de potasio en mitocondrias de corazón	
<b>Planteamiento del problema y Justificación</b> .....	<b>58</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>59</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>60</b>
<b>Metodología</b> .....	<b>61</b>
1. Animales y líneas celulares .....	61

1.1. Experimentos con dietas de potasio en ratas	
1.2. Células HEK293 y H9c2	
2. Ensayos de Western blot .....	61
3. Ensayos de Inmunofluorescencia .....	64
4. Enriquecimiento de mitocondrias .....	65
5. Ensayos de función mitocondrial en cardiomiocitos .....	67
<b>Resultados .....</b>	<b>69</b>
Sección I. Canales HCN2 y HCN4 en el riñón de rata	
1. Localización en la corteza y médula externa renal .....	69
1.1. Canal HCN2	
1.2. Canal HCN4	
2. Regulación por dietas de potasio .....	75
2.1. Inmunoblots del canal HCN2	
2.2. Inmunoblots del canal HCN4	
2.3. Inmunofluorescencias de los canales HCN2 y HCN4 .....	78
Sección II. Canales HCN en mitocondrias	
1. Expresión del canal HCN4 en células HEK293 .....	83
1.1. Inmunodetección del canal HCN4 en mitocondrias	
2. Canales HCN en mitocondrias de corazón .....	84
2.1. Inmunodetección en tejido cardiaco de rata	
2.2. Ensayos de función mitocondrial en cardiomiocitos	
<b>Discusión de resultados .....</b>	<b>89</b>
Sección I. Canales HCN2 y HCN4 en el riñón	
1. Localización en la corteza y médula externa renal .....	89
1.1. Canal HCN2	
1.2. Canal HCN4	
2. Regulación por dietas de potasio .....	94
2.1. Inmunoblots del canal HCN2	
2.2. Inmunoblots del canal HCN4	
2.3. Inmunofluorescencias de los canales HCN2 y HCN4	
Sección II. Canales HCN en mitocondrias	
2. Canales HCN en mitocondrias de corazón .....	102
2.1. Inmunodetección en tejido cardiaco de rata	
2.2. Ensayos de función mitocondrial en cardiomiocitos	
<b>Conclusiones .....</b>	<b>107</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>108</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>133</b>

---

## Abreviaturas

---

A continuación se listan las abreviaturas que se usan en más de un apartado de la tesis. El resto se indican en su primera aparición en el texto.

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>	<b>Traducción</b>
<b>AE1</b>	Anion Exchanger type 1	Intercambiador aniónico tipo 1
<b>AQP2</b>	Aquaporin 2	Acuaporina 2
<b>AMPc</b>	Adenosine Monophosphate (cyclic)	Adenosina monofosfato cíclico
<b>ASDN</b>	Aldosterone Sensitive Distal Nephron	Nefrona distal sensible a aldosterona
<b>ATP</b>	Adenosine Triphosphate	Adenosina trifosfato
<b>BBM</b>	Brush Border Membrane	Membrana de borde de cepillo
<b>BK</b>	Big conductance K <sup>+</sup> (channel)	Canal de K <sup>+</sup> de conductancia grande
<b>CNBD</b>	Cyclic Nucleotide Binding Domain	Dominio de unión a nucleótidos cíclicos
<b>CNT</b>	Connecting Tubule	Túbulo conector
<b>CCD</b>	Cortical Collecting Duct	Conducto colector cortical
<b>CD</b>	Collecting Duct	Conducto colector
<b>DCT</b>	Distal Convoluted Tubule	Túbulo contorneado distal
$\Delta\Psi_m$	Potencial de la membrana mitocondrial	
<b>ENaC</b>	Epithelial Na <sup>+</sup> Channel	Canal epitelial de Na <sup>+</sup>
<b>HCN</b>	Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (channel)	Canal activado por hiperpolarización y regulado por nucleótidos cíclicos
<b>NCC</b>	Na <sup>+</sup> -Cl <sup>-</sup> Cotransporter	Cotransportador Na <sup>+</sup> -Cl <sup>-</sup>
<b>NHE3</b>	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Exchanger type 3	Intercambiador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> tipo 3
<b>NKCC2</b>	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , 2Cl <sup>-</sup> Cotransporter type 2	Cotransportador Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , 2Cl <sup>-</sup> tipo 2
<b>OMCD</b>	Outer Medullary Collecting Duct	Conducto colector de la médula externa
<b>OXPHOS</b>	Oxidative Phosphorylation	Fosforilación oxidativa
<b>PCT</b>	Proximal Convoluted Tubule	Túbulo contorneado proximal
<b>PST</b>	Proximal Straight Tubule	Túbulo recto proximal
<b>ROMK</b>	Renal Outer Medullary K <sup>+</sup> (channel)	Canal de K <sup>+</sup> de la médula externa renal
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species	Especies reactivas del oxígeno
<b>TAL</b>	Thick Ascending Limb (of Henle's loop)	Rama gruesa ascendente (del asa de Henle)
<b>V-ATPasa</b>	Vacuolar H <sup>+</sup> ATPasa	H <sup>+</sup> ATPasa vacuolar

### Otras abreviaturas

<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcio	<b>KA</b>	K <sup>+</sup> alto
<b>Cl<sup>-</sup></b>	Cloruro	<b>KD</b>	K <sup>+</sup> deficiente
<b>H<sup>+</sup></b>	Hidrogenión, protón	<b>Na<sup>+</sup></b>	Sodio
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Bicarbonato		
<b>K<sup>+</sup></b>	Potasio		

---

## RESUMEN

---

La expresión de los canales activados por hiperpolarización y regulados por nucleótidos cíclicos (HCN), los cuales son catiónicos no selectivos, se ha descrito principalmente en cerebro y corazón, pero también se ha reportado en otros órganos, entre ellos, el riñón. En nuestro laboratorio, previamente se estableció la localización de los canales HCN1, HCN2 y HCN3 en diferentes segmentos de la nefrona, y se encontró que participan en el balance de sodio ( $\text{Na}^+$ ) y ácido-base.

La primera sección de la tesis se enfoca al estudio de los canales HCN2 y HCN4, tanto su localización en corteza y médula externa del riñón de rata, como su regulación en estas regiones renales tras someter a los sujetos experimentales a una dieta con potasio ( $\text{K}^+$ ) alto (KA) o deficiente (KD). Por ensayos de inmunofluorescencia se localizó al canal HCN2 en el túbulo conector (CNT) y conducto colector; adicionalmente, se observó en glomérulos y grandes vasos en la corteza, así como en células del compartimento intersticial tanto en corteza como en médula externa. Por su parte, el canal HCN4 se localizó en el túbulo proximal contorneado y recto, la rama gruesa ascendente del asa de Henle, así como en las células  $\alpha$ -intercaladas del CNT y conductos colectores de corteza (CCD) y médula externa (OMCD). Por ensayos de Western blot, se inmunodetectó al canal HCN2 en su forma completa no glicosilada (~100 kDa); la dieta KD no afectó de manera significativa su abundancia, mientras que la dieta KA indujo su regulación a la baja en corteza, pero su regulación a la alta y glicosilación en médula externa. En los inmunoblots de HCN4 se detectaron fragmentos del canal a 95 y 70 kDa aproximadamente, los cuales se regularon significativamente solo por la dieta KA y de manera diferencial entre regiones renales. Ya que ambos canales se localizan en más de un segmento tubular y/o tipo celular en las regiones renales de estudio, no fue posible establecer una correlación directa. Por lo tanto, a través de ensayos de inmunofluorescencia se obtuvieron resultados más específicos. La marca inmunofluorescente de HCN2 en las células de CNT y las células principales de CCD y OMCD, se incrementó por la dieta KA, lo cual sugiere la participación del canal en la entrada de  $\text{Na}^+$  a dichas células, favoreciendo así el gradiente electroquímico para la secreción de  $\text{K}^+$  en la nefrona distal. Sin embargo, ya que el aumento de HCN2 es predominantemente intracelular, éste podría corresponder al canal localizado en las mitocondrias, donde su función parece asociarse a la síntesis de ATP. Ésta última se requiere para sustentar la actividad elevada de la

$\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa y una mayor secreción de  $\text{K}^+$  en condiciones de KA. Respecto al canal HCN4, se observó un aumento de la intensidad inmunofluorescente en la membrana apical de las células  $\alpha$ -intercaladas del OMCD por la dieta KD. Esto es congruente con la participación del canal HCN4 en la entrada apical de  $\text{Na}^+$ , posiblemente acoplada a una mayor reabsorción de bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) en las células  $\alpha$ -intercaladas, la cual podría contribuir a la alcalosis metabólica que se desarrolla en condiciones de hipocalemia.

En la segunda sección de la tesis se presenta la inmunodetección del canal HCN4 en muestras enriquecidas en mitocondrias de células HEK293 transfectadas, lo cual es consistente con la gran cantidad de proteínas interactoras de origen mitocondrial previamente identificadas por espectrometría de masas. Además, se explora la expresión de las cuatro isoformas HCN en fracciones enriquecidas en mitocondrias de tejido cardiaco de rata. Se inmunodetectó a todos los canales HCN excepto a HCN1. El canal HCN3 se observó tanto en su forma completa como truncada en el amino terminal. Los canales HCN2 y HCN4 se inmunodetectaron a menor peso molecular del esperado, correspondientes a formas truncadas en el carboxilo terminal. Otra banda de HCN2 se observó a mayor peso molecular aparente con respecto al canal glicosilado reportado en cerebro, lo cual sugiere que en las mitocondrias sufre modificaciones postraduccionales distintas o adicionales. Finalmente, se estudió el efecto de un inhibidor específico de los canales HCN (ZD7288) sobre el potencial de membrana y respiración mitocondrial en cardiomiocitos (células H9c2). Respecto al primer parámetro, el bloqueo de los canales con ZD7288 provocó la hiperpolarización del potencial de membrana mitocondrial tras 30 y 60 min de incubación, lo cual sugiere que el canal permite la entrada de cationes, particularmente de  $\text{K}^+$  en condiciones basales, debido a que el gradiente electroquímico es muy favorable. Respecto al segundo parámetro, la incubación de los cardiomiocitos con ZD7288 redujo significativamente el índice de control respiratorio y el consumo de oxígeno asociado a la fosforilación oxidativa. Lo anterior apunta a que la inhibición de los canales HCN disminuye la síntesis de ATP, sin embargo, se desconoce el mecanismo molecular concreto y se requieren experimentos adicionales para confirmarlo.

---

## INTRODUCCIÓN

---

### 1. Homeostasis de potasio

El potasio ( $K^+$ ) es el catión intracelular más abundante; alrededor del 98% del  $K^+$  total corporal se encuentra dentro de las células (100-150 mM), donde participa en diversos procesos, incluyendo la regulación del volumen y pH celular, la síntesis de ADN y proteínas, el crecimiento celular y la actividad enzimática mitocondrial. Solo cerca del 2% restante de  $K^+$  se distribuye en el fluido extracelular, por lo tanto, los mecanismos para mantener la concentración plasmática de  $K^+$  dentro de un intervalo normal tan estrecho (3.5-5.0 mM), son indispensables. Además, el gradiente de  $K^+$  que se establece a través de la membrana plasmática, determina en gran medida el potencial de la membrana en reposo, que a su vez influye en la actividad de tejidos excitables como el sistema nervioso, corazón y músculo esquelético (Malnic et al. 2013; Satlin, 2009). De hecho, las manifestaciones clínicas de una alteración en la concentración plasmática de  $K^+$  son predominantemente cardíacas (e.g. arritmias) y neuromusculares (e.g. debilidad muscular, fasciculaciones en extremidades, parálisis) (Gennari, 1998; Palmer, 2010).

El consumo de  $K^+$  en la dieta se asocia con una respuesta integrada que involucra diversos órganos, incluyendo el intestino, hígado, músculo y riñón. El contenido de  $K^+$  en la dieta es muy variable (50-100 mmol/día); una sola comida representaría un peligro si el  $K^+$  permaneciera en el fluido extracelular. En consecuencia, la entrada de  $K^+$  a las células se activa de manera inmediata, mayoritariamente en los reservorios corporales del catión: músculo (~80%), hígado, hueso y eritrocitos. De esta manera, se evita el incremento de los niveles plasmáticos de  $K^+$  y se mantiene el **balance interno de  $K^+$** , es decir, su distribución adecuada entre los compartimentos extra- e intracelular (Malnic et al. 2013, Sahni et al. 2013; Satlin, 2009).

La insulina es el regulador fundamental del balance interno de  $K^+$ , pues su liberación postprandial favorece la entrada del  $K^+$  a las células, especialmente en hígado y músculo

esquelético. Esta respuesta es independiente de los efectos de la insulina sobre el metabolismo de la glucosa. La secreción de catecolaminas contribuye a la captación celular de  $K^+$  al actuar sobre los receptores  $\beta_2$  adrenérgicos (Palmer & Clegg 2019). Los efectos de la insulina y adrenalina son aditivos, lo cual sugiere que se asocian a vías de señalización independientes (Satlin, 2009). La aldosterona también estimula la entrada de  $K^+$ , sin embargo, su acción puede tomar más tiempo, en comparación con la inducida por insulina y catecolaminas (Koeppen & Stanton, 2013). La bomba de sodio ( $Na^+$ ) o  $Na^+/K^+$  ATPasa, es el blanco molecular más importante de las hormonas que inducen la entrada celular de  $K^+$ .

A largo plazo, el **balance externo de  $K^+$**  se logra igualando la entrada de  $K^+$  al organismo (a través de la dieta) con su salida por vía renal y gastrointestinal. Alrededor del 90% del  $K^+$  ingerido se absorbe en el intestino delgado, entra a la circulación y se conduce a los reservorios corporales de  $K^+$ , de donde se redistribuye progresivamente a la circulación hasta lograr su excreción por vía renal; parte del  $K^+$  ingerido (~10%) pasa al colon y se excreta a través de las heces. Por lo tanto, el riñón determina sustancialmente el balance externo del  $K^+$  (Mount & Zandi-Nejad, 2007; Palmer & Clegg, 2016b). Ante una reducción notable de la función renal (e.g. enfermedad renal crónica o de etapa final), se intensifica la contribución de los mecanismos adaptativos extrarenales, entre ellos, el aumento de la secreción de  $K^+$  a través del epitelio del colon (Clase et al. 2020).

Existe evidencia de un 'sensor de  $K^+$ ' a nivel gastrointestinal o de la circulación esplácica, cuya identidad aún se desconoce, que al detectar un aumento en la absorción del catión, induce una respuesta kaliurética, incluso antes de la alteración de los niveles de  $K^+$  en el plasma. Este sensor también es capaz de detectar un consumo reducido de  $K^+$  antes de que se registren cambios en el  $K^+$  extracelular, lo que permite disminuir tanto la captura celular de  $K^+$  como su excreción renal. Un control de este tipo (i.e. retroalimentación positiva), contribuye de manera anticipada y rápida a mantener la homeostasis de  $K^+$  (Youn & McDonough, 2009; Youn, 2013).

Ante un aumento de la concentración plasmática de  $K^+$ , se activa el mecanismo de retroalimentación tradicionalmente conocido, el cual estimula la secreción de aldosterona de

la zona glomerulosa de la corteza adrenal (Spät, 2004), hormona que al actuar sobre los receptores a mineralocorticoides en la nefrona distal, favorece la excreción urinaria de  $K^+$  (Mount & Yu, 2007). Si los niveles plasmáticos de  $K^+$  disminuyen, se retroalimenta negativamente al sistema para que no haya secreción de aldosterona. Como se verá más adelante, a través de sus acciones a largo plazo en el riñón, la aldosterona tiene un papel central en el balance externo de  $K^+$ .

### **1.1. $Na^+/K^+$ ATPasa**

La  $Na^+/K^+$  ATPasa es el mecanismo más relevante de transporte de  $K^+$  en contra de su gradiente de concentración, es decir, del espacio extracelular al intracelular. Esta bomba pertenece a la familia de ATPasas tipo P, la cual se caracteriza por la formación de un intermediario fosfoenzima covalente como parte de su mecanismo catalítico. Por cada ATP hidrolizado, la  $Na^+/K^+$  ATPasa intercambia tres iones  $Na^+$  intracelulares por dos iones  $K^+$  extracelulares, de tal manera que, es la responsable de mantener una concentración intracelular baja de  $Na^+$  y alta de  $K^+$  (Obradovic et al. 2018).

La  $Na^+/K^+$  ATPasa consta de dos subunidades principales:  $\alpha$  y  $\beta$ , presentes en igual proporción molar (1:1). La subunidad  $\alpha$  (~110 kDa) es el componente catalítico y provee los sitios de unión para el  $Na^+$ ,  $K^+$  y ATP; contiene 10 dominios transmembrana (M1-M10) y se han identificado 4 isoformas, siendo dominante la isoforma  $\alpha_1$  en todas las células, mientras que  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$  están presentes en pequeña proporción y su expresión en tejidos varía entre especies. La subunidad  $\beta$  es pequeña y está glicosilada (~35-55 kDa), se requiere para el plegamiento apropiado de la bomba y su inserción a la membrana, y también afecta la unión iónica intrínseca y propiedades de transporte de la  $Na^+/K^+$  ATPasa. Se han identificado 3 isoformas  $\beta$ ; la expresión de la isoforma  $\beta_1$  es ubicua, mientras que la isoforma  $\beta_2$  predomina en músculo esquelético y corazón. Finalmente, las proteínas FXYD (también referidas como subunidades  $\gamma$ , de las que se conocen 7 hasta el momento) tienen una expresión diferencial en células y tejidos. Estas proteínas contribuyen a darle estabilidad a la bomba y modifican su afinidad por  $Na^+$ ,  $K^+$  y ATP (Obradovic et al. 2018). La heterogeneidad de la composición de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  en diferentes tejidos diversifica las propiedades de la  $Na^+/K^+$  ATPasa

(e.g. afinidad por  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ) y determina diferentes respuestas a hormonas y otras moléculas (Sweeney & Klip, 1998).

Los determinantes más directos de la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa son las concentraciones de los sustratos. La bomba es activada por  $\text{Na}^+$  y ATP en el citoplasma, y por  $\text{K}^+$  en el espacio extracelular. Una alteración pequeña en la concentración citosólica de  $\text{Na}^+$ , secundaria a la activación de transportadores dependientes de  $\text{Na}^+$  o canales de  $\text{Na}^+$ , puede tener un efecto notable en la actividad de la bomba. De hecho, algunas hormonas alteran la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa al afectar su afinidad aparente por el  $\text{Na}^+$  (Therien & Blostein, 2000).

La regulación hormonal de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa puede ser tanto a corto como a largo plazo. La regulación a corto plazo (minutos a horas) involucra cambios en el comportamiento cinético de la enzima, su fosforilación y/o tráfico a la membrana plasmática. Las vías intracelulares de señalización inducidas hormonalmente son diversas (PKA, PKC, Akt, PKG, ERK1/2, PI3K), complejas y dependen del tejido y tipo celular particular. Se cree que la fosforilación directa de la bomba podría modificar su actividad catalítica o causar cambios conformacionales que alteren su afinidad por alguno de sus sustratos. Los mecanismos regulatorios a largo plazo (días) afectan la transcripción de los genes que codifican para las subunidades de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa (Mount & Zandi-Nejad, 2007; Obradovic et al. 2018, Sweeney & Klip, 1998; Therien & Blostein, 2000).

Las hormonas más estudiadas que regulan a la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa son la insulina y las catecolaminas adrenérgicas. Sin embargo, otras hormonas también tienen un papel regulatorio, incluyendo la dopamina, las hormonas tiroideas y esteroideas (Ewart & Klip, 1995; Therien & Blostein, 2000). Los reguladores críticos del balance interno de  $\text{K}^+$  son la insulina y las catecolaminas, y en menor grado la aldosterona (Palmer & Clegg, 2016b).

La entrada celular de  $\text{K}^+$  que induce la insulina es mediada mayormente por la estimulación de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa. No obstante, la insulina también promueve el transporte de aminoácidos acoplado a la entrada de  $\text{Na}^+$ , el intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y el cotransporte de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$ . Estos procesos aumentan la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$ , lo que a su vez

favorece la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa (Mount & Zandi-Nejad, 2007; Sahni et al. 2013). El mecanismo regulatorio principal de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa en el músculo esquelético, en respuesta a la insulina, es la translocación de las subunidades de la bomba desde sitios de almacenamiento intracelular hacia la membrana plasmática (Sweeney & Klip, 1998). En el contexto de la deficiencia de insulina (i.e. diabetes), hay una reducción en la captura de  $\text{K}^+$  por músculo e hígado (Satlin, 2009).

Durante el ejercicio, la estimulación continua de las fibras musculares conduce a la liberación excesiva de  $\text{K}^+$ . En estas condiciones, la activación rápida de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa en las células musculares, mediada por las catecolaminas (adrenalina en particular), es importante para retrasar el inicio de la fatiga muscular y reducir los niveles potencialmente tóxicos de  $\text{K}^+$  en el plasma (Therien & Blostein, 2000). Al unirse a los receptores  $\beta_2$  adrenérgicos, la adrenalina estimula a la adenilato ciclasa, conduciendo a la generación de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) y la subsecuente activación de proteínas cinasas, cuya señalización favorece la actividad de la bomba de  $\text{Na}^+$ . Como resultado, la entrada de  $\text{K}^+$  se intensifica en el músculo esquelético y cardiaco, efecto inhibido por  $\beta$ -bloqueadores no selectivos como el propranolol (Satlin, 2009).

Respecto a la aldosterona, se cree que puede afectar indirectamente la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa en músculo u otros tejidos extrarenales, a través de efectos no genómicos que estimulan la entrada celular de  $\text{Na}^+$ , como el intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y el cotransporte de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$  (Unwin et al. 2011).

Además de la participación fundamental de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa en el balance interno de  $\text{K}^+$ , ésta juega un papel importantísimo en la fisiología renal como se verá más adelante.

## **1.2. Canales de potasio**

Los canales de  $\text{K}^+$  forman poros acuosos que conducen selectivamente  $\text{K}^+$  ( $10^6$ - $10^8$  iones/s) a través de la membrana. Ya que es un transporte pasivo, el movimiento de  $\text{K}^+$  ocurre a favor de su gradiente de concentración, es decir, desde el espacio intracelular hacia el extracelular. Los

canales de  $K^+$  constituyen el grupo más numeroso, heterogéneo y ubicuo de proteínas integrales de membrana. Están formados por subunidades  $\alpha$ , las cuales pueden asociarse con subunidades  $\beta$  o auxiliares. En el poro se localiza la secuencia de selectividad a  $K^+$ , el motivo G(Y/F)G, presente en todos los canales de  $K^+$  (Shieh et al. 2000; Shieh & Goplakrishnan, 2008). Al igual que otros canales iónicos, se clasifican en función del estímulo que regula su apertura/cierre (*gating*): tensión o estiramiento (mecanosensibles), cambios en el potencial de membrana (activados por voltaje), calcio ( $Ca^{2+}$ ) u otra molécula (activados por ligando) (Alberts et al. 2008). Se han identificado más de 70 genes distintos que codifican subunidades de canales de  $K^+$  en el genoma humano. Los canales de  $K^+$  se agrupan en familias y subfamilias con base en sus propiedades funcionales y estructurales. Según la secuencia de aminoácidos de la subunidad  $\alpha$ , y en consecuencia, el número de segmentos transmembrana (TM) y dominios de poro (P), existen tres familias: 2-TM 1P, 4-TM 2P y 6-TM 1P, con 2, 4 y 6 segmentos TM, respectivamente (Alexander et al. 2013; Shieh et al. 2000).

La familia 2-TM 1P corresponde a los canales de  $K^+$  rectificadores entrantes ( $K_{ir}$ , *inward rectifying*); consta de siete subfamilias codificadas por 14 genes (*KCNJ*) en humanos. Estos canales se organizan en cuatro subgrupos dependiendo de sus características funcionales: canales rectificadores entrantes a) fuertes ( $K_{ir2.x}$ ), b) activados por proteínas G ( $K_{ir3.x}$ ), c) sensibles a ATP ( $K_{ir6.x}$  o  $K_{ATP}$ , que se combinan con los receptores a sulfonilurea SUR1-3) y d) de transporte de  $K^+$  ( $K_{ir1.1}$ ,  $K_{ir4x}$ ,  $K_{ir5.1}$  y  $K_{ir7.1}$ ). Las subunidades  $\alpha$  se ensamblan en tetrámeros, y pueden formar canales heterotetraméricos entre miembros de la subfamilia (e.g.  $K_{ir3.2}$  y  $K_{ir3.3}$ ) (Alexander et al. 2019; Deka et al. 2020). El grado de rectificación interna varía entre subfamilias  $K_{ir}$ , y depende de la afinidad de unión del canal por magnesio ( $Mg^{2+}$ ) intracelular o poliaminas (O'Grady, 2020).

La familia 4-TM 2P de canales de  $K^+$  media numerosas corrientes de fondo o 'fuga' en las células. Cada subunidad  $\alpha$  contiene dos dominios de poro (P), de ahí que se conozca como  $K_{2P}$ . Estos canales son diméricos pues se forman por dos subunidades  $\alpha$ , en consecuencia, cada canal presenta cuatro dominios P, los cuales integran una sola vía conductiva. Algunas de las subunidades  $K_{2P}$  pueden formar heterodímeros entre subfamilias (e.g.  $K_{2P3.1}$  con

K<sub>2P</sub>9.1). Los miembros de esta familia se abren en el rango de voltajes fisiológicos y son regulados por diversos neurotransmisores y mediadores bioquímicos. (Alexander et al. 2013, 2019). Se conocen 15 genes (*KCNK*) que codifican para los canales K<sub>2P</sub>, los cuales se dividen en 6 grupos: TWIK, TREK, TASK, TALK, THIK y TRESK con base en similitudes en su secuencia y características funcionales, especialmente su sensibilidad a ciertos estímulos (e.g. pH, tensión de membrana, concentración de oxígeno, temperatura) (Deka et al. 2020, O'Grady et al. 2020).

La familia 6-TM 1P de canales de K<sup>+</sup> comprende diversas subfamilias, entre las que se encuentran los canales de K<sup>+</sup> activados por voltaje (K<sub>v</sub>), los canales de K<sup>+</sup> activados por Ca<sup>2+</sup> Slo (K<sub>Ca</sub>) y los canales de K<sup>+</sup> activados por Ca<sup>2+</sup> y Na<sup>+</sup>. Como su nombre lo indica, estos canales tienen seis segmentos TM (S1-S6), excepto por dos miembros con siete; el dominio del poro se encuentra entre S5 y S6. Al igual que la familia 2-TM 1P, las subunidades α se agrupan en tetrámeros y pueden formar heterotetrámeros dentro de la misma subfamilia (e.g. K<sub>v</sub>1.1 con K<sub>v</sub>1.2) (Alexander et al. 2013, 2019).

La Unión Internacional de Farmacología Básica y Clínica (IUPHAR, *International Union of basic and clinical Pharmacology*) distingue cuatro grupos principales de canales de K<sup>+</sup>: a) canales de K<sup>+</sup> activados por Ca<sup>2+</sup> y Na<sup>+</sup>, b) canales K<sub>ir</sub>, c) canales K<sub>2P</sub>, y d) canales K<sub>v</sub> (Alexander et al. 2019). El primer y último grupo tienen aspectos en común ya que pertenecen a la familia 6-TM 1P, sin embargo, también los diferencian particularidades estructurales y funcionales.

Los canales de K<sup>+</sup> activados por Ca<sup>2+</sup> y Na<sup>+</sup> se pueden organizar en 3 subgrupos. El primer subgrupo consta de los canales K<sub>Ca</sub>1.1 (también llamado BK, maxi-K o Slo1) y K<sub>Ca</sub>5.1 (SLO3, específico de espermatozoide); son los únicos canales de este grupo (y de la familia 6TM 1P en general), que tienen siete segmentos TM en cada subunidad α en vez de seis, esto se debe a un dominio adicional (S0) ubicado antes de S1; en consecuencia, presentan un amino (N-) terminal extracelular en vez de citoplásmico, como todos los demás. Ambos canales tienen una conductancia grande, son sensibles al voltaje y en su carboxilo (C-) terminal largo se localizan dos dominios de unión a iones (Ca<sup>2+</sup> en particular), denominados RCK, que regulan el *gating*. En otro subgrupo se encuentran los canales de conductancia pequeña (SK: K<sub>Ca</sub>2.1, K<sub>Ca</sub>2.2 y K<sub>Ca</sub>2.3) e intermedia (IK: K<sub>Ca</sub>3.1). Se asemejan a los canales K<sub>v</sub> (6TM 1P) en su

topología, sin embargo, son insensibles a los cambios de voltaje y su activación ocurre a través de la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  a calmodulina, la cual está asociada al canal en la región C-terminal. El último subgrupo comprende a los canales activados por  $\text{Na}^+$  y cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) llamados  $\text{K}_{\text{Na}}1.1$  y  $\text{K}_{\text{Na}}1.2$ , pero originalmente denominados  $\text{K}_{\text{Ca}}4.1$  y  $\text{K}_{\text{Ca}}4.2$ , respectivamente, al asumir que eran sensibles a  $\text{Ca}^{2+}$  dado su parecido estructural con  $\text{K}_{\text{Ca}}1.1$ . Sin embargo, después se demostró que su activación se induce por  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  intracelular, y no por  $\text{Ca}^{2+}$ . Estos canales se asemejan a los del primer subgrupo en que tienen conductancias unitarias grandes y presentan dominios RCK en el C-terminal citoplásmico, los cuales controlan el *gating* (Kackzmarek et al. 2017).

Por su parte, las subfamilias  $\text{K}_v$  conforman el grupo más grande de canales de  $\text{K}^+$  pues son codificados por alrededor de 40 genes. Hay 12 subfamilias  $\text{K}_v$  ( $\text{K}_v1-12$ ), incluyendo los canales KCNQ ( $\text{K}_v7$ ) y EAG (*ether-a-go-go*,  $\text{K}_v10-12$ , que contiene a los canales hERG). Constituyen una familia muy diversa respecto a sus propiedades biofísicas y mecanismos de regulación (e.g. subunidades auxiliares, proteínas interactoras, modificaciones postraduccionales, *splicing* alternativo), que además se amplía por la formación de heterotetrámeros. Tanto el N- como el C-terminal de la subunidad  $\alpha$  se encuentran intracelularmente. Su característica más representativa es que se activan por la despolarización del potencial de membrana, debido a la presencia de varios aminoácidos cargados positivamente (lisina o arginina) que se distribuyen regularmente en el segmento S4, conocido como sensor de voltaje (Alexander et al. 2019; Deka et al. 2020; O'Grady, 2020).

Los canales de  $\text{K}^+$  tienen numerosos y diversos papeles fisiológicos, dado el gran número genes distintos que los codifican y su amplia distribución en el organismo. Es fundamental su contribución al establecimiento del potencial de reposo, así como de la frecuencia y forma del potencial de acción, con lo cual influyen de manera importante en la excitabilidad. También destaca su participación en la señalización celular para regular procesos como la liberación de neurotransmisores y hormonas, la contracción muscular, el transporte epitelial y el volumen celular, entre otros (Deka et al. 2020; Shieh et al. 2000).

En el músculo esquelético hay varios tipos de canales de  $K^+$ , incluyendo canales  $K_{ir}$  y  $K_v$ , a través de los cuales sale  $K^+$ . La insulina y catecolaminas, además de estimular la entrada de  $K^+$  a través la  $Na^+/K^+$  ATPasa, inhiben la salida de  $K^+$  a través de los canales  $K_{ir}$ . De hecho, mutaciones de los canales  $K_{ir2.1}$  y  $K_{ir2.6}$  se asocian con la parálisis periódica hipocalémica de tipo no familiar (Cheng et al. 2013).

En los tejidos epiteliales, incluido el riñón, se expresa una gran variedad de canales de  $K^+$ , tanto en la membrana apical como basolateral, donde participan en la regulación del volumen celular y la generación de un potencial de membrana negativo. Por lo tanto, los canales de  $K^+$  determinan el movimiento de solutos cargados a través de la membrana, y en consecuencia, afectan el transporte transepitelial y paracelular iónico en diversos tipos celulares y condiciones fisiológicas. Algunos de ellos, también son importantes para el reciclamiento del  $K^+$  en las membranas epiteliales o para la secreción de  $K^+$  (Cotton, 2000; Giebisch & Wang, 2000; O'Grady, 2020).

### **1.3. Cotransportadores NKCC y KCC**

Los cotransportadores de  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $2Cl^-$  (NKCC) y de  $K^+$ ,  $Cl^-$  (KCC) median un transporte activo secundario electroneutro. Son miembros de la familia SLC12 de transportadores de solutos; se conocen dos isoformas de NKCC (genes *SLC12A1*, *SLC12A2*) y cuatro isoformas de KCC (genes *SLC12A4* a *SLC12A7*). Están involucrados en la regulación del volumen celular y la homeostasis iónica. La dirección del movimiento de  $K^+$  mediado por estas proteínas es inversa, NKCC facilita la entrada, mientras que KCC permite la salida.

NKCC1 se localiza en diversos tejidos tanto epiteliales como no epiteliales, mientras que NKCC2 se expresa preferentemente en el riñón. La estimulación de NKCC1 por insulina o aldosterona se ha propuesto como mecanismo secundario por el que dichas hormonas inducen la actividad de la  $Na^+/K^+$  ATPasa, a través del aumento de la concentración del  $Na^+$  intracelular (Unwin et al. 2011). Por ejemplo, la insulina estimula la entrada de  $K^+$  en adipocitos, y ésta se inhibe por bumetanida y eliminación del  $Cl^-$  del fluido extracelular, lo cual indica que NKCC1 está involucrado (Sahni et al. 2013). También se ha documentado la

estimulación de NKCC1 en el músculo esquelético por la acción de catecolaminas sobre receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Mount & Zandi-Nejad, 2007).

La activación de los KCCs cuando las células se expanden ayuda a eliminar iones y regresar la célula a su volumen original, proceso conocido como disminución regulatoria de volumen. KCC1 se distribuye ubicuamente al igual que NKCC1, mientras que los otros miembros tienen una expresión relativamente restringida. Respecto al balance interno de  $K^+$ , aunque los KCCs funcionan típicamente como vías de salida de  $K^+$ , la isoforma predominante en sistema nervioso central (KCC2) puede mediar el influjo del catión cuando el  $K^+$  extracelular incrementa (Hebert et al. 2004). En el caso particular de la acidosis metabólica, los KCCs detectados en músculo esquelético (KCC1, KCC3 y KCC4), podrían contribuir al aumento del  $K^+$  extracelular (hipercalemia) a través de su acoplamiento al intercambio de  $Cl^-$  y bicarbonato ( $HCO_3^-$ ). Ante la caída de  $HCO_3^-$  en el plasma (acidemia) se estimula su salida a través del intercambiador  $Cl^-/HCO_3^-$ ; el aumento resultante del  $Cl^-$  intracelular, favorecería la actividad de los KCCs (Aronson & Giebisch, 2011).

#### **1.4. Alteraciones de la homeostasis de $K^+$**

Las alteraciones del  $K^+$  en el plasma son muy comunes en la práctica clínica. El origen de una concentración plasmática de  $K^+$  mayor a 5 mM (hipercalemia) o menor a 3.5 mM (hipocalemia) es diverso, pero de manera general se debe a factores que afectan el balance de  $K^+$ , ya sea interno (e.g. fármacos, deficiencia de insulina) o externo (e.g. ingesta inadecuada, trastorno de la excreción vía gastrointestinal o renal). En la siguiente tabla se resumen las principales causas de hiper- e hipocalemia (Gennari, 1998, 2002; Mount & Zandi-Nejad, 2007; Palmer, 2004, 2010; Palmer & Clegg, 2019; Unwin et al. 2011).

Como se mencionó previamente, el organismo cuenta con mecanismos homeostáticos para responder a una entrada elevada de  $K^+$ , por lo tanto, la mayoría de los casos de hipercalemia se deben a una función disminuida de la excreción renal de  $K^+$ , la cual conduce a la acumulación de  $K^+$  en el espacio extracelular (Palmer, 2010; Palmer & Clegg, 2016b).

**Tabla 1. Principales causas de hipercalemia e hipocalemia**

<p style="text-align: center;"><b>Hipercalemia</b> <b>K<sup>+</sup> en plasma &gt; 5 mM</b></p>	<p style="text-align: center;"><b>Hipocalemia</b> <b>K<sup>+</sup> en plasma &lt; 3.5 mM</b></p>
<p>Ingesta excesiva de K<sup>+</sup> (remedios herbales, sustitutos de sal, suplementos de K<sup>+</sup>) adicional a otras causas</p> <p><b>Alteración del balance interno de K<sup>+</sup>.</b> Factores que limitan la entrada celular de K<sup>+</sup> o favorecen su salida en exceso (aumento en el espacio extracelular):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fármacos: β-bloqueadores (propranolol), agonistas α-adrenérgicos (fenilefrina), digoxina (inhibidor de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa)</li> <li>• Daño tisular/lisis celular (rabdomiólisis, traumatismos, quemaduras, síndrome de lisis tumoral)</li> <li>• Hiperosmolaridad (hiperglicemia, manitol)</li> <li>• Acidosis metabólica (mineral)</li> <li>• Diabetes mellitus (deficiencia de insulina)</li> <li>• Hipotiroidismo</li> </ul> <p><b>Disminución de la excreción renal de K<sup>+</sup>:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fármacos: bloqueadores de ENaC (amilorida, triamtereno, trimetoprima), inhibidores del receptor a mineralocorticoides (espironolactona, eplerenona), inhibidores de liberación de renina (anti-inflamatorios no esteroideos, tacrolimus, ciclosporina), inhibidores de la síntesis de aldosterona (heparina, ketoconazol), inhibidores de ECA, bloqueadores del receptor a angiotensina II</li> <li>• Deficiencia de aldosterona (Enfermedad de Addison, Hipoaldosteronismo)</li> <li>• Función renal reducida (Enfermedad renal crónica, daño renal agudo)</li> <li>• Tubulopatías (Pseudohipoaldosteronismo tipo I y II)</li> </ul>	<p>Ingesta insuficiente de K<sup>+</sup></p> <p><b>Alteración del balance interno de K<sup>+</sup>.</b> Factores que promueven una entrada celular excesiva de K<sup>+</sup> (disminución en el espacio extracelular):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fármacos: insulina, agonistas β<sub>2</sub>-adrenérgicos (salbutamol, terbutalina), antagonistas α-adrenérgicos, teofilina, cafeína</li> <li>• Alcalosis (efecto mínimo)</li> <li>• Hipertiroidismo</li> </ul> <p><b>Pérdidas gastrointestinales</b> en exceso. Vómito, diarrea, abuso de laxantes</p> <p><b>Aumento de la excreción renal de K<sup>+</sup>:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fármacos: diuréticos de asa y tiazídicos, agonistas del receptor de mineralocorticoides</li> <li>• Hipomagnesemia</li> <li>• Exceso de aldosterona (Síndrome de Conn, Hiperplasia adrenal, Hiperaldosteronismo secundario)</li> <li>• Tubulopatías (Síndromes de Bartter, Gitelman y Liddle, Acidosis tubular renal distal)</li> </ul> <p>Parálisis periódica hipocalémica</p>

ECA: Enzima convertidora de angiotensina, ENaC: canal epitelial de Na<sup>+</sup>

Una reducción de la excreción renal de  $K^+$  se puede deber a una menor llegada de  $Na^+$  a la nefrona distal, la deficiencia de mineralocorticoides o una función alterada del conducto colector cortical (Palmer, 2004; 2010). La insuficiencia renal es responsable por más del 80% de los episodios clínicos de hipercalemia, aunque casi siempre se acompaña de otra causa, como el uso de algún fármaco que limita la entrada celular de  $K^+$  o su excreción renal (Gennari, 2002). Debido a la importancia de la aldosterona para maximizar la secreción de  $K^+$  en la nefrona distal, los fármacos y condiciones (e.g. edad avanzada, desórdenes congénitos, nefropatía diabética) que inhiben o reducen la función del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS), son también causas frecuentes del desarrollo de hipercalemia (Palmer, 2004; 2010). Pacientes con hipotiroidismo, diabetes, falla cardíaca, deficiencia crónica de  $K^+$  o edad avanzada, tienen una menor abundancia de  $Na^+/K^+$  ATPasa en el músculo esquelético, por lo tanto, son más susceptibles a los fármacos que promueven hipercalemia, como los  $\beta$ -bloqueadores y la digoxina, e incluso a la hipercalemia inducida por ejercicio (Cheng et al. 2013).

Respecto a la hipocalemia, la causa más común es el uso de diuréticos de asa y tiazídicos (Gennari, 1998, 2002). Asimismo, puede presentarse en pacientes con vómito, diarrea y abuso de laxantes, al exacerbar la pérdida gastrointestinal de  $K^+$ . En estos escenarios, la disminución del volumen extracelular (hipovolemia) contribuye al desarrollo de hipocalemia, porque se estimula la secreción de aldosterona, la cual promueve la excreción renal de  $K^+$ . Así pues, estados patológicos asociados con hiperaldosteronismo primario o secundario también causan pérdida excesiva de  $K^+$  por vía renal (Unwin et al. 2011; Mount & Zandi-Nejad, 2007). Por su parte, el balance interno de  $K^+$  puede alterarse por la administración de insulina o fármacos con actividad  $\beta_2$ -simpaticomimética (e.g. broncodilatadores, descongestionantes, tocolíticos), que al promover la entrada de  $K^+$  a las células, contribuyen al desarrollo de hipocalemia. La cafeína y teofilina pueden provocar hipocalemia transitoria pues, al estimular la liberación de aminas simpáticas e inhibir a la fosfodiesterasa (enzima que degrada AMPc), favorecen la actividad de la  $Na^+/K^+$  ATPasa (Gennari, 1998).

Las alteraciones fisiopatológicas del balance ácido-base y osmolaridad plasmática, así como la lisis celular, también afectan la distribución del  $K^+$  entre los compartimientos líquidos intra- y extracelular (Satlin, 2009).

Un estado de acidosis o alcalosis induce el movimiento de protones ( $H^+$ ) para reestablecer el pH extracelular, y dicha entrada/salida de  $H^+$  suele acompañarse del movimiento de  $K^+$  en el sentido inverso. Por ejemplo, la acidemia provoca la entrada celular de  $H^+$ , y esto se relaciona con la salida de  $K^+$  para mantener la electroneutralidad, particularmente si el anión asociado al ácido no puede atravesar la membrana junto al  $H^+$ , como el cloruro ( $Cl^-$ ). Es por ello que la acidosis mineral ( $NH_4Cl$ ,  $HCl$ ) promueve hipercalemia, mientras que la acidosis orgánica (ácido láctico,  $\beta$ -hidroxibutírico) no se manifiesta en un movimiento significativo de  $K^+$  (Palmer, 2010; Satlin, 2009). Es importante aclarar que no se trata de un intercambio directo de  $H^+$  por  $K^+$ , más bien, resulta del acoplamiento entre los transportadores que regulan el pH. En el músculo esquelético, la actividad del intercambiador  $Na^+/H^+$  (NHE) y del cotransportador electrogénico de  $Na^+$  y bicarbonato (NBCe) se reduce por la acidosis metabólica mineral (hiperclorémica), por lo que hay una menor entrada de  $Na^+$ , que a su vez disminuye la actividad de la  $Na^+/K^+$  ATPasa. Esto representa una pérdida neta de  $K^+$  intracelular, pues se contrarresta en menor medida la salida pasiva de  $K^+$  a través de canales de  $K^+$  (Aronson & Giebisch, 2011; Palmer & Clegg, 2019).

El aumento de la osmolaridad plasmática (e.g. hiperglicemia en diabéticos, administración de manitol) induce la salida de agua del compartimento intracelular, reduciendo el volumen celular y concentrando al  $K^+$ , lo que aumenta el gradiente químico para su salida a través de canales de  $K^+$  (Palmer, 2010; Satlin, 2009).

La parálisis periódica hipocalémica (PPHipo) es una enfermedad heterogénea caracterizada por la parálisis muscular episódica e hipocalemia durante el período de los ataques. Frecuentemente, el ataque paralítico es precipitado por factores que estimulan a la  $Na^+/K^+$  ATPasa, como ejercicio extenuante y comidas ricas en carbohidratos. La PPHipo puede ser familiar y no familiar. La forma familiar es heredada con un patrón dominante autosómico, y es causada predominantemente por mutaciones en genes que codifican para el canal de  $Na^+$  específico de músculo esquelético  $Na_v1.4$  o el canal de  $Ca^{2+}$  tipo L  $Ca_v1.1$ . Mientras que la

PPHipo no familiar puede ocurrir en presencia de hipertiroidismo (parálisis periódica tirotóxica) o en ausencia de hipertiroidismo (parálisis periódica espontánea) (Cheng et al. 2013).

### **1.5. Importancia del K<sup>+</sup> en la dieta**

Las dietas ricas en K<sup>+</sup> se consideran saludables; una dieta mediterránea típica puede proveer más de 155 mmol/día (6 g/día) de K<sup>+</sup>, mientras que la dieta DASH (*Dietary Approaches to Stop Hypertension*, rica en frutas y verduras, productos lácteos bajos en grasa y reducida en grasas totales y saturadas) aporta alrededor de 120 mmol/día (4.7 g/día) (Appel et al. 1997; Clase et al. 2020). De hecho, guías nacionales e internacionales sugieren un mayor consumo de K<sup>+</sup> como parte de las recomendaciones para la prevención y tratamiento de la hipertensión; aquéllas propuestas por la Asociación Cardíaca Americana (AHA), la Sociedad Americana de Hipertensión (ASH) y la Sociedad Europea de Hipertensión (ESH) coinciden con la dieta DASH en que la ingesta de K<sup>+</sup> sea alrededor de 120 mmol/día en adultos con una función renal normal. Por su parte, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Sociedad Internacional de Hipertensión recomiendan una dieta rica en frutas y verduras, la reducción del consumo de Na<sup>+</sup> y el incremento del consumo de K<sup>+</sup> para reducir la incidencia de hipertensión (Houston, 2011). En su guía específica para la ingesta de K<sup>+</sup>, la OMS (World Health Organization WHO, 2012) recomendó un consumo de al menos 90 mmol/día (~3.5 g/día) de K<sup>+</sup> en adultos sin compromiso de la excreción renal de K<sup>+</sup>.

Las fuentes principales de K<sup>+</sup> son frutas y verduras, así como carne, pollo y pescado (Clase et al. 2020). Algunos ejemplos de alimentos con un contenido muy alto de K<sup>+</sup> (>500 mg [12.5 mmol]/100 g) son los frutos secos (dátil, ciruela pasa), nueces y aguacate; entre aquéllos con un contenido alto de K<sup>+</sup> (>250 mg/100 g) están el plátano, melón, kiwi, naranja, mango, espinaca, jitomate, brócoli, zanahoria y papa (Gennari, 1998).

El contenido de K<sup>+</sup> en la dieta influye de manera inversa en la presión arterial según diversos estudios en modelos animales y humanos (Penton et al. 2015). La evidencia epidemiológica apoya que una dieta elevada en K<sup>+</sup> induce la reducción de la presión sanguínea, y ésta se

asocia con una menor incidencia de accidente cerebrovascular, enfermedad coronaria cardiaca, infarto al miocardio y otros eventos cardiovasculares adversos (Castro & Rajj, 2013; Haddy et al. 2006; Houston, 2011; Palmer & Clegg, 2016a). Los mecanismos moleculares aún no se han elucidado a detalle, sin embargo, hay evidencia experimental que apoya que el  $K^+$  induce una respuesta natriurética así como vasodilatación endotelial, mientras que la deficiencia de  $K^+$  se asocia a la retención renal de  $Na^+$  y vasoconstricción (Castro & Rajj, 2013; Haddy et al. 2006; Penton et al. 2015). Asimismo, se ha documentado que el incremento de  $K^+$  extracelular disminuye la rigidez de las células endoteliales, incrementa la actividad de la sintetasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) y la liberación de óxido nítrico (NO), agente vasodilatador. Al parecer, la suplementación de  $K^+$  también tiene la capacidad de inhibir la elevada actividad simpática nerviosa asociada a la hipertensión sensible a sal (Castro & Rajj, 2013; Ando et al. 2010).

Considerando que la alimentación 'paleolítica' que predominó por millones de años era rica en  $K^+$  y pobre en  $Na^+$ , se cree que el diseño del riñón evolucionó para eliminar el exceso de  $K^+$  y retener  $Na^+$ . Por lo tanto, es probable que dicho contexto genético ya no se ajuste al patrón alimentario actual (i.e. la dieta occidental es alta en  $Na^+$  y baja en  $K^+$ ), basado en productos procesados y consumo escaso de frutas y verduras. Lo anterior podría contribuir a que este tipo de dieta se considere un factor de riesgo en el desarrollo de hipertensión y enfermedades cardiovasculares, y en los efectos benéficos de una dieta rica en  $K^+$  (He & MacGregor, 2001).

Una dieta alta en  $K^+$  también reduce el riesgo de accidente cerebrovascular de manera independiente a la disminución de la presión arterial. Al respecto, se cree que un consumo elevado de  $K^+$  inhibe la formación y progresión de la lesión aterosclerótica, a través de la reducción de procesos como la proliferación y migración de las células del músculo liso vascular, la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la agregación de plaquetas (Palmer & Clegg 2016a; Houston, 2011). El consumo alto de sal induce hipertensión y daño cardiovascular, mientras que la suplementación de  $K^+$  en la dieta contrarresta estos efectos dañinos. Se ha propuesto que la capacidad antioxidante del  $K^+$ , al reducir la generación de

ROS, ayuda a proteger de la disfunción cardíaca y resistencia a insulina inducidas por el exceso de sal (Ando et al. 2010; Castro & Raij, 2013).

Al contrario de un consumo alto de  $K^+$  en la dieta, una ingesta deficiente del catión se ha asociado con hipertensión, así como con eventos renales (e.g. daño tubulointersticial, defecto en la concentración urinaria) y cardiovasculares adversos, debido en parte, al manejo interrelacionado del  $Na^+$  y  $K^+$  en el riñón (Mount & Zandi-Nejad, 2007).

Entonces, existe la posibilidad de que una ingesta alta de  $K^+$  estimule la producción de mediadores bioquímicos con efectos benéficos directos a diversos niveles fisiológicos. Adicionalmente, una dieta rica en  $K^+$  podría inhibir la producción de factores que, a pesar de ser útiles en un contexto de conservación de  $K^+$ , tengan efectos negativos a largo plazo para el sistema cardiovascular. En este sentido, las ROS serían buenos candidatos (Youn, 2013), pues se sabe que la dieta baja en  $K^+$  induce la actividad de la NADPH oxidasa, la cual está implicada en la producción de aniones superóxido para señalar una menor secreción renal de  $K^+$  (Babilonia et al. 2007; Wei et al. 2007, ver más adelante).

## **2. Fisiología renal**

Los riñones son órganos que se encuentran en la cavidad retroperitoneal, uno a cada lado de la columna vertebral. En el humano, el peso de ambos riñones representa menos del 0.5% del peso total corporal y, sin embargo, reciben un flujo sanguíneo cercano al 25% del gasto cardíaco en reposo,  $\sim 1.25$  L/min (Koeppen & Stanton, 2013).

Los riñones tienen diversas funciones, siendo la más importante asegurar la homeostasis hidroelectrolítica y ácido-base de nuestro organismo, es decir, la constancia del volumen y la composición química del fluido extracelular. Además, la sangre que pasa a través de los riñones se "limpia" de los productos de desecho, los cuales se eliminan a través de la orina.

El riñón consta de dos regiones macroscópicamente distinguibles: la corteza, que es la más externa, y la médula. En el riñón humano, la médula se organiza en varias pirámides renales, a diferencia del riñón de rata, que solo consta de una. La médula se subdivide en externa e

interna, y a su vez, la médula externa (OM, *Outer Medulla*) presenta una franja o banda externa (OS, *Outer stripe*) y una banda interna (IS, *Inner stripe*). La parte más profunda de la médula interna (IM, *Inner Medulla*) se denomina papila (Fig. 1). La orina que emerge de la papila se conduce a los cálices menores, los cuales convergen en los cálices mayores, que a su vez alimentan a la pelvis renal, y ésta a los uréteres, que conectan con la vejiga urinaria (Michael & Sircar, 2011).

La nefrona es la unidad funcional del riñón. Se estima que cada riñón humano tiene alrededor de un millón de nefronas. La nefrona consta de una porción corpuscular y una tubular. El corpúsculo renal comprende el glomérulo (red compacta de capilares en forma de ovillo, donde la sangre entra por la arteriola aferente y sale por la arteriola eferente) y la cápsula de Bowman (estructura que rodea al glomérulo, la cual presenta dos capas celulares, una capa visceral alrededor de los capilares glomerulares y una capa parietal externa, entre las cuales queda un espacio que es continuo con la luz tubular). La tasa de excreción renal de cada uno de los solutos/electrolitos está determinada por el balance de tres procesos fundamentales: filtración, reabsorción y secreción (Fox, 2014; Koeppen & Stanton, 2013).

La filtración ocurre a nivel glomerular a través de los componentes de la barrera de filtración: endotelio capilar fenestrado, membrana basal glomerular y diafragma de hendidura en los podocitos (capa visceral de la cápsula de Bowman). El ultrafiltrado producido se recibe en el espacio de Bowman y de ahí pasa a la luz de los túbulos de la nefrona. Cada segmento tubular está formado por células epiteliales de diferentes características ultraestructurales, bioquímicas y biofísicas, en las que ocurren los procesos de reabsorción y secreción, cuya regulación por hormonas y factores locales, determina la tasa de excreción urinaria de cada uno de los solutos filtrados. La red de vasos sanguíneos que rodean a los túbulos (capilares peritubulares) facilitan los procesos de intercambio de sustancias (Koeppen & Stanton, 2013; Madsen et al. 2007).

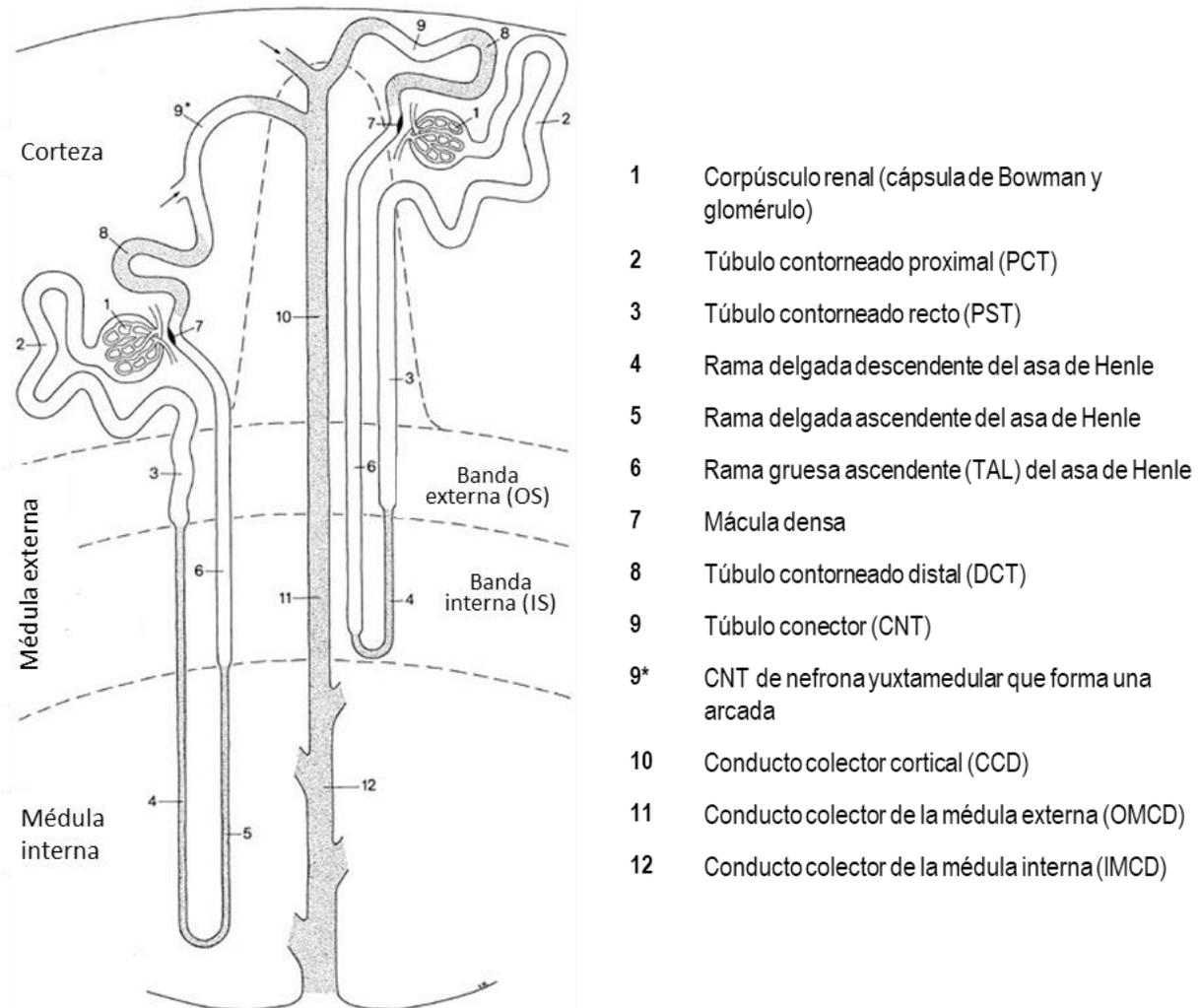
La porción tubular de la nefrona se divide en varios segmentos (Fig. 1, Kriz & Bankir, 1988): túbulo contorneado proximal (PCT, *Proximal convoluted tubule*), túbulo recto proximal (PST, *Proximal straight tubule*), ramas delgadas descendente y ascendente del asa de Henle, rama

gruesa ascendente (TAL) del asa de Henle, túbulo contorneado distal (DCT, *Distal convoluted tubule*), túbulo conector (CNT, *Connecting tubule*) y conducto colector (CD, *Collecting duct*). Este último se identifica por la región renal en la que se encuentra: cortical (CCD), de la médula externa (OMCD) y de la médula interna (IMCD). Cada segmento de la nefrona presenta diferentes tipos celulares, con una composición específica de proteínas de transporte en sus membranas y por lo tanto, con una contribución particular en la modificación del ultrafiltrado. Cabe aclarar que el CD es común para varias nefronas, lo cual aplica también para el CNT de las nefronas profundas, pues generalmente se juntan varios CNT para formar una arcada antes de drenar al CCD; solo las nefronas superficiales suelen tener un CNT individual. Los CCDs descienden dentro de los rayos medulares de la corteza, y luego en la médula externa, los OMCDs atraviesan sin ramificaciones. Al entrar en la médula interna, los IMCDs se fusionan sucesivamente (Kriz & Kaissling, 2013).

Las nefronas se clasifican de acuerdo a la posición de su glomérulo en la corteza y la longitud de sus asas de Henle. Las nefronas corticales o superficiales, cuyas asas son cortas, tienen glomérulos ubicados en la región más externa de la corteza, mientras que las nefronas yuxtamedulares, de asas largas que se extienden profundamente en la médula interna, tienen glomérulos en la parte de la corteza adyacente a la médula (Fig. 1). Es importante mencionar que al final de TAL se localiza la mácula densa, conjunto de células especializadas que sensan el flujo tubular y que están en contacto con la arteriola aferente de su glomérulo correspondiente; esto forma parte del aparato yuxtaglomerular (Fox, 2014; Koeppen & Stanton, 2013).

Las células epiteliales del riñón están polarizadas, es decir, presentan dos dominios morfológica y bioquímicamente distintos; éstas expresan diferentes conjuntos de proteínas de transporte en su membrana apical (orientada hacia el lumen del túbulo), respecto a su membrana basolateral (en contacto con el intersticio) (Matlin & Caplan, 2013). El transporte epitelial de solutos puede ocurrir por vía transcelular o paracelular. En la primera vía, el soluto necesita 'atravesar' ambas membranas celulares (apical y basolateral). La dirección del movimiento del soluto (y por ende, la secuencia de las membranas que atraviesa) determina

si el proceso es de reabsorción (de la luz tubular hacia el intersticio) o de secreción (del intersticio hacia el lumen). La vía paracelular implica el movimiento (reabsorción, por lo regular) de la sustancia a través de uniones estrechas y espacios intercelulares laterales que se forman entre células epiteliales adyacentes de algunos segmentos tubulares (Kriz & Kaissling, 2013).



**Figura 1.** Esquema de la nefrona (modificado de Kriz & Bankir, 1988). Se representa una nefrona cortical (derecha) y una nefrona yuxtamedular (izquierda). Las regiones renales: corteza, médula externa y médula interna se delimitan con líneas punteadas, al igual que un rayo medular dentro de la corteza. La médula externa se subdivide en banda externa (OS) y banda interna (IS). Los números corresponden a los diferentes segmentos de la nefrona, cuyo nombre y nomenclatura se indican a la derecha del esquema.

Como se detallará más adelante, los canales HCN permiten el paso de cationes, por lo tanto, a continuación se expondrán con mayor énfasis los mecanismos relacionados con el manejo renal de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). Sin embargo, el transporte de éstos influye en el transporte de otros electrolitos como  $\text{Cl}^-$  y  $\text{HCO}_3^-$ , por lo que es inevitable hacer referencia a ellos de manera secundaria.

## **2.1. Transporte renal de sodio y potasio**

La actividad y expresión de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa se ha detectado en la membrana basolateral de la células del epitelio renal, aunque en diferente proporción dependiendo del segmento, siendo más abundante en TAL, DCT, CNT y CCD (Baskin & Stahl, 1982; Katz et al. 1979; Takada et al. 1992). Esta bomba es indispensable para mantener el gradiente de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , lo que permite la reabsorción transcelular neta de  $\text{Na}^+$  hacia el intersticio (de donde pasa a los capilares peritubulares), así como el transporte activo secundario (cotransportadores e intercambiadores) en los diferentes segmentos de la nefrona.

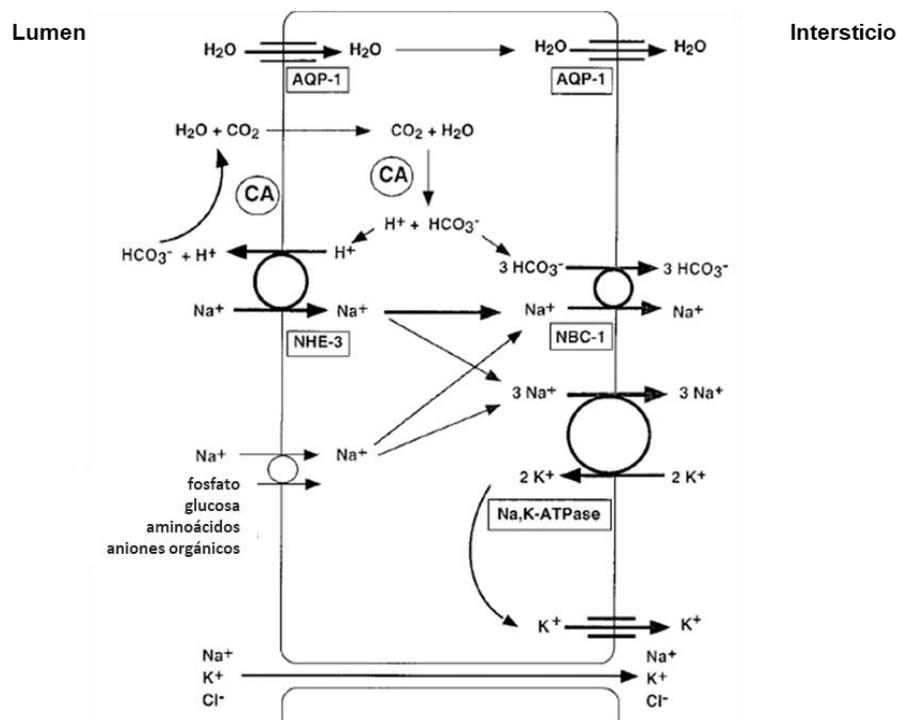
Asimismo, existen canales de  $\text{K}^+$  en la membrana basolateral a lo largo de la nefrona; éstos contribuyen a generar y mantener el potencial negativo de la membrana basolateral, así como reciclar el  $\text{K}^+$  para mantener la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa, entre otras funciones. Se han reportado canales de  $\text{K}^+$  pertenecientes a diversas familias (Hamilton & Devor, 2012); los más estudiados en la nefrona distal son los canales  $\text{K}_{ir}$ .

La reabsorción transcelular de agua es un aspecto importante de la fisiología renal y depende del gradiente osmótico y la expresión de proteínas integrales denominadas acuaporinas (AQP), tanto en la membrana apical como basolateral. A excepción de TAL y DCT, segmentos tubulares que no expresan dichas proteínas y en consecuencia son impermeables al agua, existe una distribución diferencial de las isoformas de AQP en la nefrona. AQP1 y AQP2 son las más estudiadas; AQP1 aporta permeabilidad acuosa constitutiva al túbulo proximal y ramas delgadas descendentes del asa de Henle, mientras que AQP2 se localiza en la nefrona distal, específicamente en las células del CNT y principales a lo largo del CD, donde su tráfico

vesicular hacia la membrana apical es regulado por la hormona vasopresina (Nielsen et al. 2002).

### 2.1.1. Túbulo proximal

En el túbulo proximal se reabsorbe el mayor porcentaje de los solutos filtrados; 60-70% de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , y alrededor del 80% de  $\text{HCO}_3^-$ . En esta región, dichos iones se reabsorben principalmente por vía paracelular. Sin embargo, en el caso del  $\text{Na}^+$ , su reabsorción transcelular es muy importante, pues se aprovecha el gradiente favorable para este catión (energizado por la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa basolateral) para el cotransporte de moléculas orgánicas (e.g. aminoácidos, glucosa). Asimismo, en este segmento destaca la participación del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  tipo 3 (NHE3) en la membrana apical y del cotransportador  $\text{Na}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$  electrogénico tipo 1 (NBCe1) en la membrana basolateral. Estos transportadores no solo contribuyen a la homeostasis de  $\text{Na}^+$ , sino también al balance ácido-base, al actuar en conjunto con las anhidrasas carbónicas luminal (CA IV) e intracelular (CA II) (Curthoys & Moe, 2014).



**Figura 2.** Esquema de la célula del túbulo proximal y sus principales mecanismos de transporte (modificado de Féraillé & Doucet, 2001). AQP1: acuaporina 1, NHE3: Intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  tipo 3, NBC1: Cotransportador  $\text{Na}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$  tipo 1, CA: Anhidrasa carbónica.

### 2.1.2. Rama gruesa ascendente del asa de Henle

En la rama gruesa ascendente (TAL) del asa de Henle se reabsorbe ~30% del NaCl filtrado, tanto por vía transcelular como paracelular. Su permeabilidad al agua es casi nula por lo que es un segmento fundamental en el mecanismo de concentración urinaria. Los elementos de transporte apicales más importantes son: el cotransportador NKCC2, sensible a los diuréticos de 'asa' (e.g. furosemida, bumetamida) y el canal de K<sup>+</sup> ROMK (*Renal Outer Medullary K<sup>+</sup>*, isoformas 2 y 3, Kir1.1b/c) (Mount & Yu, 2007, Reeves & Andreoli, 2008). El papel central del canal ROMK en TAL es el reciclamiento apical de K<sup>+</sup>, proceso que tiene varias funciones: hiperpolarizar el potencial de la membrana para favorecer la difusión basolateral de Cl<sup>-</sup>, proveer de K<sup>+</sup> a NKCC2 para mantener la reabsorción transcelular de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>, así como generar un potencial transepitelial lumen-positivo que permita la reabsorción paracelular de Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> (Hebert et al. 2005). La reabsorción de K<sup>+</sup> en TAL (~25% del K<sup>+</sup> filtrado) también puede ocurrir transcelular o paracelularmente; en el primer caso, el K<sup>+</sup> entra a través de NKCC2 en la membrana apical y sale por canales de K<sup>+</sup> o cotransporte con Cl<sup>-</sup> o HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> en la membrana basolateral (Giebisch, 1998).

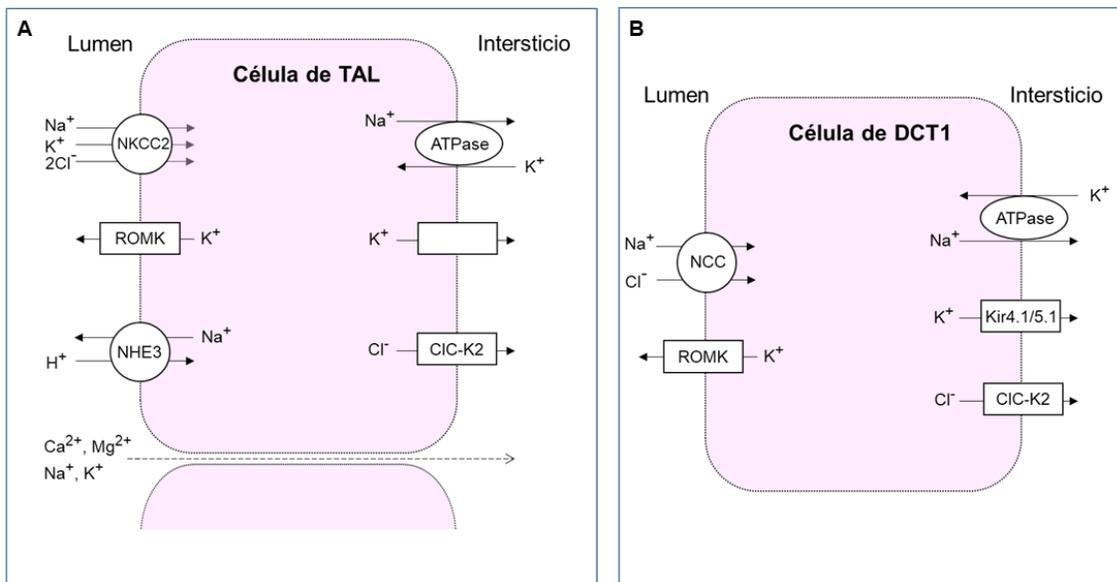
En TAL se reabsorbe ~15% del HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> filtrado. Se ha descrito la expresión de NHE3 en la membrana apical, intercambiador que participa en la secreción de H<sup>+</sup> (acoplada a la reabsorción de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Existen varios mecanismos para la salida de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> en la membrana basolateral, incluyendo el intercambio de Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>; mientras que la salida de Cl<sup>-</sup> ocurre principalmente a través del canal de Cl<sup>-</sup> renal CIC-K2 y su subunidad Bartina (*Barttin*). Cabe mencionar que TAL también tiene una contribución importante en la reabsorción de cationes divalentes (Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>) por la vía paracelular (Mount, 2014).

La reabsorción de Na<sup>+</sup> en TAL, en ausencia del transporte de agua, incrementa la osmolaridad del intersticio medular, que es indispensable para inducir la reabsorción de agua a nivel del CD, y en consecuencia la concentración urinaria (Mount & Yu, 2007).

### 2.1.3. Túbulo contorneado distal

En el túbulo contorneado distal (DCT) se reabsorbe del 5-10% de  $\text{Na}^+$  y tiene una contribución significativa a la reabsorción transcelular de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (Subramanya & Ellison, 2014). En humanos y roedores, este segmento se subdivide en dos: temprano (DCT1) y tardío (DCT2). En el riñón, el cotransportador  $\text{Na}^+-\text{Cl}^-$  (NCC) es exclusivo de DCT, siendo mayor su expresión en DCT1 respecto a DCT2 (Loffing et al. 2003).

En la membrana basolateral de las células de DCT es importante la presencia de los canales de  $\text{K}^+$  Kir4.1/5.1, que al parecer actúan como sensores del  $\text{K}^+$  extracelular, pues su actividad determina el potencial de la membrana basolateral, el cual afecta la actividad del canal de  $\text{Cl}^-$  CIC-K2 y por lo tanto, la concentración intracelular de  $\text{Cl}^-$ , que a su vez influye en la cascada de señalización WNK-SPAK/OSR1 involucrada en el nivel de fosforilación y actividad de NCC (Hoorn et al. 2020).



**Figura 3. (A)** Esquema de la célula de TAL y sus principales mecanismos de transporte. **(B)** Esquema de la célula de DCT1 y sus principales mecanismos de transporte. CIC-K2: canal de  $\text{Cl}^-$  renal, Kir: canal de  $\text{K}^+$  rectificador entrante, NCC: Cotransportador  $\text{Na}^+-\text{Cl}^-$ , NHE3: Intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  tipo 3, NKCC2: Cotransportador  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$  tipo 2, ROMK: canal de  $\text{K}^+$  Kir1.1.

#### 2.1.4. Nefrona distal sensible a aldosterona

La nefrona distal sensible a aldosterona (ASDN, *Aldosterone Sensitive Distal Nephron*) comprende DCT2, CNT y CD. Como su nombre lo sugiere, es donde ocurre la regulación fina de la excreción de electrolitos (en particular de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ) mediada por aldosterona. La enzima  $11\beta\text{HSD2}$  (*11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2*) confiere la sensibilidad de la ASDN a la aldosterona, pues al actuar sobre los glucocorticoides, evita que éstos ocupen inespecíficamente el receptor de mineralocorticoides (Loffing et al. 2001, Meneton et al. 2004). A la ASDN solo llega ~10% del  $\text{Na}^+$  filtrado, y la mayoría se reabsorbe debido a su importancia para mantener el volumen del fluido extracelular y por lo tanto, la presión arterial. Además, la ASDN es el sitio principal de secreción de  $\text{K}^+$  (CNT/CCD), aunque también puede darse la reabsorción de  $\text{K}^+$  (en OMCD principalmente) según sea la demanda fisiológica (Mount & Yu, 2007, Wang & Giebisch 2009).

En la ASDN coexisten las células más abundantes específicas de cada segmento (de DCT2, de CNT o las 'principales' de CD) y las células menos numerosas, denominadas intercaladas. Estas últimas se subdividen al menos en tres: tipo A o  $\alpha$ -intercaladas, tipo B o  $\beta$ -intercaladas y tipo no A-no B, de acuerdo a la distribución subcelular de la  $\text{H}^+$  ATPasa vacuolar (V-ATPasa) y de los intercambiadores de  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ . Las células  $\alpha$ -intercaladas se caracterizan por la expresión apical de la V-ATPasa y la expresión basolateral del intercambiador  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  AE1 (*Anion exchanger type 1*), al contrario de las células  $\beta$ -intercaladas, que expresan a la V-ATPasa en la membrana basolateral y al intercambiador  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  pendrina en la membrana apical, mientras que las células no A-no B, expresan apicalmente tanto a V-ATPasa como a pendrina (Kriz & Kaissling, 2013).

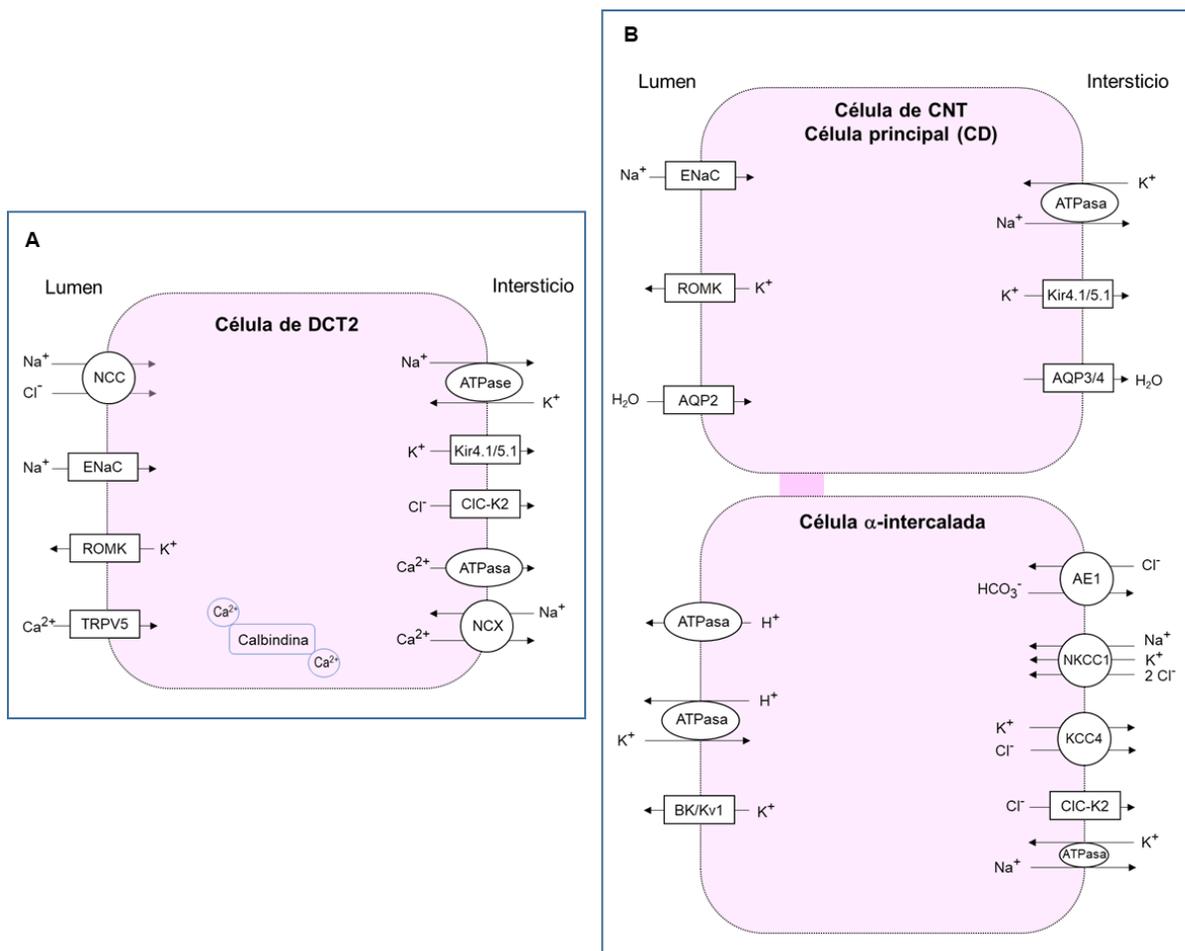
DCT2 se diferencia de DCT1 en que contiene células intercaladas además de las células propias del segmento, y en que expresa simultáneamente a NCC y al canal epitelial de  $\text{Na}^+$  (ENaC). Este último es sensible a amilorida y se localiza a lo largo de la ASDN, aunque su función es particularmente crítica y significativa en CNT (Loffing & Korbmayer, 2009; Rubera et al. 2003).

Tanto el transporte mediado por ENaC (apical) como por la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPasa (basolateral) en las células principales es electrogénico, por lo que genera una diferencia de potencial transepitelial (lumen-negativo) y un gradiente electroquímico que favorecen la secreción de K<sup>+</sup>. En condiciones basales, el canal ROMK (isoformas 1 y 2, Kir1.1a/b), cuyas propiedades biofísicas (caracterizadas por la técnica electrofisiológica de 'patch-clamp') corresponden al canal de K<sup>+</sup> de baja conductancia SK (*Small-conductance K*), permite la secreción de K<sup>+</sup> en las células principales debido a su alta probabilidad de apertura (Hebert et al. 2005; Wang & Giebisch, 2009). En condiciones de un flujo luminal distal elevado, el canal BK (*Big-conductance K* o maxi-K, sensible a Ca<sup>2+</sup> y voltaje), localizado tanto en células principales como intercaladas, también participa en la secreción de K<sup>+</sup> (Palmer & Frindt, 2007a; Pluznick & Sansom, 2006; Woda et al. 2001).

La aldosterona estimula la reabsorción de Na<sup>+</sup> y la secreción de K<sup>+</sup>, al favorecer la expresión en membrana plasmática de ENaC, ROMK y la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa (Thomas et al. 2008, Verrey et al. 2003; Welling, 2013). A continuación, se resumen algunos de los mecanismos involucrados. La aldosterona induce tempranamente a la cinasa regulada por suero y glucocorticoides isoforma 1 (*SGK1, Serum- and glucocorticoid-regulated kinase 1*). SGK1 fosforila a la ubiquitina ligasa Nedd4-2 (*Neural precursor cell-expressed and developmentally downregulated*), inhibiendo la interacción de ésta con ENaC y, por ende, la señalización de degradación del canal, lo cual conduce a su mayor residencia en membrana y actividad (Staub & Loffing, 2013). La fosforilación de ROMK1 (Ser 44) por SGK1 promueve su tráfico hacia la membrana plasmática (Yoo et al. 2003); asimismo, se ha demostrado que SGK1 inhibe a la cinasa WNK4 al fosforilarla (Ring et al. 2007), limitando así la acción inhibitoria de WNK4 (independiente de su actividad cinasa) sobre ROMK (Kahle et al. 2003). Además de los efectos mediados por SGK1, la aldosterona también induce la transcripción de diversos genes, entre ellos, la subunidad  $\alpha$  de ENaC y las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa (Verrey et al. 2003).

Los estímulos principales para la secreción de aldosterona son hipercalemia e hipovolemia (contracción del volumen intravascular). Por lo regular, la secreción de K<sup>+</sup> está acoplada a la reabsorción de Na<sup>+</sup>; sin embargo, en el caso de hipovolemia, la aldosterona induce la

retención de  $\text{Na}^+$  sin promover la excreción de  $\text{K}^+$ . A esta respuesta renal contradictoria, dependiendo del origen del estímulo, se le denomina "paradoja de la aldosterona", y molecularmente se relaciona con la actividad de las cinasas WNK (*With no K*, sin lisina) y su señalización asociada, cuyos principales blancos son NCC, ENaC y ROMK (Arroyo et al. 2011).



**Figura 4. (A)** Esquema de la célula de DCT2 y sus principales mecanismos de transporte. **(B)** Esquema de la célula de CNT o principal de CD y de la célula  $\alpha$ -intercalada (DCT2/CNT/CD), indicando sus principales mecanismos de transporte. AE1: Intercambiador aniónico tipo 1, AQP: Acuaporina, BK: Canal de  $\text{K}^+$  regulado por  $\text{Ca}^{2+}$ , CIC-K2: canal de  $\text{Cl}^-$  renal, ENaC: Canal epitelial de  $\text{Na}^+$ , KCC4: Cotransportador  $\text{K}^+$ - $\text{Cl}^-$  tipo 4, Kir: Canal de  $\text{K}^+$  rectificador entrante, NCC: Cotransportador  $\text{Na}^+$ - $\text{Cl}^-$ , NKCC1: Cotransportador  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$  tipo 1, NCX: Intercambiador  $\text{Na}^+$ / $\text{Ca}^{2+}$ , ROMK: canal de  $\text{K}^+$  Kir1.1 (isoformas 1 y 2), TRPV5: Canal epitelial de  $\text{Ca}^{2+}$ .

La reabsorción transcelular de  $\text{Ca}^{2+}$  ocurre en DCT2 y CNT, por lo que estos segmentos expresan varias proteínas relacionadas con el transporte de dicho catión: canal TRPV5 (*Transient receptor potential vanilloid 5*, previamente denominado canal epitelial de  $\text{Ca}^{2+}$ ),

calbindina D<sub>28k</sub> (proteína de unión a Ca<sup>2+</sup> citosólico), intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (NCX1) y Ca<sup>2+</sup> ATPasa de membrana plasmática (PMCAb1) (Loffing & Kaissling, 2003; Boros et al. 2009).

Como se ha mencionado, los principales mecanismos apicales de transporte en las células de CNT y principales (CD) relacionados con Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, son ENaC y ROMK, respectivamente. Por su parte, las células  $\alpha$ -intercaladas, también conocidas como secretoras de ácido, se caracterizan por la presencia de dos bombas en su membrana apical: V-ATPasa y H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa. Esta última permite la reabsorción de K<sup>+</sup> además de la secreción de H<sup>+</sup> (Rao et al. 2019).

En las células  $\beta$ -intercaladas, o secretoras de base, la actividad conjunta de la pendrina y del intercambiador de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/Cl<sup>-</sup> dependiente de Na<sup>+</sup> (NDBCE) en la membrana luminal, permite la reabsorción electroneutra de Na<sup>+</sup> en el CCD (Leviel et al. 2010).

## 2.2. Balance ácido-base y transporte renal de amonio

La concentración sistémica de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> es un componente crítico de la homeostasis ácido-base, y los riñones se encargan no solo de la reabsorción del HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> filtrado, sino también de la producción *de novo* de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> a través de la excreción de ácido y NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Esto último es indispensable para restituir el HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> que se utilizó para amortiguar la carga ácida endógena generada durante el metabolismo de las proteínas provenientes de la dieta (Hamm & Nakhoul, 2007).

Como se mencionó en las secciones previas, la mayoría del HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> filtrado se reabsorbe: túbulo proximal (~80%), TAL (~15%) y nefrona distal (~5%). En el túbulo proximal, los iones H<sup>+</sup> que se secretan a la luz tubular, en gran parte a través de NHE3, se combinan con el HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> filtrado para formar H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, el cual genera H<sub>2</sub>O y CO<sub>2</sub> bajo la acción de la anhidrasa carbónica (CA) IV; el CO<sub>2</sub> difunde al interior de la célula, donde se reconstituye el H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, y la CA II cataliza su disociación en HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y H<sup>+</sup>; finalmente, el HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> sale por vía basolateral a través de NBCe1. En TAL, el mecanismo también involucra a NHE3 en la membrana apical, mientras que la salida basolateral de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ocurre principalmente por un intercambiador aniónico. En la nefrona distal, se reabsorbe el porcentaje restante del HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> filtrado; el proceso tiene lugar en

las células  $\alpha$ -intercaladas, donde la secreción apical de  $H^+$  está mediada por dos bombas (V-ATPasa y  $H^+/K^+$  ATPasa), y el transporte basolateral de  $HCO_3^-$  por AE1. Además, en las células  $\alpha$ -intercaladas se produce  $HCO_3^-$  nuevo a partir del  $CO_2$  y  $H_2O$  provenientes del intersticio y la acción intracelular de la CA II; en este caso, el  $HCO_3^-$  también sale por vía basolateral, mientras que los iones  $H^+$  generados en el proceso se secretan por las bombas antes mencionadas para su excreción en forma de acidez titulable o  $NH_4^+$  (Weiner & Verlander, 2020).

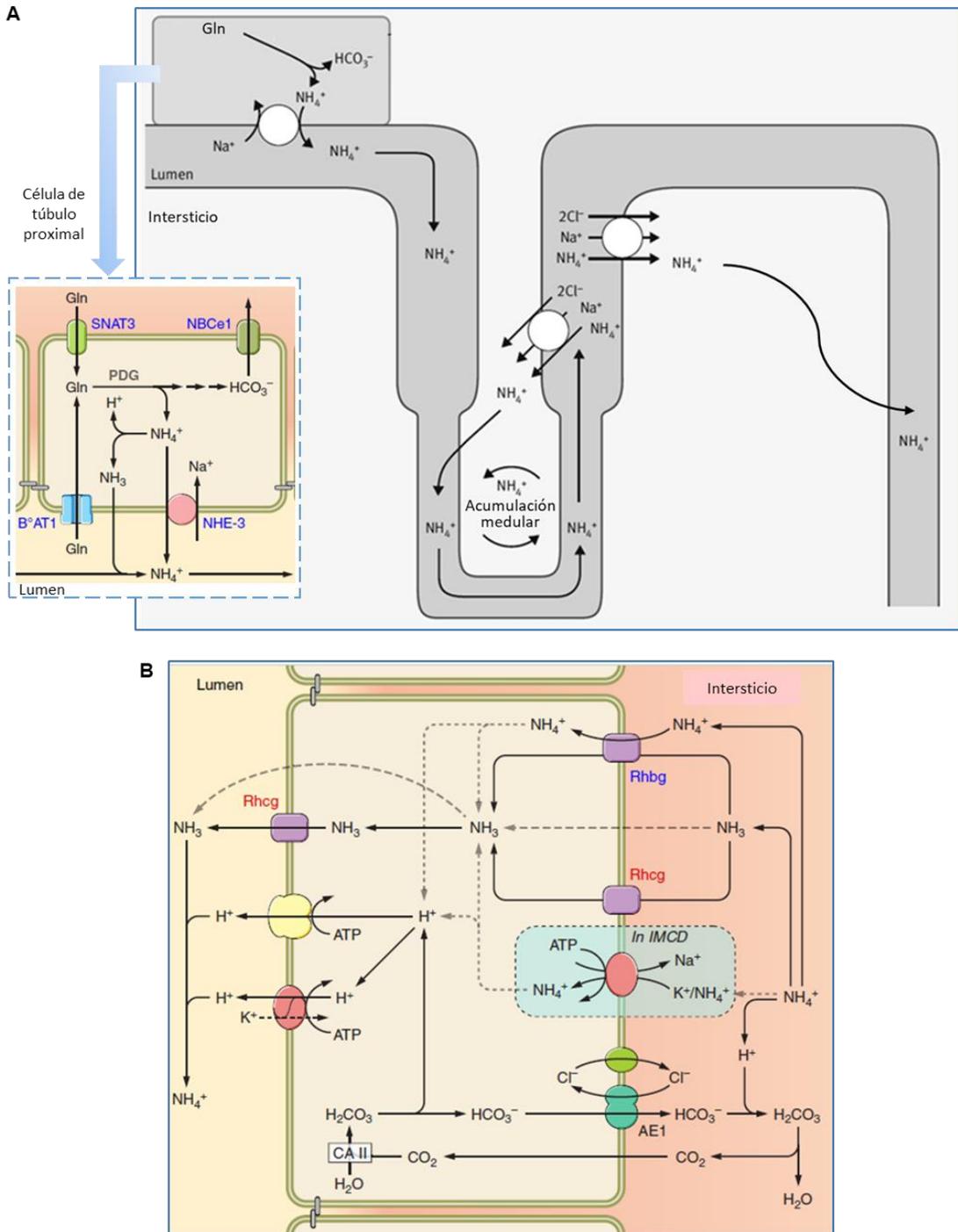
El sistema amortiguador constituido por el amoníaco ( $NH_3$ ) y el  $NH_4^+$  tiene una participación esencial en la fisiología renal ácido-base. La excreción de  $NH_4^+$  y de 'acidez titulable' son los dos componentes de la excreción neta de ácido. La excreción de acidez titulable (fosfatos principalmente) tiene una contribución de 1/3 a 1/2 en condiciones basales y una capacidad de aumento mínima ante una demanda fisiológica o patológica, mientras que la excreción de  $NH_4^+$  suele ser mayoritaria en condiciones basales y puede aumentar considerablemente ante una sobrecarga ácida sistémica (i.e. acidosis metabólica) (Hamm et al. 2015).

El  $NH_4^+$  proveniente del plasma y filtrado por los glomérulos es mínimo. En su mayoría se produce a nivel renal a través del proceso de amoniagénesis, el cual ocurre principalmente en el túbulo proximal a partir de la glutamina. Este aminoácido puede acceder tanto por vía apical ( $B^{\circ}AT1$ , transportador de aminoácidos neutros tipo B, dependiente de  $Na^+$ ), como basolateral (SN1 o SNAT3, transportador de glutamina dependiente de  $Na^+$ ). Posteriormente, la glutamina se transporta a la mitocondria, donde es sustrato de la glutaminasa dependiente de fosfato (PDG), que genera glutamato y libera  $NH_4^+$ . La desaminación del glutamato por la GDH (glutamato deshidrogenasa) produce  $\alpha$ -cetoglutarato y libera otro  $NH_4^+$ . Se ha propuesto que el  $NH_4^+$  sale de la mitocondria a través de AQP8. A partir del  $\alpha$ -cetoglutarato se obtiene malato, el cual se transporta al citoplasma. El metabolismo del malato conduce a fosfoenolpiruvato y  $CO_2$ ; una de las enzimas clave de este proceso es PEPCK (fosfoenolpiruvato carboxicinas). El fosfoenolpiruvato se puede convertir en piruvato, que en la mitocondria se oxida a acetil-CoA, el cual entra al ciclo de Krebs, donde se genera  $HCO_3^-$ . Alternativamente, el piruvato puede entrar a la vía de la gluconeogénesis renal para producir

glucosa y  $\text{HCO}_3^-$ . Por lo tanto, la amoniagénesis también contribuye a la generación de  $\text{HCO}_3^-$  'nuevo' (Weiner & Verlander, 2017).

Para seguir el transporte de  $\text{NH}_4^+$  a lo largo de la nefrona, es importante mencionar que éste comparte vías de transporte con el  $\text{K}^+$  debido a la similitud en sus propiedades fisicoquímicas (e.g. radio iónico, radio hidrodinámico). Se ha planteado que puede sustituir al  $\text{K}^+$  en diversas proteínas de transporte, como NKCC, canales de  $\text{K}^+$  y la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa, entre otras. También se ha demostrado que el  $\text{NH}_4^+$  puede sustituir al hidrogenión en los intercambiadores NHE, aunque el mecanismo no es claro (Weiner & Hamm, 2007).

El  $\text{NH}_4^+$  que se produce en el túbulo proximal se secreta al fluido tubular a través de NHE3 (Fig. 5). En el pasado se propuso que el transporte de  $\text{NH}_4^+$  implicaba su disociación en  $\text{NH}_3$  y  $\text{H}^+$ , seguido de la difusión de  $\text{NH}_3$  a través de las membranas plasmáticas. Sin embargo, considerando que el pKa del sistema  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  es de  $\sim 9.15$ , se puede asumir que al pH de los fluidos biológicos de 7.4 o menos, predomina la forma protonada (Weiner & Verlander, 2011). En TAL, el  $\text{NH}_4^+$  luminal se reabsorbe hacia el intersticio medular; en la membrana apical puede ocupar el sitio del  $\text{K}^+$  en NKCC2 (Kinne et al. 1986) y en la membrana basolateral, salir a través el intercambiador NHE4 (Bourgeois et al. 2010). Finalmente, en la nefrona distal, el  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  pasa del intersticio hacia la luz tubular. Las glicoproteínas *Rhesus* (Rh), que se expresan en todos los tipos celulares a lo largo de la nefrona distal, median el transporte de  $\text{NH}_3$ . La glicoproteína Rh c (Rhcg) tienen un papel clave tanto en la membrana basolateral como apical, mientras que la glicoproteína Rh b (Rhbg) solo se expresa basolateralmente, y algunos estudios en sistemas heterólogos apoyan que transporta  $\text{NH}_4^+$  además de  $\text{NH}_3$  (Weiner & Verlander, 2014). Tras el transporte apical de  $\text{NH}_3$  a través de Rhcg, la formación inmediata de  $\text{NH}_4^+$  ocurre debido a la secreción luminal simultánea de  $\text{H}^+$  por la V-ATPasa en las células  $\alpha$ -intercaladas (Fig. 5). La excreción urinaria de  $\text{NH}_4^+$  es el principal componente de la excreción neta de ácido y producción de bicarbonato nuevo, en comparación con la 'acidez titulable' mediada principalmente por el sistema amortiguador de fosfatos (Hamm et al. 2015).



**Figura 5. (A)** Diagrama que resume el recorrido renal del  $\text{NH}_4^+$  a lo largo de la nefrona (modificado Hickish & Farmery, 2012) con inserto\* de la célula proximal (sitio principal de amoniagénesis) para observar las proteínas de membrana basolateral y apical relacionadas con el proceso. **(B)** Esquema que muestra los mecanismos de transporte de  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  en la nefrona distal (\*tomado de Weiner & Verlander, 2017). AE1: Intercambiador aniónico tipo 1, B°AT1: Transportador de aminoácidos neutros tipo B, CA II: Anhidrasa carbónica tipo II, Gln: Glutamina, NBCe1: Cotransportador  $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$  electrogénico tipo 1, NHE3: Intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  tipo 3, PDG: Glutaminasa dependiente de fosfato, Rhbg/Rhcg: glicoproteínas Rh b/c, SNAT3: Transportador de glutamina.

### 2.3. Papel del riñón en la homeostasis de potasio

La función homeostática del riñón es de vital importancia ante las variaciones cotidianas en la composición de la dieta, ya que contribuye a mantener los niveles plasmáticos de los diferentes electrolitos, incluido el  $K^+$ , en rangos fisiológicos estrechos.

Los estudios que utilizan la administración crónica (1 a 2 semanas) de dietas de  $K^+$  extremas (exceso o deficiencia), en su mayoría se han llevado a cabo en modelos animales (roedores principalmente) y han permitido, en combinación con diversas metodologías (bioquímicas, inmunológicas, genéticas, electrofisiológicas, micropunción y microperfusión renal, entre otras), comprender mejor la naturaleza molecular y funcional de los mecanismos renales que contribuyen a mantener la homeostasis de  $K^+$ .

#### **2.3.1. Respuestas renales ante una dieta con potasio alto (KA)**

Ante una dieta con  $K^+$  alto (KA), el riñón tiene la capacidad de incrementar sustancialmente la secreción de  $K^+$  en la nefrona distal y por lo tanto, su excreción urinaria (Malnic et al. 2013). Esta respuesta kaliurética se asocia a la inhibición del transporte de  $Na^+$  en varios segmentos de la nefrona, de tal manera que aumenta notablemente tanto el flujo como el contenido tubular de  $Na^+$  que llega a la ASDN, lo cual estimula las vías de secreción de  $K^+$  (Giebisch 1998). Recientemente, se reportó que la expresión proteica de NHE3, NKCC2 y NCC disminuye ante una dieta KA (Yang et al. 2017), lo cual explicaría que en el túbulo proximal, TAL y DCT1 se reabsorba menos  $Na^+$ ; en el túbulo proximal en particular, esto debe relacionarse con la menor reabsorción de fluido registrada (Brandis et al. 1972).

Asimismo, la dieta KA provoca la disminución de los niveles de NCC fosforilado (Vallon et al. 2009, Yang et al. 2018), incluso si el tratamiento es agudo (Rengarajan et al. 2014; Sorensen et al. 2013) o se combina con deficiencia de  $Na^+$  (van der Lubbe et al. 2013). La dieta KA también induce la reducción de NKCC2 fosforilado (Yang et al. 2018). Existe evidencia de que la fosforilación de dichos transportadores por las cinasas SPAK (*Ste-20-related proline alanine-rich protein kinase*) y OSR1 (*Oxidative stress-responsive kinase 1*), a su vez activadas por las

cinastas WNK, favorece su actividad en membrana plasmática (McCormick et al. 2020). De tal manera que, niveles bajos de NKCC2 y NCC fosforilados, serían indicadores de menor actividad y reabsorción electroneutra de  $\text{Na}^+$  en TAL y DCT.

En la ASDN, el  $\text{K}^+$  elevado estimula la secreción de aldosterona, y niveles altos de esta hormona activan la señalización molecular que promueve la expresión apical de ENaC y ROMK (Sección 1.1.4). Consistente con la acción de la aldosterona, hay evidencia de que la dieta KA provoca una mayor expresión apical y conductancia de ENaC (Frindt & Palmer, 2004a; Frindt & Palmer, 2010; Yang et al. 2017), así como una mayor actividad renal de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa tanto total (Silva et al. 1973) como en CNT, CCD y OMCD (Doucet & Katz, 1980; LeHir et al. 1982). Lo anterior favorece el gradiente electroquímico para la secreción de  $\text{K}^+$  a través de los canales apicales de  $\text{K}^+$ . Se ha documentado que la dieta KA se asocia con mayor actividad del canal ROMK en CNT y CCD (Frindt et al. 2009), y el aumento de su inmunofluorescencia apical en DCT2, CNT y CCD (Wade et al. 2011). También el canal BK se regula a la alta por la dieta KA y es responsable por la secreción de  $\text{K}^+$  dependiente de flujo (Bailey et al. 2006; Hotzclaw et al. 2010; Najjar et al. 2005), mientras que el canal Kv1.3 aumenta su expresión en la membrana apical de las células  $\alpha$ -intercaladas para contribuir a la secreción de  $\text{K}^+$  (Carrisoza et al. 2010).

Por otro lado, la actividad de la  $\text{H}^+/\text{K}^+$  ATPasa, principal mecanismo de reabsorción de  $\text{K}^+$  en la nefrona distal, está disminuida (Eiam-Ong et al. 1993, Garg & Narang, 1989).

Respecto al balance ácido-base, se ha observado que una dieta KA provoca una reducción del pH y  $\text{NH}_4^+$  urinario, así como de la excreción neta de ácido (Tannen, 1977; Tannen et al. 1973). Se ha planteado que la alteración del metabolismo renal de  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  provocada por la hipercalemia, subyace al desarrollo de acidosis metabólica (Karet, 2009; Harris et al. 2018). Entre los mecanismos posiblemente involucrados se encuentran: a) la disminución de la amoniagénesis (Nagami et al. 1990), debido a que las enzimas involucradas reducen su actividad ante el aumento del pH intracelular (Karet, 2009) y/o su expresión proteica (Harris et al. 2018), b) la reducción de la secreción de  $\text{H}^+$  por una actividad baja de la  $\text{H}^+/\text{K}^+$  ATPasa (Eiam-Ong et al. 1993, Garg & Narang, 1989) y una menor expresión apical de la V-ATPasa

(Harris et al. 2018), c) la disminución de la abundancia de Rhcg en OMCD. Asimismo, es necesario considerar que la elevación de la concentración luminal de  $K^+$  compromete la reabsorción de  $NH_4^+$  en TAL, dado que ambos cationes compiten por el mismo sitio de unión en NKCC2 (Good, 1988). La disminución de la concentración de  $NH_3/NH_4^+$  en el intersticio medular, en consecuencia, afecta el gradiente para su secreción en el CD (Dubose & Good, 1992).

### 2.3.2. Respuestas renales ante una dieta deficiente de potasio (KD)

Ante una ingesta deficiente de  $K^+$ , el riñón activa mecanismos que disminuyen notablemente la excreción de  $K^+$  a solo 1-3% del  $K^+$  filtrado (Linas et al. 1979). Ya que la ASDN es el sitio principal donde se regula la secreción de  $K^+$ , el objetivo es disminuir los factores que estimulan la reabsorción electrogénica de  $Na^+$  a través de ENaC. Para lograrlo, la dieta deficiente de  $K^+$  (KD), al contrario de la dieta KA, provoca que una menor cantidad de  $Na^+$  llegue a la ASDN, y por lo tanto, se intensifica la reabsorción de  $Na^+$  en los segmentos tubulares previos.

En el túbulo proximal aumenta la expresión y actividad de NHE3 por la dieta KD (Elkjaer et al. 2002; Soleimani et al. 1990). En DCT, KD provoca el aumento de la fosforilación de NCC (Frindt & Palmer, 2010, Vallon et al. 2009, Wade et al. 2015, Wang et al. 2018), incluso en un contexto de exceso de  $Na^+$  en la dieta (Terker et al. 2015); esto implica una mayor actividad del cotransportador y en consecuencia, un aumento de la reabsorción de NaCl en DCT.

Además, los niveles plasmáticos de aldosterona caen drásticamente por la dieta KD (Linas et al. 1979, Wald et al. 1998), lo cual indica que los mecanismos inducidos por esta hormona para estimular la actividad de ENaC y ROMK, están inhibidos. En particular, si el nivel de SGK1 es bajo, Nedd4-2 puede ubiquitinar a ENaC para conducir a su degradación, y WNK4 puede ejercer su acción inhibitoria sobre ROMK. Esto es consistente con la menor expresión apical de ENaC (Elkjaer et al. 2002). La actividad de ROMK no solo está restringida por una menor entrada de  $Na^+$  a través de ENaC, sino también por la disminución de su expresión apical al promoverse su endocitosis (Chu et al. 2003). La fosforilación del canal ROMK (Tyr337) por la

proteína tirosina cinasa (PTK) c-Src induce su internalización (Lin et al. 2002). Los aniones superóxido, cuya producción aumenta por la deficiencia de  $K^+$ , estimulan la expresión de c-Src (Babilonia et al. 2005; Wang et al. 2010). Se ha propuesto que la activación del receptor de Ang II tipo 1 (AT1R) y de la NADPH oxidasa en el riñón está relacionada con la generación de aniones superóxido (Babilonia et al. 2007, Wei et al. 2007).

La deficiencia dietaria de  $K^+$ , además de activar los mecanismos descritos para evitar la secreción renal de  $K^+$ , estimula la reabsorción neta de  $K^+$  por las células  $\alpha$ -intercaladas en el CD, al aumentar la expresión y actividad de la  $H^+/K^+$  ATPasa, especialmente la isoforma cólonica (Nakamura et al. 1998a, 1998b; Gumz et al. 2010).

Una dieta KD se asocia al desarrollo de alcalosis metabólica, la cual se refleja en el aumento de la concentración plasmática de  $HCO_3^-$  (Jones et al. 1982). Esta alteración en el equilibrio ácido-base es resultado del aumento de varios procesos interrelacionados: amoniagénesis y transporte renal de  $NH_3/NH_4^+$ , reabsorción de bicarbonato, secreción de  $H^+$  y excreción urinaria de  $NH_4^+$ .

Se ha demostrado que una dieta KD induce una disminución del pH intracelular (Adam et al. 1986), que se ha implicado en la señalización para inducir la amoniagénesis. Además, hay estudios tanto en humanos como en animales de experimentación que asocian una ingesta deficiente de  $K^+$  con el aumento de la amoniagénesis (Tannen 1970; Tannen, 1977; Abu Hossain et al. 2011). En particular, se ha demostrado que la dieta KD aumenta la expresión del transportador de glutamina SN1, de las enzimas mitocondriales amoniagénicas PDG y GDH, así como de la enzima citosólica PEPCK (Abu Hossain et al. 2011). Al haber una mayor producción de  $NH_4^+$  a nivel proximal, aumenta su concentración en el fluido luminal, lo que favorece su reabsorción en TAL y acumulación en el intersticio medular. Lo anterior se traduce en un mayor transporte de  $NH_3/NH_4^+$  en la región distal. Al respecto, se ha reportado que una dieta KD induce una mayor expresión de Rhcg en las células principales e intercaladas del OMCD (Han et al. 2011; Lee et al. 2013), y de Rhbg en las células intercaladas del CCD y

OMCD, además de que la delección de *Rhbg* específicamente en las células intercaladas, inhibe el aumento de la excreción urinaria de  $\text{NH}_4^+$  inducida por una dieta KD (Bishop et al. 2013).

El aumento de la reabsorción de  $\text{HCO}_3^-$  se ha confirmado tanto a nivel proximal como distal mediante estudios de micropunción y microperfusión (Capasso et al. 1987; Nakamura et al. 1998a, 1998b; Rector et al. 1964). Una mayor expresión y actividad tanto de NBCe1 (Amlal et al. 2000a; Soleimani et al. 1990) como de NHE3 (Elkjaer et al. 2002; Soleimani et al. 1990) en la corteza renal ante la dieta KD, es consistente con un aumento de la reabsorción proximal de  $\text{HCO}_3^-$ , tanto filtrado como 'nuevo' (producido durante la amoniagénesis).

También contribuye al mantenimiento de la alcalosis metabólica, la intensa secreción de  $\text{H}^+$  por el aumento de la actividad y expresión apical de la V-ATPasa (Bailey et al. 1998, Silver et al. 2000), y de la actividad de la  $\text{H}^+/\text{K}^+$  ATPasa (Nakamura et al. 1998a, 1998b), pues favorece una mayor excreción urinaria de  $\text{NH}_4^+$  (Abu Hossain et al. 2011, Han et al. 2011), el principal componente de la excreción neta de ácido, que a su vez se asocia a la producción de  $\text{HCO}_3^-$  nuevo y su reabsorción en la nefrona distal.

La dieta KD afecta profundamente el balance de agua, pues se ha observado: polidipsia, poliuria, disminución de la osmolaridad urinaria y defecto en la habilidad concentradora urinaria (Amlal et al. 2000b, Berl et al. 1977). Estas alteraciones se han relacionado con una menor expresión proteica de AQP2 (Amlal et al. 2000b, Marples et al. 1996), así como con la inhibición de la reabsorción de NaCl en TAL (Gutsche et al. 1984, Unwin et al. 1994), asociada a la regulación a la baja de NKCC2 (Amlal et al. 1998; Elkjaer et al. 2002; Mennitt et al. 2000), y que se traduce en una menor hipertonicidad del intersticio medular.

**Tabla 2. Mecanismos renales principales para mantener la homeostasis de potasio**

Proceso	Mecanismo molecular	Regulación por la dieta KA	Regulación por la dieta KD
Reabsorción de Na <sup>+</sup> en túbulo proximal	NHE3	↓	↑
Reabsorción de Na <sup>+</sup> en TAL	NKCC2	↓	↓
Reabsorción de Na <sup>+</sup> en DCT	NCC fosforilado	↓	↑
Secreción de K <sup>+</sup> (ASDN)	ENaC ROMK BK	↑	↓
Reabsorción de K <sup>+</sup> (células α-intercaladas, ASDN)	H <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPasa	↓	↑
<b>Balance ácido-base</b>		Acidosis metabólica	Alcalosis metabólica
<b>Secreción de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> Amoniagénesis: Entrada de glutamina Enzimas clave</b>	NHE3  SN1 PDG, GDH, PEPCK	↓	↑
<b>Transporte de NH<sub>3</sub> Secreción de H<sup>+</sup></b>	Rhbg, Rhcg H <sup>+</sup> ATPasa	↓	↑
<b>Reabsorción de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	NBCe1 AE1	?	↑
<b>Acción de aldosterona</b>	SGK1	↑	↓

AE1: Intercambiador aniónico tipo 1, BK: Canal de K<sup>+</sup> regulado por Ca<sup>2+</sup>, ENaC: Canal epitelial de Na<sup>+</sup>, GDH: glutamato deshidrogenasa, NBCe1: Cotransportador Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> electrogénico tipo 1, NCC: Cotransportador Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>, NHE3: Intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> tipo 3, NKCC2: Cotransportador Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, 2Cl<sup>-</sup> tipo 2; PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxicinas, ROMK: canal de K<sup>+</sup> Kir1.1., PDG: Glutaminasa dependiente de fosfato, Rhbg/Rhcg: glicoproteínas Rh b/c, SGK1: cinasa regulada por suero y glucocorticoides, SN1: Transportador de glutamina.

### 3. Canales iónicos

Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana, ya sea plasmática o subcelular (e.g. mitocondria, aparato de Golgi), que presentan una estructura denominada 'poro', el cual permite el paso de iones. A diferencia de otros mecanismos de transporte iónico, los canales median un transporte pasivo (a favor del gradiente de concentración), por lo que no

requieren energía, a diferencia de las proteínas que median un transporte activo (ATPasas), y tienen una velocidad de conducción mucho mayor que las proteínas transportadoras (e.g. cotransportadores, intercambiadores). Dos propiedades que distinguen a los canales iónicos de simples poros acuosos son: la selectividad iónica y el control de su apertura/cierre (*gating*). Por lo tanto, los canales iónicos se pueden clasificar de acuerdo con el tipo de ión que dejan pasar (e.g. canales de K<sup>+</sup>, canales de Na<sup>+</sup>, canales de Cl<sup>-</sup>, canales catiónicos) y el mecanismo que controla su apertura/cierre (Alberts et al. 2008). Este último parámetro determina la clasificación de los canales iónicos en tres grupos principales: activados por cambios en el voltaje de la membrana (*voltage-gated*), activados por un estímulo mecánico (*mechanically-gated*), activados por un ligando extracelular o intracelular (*ligand-gated*; e.g. activados por neurotransmisor, activados por Ca<sup>2+</sup>) (Alberts et al. 2008).

### **3.1. Canales HCN**

Los canales activados por hiperpolarización y regulados por nucleótidos cíclicos (HCN, *hyperpolarization-gated cyclic nucleotide-regulated*) pertenecen a la superfamilia de canales iónicos activados por voltaje. Con base en la homología de su secuencia formadora de poro, los canales HCN están más cercanamente relacionados a las familias de canales: CNG (*Cyclic nucleotide-gated*) y K<sub>v</sub>10-12 (homólogos de los canales EAG, *ether-a-go-go*) (Jackson et al. 2007, Yu & Catterall, 2004).

#### **3.1.1. Estructura, propiedades biofísicas y regulación**

La topología de los canales HCN es similar a la de los canales K<sub>v</sub>, es decir, constan de 4 subunidades (tetrámeros) que se organizan alrededor de un poro central. Cada subunidad tiene 6 segmentos transmembrana (S1-S6), un sensor de voltaje cargado positivamente en S4, un bucle entre S5 y S6 donde se localiza la región del poro (incluido el filtro de selectividad), N- y C-terminal citoplásmicos y un dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD, *Cyclic nucleotide binding domain*) que se conecta a S6 a través de un péptido (80 aminoácidos) denominado 'C-linker' (Postea & Biel, 2011; Fig. 6). La región entre S1 y el CNBD está muy conservada en la familia de canales HCN, mientras que la variación entre isoformas ocurre

mayoritariamente en el N- y C-terminal, tanto en longitud como en composición de aminoácidos (Jackson et al. 2007).

La apertura de los canales HCN se induce por voltajes negativos (hiperpolarizantes), mientras que la unión de AMPc al CNBD solo acelera la cinética de apertura y favorece el desplazamiento del voltaje medio de activación ( $V_{1/2}$ ) hacia valores más positivos. La permeabilidad de los canales HCN es mayor a  $K^+$  que a  $Na^+$  ( $P_{Na}:P_K \sim 1:4$ ); sin embargo, en condiciones fisiológicas, debido al gradiente de concentración que se establece para estos iones a través de la membrana plasmática, los canales HCN permiten principalmente la entrada de  $Na^+$  a la célula (Biel et al. 2009; Wahl-Schott & Biel, 2009). Cabe mencionar que también se ha reportado cierta permeabilidad de los canales HCN a  $Ca^{2+}$  en tejido nervioso y cardiaco (Yu et al. 2004, 2007; Michels et al. 2008).

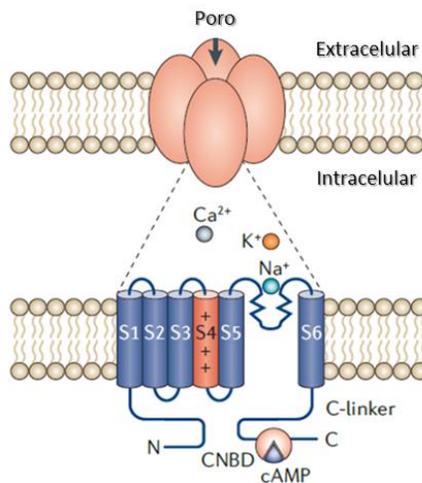


Fig. 6. Estructura de los canales HCN (modificada de Postea & Biel, 2011).

En el mamífero, la familia de canales HCN consta de cuatro miembros homólogos o isoformas: HCN1 a HCN4. Un canal funcional puede estar formado por la misma isoforma (homotetrámero) o por dos isoformas distintas (heterotetrámero). La existencia de heterotetrámeros amplía la diversidad funcional de los canales HCN (Much et al. 2003). La interacción con subunidades auxiliares, como KCNE2 (MiRP1, *MinK-related peptide 1*), también puede modificar sus propiedades biofísicas basales (Brandt et al. 2009).

Además del AMPc, se han documentado diversas formas de regulación de los canales HCN, entre ellas: iones ( $H^+$ ,  $K^+$ ,  $Cl^-$ ), derivados lipídicos ( $PIP_2$ ), proteínas interactoras (TRIP8b, filamina A, caveolina 3), fosforilación (quinasas Src, p38-MAPK, PKC, CAMKII). La mayoría de estos mecanismos se han descrito en sistemas heterólogos, o bien, en tejido cardíaco o neuronal (He et al. 2014, Postea & Biel, 2011). Es posible que algunas de estas formas de regulación también ocurran en tejidos no excitables que expresan a los canales HCN, sin embargo, hay poco avance al respecto.

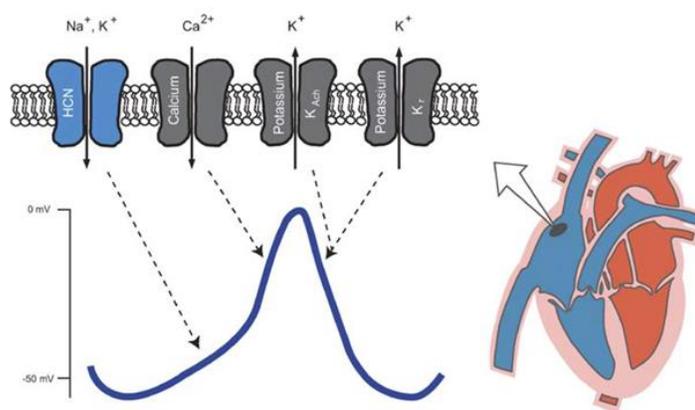
Los canales HCN son responsables de la corriente catiónica denominada  $I_f$  por '*funny*' (rara), también referida como  $I_h$  debido a su activación por hiperpolarización, o  $I_q$  por '*queer*' (extraña). Tras la clonación de los genes de la familia HCN, se mostró que su expresión en sistemas heterólogos produce corrientes con las características distintivas de la corriente nativa  $I_f$ . Además, la corriente  $I_f$  es sensible a cesio ( $Cs^+$ ) extracelular pero insensible a concentraciones milimolares de bario ( $Ba^{2+}$ ) y tetraetilamonio (TEA), los cuales bloquean canales de  $K^+$  (Biel et al. 2009).

La expresión de los canales HCN se ha descrito principalmente en tejidos excitables como el corazón y cerebro (Ludwig et al. 1998, 1999; Moosmang et al. 1999, Herrmann et al. 2011, Monteggia et al. 2000, Notomi et al. 2004, Santoro et al. 1998, 2000; Shi et al. 1999), pero también se ha encontrado en otros órganos, entre ellos se encuentran: páncreas, riñón, vejiga, testículos y ovarios (Bolivar et al. 2008; Carrisoza et al. 2011; El-Kholy et al. 2007; He et al. 2012; López-González et al. 2016; Seifert et al. 1999; Yeh et al. 2008). En tejidos excitables, la función "marcapaso" de los canales HCN es muy relevante y ha sido ampliamente estudiada; sin embargo, su distribución en tejidos no excitables apunta a otros papeles fisiológicos, aún poco explorados.

### **3.1.2. Canales HCN en el corazón**

Los canales HCN determinan una actividad eléctrica rítmica en el tejido cardíaco, especialmente en las células marcapaso del nodo sinoauricular (SAN), así como en ciertas regiones del cerebro (Robinson & Siegelbaum, 2003). La corriente  $I_f$ , al ser despolarizante y

estimulada a voltajes negativos, permite que el potencial de membrana del SAN regrese al umbral de activación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , y así mantiene un disparo rítmico en el corazón. Por lo tanto, la activación lenta de la corriente  $I_f$  es fundamental para la generación y control de la fase de despolarización diastólica del potencial de acción de las células marcapaso. Además, la regulación de  $I_f$  por AMPc resulta de gran importancia fisiológica, pues permite al sistema nervioso autónomo ejercer control sobre la frecuencia cardiaca a través de la liberación de neurotransmisores que actúan sobre receptores acoplados a proteínas G. La estimulación  $\beta$ -adrenérgica de las células marcapaso, al conducir al aumento de la concentración intracelular de AMPc, regula positivamente la corriente  $I_f$  e incrementa la pendiente de la despolarización diastólica, lo cual disminuye la duración de la diástole y acelera la frecuencia cardiaca. Mientras que una estimulación vagal, a través de la liberación de acetilcolina, induce los efectos contrarios (DiFrancesco, 2006).



**Figura 7.** Papel de los canales HCN localizados en el nodo sinoauricular (SAN) en el potencial de acción cardíaco (tomada de Craven & Zagotta, 2006).

Se han desarrollado diversos compuestos para bloquear a la corriente  $I_f$ , entre los que se encuentran: alinidina, ZD7288, zatebradina, cilobradina e ivabradina (Baruscotti et al. 2005). La ivabradina es de particular importancia porque ha superado las fases del desarrollo de un nuevo fármaco (pruebas preclínicas y fases clínicas I-III), siendo aprobada por las Agencias reguladoras de medicamentos de Europa (EMA, *European Medicines Agency*) en 2005 y de E.U.A (FDA, *Food and Drug Administration*) en 2015. Inicialmente, la indicación médica de la ivabradina fue para angina de pecho estable, luego se amplió para angina de pecho inestable,

y posteriormente, para insuficiencia cardiaca con fracción de expulsión reducida, es decir, disfunción del ventrículo izquierdo (Koruth et al. 2017).

Debido a que la expresión de los canales HCN es particularmente abundante en SAN, se planteó que el bloqueo de la corriente  $I_f$ , que subyace a la despolarización diastólica espontánea, reduce de manera "pura" o específica la frecuencia cardiaca (DiFrancesco & Camm, 2004), a diferencia de otros fármacos (e.g. antagonistas de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos o  $\beta$ -bloqueadores, y algunos bloqueadores de canales de  $Ca^{2+}$ ) utilizados para tratar enfermedades cardiovasculares, que a pesar de su capacidad reductora de la frecuencia cardiaca, afectan negativamente otros parámetros hemodinámicos y cardiacos (e.g. contractilidad del miocardio, tono vascular, presión sanguínea) (DiFrancesco & Borer, 2007).

Una frecuencia cardiaca elevada no sólo es el detonante de la mayoría de los episodios isquémicos, sino también un predictor independiente de mortalidad, tanto en la población general como en aquella con un padecimiento cardiovascular. Estudios preclínicos muestran que la inhibición de  $I_f$  en SAN con ivabradina disminuye la frecuencia cardiaca, tanto en reposo como durante el ejercicio, preservando la contractilidad miocárdica, la conducción auriculoventricular y la repolarización ventricular (Vilaine, 2006). Por esta razón, el potencial terapéutico de la ivabradina se ha explorado en varias patologías cardiacas a través de ensayos clínicos aleatorizados con un gran número de pacientes. Se ha confirmado la capacidad anti-isquémica de la ivabradina en pacientes con angina de pecho estable (Borer et al. 2003; Tardif, 2005). En el estudio BEAUTIFUL, realizado en pacientes con enfermedad arterial coronaria (CAD, *Coronary artery disease*) y disfunción del ventrículo izquierdo, se evaluó el efecto de la ivabradina sobre la hospitalización o mortalidad de origen cardiovascular (resultados principales); y aunque no se registró una mejora considerando el total de participantes, si la hubo en el subgrupo de pacientes con una frecuencia cardiaca pre-tratamiento  $\geq 70$  latidos/min (Fox et al. 2008). En el ensayo SHIFT se evaluaron los mismos resultados principales, pero en pacientes con insuficiencia cardiaca, y se observó una disminución del 18% por la ivabradina respecto al placebo (Swedberg et al. 2010). Por otra parte, en el ensayo SIGNIFY, en el cual se estudiaron pacientes con CAD estable, pero sin

insuficiencia cardiaca y con 70 o más latidos/min, no se encontró efecto sobre la mortalidad por causa cardiovascular o infarto al miocardio no fatal, al sumar la ivabradina a la farmacoterapia estándar, a pesar de registrarse una reducción significativa de la frecuencia cardiaca respecto al placebo (Fox et al. 2014). Al parecer, el beneficio de la ivabradina en el manejo y resultado clínico positivo de algunas cardiopatías aún resulta inconsistente en ciertos aspectos. Lo anterior no descarta que la ivabradina sea una alternativa terapéutica relativamente segura, en especial en pacientes que no responden o toleran a los  $\beta$ -bloqueadores u otros medicamentos para disminuir la frecuencia cardiaca.

#### 4. Mitocondrias

Las mitocondrias son organelos celulares que se organizan en redes dinámicas e interconectadas. Cada mitocondria tiene dos membranas funcionalmente distintas, la membrana externa y la membrana interna, lo que da lugar a la formación de dos compartimentos acuosos: la matriz mitocondrial y el espacio intermembrana. La composición de la membrana externa mitocondrial (OMM, *Outer mitochondrial membrane*) es parecida a la de otras membranas celulares, presenta gran permeabilidad (solo limita la difusión de moléculas mayores a ~5 kDa) y es donde se encuentra VDAC (*Voltage-dependent anion channel*) o porina, que permite el intercambio de sustancias entre el espacio intermembrana y el citosol (Murphy & Hartley, 2018). Por su parte, la membrana interna mitocondrial (IMM, *Inner mitochondrial membrane*) delimita la matriz y se caracteriza por la presencia del fosfolípido cardiolipina; la IMM se subdivide en dos: la membrana interna frontera (*Inner boundary membrane*), paralela a la OMM, y las crestas (*cristae*) mitocondriales, que contienen la maquinaria requerida para la fosforilación oxidativa (OXPHOS) y cuya disposición en forma de pliegues permite amplificar su área superficial y capacidad funcional (Murphy & Hartley, 2018; Giacomello 2020).

Las mitocondrias contienen un genoma circular, el ADN mitocondrial (mtDNA), que codifica solo 13 proteínas de un contenido mitocondrial aproximado de 1500 proteínas. Por lo tanto, las mitocondrias dependen del núcleo para proveer la mayoría de sus proteínas (Nunnari &

Suomalainen, 2012). Existen mecanismos de importación de las proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo, entre los que destacan la translocasa de la membrana externa (TOM) y la translocasa de la membrana interna (TIM) (Neupert & Herrmann, 2007).

#### **4.1. Funciones mitocondriales**

Las mitocondrias son organelos multifuncionales. Su función central se relaciona con el metabolismo y bioenergética celular; son el sitio principal de producción de ATP y nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH), y donde ocurre la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y la biosíntesis o regulación de los niveles celulares de metabolitos, aminoácidos y cofactores de diversas enzimas regulatorias. Asimismo, en las mitocondrias se sintetizan el grupo hemo y los centros de hierro-azufre (Fe-S), componentes esenciales de la hemoglobina (principal transportador de oxígeno) y de la maquinaria de OXPHOS y de reparación del ADN (Nunnari & Suomalainen, 2012).

Además de sus funciones bioenergéticas y biosintéticas, las mitocondrias se han reconocido como plataformas de señalización que pueden orquestar respuestas celulares complejas ante estímulos tanto internos como externos. Por ejemplo, las mitocondrias participan en la señalización de la muerte celular programada (apoptosis), la producción de especies reactivas del oxígeno, la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  y la respuesta inmune (Chandel, 2014)

La dinámica mitocondrial es un proceso clave en la regulación de la función y calidad mitocondrial (Sebastián et al. 2017). El cambio continuo de la morfología mitocondrial, que depende del balance de los eventos de fusión y fisión, es importante para responder a las demandas metabólicas y asegurar la remoción de los organelos dañados través de la mitofagia (Wai & Langer, 2016).

##### **4.1.1. Fosforilación oxidativa**

La función más conocida de las mitocondrias es la producción de ATP a través de OXPHOS. En la matriz mitocondrial, los electrones provenientes de los carbohidratos, que se oxidan a través del ciclo de Krebs o de los ácidos tricarboxílicos (TCA), y de los ácidos grasos ( $\beta$ -

oxidación), se acumulan en las coenzimas NADH y flavina adenina dinucleótido reducido (FADH<sub>2</sub>), de donde pasan a la cadena de transporte de electrones (ETC, *Electron Transport Chain*) localizada en la IMM. La ETC comprende cuatro complejos proteicos (I-IV), en los cuales ocurren reacciones de óxido-reducción (redox) secuenciales que les permiten, a excepción del complejo II, bombear iones H<sup>+</sup> de la matriz hacia el espacio intermembrana. En el complejo I (NADH deshidrogenasa o NADH-ubiquinona oxidoreductasa), NADH se oxida a NAD<sup>+</sup> y los electrones pasan a la coenzima Q (CoQ), un acarreador lipofílico de electrones que existe en forma de ubiquinona y ubiquinol. Los electrones del ciclo de Krebs también pueden pasar vía succinato a la CoQ a través del complejo II (succinato deshidrogenasa o succinato-ubiquinona oxidoreductasa). De manera similar, la β-oxidación conduce a la acumulación de electrones en flavoproteínas, las cuales pueden transferir sus electrones a la CoQ a través de la 'flavoproteína transportadora de electrones-ubiquinona oxidoreductasa'. Posteriormente, los electrones pasan de la CoQ al citocromo c (Cyt c) mediante el complejo III (ubiquinol-citocromo c oxidoreductasa) y del citocromo c, los electrones finalmente se usan para reducir el oxígeno en agua en el complejo IV (citocromo c oxidasa, o citocromo bc<sub>1</sub>). El gradiente de protones generado durante el transporte de electrones en los complejos I, III y IV se libera por el reingreso de los iones H<sup>+</sup> a través de la F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP sintetasa (complejo V), la cual dirige la fosforilación de ADP. El ATP sintetizado en la mitocondria puede salir por el intercambio con ADP citoplásmico, mediado por la translocasa de nucleótidos de adenina (ANT) (Smith et al. 2012).

En la teoría quimiosmótica, Peter Mitchell (1961) propuso que el acoplamiento entre la actividad de ETC y la fosforilación está mediado por el gradiente electroquímico de protones o fuerza protón-motriz ( $\Delta p$ ), que tiene un componente químico, el gradiente de iones H<sup>+</sup> ( $\Delta pH$ ) y un componente eléctrico, el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ); este último se debe al movimiento de cargas inherente al bombeo de protones. Es importante señalar que OXPHOS no está totalmente acoplada, pues los iones H<sup>+</sup> pueden regresar a la matriz por vías independientes de la ATP sintetasa, lo cual se conoce como 'fuga de protones' (Divakaruni & Brand, 2011).

Cabe mencionar que el  $\Delta\Psi_m$  determina funciones esenciales de la mitocondria, como el importe de proteínas mitocondriales (Neupert & Herrmann, 2007), el transporte de iones y metabolitos hacia dentro y fuera del organelo, así como la producción de ROS (Brookes, 2005).

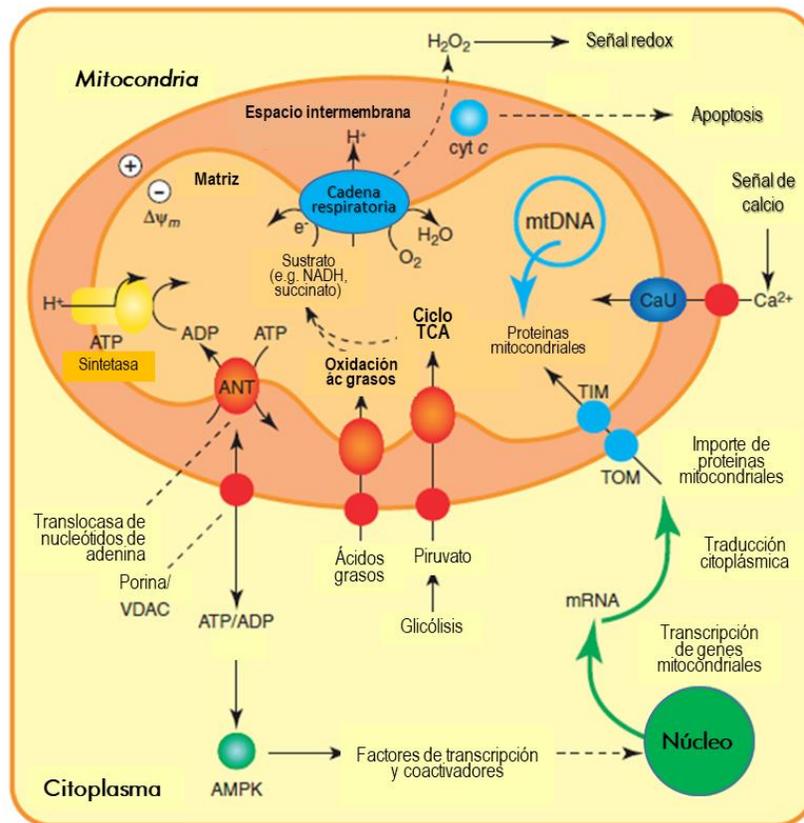
#### 4.1.2. Producción de especies reactivas del oxígeno

Las mitocondrias son una fuente importante de ROS. Hay numerosas reacciones enzimáticas mitocondriales (localizadas en la OMM, IMM y matriz) que producen ROS (e.g. monoamina oxidasa, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa,  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa). Sin embargo, el origen principal de ROS en la mitocondria es la fuga de electrones de la ETC, principalmente a nivel de los complejos I y III; dependiendo de la dirección del 'escape' de los electrones, se puede generar ROS en la matriz o en el espacio intermembrana. La adición de un electrón a la molécula de oxígeno produce el radical anión superóxido  $O_2^{\cdot-}$ , el cual se puede convertir en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) por acción de las dismutasas de superóxido (Angelova & Abramov, 2016).

En condiciones fisiológicas, se ha mostrado que ROS mitocondrial regula o ayuda a coordinar una amplia variedad de procesos biológicos, entre ellos la adaptación a la hipoxia, proliferación y diferenciación celular, autofagia, respuesta inmune, señalización hormonal y adaptación metabólica (Sena & Chandel 2012). Sin embargo, la acumulación de ROS resulta tóxica para los componentes celulares, incluyendo lípidos, ácidos nucleicos y proteínas.

La importancia de los mecanismos que regulan la concentración de ROS mitocondrial subyace en que ésta determina su papel en la señalización celular: niveles bajos de ROS (rango picomolar a nanomolar) son necesarios para su función homeostática en los procesos biológicos, niveles ligeramente elevados inician vías de adaptación al estrés, y niveles mucho más elevados desencadenan la muerte celular o senescencia (Chandel, 2014). Existen diversos estímulos que aumentan los niveles de ROS, como la hipoxia y el aumento de la concentración citosólica de  $Ca^{2+}$ . Por otro lado, la acción de las enzimas antioxidantes (e.g. peroxidasa de glutatión, peroxiredoxinas y catalasa) es un mecanismo importante para

disminuir los niveles de ROS; la mitofagia también puede hacerlo de manera indirecta al reducir la cantidad total de mitocondrias, en particular aquéllas dañadas que producen más ROS (Sena & Chandel, 2012). Asimismo, las mitocondrias pueden mitigar el estrés oxidativo a través de otras medidas de control de calidad relacionadas con el balance de la biogénesis mitocondrial, vías de recambio/re-plegamiento de proteínas específicas de mitocondria y eventos de fisión/fusión (Whitaker et al, 2016).



**Figura 8.** Esquema que resume la estructura y principales funciones mitocondriales (modificada de Smith et al. 2012). La mayoría de las abreviaturas se han indicado en el texto, excepto AMPK: cinasa activada por AMP y CaU: Uniportador de  $Ca^{2+}$ .

La producción de ROS mitocondrial se regula por diversos factores, entre los principales se encuentran: el estado redox de los diferentes complejos de la ETC, los componentes del  $\Delta p$  ( $\Delta p_H$  y  $\Delta\Psi_m$ ) y la concentración local de oxígeno (Brookes, 2005; Murphy 2009). El  $\Delta\Psi_m$  parece correlacionar directamente con la producción de ROS, pues su disminución (i.e. despolarización) reduce ROS. Se ha planteado que un desacoplamiento moderado, mediado por la fuga de protones, es un blanco terapéutico potencial en contextos asociados a la

producción excesiva de ROS, como la obesidad, enfermedad cardiovascular y neurodegenerativa, diabetes y envejecimiento (Cardenas, 2018).

## **4.2. Mitocondrias en el corazón**

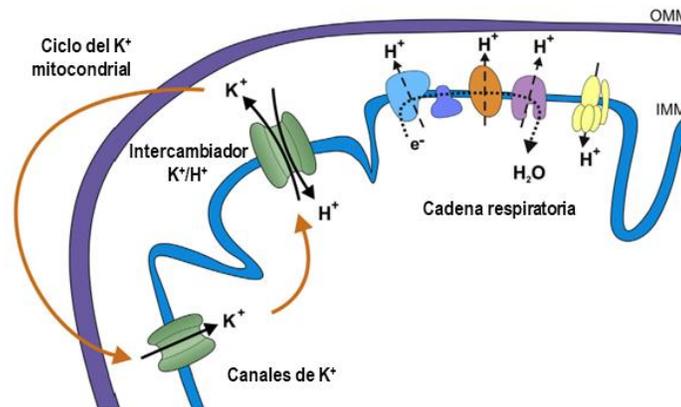
La actividad metabólica del corazón es muy alta, lo que determina que sea el órgano con mayor número de mitocondrias, pues constituyen alrededor del 25-30% del volumen celular del músculo cardíaco del mamífero. Para mantener la función contráctil, se estima que el corazón humano adulto produce diariamente un equivalente a ~35 kg de ATP, alrededor de 100 veces el peso del órgano y más de 10,000 veces el contenido de ATP almacenado en el corazón (~10 mM, suficiente solo para algunos latidos); esto implica que la célula miocárdica debe sintetizar ATP continuamente, en su mayoría a través de OXPHOS (~95%), siendo la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos la fuente primaria (Brown et al. 2017; Ingwall, 2009; Taegtmeyer, 1994).

La disfunción mitocondrial juega un papel clave en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis, isquemia, hipertrofia e insuficiencia cardíaca, entre otras. Algunos aspectos asociados con la disfunción mitocondrial incluyen la afectación de la cadena respiratoria y la síntesis de ATP, el aumento de la producción de ROS, así como la alteración de la morfología mitocondrial y de los mecanismos de control de calidad, entre ellos la mitofagia (Chistiakov et al. 2018).

### **4.2.1. Canales de potasio en mitocondrias de corazón**

En la mitocondria, se han reportado canales de  $K^+$  pertenecientes a diversas familias (Szewczyk et al. 2018). En el tejido cardíaco en particular, el canal de  $K^+$  más estudiado es el regulado por ATP (mitoK<sub>ATP</sub>; Paucek et al. 1992), cuya subunidad principal corresponde al canal Kir1.1 (ROMK2) (Foster et al. 2012; Laskowski et al. 2019). Asimismo, se han identificado canales de  $K^+$  sensibles a  $Ca^{2+}$ , tanto de conductancia grande (mitoBK<sub>Ca</sub>, Xu et al. 2002) como pequeña (SK<sub>Ca</sub>, Stowe et al. 2013), activados por voltaje (K<sub>v</sub>7.4, Testai et al. 2016) y sensibles a  $Na^+$  (K<sub>Na</sub>1.2, Smith et al. 2018).

La función de los canales de  $K^+$  en la mitocondria no es del todo clara, sin embargo, se sabe que la entrada de  $K^+$  está favorecida por el gradiente químico, pues su concentración citosólica es muy alta, así como por el potencial tan negativo de la membrana mitocondrial. Ya que el flujo de  $K^+$  hacia el interior de la mitocondria afecta el volumen mitocondrial al inducir la entrada osmótica de agua a través de aquaporinas, es indispensable un mecanismo que lo contrarreste; en este caso, la actividad del intercambiador  $K^+/H^+$  favorece la salida de  $K^+$  (Garlid & Paucek, 2003); este proceso se conoce como el ciclo del  $K^+$  mitocondrial (Fig. 9). Por lo tanto, el mantenimiento de la homeostasis del volumen y  $K^+$  mitocondrial ocurre a expensas de la fuerza protón-motriz, y en consecuencia influye indirectamente sobre la actividad de OXPHOS y la producción de ROS (Checchetto et al. 2018).



**Figura 9.** Esquema del ciclo del  $K^+$  mitocondrial (modificada de Leanza et al. 2015). OMM: membrana externa mitocondrial, IMM: membrana interna mitocondrial.

A través de compuestos capaces de abrir (*openers*) al canal mito $K_{ATP}$  (e.g. diazóxido) se ha mostrado que éste participa en la cardioprotección en modelos experimentales de daño isquémico y reperfusión (Facundo et al. 2005, Garlid et al. 1997). La misma estrategia se ha usado para el canal mito $BK_{Ca}$  (Xu et al. 2002). Existe cierta controversia respecto al mecanismo, entre las hipótesis que se han planteado para explicar el fenómeno cardioprotector de la activación farmacológica de canales de  $K^+$  mitocondriales se encuentran: a) que provoca una disminución del  $\Delta\Psi_m$ , lo cual atenúa la entrada de  $Ca^{2+}$  (Holmuhamedov et al. 1999), b) que regula el volumen y pH mitocondrial, y en consecuencia, la función de la cadena respiratoria, c) que afecta los niveles de ROS, cuya señalización parece contribuir al preconditionamiento isquémico (Garlid et al. 2003; O'Rourke, 2004).

---

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

---

La expresión de los canales HCN no se limita a los tejidos excitables, pues se ha reportado en diversos órganos, incluido el riñón. Particularmente, en nuestro laboratorio se describió la localización de las isoformas HCN1 y HCN3 en el túbulo proximal, así como de HCN2 en el túbulo conector y conducto colector. Además, se demostró que estos canales participan en los mecanismos renales involucrados en el mantenimiento de la homeostasis de  $\text{Na}^+$  y ácido-base. La presente tesis se enfoca en localizar al canal HCN2 y HCN4 en la corteza y médula renal de la rata, así como, a través de la manipulación del contenido de  $\text{K}^+$  en la dieta (alto o deficiente), investigar si estas isoformas tienen alguna contribución en los mecanismos renales de eliminación o conservación de  $\text{K}^+$ . De manera simultánea, considerando que la homeostasis de  $\text{K}^+$  está interrelacionada con el balance ácido-base y de  $\text{Na}^+$ , la regulación de la abundancia y/o distribución de los canales catiónicos HCN2 y HCN4, inducida por las dietas de  $\text{K}^+$ , también nos orientará sobre su posible participación en el transporte renal de  $\text{Na}^+$  y/o  $\text{NH}_4^+$ , dependiendo del segmento de la nefrona donde se observe el cambio.

Por otro lado, debido a que el canal HCN3 se expresa de manera abundante en las mitocondrias de riñón, se planteó la posibilidad de que la presencia de los canales HCN en dichos organelos sea algo común en otros tejidos, al menos para algunas isoformas. En particular, se decidió estudiar al tejido cardíaco, debido a que la ivabradina, el único bloqueador de los canales HCN utilizado en la clínica para el tratamiento de padecimientos cardiovasculares, parece tener efectos benéficos que van más allá de la presencia de estos canales en el nodo sinoauricular (SAN), su participación en la actividad marcapaso y la regulación de la frecuencia cardíaca. Por lo tanto, la segunda sección de la tesis se enfoca en explorar la expresión proteica de las cuatro isoformas de los canales HCN (1-4) en las mitocondrias de corazón de rata (ventrículos). Asimismo, en cardiomiocitos (células H9c2), evaluar el efecto de la adición de ZD7288 (bloqueador específico de los canales HCN) sobre el potencial de membrana mitocondrial, el índice de control respiratorio y el consumo de oxígeno asociado a la fosforilación oxidativa.

---

## OBJETIVOS

---

Localizar a los canales HCN2 y HCN4 en la corteza y médula externa renal de rata.

Evaluar el efecto de dietas con un contenido alto o deficiente de  $K^+$  sobre la abundancia proteica y distribución de los canales HCN2 y HCN4 en la corteza y médula externa del riñón de rata.

Investigar si las cuatro isoformas de los canales HCN (HCN1, HCN2, HCN3 y HCN4) se expresan en mitocondrias de corazón de rata.

Evaluar si el bloqueo de los canales HCN con ZD7288 en cardiomiocitos afecta el potencial de membrana mitocondrial, el índice de control respiratorio y el consumo de oxígeno asociado a la fosforilación oxidativa.

---

## HIPÓTESIS

---

Los canales HCN2 y HCN4 se expresarán en diferentes tipos celulares de corteza y médula externa del riñón de rata.

Las dietas con  $K^+$  alto o deficiente afectarán la abundancia proteica de los canales HCN2 y HCN4 en muestras enriquecidas en mitocondrias de corteza y médula externa. La expresión de HCN2 y HCN4 cambiará en aquéllos segmentos de la nefrona donde el transporte catiónico ( $Na^+$  o  $NH_4^+$ ) mediado por estos canales sea compatible con los mecanismos adaptativos renales para eliminar o conservar  $K^+$ , o bien, con las alteraciones asociadas a hipercalemia o hipocalemia.

Los canales HCN2, HCN3 y HCN4 se expresarán en mitocondrias de corazón, pero no HCN1.

La inhibición de los canales HCN con ZD7288 en cardiomiocitos, al disminuir la entrada basal de  $K^+$  a las mitocondrias, provocará la hiperpolarización del potencial de membrana mitocondrial.

Si la actividad de los canales HCN mitocondriales influye en la función de la cadena de transporte de electrones y/o la síntesis de ATP, su bloqueo con ZD7288 en cardiomiocitos reducirá el índice de control respiratorio y/o el consumo de oxígeno asociado a OXPHOS.

---

## MÉTODOS

---

### 1. Animales y líneas celulares

#### 1.1. Experimentos con dietas de K<sup>+</sup> en ratas

Se utilizaron ratas Wistar macho (200-300 g), las cuales se mantuvieron bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h, con acceso libre a alimento y agua. Las ratas del grupo control recibieron una dieta estándar, mientras que a los grupos experimentales: K<sup>+</sup> deficiente (KD) y K<sup>+</sup> alto (KA) se les dio una dieta con 0 o 10% de K<sup>+</sup> (Harlan-Teklad Laboratories), respectivamente. Los experimentos con animales se realizaron bajo la aprobación del Comité de Investigación y Ética Animal de la Facultad de Medicina (UNAM).

#### 1.2. Células HEK293 y H9c2

Las células HEK293 (*Human embryonic kidney 293*) y H9c2 (cardiomiocitos) se dejaron crecer a 80% de confluencia en una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub> y 37 °C. Como medio de cultivo se utilizó DMEM alto en glucosa suplementado con NaHCO<sub>3</sub> (3.7 o 1.5 g/L para HEK293 o H9c2, respectivamente), 100 U/mL penicilina, 10 mg/mL estreptomycin y 10% suero bovino fetal (SBF).

### 2. Western blot

#### 2.1. Preparación de muestras

Tras extraer los riñones de cada animal, la corteza y médula externa renal se disectaron y congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Posteriormente, se pesaron y homogenizaron mecánicamente en la solución de lisis: 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 250 mM sacarosa, 1 mM EDTA, 1 mM PSMF y un coctel de inhibidores de proteasas (Complete, Roche). Los homogenados se centrifugaron a 1000 x g por 10 min para remover las células que no se lograron romper. El sobrenadante se centrifugó a 17,000 x g por 20 min y se recuperó el

pellet, el cual se resuspendió en la solución de lisis. En estas muestras se determinó la concentración de proteína con el método de Lowry modificado (DC protein assay, Bio-Rad Laboratories). Originalmente, se utilizó este procedimiento con la idea de enriquecer las membranas plasmáticas de tejido renal (Marple et al. 1995; Goel et al. 2007), sin embargo, considerando que la composición de la solución de lisis y la velocidad de centrifugación son muy parecidas a las utilizadas para enriquecer mitocondrias, se cree que las muestras están predominantemente enriquecidas en dichos organelos. Además, un estudio proteómico de esta fracción (17,000 x g) mostró que su composición proteica es muy heterogénea y la presencia de proteínas de membrana plasmática es menor al 50% (Sachs et al. 2008).

## **2.2. Electroforesis desnaturante (SDS-PAGE) y transferencia.**

Las muestras (20 µg proteína) se combinaron con solución Laemmli (Bio-Rad) al cual se le adicionó previamente β-mercaptoetanol (5-8%). La desnaturalización se realizó a 70 °C durante 10 min. Para la separación de las proteínas se utilizó una electroforesis desnaturante (SDS-PAGE, *Sodium Dodecil Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) en geles de 8 o 10% acrilamida; se usó un voltaje constante inicial de 80 V y cuando las muestras alcanzaron el gel separador, se aumentó a 120 V hasta observar la separación adecuada de las proteínas del marcador de peso molecular. Posteriormente, se realizó una electrotransferencia semi-seca a voltaje constante (10 V) utilizando la solución amortiguadora de Towbin (25 mM Trizma base, 192 mM glicina, 20% metanol) durante 1h. De esta manera, se favoreció el paso de las proteínas del gel hacia la membrana de PVDF (Bio-Rad), soporte sólido que se usó para la inmunodetección.

## **2.3. Inmunodetección**

La membrana (blot) se bloqueó con leche al 5% disuelta en solución amortiguadora TBS (*Tris-buffered saline*) con 1% de Tween 20 (TBS-T) durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 2) por ~18 h a 4°C. Al término de la incubación, se lavó la membrana tres veces (10 min cada una) con TBS-T. Luego, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a la

peroxidasa de rábano (HRP, *Horseradish Peroxidase*) durante 1 h a temperatura ambiente, y se realizaron tres lavados con TBS-T. Finalmente, como sistema de detección se utilizó un kit de quimioluminiscencia intensificada (Millipore). Tras la incubación de la membrana con los reactivos del kit, ésta se colocó entre dos acetatos dentro de un *cassette* de placas autoradiográficas y se procedió al revelado de la señal quimioluminiscente dentro de un cuarto oscuro. El tiempo de exposición se ajustó a la intensidad de la señal generada por la reacción inmune. Tras la exposición, la placa se sumergió secuencialmente en revelador y fijador, con lavado en agua después de cada uno. Para la densitometría de las bandas de interés se utilizó el programa EDAS Kodak.

**Tabla 3. Datos de los anticuerpos utilizados en esta tesis**

Proteína	Hospedero	Nº catálogo/Epítotope	Marca	Ensayo
Canales HCN				
<b>HCN1</b>	Cobayo	APG-203 N-term aa 6-24 rHCN1	Alomone	WB
<b>HCN2</b>	Conejo	APC-030 N-term aa 147-161 hHCN2	Alomone	WB/IF
<b>HCN3</b>	Conejo	APC-057 C-term aa 727-744 rHCN3	Alomone	WB
<b>HCN3</b>	Conejo	LS-C154764 N-term	LSBio	WB
<b>HCN4</b>	Conejo	APC-052 N-term aa 119-155 hHCN4	Alomone	WB/IF
Marcadores nefrona				
<b>AQP2</b>	Cabra	sc-9882	Santa Cruz Biotechnology	IF
<b>Calb</b>	Cabra	sc-7691		
<b>THP</b>	Cabra	sc-19554		
<b>V-ATPasa</b>	Cabra	sc-21206		
Otros marcadores				
<b><math>\alpha</math>-tubulina</b>	Ratón	t9026	Sigma-Aldrich	WB
<b>VDAC</b>	Conejo	ab34726	Abcam	

aa: aminoácidos, AQP2: aquaporina 2, C-term: carboxilo terminal, Calb: calbindina  $D_{28k}$ , h: humano, IF: inmunofluorescencia, N-term: amino terminal, r: rata, THP: Tamm Horsfall protein, V-ATPasa:  $H^+$  ATPasa vacuolar, WB: Western blot.

### 3. Inmunofluorescencia indirecta

#### 3.1. Perfusión cardiaca y cortes histológicos

Las ratas se anestesiaron por inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico, se perfundieron a través del ventrículo izquierdo con PBS (*Phosphate-buffered saline*, pH 7.4) y fijador (3% paraformaldehído en PBS). Los riñones se extrajeron, se cortaron y fijaron por 12 h más a 4 °C. Los tejidos se crioprotegieron con 30% sacarosa en PBS antes de congelarse embebidos en medio OCT (Tissue-Tek). Los cortes histológicos (10 µm de grosor) se realizaron mediante criostato (Leica CM1100).

#### 3.2. Inmunodetección

Tras dejar descongelar los cortes, éstos se hidrataron con TBS durante 10 min. Las muestras se sometieron a desenmascaramiento de antígeno con una solución de Tris-EDTA pH 9.0 durante 30 min a 80 °C. Posterior al enfriamiento de los cortes, se lavaron 3 veces con TBS, 5 min cada una. Luego, se permeabilizaron con TBS adicionado con 3% Tritón X-100 (TX) durante 15 min. Los sitios inespecíficos se bloquearon durante 1 h con una solución compuesta de: 10% suero bovino fetal, 1% albúmina sérica bovina, TBS con 1% TX (TBS-TX). Posteriormente, se realizó la inmunodetección de la proteína de interés (canal HCN2) al incubar las laminillas con el anticuerpo diluido en la solución de bloqueo durante 12-24 h a 4 °C. La incubación con el anticuerpo 2° acoplado al fluoróforo fue de 1 h a temperatura ambiente. Después de cada paso de incubación, se realizaron tres lavados con TBS-TX, de 8 min cada uno. Se repitió el procedimiento para la inmunodetección del marcador de la nefrona correspondiente en la misma laminilla, con la única diferencia que la incubación del anticuerpo primario fue de 1h a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios se diluyeron de 1:75 – 1:100 en TBS-TX, tanto el anti-HCN2 (Alomone) como los marcadores de la nefrona (Santa Cruz Biotechnology). Los anticuerpos secundarios acoplados a los fluoróforos Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Thermo Scientific) o DyLight 594 (Abcam) se utilizaron en una dilución 1:500.

En el caso específico de las inmunofluorescencias de HCN4, se utilizó el método TSA (*Tyramide signal amplification*) con Alexa Fluor 488 como reactivo fluorescente (T20922, Molecular Probes). Las diluciones de los anticuerpos primario y secundario fueron: anti-HCN4 1:500 (Alomone) y anti-conejo de cabra conjugado con HRP 1:200 (kit TSA), cada uno aplicado por 1 h a temperatura ambiente. Al término del etiquetado inmunofluorescente de HCN4 y previo al etiquetado de los marcadores de la nefrona, las muestras se sometieron a una elución de anticuerpos (Pirici et al. 2009) para evitar cualquier reactividad cruzada.

Se consideraron los siguientes controles negativos: omisión de la incubación de los tejidos con el anticuerpo primario, incubación con el anticuerpo primario pre-adsorbido con su péptido control, sustitución el anticuerpo primario por la inmunoglobulina específica de isotipo (IgG de conejo).

### **3.3. Microscopía confocal**

Para realizar las observaciones de microscopía, a los cortes sometidos a inmunofluorescencia se les colocó una solución de montaje (Vectashield, Vector Laboratories) y un cubreobjetos. Para la adquisición de las imágenes se utilizó un microscopio confocal Leica (TCS-SP5), y el programa LAS AF (Leica Application Suite Advance Fluorescence) Lite para su visualización y análisis.

## **4. Enriquecimiento de mitocondrias**

### **4.1. Células HEK293**

Las células HEK293 se crecieron en cajas Petri de 10 cm y se transfectaron usando PEI (*Polyethylenimine*). La mezcla de transfección se preparó en medio bajo en suero (Optimem, Gibco) con 3 µg de cada plásmido (pcDNA3-mHCN1 o pcDNA3-hHCN4) y 1 mg/mL del agente de transfección; se incubó de 20-25 min a temperatura ambiente y se adicionó a los cultivos.

Después de 48 h de la transfección, se procedió al enriquecimiento de las mitocondrias siguiendo un método previamente descrito (Lampl et al. 2015). Las células se lavaron dos veces con PBS frío, se colectaron con 2 mL de PBS (caja Petri de 10 cm) y se centrifugaron a 700 x g durante 10 min a 4°C. El pellet se resuspendió y homogenizó en la solución amortiguadora de aislamiento de mitocondrias (200 mM sacarosa, 10 mM Tris/MOPS pH 7.4, 1 mM EGTA) utilizando un homogenizador de vidrio con pistilo de Teflon, este último se conectó a un taladro y se dieron 3 pasos a velocidad media. El homogenado se hizo pasar a través de dos jeringas (18G x 1 1/2 pulgadas y 27G x 1/2 pulgada). Luego, se centrifugó a 600 x g, 10 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se centrifugó a 10,000 x g, 10 min a 4 °C. Finalmente, el pellet mitocondrial se lavó 2 veces con solución amortiguadora de aislamiento de mitocondrias, se centrifugó a 10,000 x g por 10 min a 4 °C y se resuspendió en solución amortiguadora RIPA (25 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% desoxicolato de sodio, 0.1% SDS).

#### **4.2. Corazón de rata**

Las mitocondrias se aislaron por centrifugación diferencial como se describe previamente (Calderone et al. 2010). Brevemente, las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico vía intraperitoneal (50 mg/kg). Se abrió la cavidad torácica y se extrajo el corazón, el cual se colocó en PBS frío para lavar el exceso de sangre. Los ventrículos se cortaron en pedacitos muy pequeños con tijeras quirúrgicas y se homogenizaron mecánicamente (3 ciclos de 25 segundos cada uno) en solución amortiguadora de aislamiento (20 mL/corazón): 5 mM Tris-HCl pH 7.4, 250 mM sacarosa y 1 mM EGTA. El homogenado se centrifugó a 1075 x g por 3 min a 4 °C, y el sobrenadante obtenido se centrifugó a 12,000 x g por 10 min a 4 °C. El botón (pellet) generado (fracción mitocondrial) se lavó 2 veces con solución amortiguadora de aislamiento (sin EGTA) y el botón final se resuspendió en 400 µL de solución de lisis con inhibidores de proteasas (Complete, Roche).

## 5. Ensayos de función mitocondrial en cardiomiocitos

### 5.1. Potencial de membrana mitocondrial

El potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) se estimó en células H2c9 cultivadas en placa de 96 pozos utilizando el compuesto fluorométrico JC-1. El medio de cultivo se reemplazó por DMEM sin SBF, al cual se le adicionó JC-1 (1  $\mu\text{g/mL}$ ). La placa se incubó por 20 min a 37 °C y 5%  $\text{CO}_2$ . Posteriormente, las células se lavaron con PBS (3X). La fluorescencia a 525 y 590 nm, ambas obtenidas por excitación a 488 nm, se midieron en un equipo multifunción con lector de placas y captura de imágenes celulares (Cytation 5, BioTek Instruments) a diferentes tiempos (10, 30 y 60 min) tras la adición de PBS (control), ZD7288 (inhibidor de canales HCN) o CCCP (*Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone*, desacoplante mitocondrial). Simultáneamente, se obtuvieron imágenes representativas con los filtros GFP y RFP. La proporción de JC-1 acoplado (hiperpolarizado) respecto al no acoplado (despolarizado) se calculó como el cociente de la fluorescencia roja (590 nm) y verde (525 nm), y los datos se normalizaron respecto a las células control.

### 5.2. Respirimetría celular

El consumo de oxígeno de las células H9c2 se determinó utilizando el equipo de Respirimetría O2k (Oroboros Instruments). Las mediciones se realizaron en 2 mL de medio de cultivo. Cada experimento se inició con la adición de las células. Los parámetros respiratorios se definieron como: 1) Respiración de rutina. Consumo de oxígeno de las células incubadas con ZD7288 (50  $\mu\text{M}$ ) o agua (vehículo). 2) Fuga de la respiración. Consumo de oxígeno de las células en presencia de 7.5  $\mu\text{M}$  de oligomicina. 3) Índice de control respiratorio. Se define como el cociente de la respiración de rutina y de fuga. 4) Respiración atribuible a la fosforilación oxidativa (OXPHOS). Se obtuvo restando la respiración de fuga a la de rutina. 5) Porcentaje de la respiración atribuible a OXPHOS. Se estimó como:  $(\text{OXPHOS}/\text{Rutina}) \times 100$ .

Todos los parámetros se corrigieron restando el consumo de oxígeno no mitocondrial, el cual se obtuvo por la adición de 2  $\mu\text{M}$  rotenona y 10  $\mu\text{M}$  antimicina A, y normalizando con el número de células, que se obtuvo mediante la tinción con azul de tripano (Strober, 2015).

## **6. Análisis estadístico**

Los datos se presentan como promedios  $\pm$  error estándar. La comparación de dos grupos se realizó con la prueba  $t$  de Student. Para comparar los grupos del ensayo de JC-1 (determinación de  $\Delta\Psi_m$ ) se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a  $p < 0.05$ .

---

## RESULTADOS

---

### SECCIÓN I. Canales HCN2 y HCN4 en el riñón de rata

#### 1. Localización en la corteza y médula externa renal

Para estudiar la distribución de los canales HCN2 y HCN4 a lo largo de la nefrona, se utilizaron marcadores específicos para diferentes segmentos y/o tipos celulares, según muestra la Tabla 4.

**Tabla 4. Marcadores de la nefrona utilizados**

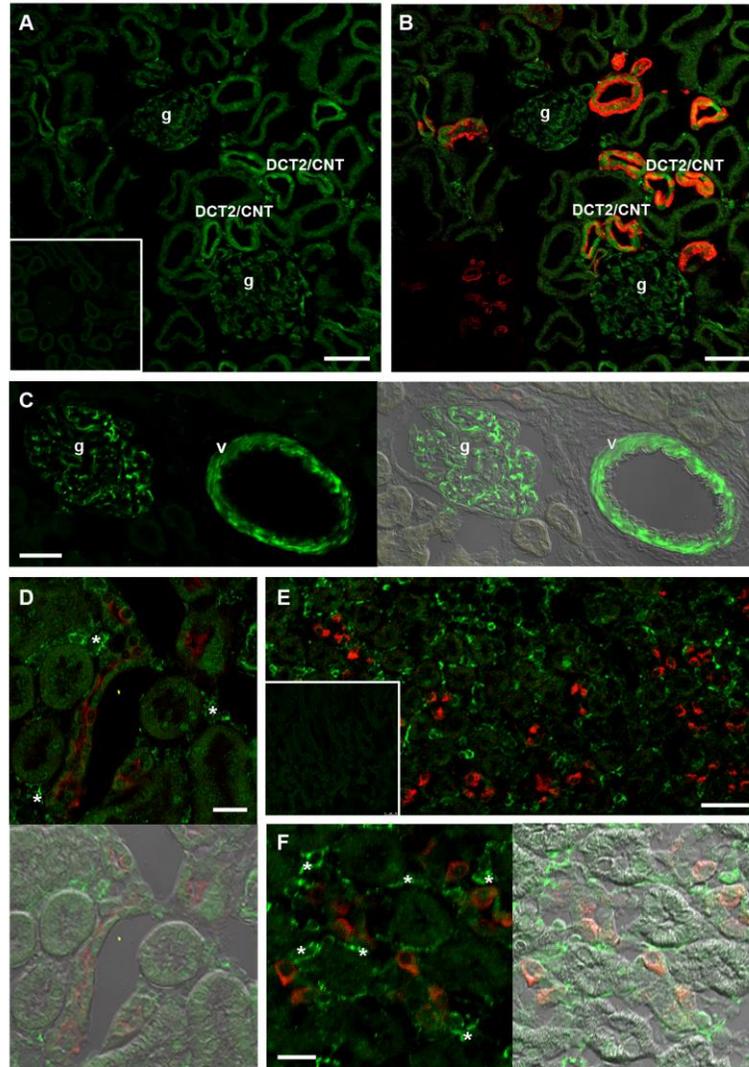
Segmento/Tipo celular	Marcador
TAL	THP
Células DCT2 y CNT	Calb
Células CNT y principales (CCD/OMCD)	AQP2
Células $\alpha$ -intercaladas (DCT2/CNT/CCD/OMCD)	V-ATPasa

AQP2: aquaporina 2, Calb: calbindina D<sub>28k</sub>, CCD: conducto colector de la corteza, CNT: túbulo conector, DCT2: túbulo contorneado distal tardío, THP: *Tamm Horsfall protein*, OMCD: conducto colector de la médula externa, V-ATPasa: H<sup>+</sup> ATPasa vacuolar.

#### 1.1. Canal HCN2

El canal HCN2 se describió previamente en CNT y CD, tanto en las células principales como  $\alpha$ -intercaladas, principalmente en la membrana basolateral (Carrisoza-Gaytán et al. 2011). En la Fig. 10 se confirma que HCN2 se inmunodetecta en CNT y CCD (Fig. 10A-B, D), identificado con calbindina D<sub>28k</sub> (Calb, Fig. 10B) y AQP2 (Fig. 10D), respectivamente; la distribución del canal parece predominantemente intracelular. Además del CNT, HCN2 podría ubicarse en DCT2, pues este subsegmento de DCT también expresa Calb y muestra un patrón alterno debido a la aparición de las células  $\alpha$ -intercaladas (Loffing et al. 2003). Cabe mencionar que se distingue una mayor intensidad inmunofluorescente intracelular de HCN2 en DCT2/CNT (Fig. 10A) respecto a CCD (Fig. 10D) en condiciones basales. Un resultado nuevo e importante es la identificación del canal HCN2 en glomérulos y vasos renales (Fig. 10C). En la imagen donde se traslapa la inmunofluorescencia y el contraste de interferencia diferencial (DIC, *Differential interference contrast*), se puede observar que la inmunofluorescencia asociada a

HCN2 no está en la capa más externa (células endoteliales) del vaso renal, sino en una capa celular interna, posiblemente correspondiente a células del músculo liso. También se observó marca del canal en algún tipo celular del intersticio de la corteza renal (Fig. 10D, asteriscos), aunque se tendría que confirmar con el uso de marcadores de este compartimento.



**Fig. 10. Localización del canal HCN2 en corteza (Cx) y médula externa (OM) renal.** En Cx se observa inmunofluorescencia del canal HCN2 (verde) en el túbulo contorneado distal tardío (DCT2) y el conducto conector (CNT), etiquetados con calbindina  $D_{28k}$  (rojo, B), así como en el conducto colector cortical (CCD), marcado con acuaporina 2 (rojo, D). Además, HCN2 se localiza en glomérulos (g, A-C), grandes vasos (v, C) y células intersticiales (asteriscos), estas últimas más evidentes al empalmar la imagen de contraste de interferencia diferencial (D y F). En el control negativo no se observa inmunoreactividad (inserto, A y E). En la OM, la inmunofluorescencia de HCN2 parece casi imperceptible en el conducto colector de la médula externa (OMCD), etiquetado con V-ATPasa, (E, F), pero es intensa en el compartimento intersticial medular (asteriscos, F). Escala: 50  $\mu\text{m}$  (A-C, E), 25  $\mu\text{m}$  (D, F).

En la médula externa, el canal HCN2 se encontró muy escaso en los conductos colectores (OMCD), marcados con V-ATPasa (Fig. 10E); al realizar la magnificación de una zona de la Fig. 1E, se observa su abundancia pobre en OMCD, casi imperceptible e intracelular (Fig. 10F). Un resultado inesperado fue que la inmunofluorescencia más notable de HCN2 aparece en células que no pertenecen a OMCD ni a TAL, debido a que la señal intensa es externa tanto a los túbulos positivos a V-ATPasa (OMCD) como a las células de TAL, identificadas por su perfil morfológico en la imagen de DIC (Fig. 10F, derecha). La observación cuidadosa sugiere que la identidad de las células donde resalta HCN2 corresponde al compartimento intersticial de la médula renal (Fig. 10F, asteriscos), y al igual que en la corteza, se tendría que confirmar el tipo celular en particular.

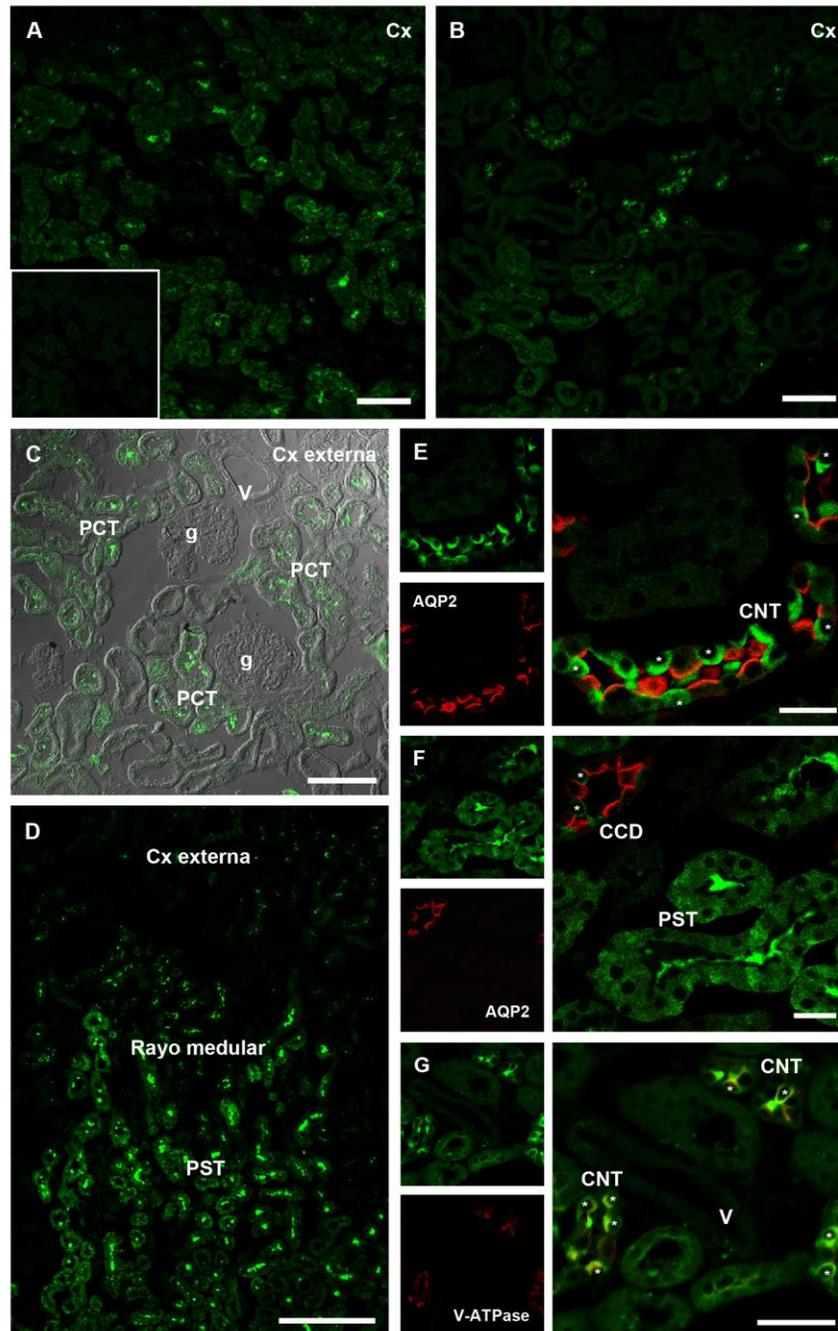
## **1.2. Canal HCN4**

Al realizar observaciones amplias (de baja magnificación) en la corteza renal, se aprecian dos patrones predominantes de la marca inmunofluorescente del canal HCN4: uno con distribución intracelular difusa, pero con gran intensidad luminal (Fig. 11A), y otro con alternancia celular en algunos túbulos (Fig. 11B). En las imágenes posteriores se profundizará en su localización específica.

En la Fig. 11C, al sobreponer la imagen de DIC y considerando criterios morfológicos, se concluyó que el canal HCN4 no se expresa en glomérulos ni vasos sanguíneos, como en el caso de HCN2, pero si en el túbulo contorneado proximal (PCT), segmento de la nefrona que ocupa el mayor porcentaje de la corteza renal. El lumen del túbulo proximal se caracteriza por una gran oclusión debido a la membrana de borde de cepillo (BBM, *brush border membrane*). La señal más intensa del canal HCN4 se observa precisamente en la BBM, y en regiones intracelulares en menor proporción.

En la Fig. 11D se muestra una imagen de baja magnificación para lograr abarcar la corteza renal externa y un rayo medular, el cual pertenece a la región cortical a pesar de su nombre; se puede visualizar que la marca del canal HCN4 destaca en el rayo medular en comparación con la parte más externa de la corteza; la localización, abundancia y morfología de los túbulos

donde se observa la señal inmunofluorescente de HCN4 corresponden al túbulo proximal recto (PST).



**Fig. 11. Inmunolocalización del canal HCN4 en la corteza (Cx) renal.** En todos los paneles, la inmunofluorescencia de HCN4 se observa en verde. **A.** HCN4 se localiza en segmentos tubulares proximales de Cx; la marca inmunofluorescente desaparece en el control negativo (inserto). **B.** HCN4 se inmunodetecta en segmentos tubulares distales de Cx. **C.** HCN4 es evidente en la membrana de borde de cepillo (BBM) del túbulo contorneado proximal (PCT), sin embargo, está ausente en glomérulos (g) y vasos renales (v). **D.** Micrografía de baja magnificación para mostrar simultáneamente la Cx externa y

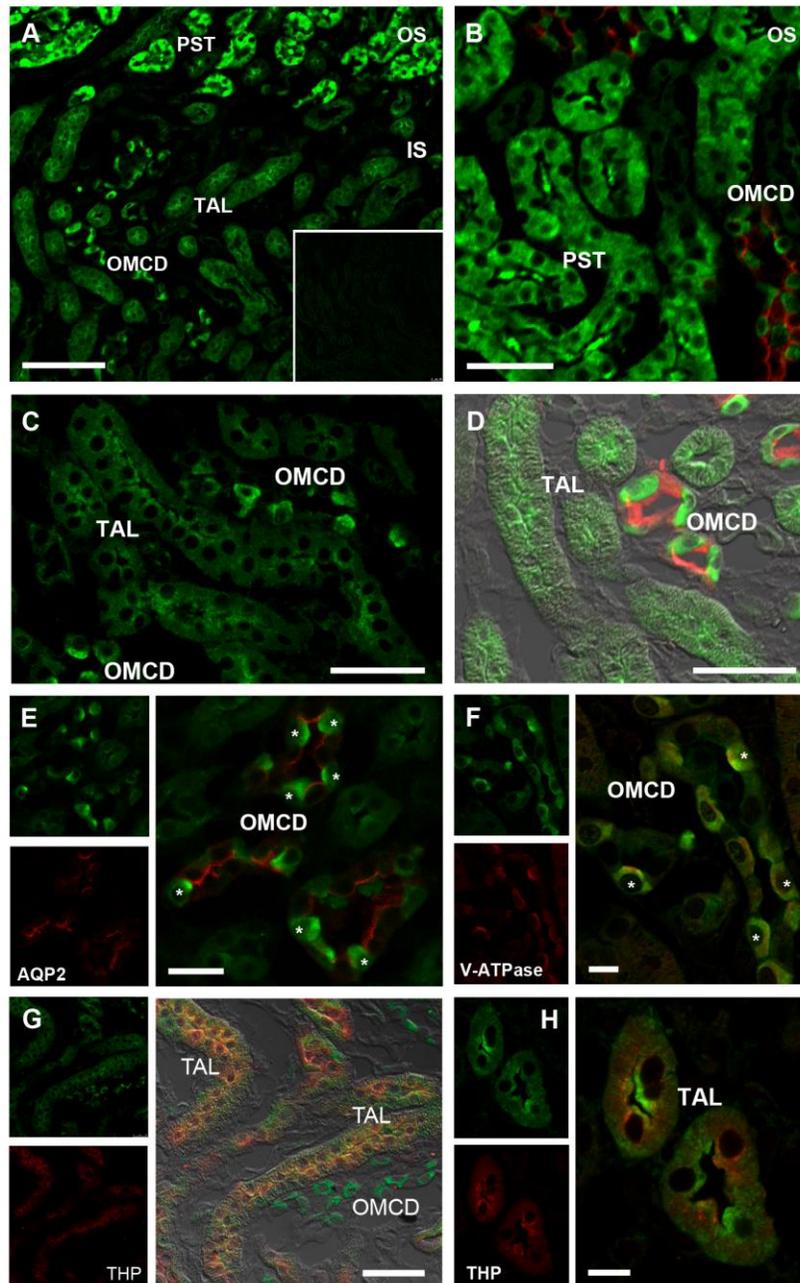
un rayo medular; la inmunofluorescencia de HCN4 es más abundante en el rayo medular, específicamente en el túbulo recto proximal (PST), donde resalta en BBM. Doble marcaje de HCN4 y acuaporina 2 (AQP2, rojo) en la Cx externa (E) y rayo medular (F) para confirmar la expresión de HCN4 en el conducto conector (CNT) y el conducto colector cortical (CCD), respectivamente, en células negativas a AQP2. G. Doble marcaje de HCN4 y H<sup>+</sup>-ATPasa vacuolar (V-ATPasa, rojo) para demostrar su colocalización (amarillo en la imagen empalmada) en la membrana apical de las células  $\alpha$ -intercaladas. Escala: 250  $\mu$ m (D), 100  $\mu$ m (A, B), 50  $\mu$ m (C, G), 25  $\mu$ m (E, F).

En la corteza renal, el canal HCN4 también se inmunodetectó en túbulos de la nefrona distal positivos para AQP2, tanto CNT como CCD (Fig. 11E, F), pero no en las mismas células que expresan dicha acuaporina (células principales). Por lo anterior, se infiere que el canal se encuentra en las células intercaladas. Para confirmar la presencia de HCN4 específicamente en las células  $\alpha$ -intercaladas, se realizó el comarcaje con V-ATPasa, observándose la colocalización de ambas proteínas en la membrana apical de dichas células (Fig. 11G).

En la Fig. 12A-B se observa la señal inmunofluorescente del canal HCN4 en PST de las nefronas yuxtglomerulares, segmento que aún se encuentra presente en la banda externa (OS) de la médula externa. A diferencia de la corteza, la distribución de HCN4 tiende a ser más intensa en toda la célula (compartimentos intracelulares), excepto por su ausencia en el núcleo y que destaca en la BBM como en la corteza. En la banda interna (IS) de la médula externa predomina en TAL y OMCD (Fig. 12A, C-D). HCN4 en OMCD (túbulos positivos a AQP2 en Fig. 12B, D, E) mantiene su expresión en células distintas a las principales. Al realizar el comarcaje con V-ATPasa, se confirmó la presencia de HCN4 en las células  $\alpha$ -intercaladas (Fig. 12F), como ocurrió en la corteza renal; sin embargo, su tendencia apical en las células  $\alpha$ -intercaladas de OMCD, en comparación con CNT y CCD, no es tan marcada ni exclusiva, pues también se aprecia en regiones intracelulares, e incluso con tendencia basolateral en algunas células.

Finalmente, ya que HCN4 se observó en túbulos distintos a OMCD en la banda interna (IS) de la médula externa (Fig. 12A, C-D), se utilizó como marcador a la uromodulina, glicoproteína también conocida como THP (*Tamm Horsfall Protein*), para confirmar la presencia del canal HCN4 en TAL (Fig. 12G, H). En este segmento, la distribución de HCN4 predomina hacia la

membrana apical, donde colocaliza parcialmente con THP, pero además se observa intracelularmente.

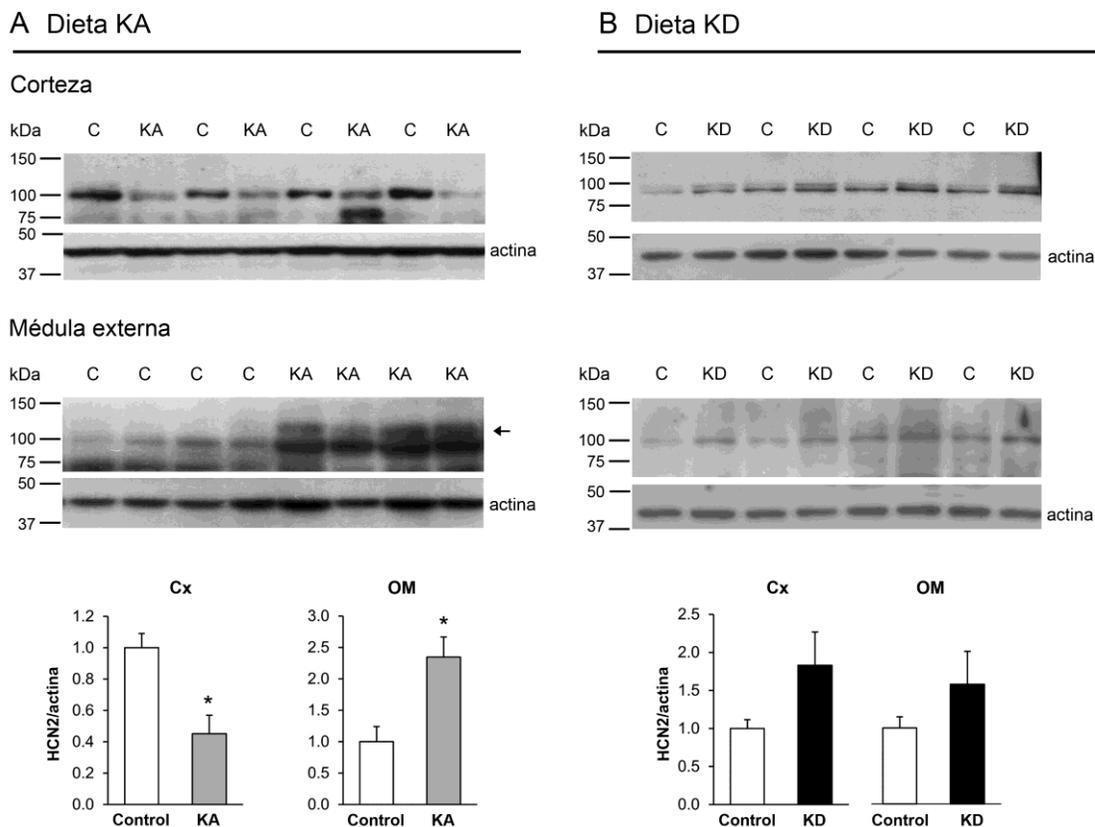


**Fig. 12. Inmunolocalización del canal HCN4 en la médula renal.** **A.** La inmunofluorescencia de HCN4 (verde) se observa en diferentes segmentos tubulares de la médula externa (OM). No hay marca en el control negativo (inserto). **B.** En el túbulo recto proximal (PST), presente en la banda externa (OS) de la médula externa, se aprecia de manera intensa la inmunofluorescencia de HCN4. **C.** Se observa la presencia intracelular y apical de HCN4 en túbulos distintos al conducto colector de la médula externa (OMCD), estos últimos reconocidos por el patrón alternante de HCN4. **D.** Una imagen empalmada con el contraste de interferencia diferencial (DIC) permite reconocer que HCN4 se localiza en rama gruesa

ascendente (TAL) del asa de Henle, además de OMCD. Doble inmunofluorescencia del canal HCN4 (verde) con diferentes marcadores de la nefrona (rojo): AQP2 para las células principales del OMCD (**B, D, E**), V-ATPasa para las células  $\alpha$ -intercaladas del OMCD (**F**) y la proteína Tamm Horsfall (THP) para TAL (**G, H**). HCN4 no se identifica en las células principales (positivas a AQP2), pero si en las células complementarias, es decir, intercaladas (B, D, E). HCN4 y V-ATPasa colocalizan apicalmente en las células  $\alpha$ -intercaladas (amarillo/naranja en imagen empalmada, F). Finalmente, la presencia de HCN4 en TAL se confirma por su colocalización con THP (G, H). Escala: 100  $\mu\text{m}$  (A), 50  $\mu\text{m}$  (B-D, G), 25  $\mu\text{m}$  (E), 10  $\mu\text{m}$  (F, H).

## 2. Regulación por dietas de potasio

### 2.1. Inmunoblots del canal HCN2



**Fig. 13. Regulación de la abundancia proteica del canal HCN2 en riñón de rata por dietas con  $\text{K}^+$  alto (KA) y deficiente (KD).** Inmunoblots del canal HCN2 en muestras enriquecidas en mitocondrias de corteza (Cx, *cortex*) y médula externa (OM, *outer medulla*); C: dieta control. Las gráficas representan el análisis densitométrico de la banda del canal HCN2 (~100 kDa) respecto al control de carga ( $\beta$ -actina). **A.** La dieta KA provoca efectos significativos contrarios en Cx (disminución) y OM (aumento); en esta última, se induce la glicosilación del canal HCN2 (banda a ~120 kDa, flecha). **B.** Se observa una tendencia de regulación a la alta de HCN2 por la dieta KD en ambas regiones. Las gráficas de barras representan la media  $\pm$  el error estándar ( $n = 4$ ), \* $p < 0.05$ .

La banda del canal HCN2 se observa cercana a su peso molecular teórico de 95 kDa, lo cual sugiere que en el riñón de rata predomina en su forma completa sin modificaciones postraduccionales, a diferencia del cerebro, donde el canal se detecta a mayor peso (alrededor de 125 kDa) debido a su glicosilación (Zha et al. 2008).

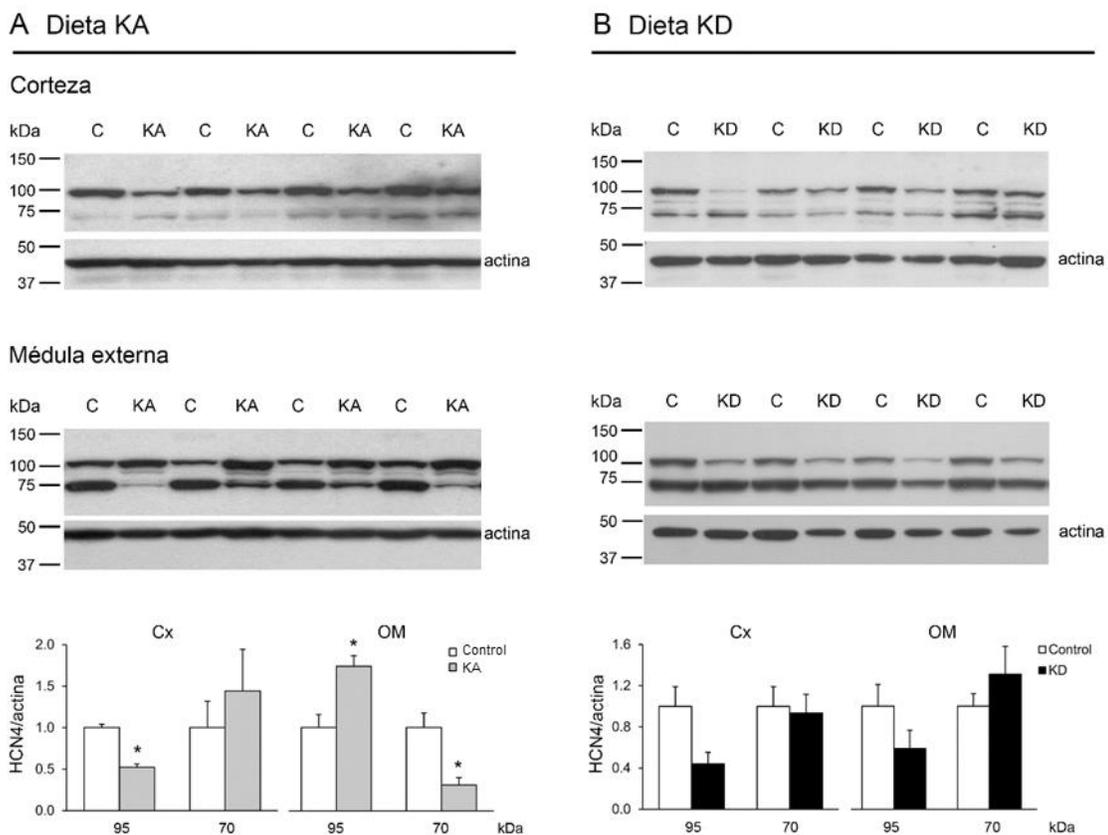
La dieta KA provocó cambios significativos del canal HCN2, disminución en la corteza y aumento en la médula externa; en esta última también se observó la aparición de una banda a mayor peso, la forma glicosilada del canal (Fig. 13A). La dieta KD no afectó significativamente la abundancia del canal HCN2, sin embargo, se observa una tendencia de aumento respecto al grupo control, tanto en corteza como en médula externa (Fig. 13B)

## **2.2. Inmunoblots del canal HCN4**

El peso molecular teórico del canal HCN4 es de 129 kDa de acuerdo a su secuencia de aminoácidos, sin embargo, su peso molecular aparente suele ser mayor (140-160 kDa) debido a su glicosilación (Harzheim et al. 2008, Müller et al. 2003). Ya que el anticuerpo utilizado está dirigido hacia los aminoácidos 119-155 del HCN4 de humano (N-terminal) y detecta bandas de menor peso (aproximadamente a 95 y 70 kDa), tanto en corteza como en médula renal (Fig. 14), se hipotetiza que el canal está truncado en el C-terminal. La banda correspondiente al canal completo glicosilado, solo se logró observar en la médula externa de manera muy débil tras exponer las placas fotográficas por un período prolongado; esta sobreexposición provocó la saturación de las bandas más abundantes (Fig. 1 Suplementaria). En la corteza no se logró observar la banda del canal completo. Por lo tanto, se dio prioridad a la detección de las bandas a 95 y 70 kDa, la cual fue reproducible en las condiciones experimentales en ambas regiones renales.

El análisis densitométrico de las bandas de 95 y 70 kDa de HCN4 muestra una regulación diferencial compleja de dichos fragmentos dependiendo de la dieta de K<sup>+</sup> y región renal, lo cual apoya el origen endógeno de éstos y descarta que son resultado de un artefacto, si se considera que todas las muestras se procesaron en igualdad de condiciones.

La dieta KA provocó una disminución significativa del fragmento de 95 kDa en la corteza, pero no se observó un cambio claro de la banda de 70 kDa. En la médula externa, la dieta KA indujo una regulación inversa de la banda de 95 kDa (incremento) respecto a la banda de 70 kDa (reducción) (Fig. 14A). La abundancia proteica del canal HCN4 no cambió significativamente por la dieta KD, aunque se observa una tendencia de disminución de la banda de 95 kDa, tanto en corteza como en médula externa (Fig. 14B). Es importante notar que la banda de ~70 kDa es más abundante en la médula externa respecto a la corteza en condiciones control.



**Fig. 14. Regulación de la abundancia proteica del canal HCN4 en riñón de rata por dietas con  $K^+$  alto (KA) y deficiente (KD).** Inmunoblots del canal HCN4 en muestras enriquecidas en mitocondrias de corteza renal (Cx) y médula externa (OM); C: dieta control. Las gráficas representan el análisis densitométrico de las bandas correspondientes a fragmentos del canal HCN4 (~ 95 y ~70 kDa) respecto a la banda de  $\beta$ -actina (control de carga). **A.** La dieta KA provoca efectos significativos contrarios en Cx (disminución) y OM (aumento) para la banda de 95 kDa. En OM en particular, la banda de 95 kDa aumenta pero la banda de 70 kDa disminuye. **B.** Se observa una tendencia de regulación a la baja de la banda de 95 kDa por la dieta KD en ambas regiones. Las gráficas de barras representan la media  $\pm$  el error estándar ( $n = 4$ ), \* $p < 0.05$ .

Con el objetivo de favorecer la visualización de la banda de alto peso molecular (canal completo glicosilado) y así sustentar la especificidad del anticuerpo, se logró su detección en la médula externa a ~140 kDa (Fig. 2A Suplementaria) tras modificar las condiciones del experimento de Western blot, en particular de transferencia proteica (e.g. composición de la solución de transferencia, sistema de transferencia, voltaje, tiempo). Se cree que dicha banda corresponde al canal completo glicosilado porque se ha detectado en ese rango de peso (140-160 kDa), ya sea de manera endógena en diferentes tejidos (Fik-Kolodziej & Pourcho, 2007; Müller et al. 2003; Zhang et al. 2009), o posterior a su transfección en células HEK293 (Li et al. 2008, Ye et al. 2008) y CHO (Brandt et al. 2009). El que la banda no se observe en corteza, no descarta por completo su presencia en esta región; quizá su abundancia es mucho menor respecto a la médula renal. En el control negativo (pre-adsorción previa del anticuerpo con su péptido control) se aprecia la desaparición de todas las bandas, incluidas aquéllas de bajo peso, lo que sugiere que son legítimas y no una inespecificidad del anticuerpo primario. Adicionalmente, para corroborar que la expresión del canal en tejido renal no es un artefacto, en la figura 2B Suplementaria se muestra que se logró amplificar una parte del canal (1300 pb) por RT-PCR tanto en corteza como médula renal de rata, siendo su abundancia mucho menor que en corazón.

Debido al intervalo de peso en que aparecen los fragmentos en los inmunoblots, se podría sospechar que las bandas corresponden a alguna de las otras isoformas de los HCN (HCN1-3); sin embargo, esto se descartó tras el alineamiento de las secuencias de todos los HCN (rata) con la secuencia de aminoácidos que reconoce el anticuerpo utilizado (residuos 119-155, hHCN4). De este análisis se concluyó que el epítipo al cual está dirigido el anticuerpo solo está presente en la isoforma HCN4.

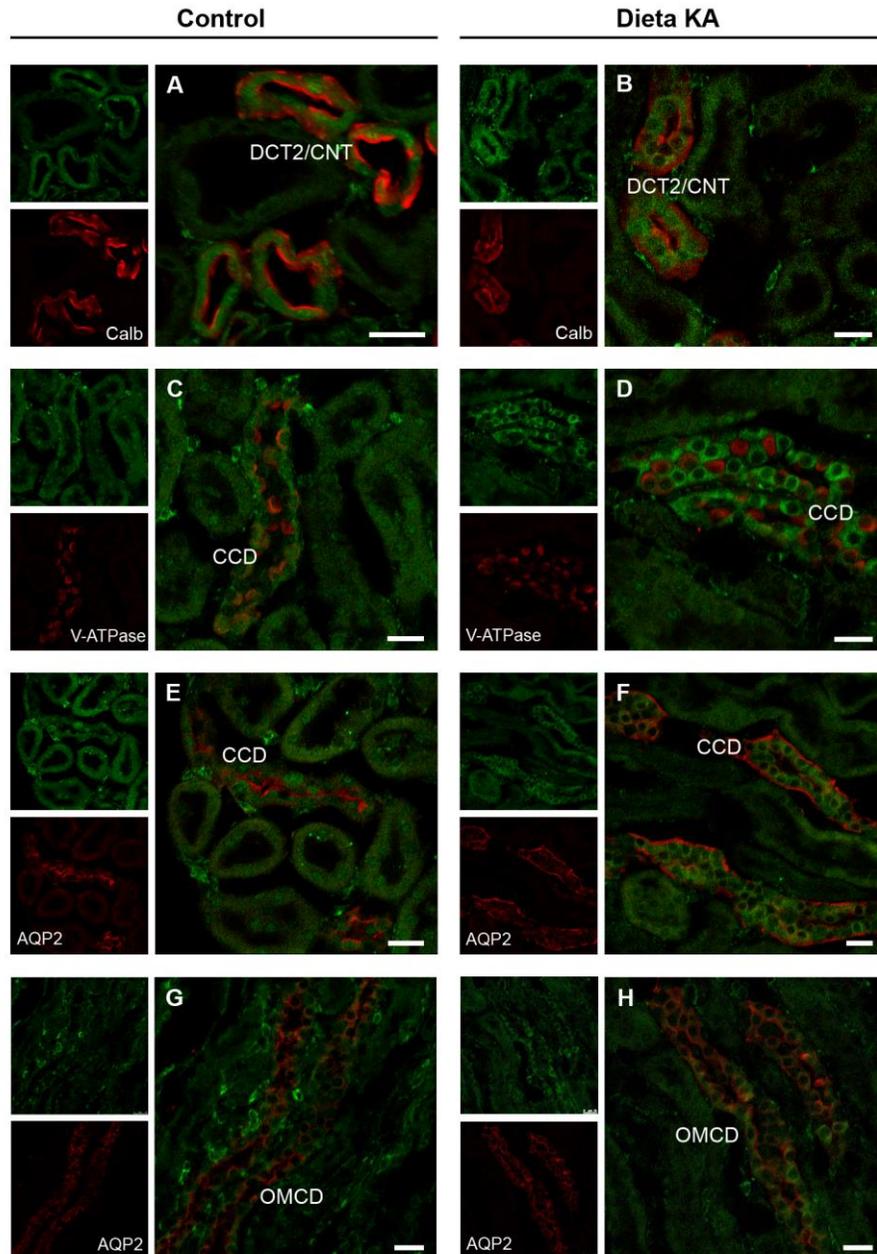
### **2.3. Inmunofluorescencias de los canales HCN2 y HCN4**

Debido a que los canales HCN2 y HCN4 se distribuyen en más de un segmento en la nefrona tanto en la corteza como en la médula renal, los cambios observados en los inmunoblots son difíciles de interpretar. Por lo tanto, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para buscar algún efecto particular inducido por las dietas de  $K^+$ , lo suficientemente fuerte para ser

evidente. Desafortunadamente, se cree que los cambios que ocurren de manera moderada o sutil no se logran distinguir, debido en parte, a las limitaciones asociadas a la técnica (e.g. autofluorescencia elevada del tejido renal, baja abundancia de las proteínas de interés). Es así que en la siguiente sección, se muestran solo los cambios notables en la intensidad de la inmunofluorescencia y/o distribución de los canales HCN2 y HCN4.

### **2.3.1. Regulación del canal HCN2 por la dieta KA**

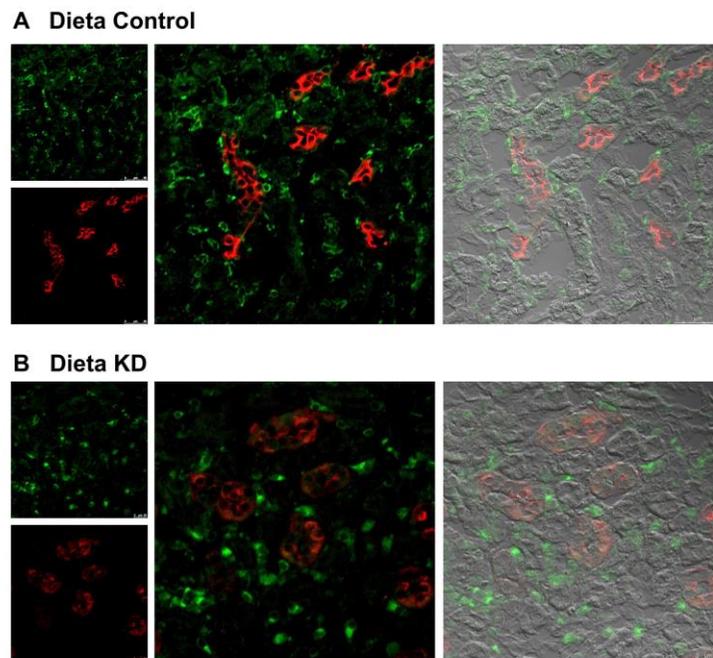
En la corteza renal se observó que la dieta KA provoca un incremento de la inmunoreactividad del canal HCN2 en DCT2/CNT, segmentos marcados con Calb (Fig. 15A, B), así como en CCD, etiquetado con V-ATPasa (Fig. 15C, D) y AQP2 (Fig. 15E, F). El aumento de la inmunofluorescencia parece ocurrir particularmente en las células principales y no en las  $\alpha$ -intercaladas (Fig. 15D). En OMCD también se registra mayor intensidad de la inmunofluorescencia de HCN2, pues pasa de ser prácticamente imperceptible en condiciones control, a observarse en los túbulos AQP2-positivos en la dieta KA (Fig. 15G, H). De manera interesante, esta dieta induce la expresión basolateral de AQP2, particularmente evidente en CCD, lo cual contrasta con su localización exclusivamente apical en condiciones control (Fig. 15C, D).



**Fig. 15. Regulación del canal HCN2 por la dieta KA.** Imágenes representativas de la inmunofluorescencia doble de HCN2 (verde) y marcador de la nefrona (rojo): Calb (calbindina D<sub>28k</sub>) (**A y B**), V-ATPasa (**C y D**), AQP2 (**E - H**). En condiciones control (izquierda), HCN2 se expresa predominantemente en regiones intracelulares en DCT2/CNT y CCD, mientras que en OMCD la marca del canal es casi imperceptible. La dieta KA (derecha) incrementa la intensidad de la inmunofluorescencia de HCN2 en los segmentos distales mencionados, mayormente en las células principales. La dieta KA también favorece la expresión basolateral de AQP2, principalmente en CCD (**F**) y en menor proporción en OMCD (**H**). La escala representa 25  $\mu$ m.

### 2.3.2. Regulación del canal HCN2 por la dieta KD

En la Fig. 16 se observa que la dieta KD se asocia con un aumento de la inmunofluorescencia del canal HCN2 en el intersticio medular, además de un cambio en la morfología de las células intersticiales, cuya identidad específica se desconoce. La presencia del canal HCN2 en OMCD (etiquetado con AQP2) es muy pobre, tanto en condiciones control como de dieta KD, en comparación con la inmunoreactividad notable que se observa en las células intersticiales. También se aprecia que la intensidad de la inmunofluorescencia de AQP2 disminuye por la dieta KD, y su localización se vuelve menos apical y más intracelular.

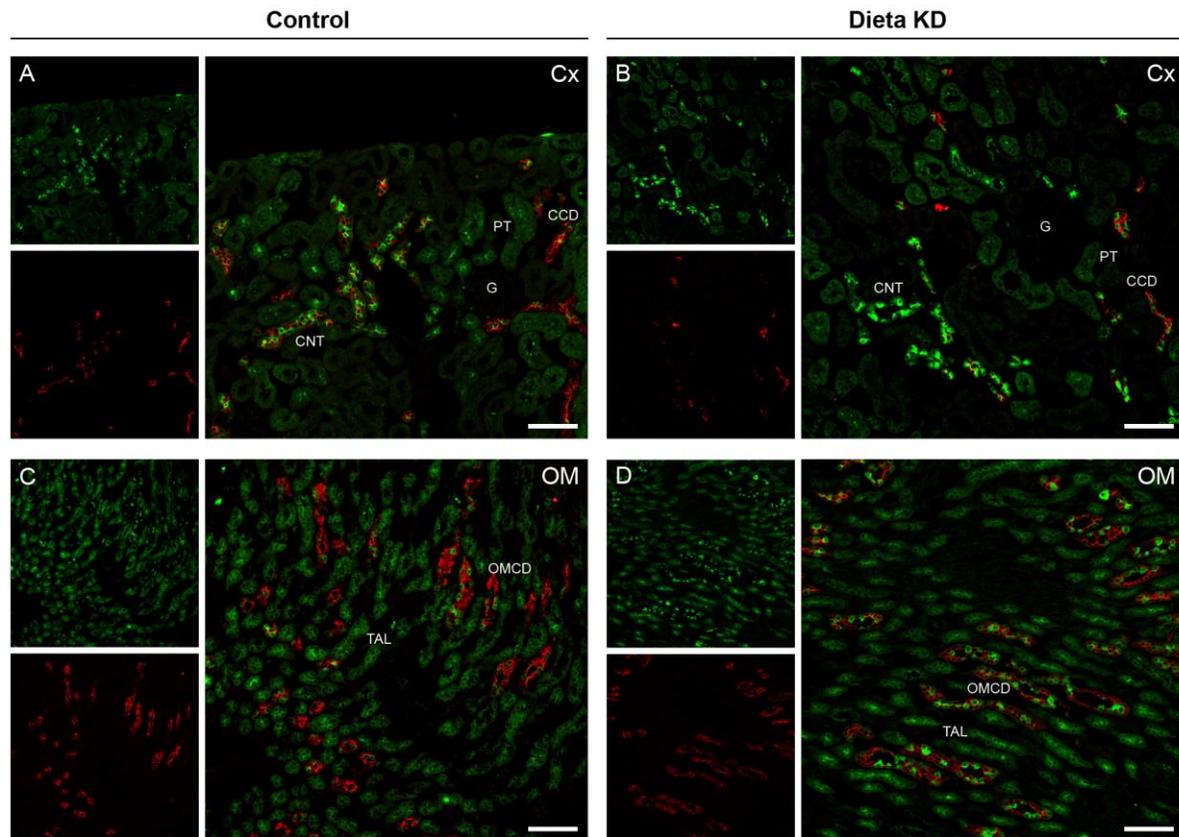


**Fig. 16. Regulación del canal HCN2 por la dieta KD.** Imágenes representativas de microscopía confocal que muestran la inmunofluorescencia de HCN2 (verde) y AQP2 (rojo) en la médula externa, y su regulación por la dieta KD (abajo) respecto a la dieta control (arriba). Se observa un cambio en la morfología y abundancia del canal HCN2 en las células intersticiales de la médula externa, identificadas mediante el empalme con la imagen de DIC correspondiente (panel derecho).

### 2.3.3. Regulación del canal HCN4 por la dieta KD

En la corteza renal (Fig. 17A, B), las células  $\alpha$ -intercaladas de CNT (menor expresión de AQP2 en comparación con CCD) mostraron una inmunofluorescencia intensa en las membranas apicales, tanto en condiciones control como de dieta KD. Cabe mencionar que en los cortes

de ratas sometidas a dieta KD vs control, se observa que AQP2 casi desaparece en CNT y disminuye en CCD. Mientras que en la médula externa (Fig. 17C, D), se observa que la dieta KD induce un aumento notable en la intensidad de la inmunofluorescencia apical de HCN4 en las células  $\alpha$ -intercaladas del OMCD (túbulos AQP2-positivos). Al igual que en CCD, en OMCD parece que la proporción de células principales (AQP2-positivas) se reduce respecto a las células  $\alpha$ -intercaladas (AQP2-negativas, HCN4-positivas) por la deficiencia de  $K^+$ . Para visualizar mejor el efecto de la dieta KD sobre HCN4 en las células  $\alpha$ -intercaladas, en la Fig. 18 se muestran magnificaciones representativas (Fig. 18C, D, G, H) de observaciones de corteza y médula externa (Fig. 18A, B, E, F). Se aprecia una mayor intensidad de la inmunofluorescencia de HCN4 en la membrana apical, la cual tiende a proyectarse hacia el lumen.



**Fig. 17. Regulación del canal HCN4 por la dieta KD.** Imágenes representativas de microscopía confocal de cortes histológicos obtenidos de ratas alimentadas con dieta control (izquierda) o KD (derecha), tanto de corteza (Cx, paneles superiores) como de médula externa (OM, paneles inferiores). HCN4 se etiquetó en verde y AQP2 en rojo. Se observa una regulación a la alta de la inmunofluorescencia de HCN4 en OMCD. Escala: 100  $\mu$ m.

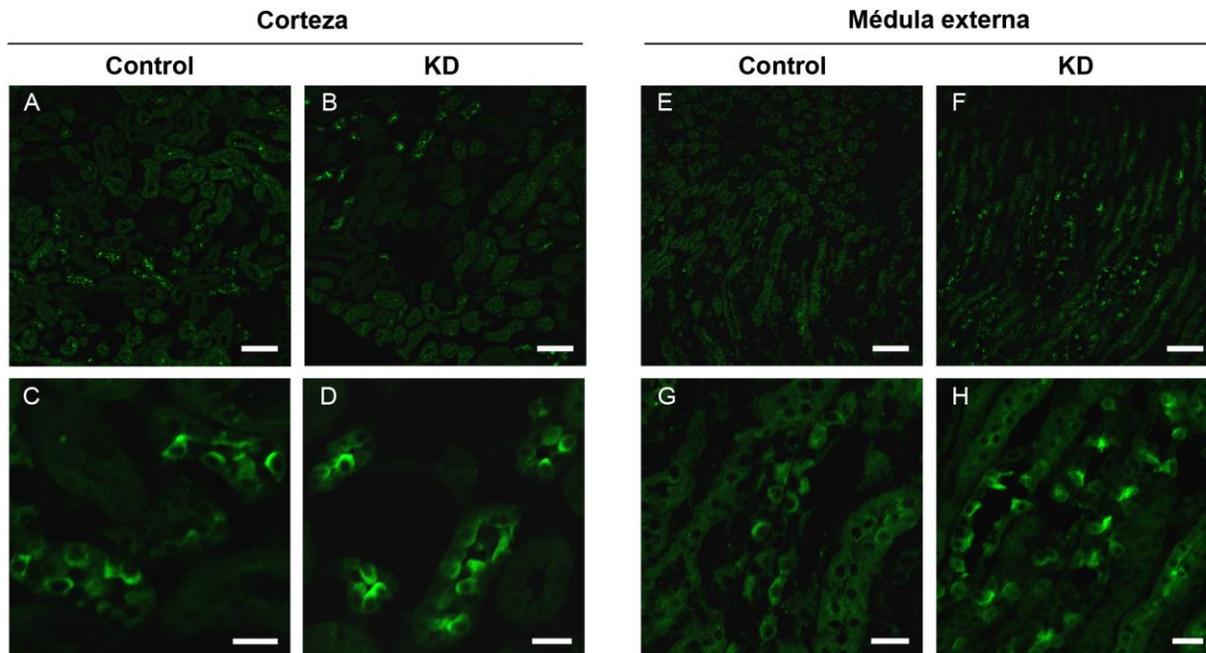


Fig. 18. Regulación del canal HCN4 en las células  $\alpha$ -intercaladas por la dieta KD. Imágenes representativas de microscopía confocal donde se observa HCN4 en corteza (panel izquierdo) y médula externa (panel derecho), tanto en muestras control como KD. Las imágenes inferiores (C, D, G, H) representan magnificaciones realizadas dentro de las imágenes superiores (A, B, E, F). Se observa un aumento de la intensidad inmunofluorescente de HCN4 en la región apical de OMCD por la dieta KD. Escala: 100  $\mu$ m (A, B, E, F), 25  $\mu$ m (C, D, G, H).

## Sección II. Canales HCN en mitocondrias de corazón

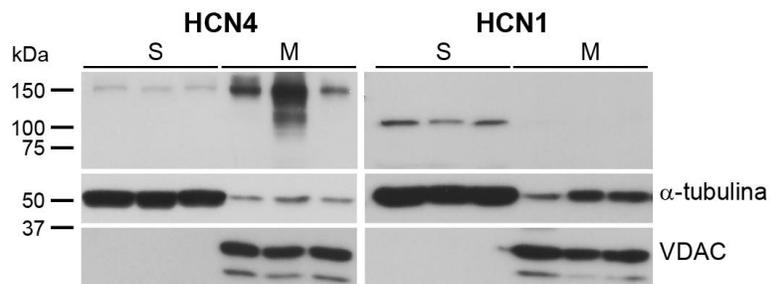
### 1. Expresión del canal HCN4 en células HEK293

Con el objetivo de profundizar en la comprensión de la regulación molecular del canal HCN4, y debido a la dificultad técnica para inmunoprecipitar al canal directamente del tejido nativo de rata, se decidió expresarlo en células HEK293 y a través de un enfoque proteómico, identificar las proteínas de interacción del canal, al menos en este sistema heterólogo. Para lograrlo, el canal se inmunoprecipitó de las células HEK293 transfectadas previamente; el inmunoprecipitado se sometió a una electroforesis desnaturalizante de una dimensión, y la zona del gel donde se observaron las bandas (tinción de Comassie), se envió a un Servicio externo para su procesamiento y análisis por espectrometría de masas. La mayoría de las proteínas interactoras del canal HCN4 identificadas por espectrometría de masas pertenecen a la mitocondria (Padilla-Flores et al. 2020), lo cual sugiere fuertemente una localización del

canal HCN4 en dicho organelo. Esto se confirmó a través de la inmunodetección de HCN4 en una fracción mitocondrial de células HEK293, previamente transfectadas con el canal, como se describirá a continuación.

### 1.1. Inmunodetección del canal HCN4 en mitocondrias

En la Fig. 19 se observa el inmunoblot de los canales HCN4 y HCN1 en muestras obtenidas de células HEK293 tras un protocolo de enriquecimiento mitocondrial. Como se esperaba, HCN4 se inmunodetectó de manera intensa en la fracción enriquecida en mitocondrias (M) y muy poco en el sobrenadante (S), que sirvió de control. Este resultado contrasta con HCN1, cuya banda no aparece en M, solo en S, lo que descarta su localización en mitocondria, al menos en este modelo heterólogo. VDAC se usó como marcador mitocondrial y  $\alpha$ -tubulina como marcador citoplásmico; esta última no desaparece por completo en M pero se observa su reducción notable.



**Fig. 19.** Inmunoblot del canal HCN4 en mitocondrias de células HEK293. La banda de HCN4 se observa cercana a 150 kDa, correspondiente al canal completo glicosilado, mucho más abundante en la fracción enriquecida en mitocondrias (M) respecto al sobrenadante (S). Mientras que HCN1 solo aparece en S. VDAC y  $\alpha$ -tubulina se usaron como marcadores de mitocondria y citoplasma, respectivamente.

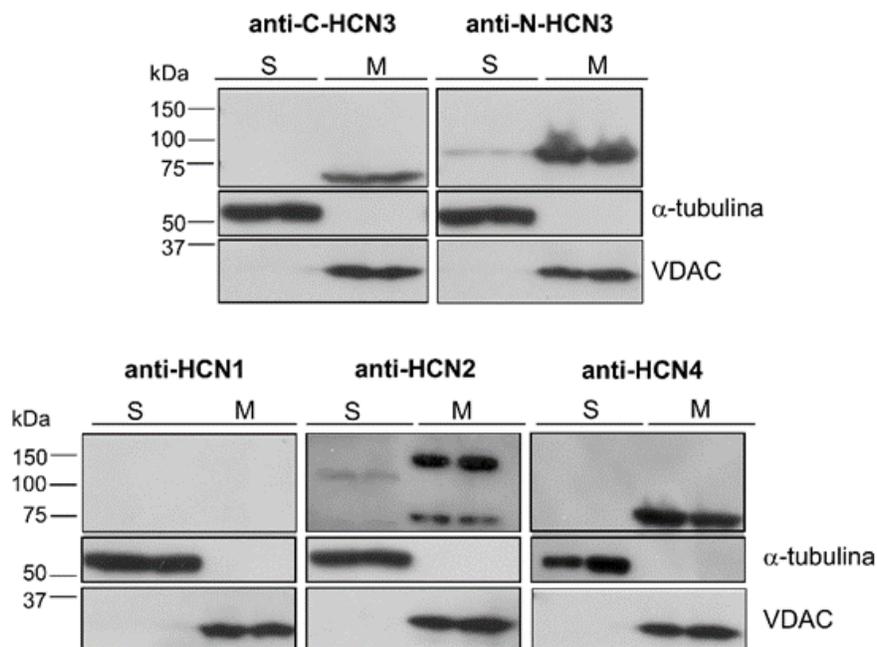
## 2. Canales HCN en mitocondrias de corazón

Considerando la localización del canal HCN3 en mitocondrias de células HEK293 y tejido renal (León-Aparicio et al. 2019), y los resultados antes mencionados en células HEK293 que apoyan la presencia del canal HCN4 en mitocondria, se procedió a determinar si algún

miembro de la familia HCN se localizaba en las mitocondrias de tejido cardiaco, donde la expresión y relevancia funcional de estos canales ha sido mayormente estudiada.

## 2.1. Inmunodetección en tejido cardiaco de rata

Se sabe que todas las isoformas de los canales HCN se expresan a nivel de transcrito y/o proteína en el corazón (Herrmann et al. 2011, Ludwig et al. 1998, 1999, Santoro et al. 1998), por lo tanto, se evaluó la presencia de cada una por Western blot en muestras enriquecidas en mitocondrias de corazón de rata (Fig. 20).



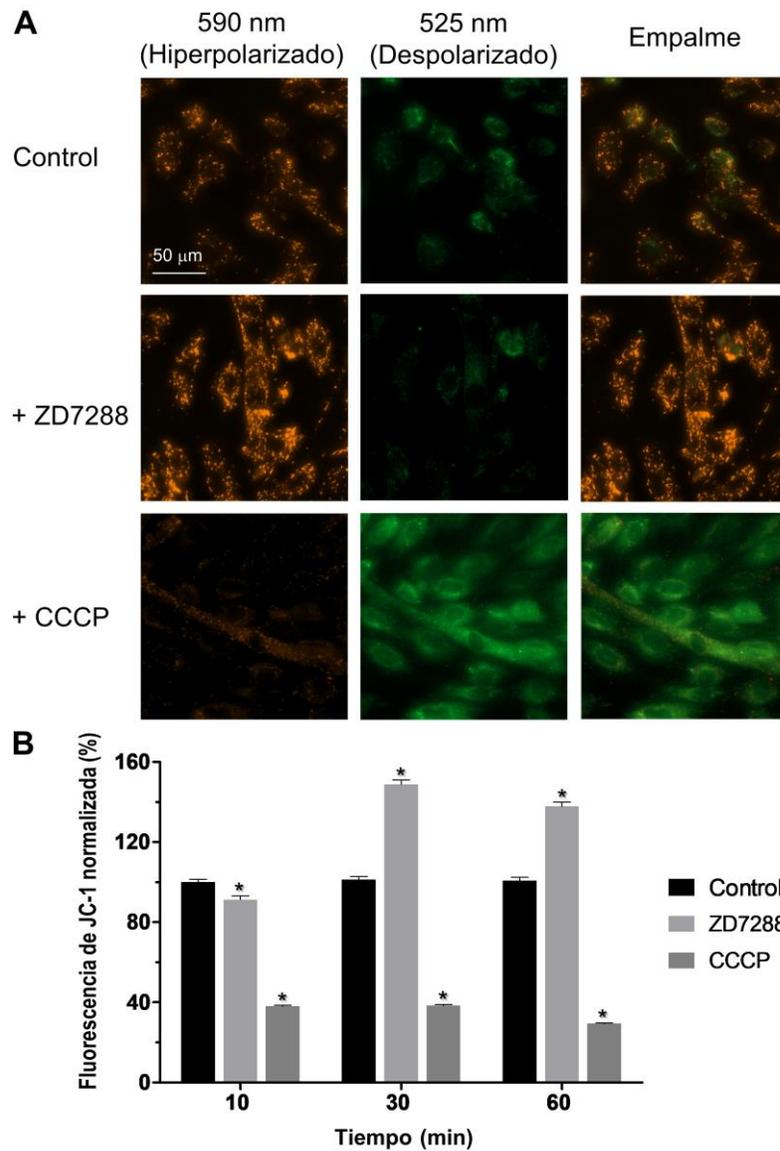
**Fig. 20. Inmunoblot de canales HCN en mitocondrias de corazón de rata.** HCN3 se detectó en la fracción enriquecida en mitocondrias (M) tanto como proteína N-truncada (~70 kDa) con un anticuerpo dirigido hacia un epítipo del C-terminal (anti-C-HCN3), como a su tamaño completo (~86 kDa) con un anticuerpo que reconoce un epítipo del N-terminal (anti-N-HCN3). En M también se inmunodetectaron bandas para HCN2 (~140 y ~70 kDa, probablemente correspondientes al canal completo con modificaciones postraduccionales y a la proteína truncada en el C-terminal, respectivamente) y para HCN4 (~70 kDa, canal C-truncado) usando anticuerpos dirigidos contra un epítipo del N-terminal de cada canal; en contraste, no se observaron bandas para el canal HCN1. Las isoformas HCN2, HCN3 y HCN4 fueron más abundantes en M que en el sobrenadante (S). Para evaluar el enriquecimiento mitocondrial,  $\alpha$ -tubulina (~55 kDa) y VDAC (~31 kDa) se usaron como controles negativo y positivo, respectivamente.

Además del canal HCN3 (~86 y ~70 kDa), previamente descrito en mitocondrias renales (León-Aparicio et al. 2019), HCN2 y HCN4 también se detectaron en las mitocondrias cardiacas. Para el canal HCN2, se observaron bandas de mayor (~140 kDa) y menor (~70 kDa) peso molecular aparente respecto a su peso molecular teórico (95 kDa); mientras que en el sobrenadante (control) se observa una banda a ~125 kDa. Para HCN4, se detectó un fragmento a ~70 kDa, peso al cual se observó en riñón (membranas plasmáticas), sin embargo, no se detectó el fragmento de ~95 kDa.

## **2.2. Ensayos de función mitocondrial en cardiomiocitos**

### **2.2.1. ZD7288 hiperpolariza el potencial de membrana mitocondrial**

JC-1 es un compuesto catiónico lipofílico sensible a los cambios del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ): forma agregados con fluorescencia roja cuando el  $\Delta\Psi_m$  es alto (hiperpolarizado), y se desagrega en monómeros con fluorescencia verde en mitocondrias con un  $\Delta\Psi_m$  bajo (despolarizado). Como se esperaba, en condiciones control las mitocondrias de los cardiomiocitos (células H9c2) se observaron mayormente hiperpolarizadas. A los 30 min de incubación con ZD7288, se registró un aumento significativo (~50%) de la hiperpolarización respecto a las células control (Fig. 21A, B). En la gráfica de barras se muestra el efecto de la adición de ZD7288 o CCCP al cultivo celular a los tres tiempos evaluados (10, 30 y 60 min) respecto al control. A los 60 min se mantiene la respuesta al ZD7288 observada a los 30 min, sin embargo, la respuesta inicial (10 min) fue una ligera pero significativa despolarización (Fig. 21B). Cabe mencionar que el efecto despolarizante (fluorescencia verde) mediado por los canales HCN en condiciones basales (Control, sin ZD7288) es moderado, en comparación con el fuerte efecto despolarizante causado por el agente desacoplante CCCP (Fig. 21A, B).



**Fig. 21.** Efecto del ZD7288 y CCCP sobre el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) en cardiomiocitos (células H9c2). **A.** Imágenes representativas de las células tras 30 min de tratamiento que muestran la fluorescencia roja (590 nm) y verde (525 nm) de JC-1, así como el empalme. **B.** La fluorescencia de JC-1 se reporta como el cociente de la fluorescencia roja y la fluorescencia verde; los valores se normalizaron respecto a las células control (sin inhibidor). ZD7288 o CCCP (50  $\mu$ M). Los datos corresponden a los promedios  $\pm$  error estándar,  $n = 10$ ,  $*p < 0.001$  vs control.

## 2.2.2. ZD7288 disminuye el consumo de oxígeno mitocondrial

Para elucidar el papel de los canales HCN en la bioenergética mitocondrial cardiaca, se evaluó el efecto de la adición de ZD7288 sobre OXPPOS en cardiomiocitos (células H9c2). La respiración *in vitro* se regula por la demanda de ATP aeróbica pero también por eventos que reducen el acoplamiento mitocondrial como la fuga de protones y la fuga de electrones (producción de ROS). En las gráficas se muestra el comportamiento de los diferentes parámetros respiratorios evaluados. La respiración basal disminuyó tras una incubación de 30 min con ZD7288 (Fig. 22A). El consumo de oxígeno mitocondrial que no produce ATP se determinó a través de la inducción un estado de no fosforilación (*leak*, fuga) con oligomicina; se observó solo una tendencia de reducción a los 30 min pues la diferencia no fue estadísticamente significativa (Fig. 22B). La respiración atribuible a OXPPOS (P, Fig. 22C), el índice de control respiratorio (ICR, Fig. 22D) y el % OXPPOS (Fig. 22E) disminuyeron por efecto del ZD7288 a los 10 min, y el decremento fue aún mayor a los 30 min.

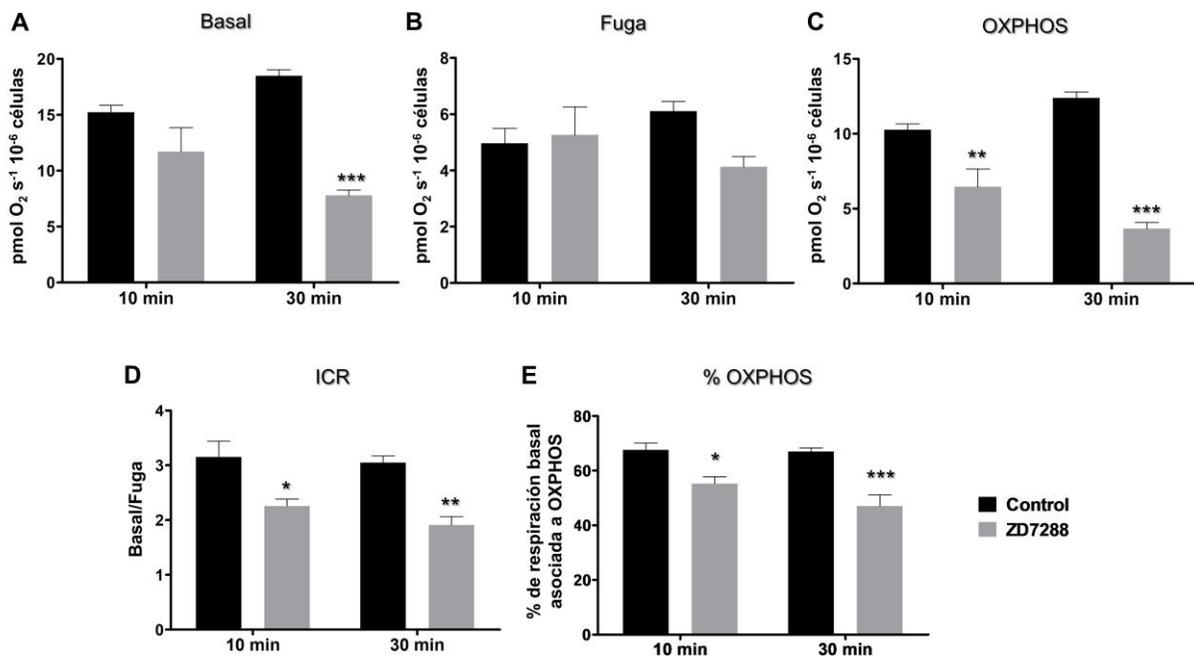


Fig. 22. Efecto del ZD7288 (50  $\mu$ M) en los parámetros respiratorios de cardiomiocitos (células H2c9). A. Respiración basal celular, B. Respiración de fuga, C. Respiración asociada a la fosforilación oxidativa (OXPPOS), D. Índice de control respiratorio (ICR), E. Porcentaje de respiración basal atribuible a OXPPOS. Los datos se presentan como promedios  $\pm$  error estándar,  $n = 3-4$ , \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs control.

---

## DISCUSIÓN

---

### SECCIÓN I. Canales HCN2 y HCN4 en el riñón de rata

#### 1. Localización en la corteza y médula externa renal

Tabla 5. Resumen de la distribución de los canales HCN2 y HCN4 en la corteza y médula renal

Estructura	Canal HCN2	Canal HCN4
Glomérulos	✓	✗
Grandes vasos	✓	✗
Intersticio	✓	✗
Túbulo proximal	✗	✓
TAL	✗	✓
CNT	✓	✓ $\alpha$ -int
CCD	✓	✓ $\alpha$ -int
OMCD	✓	✓ $\alpha$ -int

$\alpha$ -int: células  $\alpha$ -intercaladas, CCD: conducto colector de la corteza, CNT: túbulo conector, OMCD: conducto colector de la médula externa, TAL: rama gruesa del asa de Henle

#### 1.1. Canal HCN2

##### 1.1.1. Canal HCN2 en la nefrona distal

En condiciones control, la intensidad de la inmunofluorescencia de HCN2 es mayor en DCT2/CNT respecto a CCD, lo cual resulta interesante debido a la relevancia de estos segmentos en el manejo renal de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  (Meneton et al. 2004). Dentro de la nefrona distal sensible a aldosterona (ASDN), hay evidencia de que CNT tiene una contribución importante en la reabsorción de  $\text{Na}^+$ , incluida la sensible a amilorida (mediada por ENaC), así como en la secreción de  $\text{K}^+$  a través de ROMK (Frindt & Palmer, 2004b; Palmer & Frindt, 2007b). Por ensayos de *patch clamp* en segmentos microdisectados de riñón de rata, se registró una mayor densidad apical y actividad del canal ROMK en CNT en comparación con el CCD (Frindt

& Palmer, 2004a). Asimismo, mediante modelos *knockout* de la subunidad  $\alpha$  de ENaC, específicamente en CD (Rubera et al. 2003) o en CNT/CD (Christensen et al. 2010), se demostró que solo en el primer caso se mantiene el balance de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , incluso cuando los ratones se someten a una ingesta baja en  $\text{Na}^+$  o alta en  $\text{K}^+$ , debido a que se conserva la función de ENaC en CNT, mientras que en el segundo caso, se alteran los niveles plasmáticos de  $\text{Na}^+$  (disminuyen) y  $\text{K}^+$  (aumentan), e incrementa la excreción urinaria de  $\text{Na}^+$ .

La marca inmunofluorescente del canal HCN2 en DCT2/CNT es predominantemente intracelular, lo que sugiere su expresión en algún organelo. Es posible que se encuentre en las mitocondrias, dado el reciente hallazgo de que los canales HCN tienen una localización y función mitocondrial, tanto en riñón (León-Aparicio et al. 2019) como en corazón (Padilla-Flores et al. 2020). De hecho, las células de DCT y CNT presentan un contenido mitocondrial mayor que las células principales del CCD (Kriz & Kaissling, 2013). La presencia del canal HCN2 en mitocondria se podría explorar a través de un marcador específico de dicho organelo en ensayos de inmunofluorescencia. Sin embargo, sería necesario un triple inmunomarcaje (canal, marcador de nefrona y marcador de mitocondria), y lo más probable es que la resolución de la microscopía confocal no sea suficiente para demostrar la colocalización del canal y el marcador mitocondrial. Por lo tanto, sería más contundente hacer un doble inmunomarcaje con partículas de oro para ubicar al canal específicamente en DCT2/CNT, y demostrar su distribución mitocondrial con base en la ultraestructura característica del organelo por microscopía electrónica.

La localización del canal HCN2 en la ASDN sugiere su participación en el transporte de  $\text{Na}^+$ . Sin embargo, su expresión en membrana no es tan clara como su distribución intracelular. Si la hipótesis de su presencia en mitocondria es correcta, el canal HCN2 podría ayudar indirectamente a la reabsorción de  $\text{Na}^+$  a través de su papel mitocondrial relacionado con la síntesis de ATP. Esto debido a que, tanto la reabsorción de  $\text{Na}^+$  como la secreción de  $\text{K}^+$  en las células del CNT y principales del CD, dependen de la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa, la cual mantiene los gradientes electroquímicos favorables para el transporte mediado por los

canales ENaC y ROMK. Acorde con el mayor contenido mitocondrial en CNT respecto a CCD, también se ha demostrado una mayor actividad de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (Palmer & Frindt, 2007a).

### 1.1.2. Canal HCN2 en glomérulos y vasos renales

En los glomérulos, una posibilidad es que el canal HCN2 se encuentre en los capilares glomerulares, dado que también se observa en los grandes vasos renales. Sin embargo, harían falta experimentos de inmunofluorescencia con marcadores de los distintos tipos celulares presentes en el glomérulo, en especial de podocitos, pues éstos recubren a los capilares glomerulares, por lo que su patrón de distribución es muy parecido. En podocitos ya se ha descrito el canal BK (Morton et al. 2004), así como el canal catiónico no selectivo TRPC6 (Reiser et al. 2005). La presencia del canal HCN2, el cual permite la entrada de cationes (corriente despolarizante), podría favorecer la activación del canal BK, ya que éste es sensible a voltaje, y a su vez, la corriente saliente de  $\text{K}^+$  a través de BK u otro canal de  $\text{K}^+$ , retroalimentaría la activación de HCN2 al inducir hiperpolarización.

No se han documentado canales de la familia HCN en células endoteliales o de músculo liso vascular, pero si canales de la familia CNG (*Cyclic nucleotide-gated*) en diversos lechos vasculares, tanto en células endoteliales como de músculo liso vascular (Cheng et al. 2003, Yao et al. 1999). Los canales HCN y CNG están relacionados cercanamente en su secuencia y estructura, son catiónicos no selectivos y se regulan o activan por nucleótidos cíclicos (Yu & Catterall, 2004; Craven & Zagotta, 2006), por lo cual parece factible que un miembro de la familia HCN se exprese en algún tipo celular de la vasculatura.

La presencia del canal HCN2 en células del músculo liso de los vasos renales resulta muy interesante, pues apunta a que el canal podría estar asociado a la regulación del tono vascular renal. Aunque no en la vasculatura, se ha reportado la presencia de canales HCN en células del músculo liso en la vejiga urinaria (músculo detrusor), y su inhibición con ZD7288 aumenta la contractilidad (Mader et al. 2018).

### **1.1.3. Canal HCN2 en células intersticiales**

El intersticio renal se define como el espacio intertubular, extraglomerular y extravascular del riñón; consta de diversos tipos celulares, entre los cuales predominan las células del sistema inmune y los fibroblastos. Éstos últimos comprenden una población celular heterogénea que se asocia a diversas funciones: producción de matriz extracelular para dar soporte estructural a la nefrona, mantenimiento de la integridad vascular (pericitos), síntesis de eritropoyetina y renina, entre otras (Zeisberg & Kalluri, 2015).

La apariencia de las células donde se observa la señal inmunofluorescente del canal HCN2 parece corresponder a la morfología de los fibroblastos, los cuales forman una red con procesos citoplásmicos que se extienden entorno a las células tubulares. Sin embargo, la caracterización de las células del intersticio es compleja debido a la heterogeneidad de los fibroblastos, y a que no existe un marcador exclusivo. La mayoría de los marcadores etiquetan solo un subgrupo de fibroblastos y simultáneamente otro tipo celular, por ejemplo: endotelio (vimentina), sistema inmune (CD73, receptor a PDGF) y músculo liso endotelial ( $\alpha$ -SMA) (Zeisberg & Kalluri, 2015). De cualquier manera, la presencia del canal HCN2 en el intersticio renal abre una nueva línea de investigación, en la cual se podrían plantear otros modelos y técnicas experimentales para elucidar la función de dicho canal en este compartimento.

## **1.2. Canal HCN4**

### **1.2.1. Canal HCN4 en túbulo proximal**

La localización apical del canal HCN4 en el del túbulo proximal (BBM) es similar a la descrita previamente para los canales HCN1 y HCN3 (López-González et al. 2016), por lo que podrían formar heteromultímeros. En este segmento de la nefrona, los canales HCN posiblemente participan en la reabsorción transcelular de  $\text{Na}^+$  y/o el mantenimiento/estabilización del potencial de membrana (i.e. evitar una hiperpolarización excesiva). Además, la entrada apical de  $\text{Na}^+$  podría favorecer la reabsorción transcelular o paracelular de  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{Cl}^-$ . Por otro lado,

la presencia notablemente intracelular de HCN4 en PST sugiere su localización mitocondrial, aunque se tendría que demostrar de manera similar a lo planteado para HCN2.

### **1.2.2. Canal HCN4 en TAL**

La presencia del canal HCN4 en la membrana apical de TAL probablemente se relaciona con su participación en la reabsorción de  $\text{Na}^+$  hacia el intersticio medular, de gran importancia para favorecer el mecanismo de concentración urinaria (Mount & Yu, 2007). HCN4 también podría contribuir a la reabsorción de  $\text{NH}_4^+$  en TAL, particularmente cuando la concentración luminal de dicho catión aumenta, es decir, en condiciones que estimulan la amoniagénesis, como la acidosis metabólica y la deficiencia de  $\text{K}^+$  (Hamm et al. 2015; Tannen, 1977). Al igual que en el túbulo proximal, el canal HCN4 podría ayudar a estabilizar el potencial de membrana en TAL, por ejemplo, para contrarrestar la hiperpolarización mediada por la actividad del canal ROMK.

### **1.2.3. Canal HCN4 en la nefrona distal**

Lo interesante de HCN4 en la ASDN es su localización específica en las células  $\alpha$ -intercaladas, con una distribución preferentemente apical, a diferencia de HCN2, el cual predomina intracelularmente tanto en células principales como  $\alpha$ -intercaladas. HCN4 presenta mayor abundancia en CNT respecto a CCD en condiciones control, similar a HCN2, lo cual sería compatible con su participación en la reabsorción basal de  $\text{Na}^+$ . Desde una perspectiva anatómica, la superficie luminal de CNT es más grande, con aproximadamente cinco CNTs que alimentan a un CD, lo cual implica una mayor capacidad reabsortiva de  $\text{Na}^+$ . Mientras que el CD, en especial CCD y OMCD, tiene un papel complementario, pues junto con el CNT, tienen la capacidad de aumentar la reabsorción de  $\text{Na}^+$  en respuesta a las demandas del organismo (e.g. restricción dietaria de  $\text{Na}^+$ , hipovolemia, hipercalemia).

La localización apical del canal HCN4 en las células  $\alpha$ -intercaladas, lo sitúa como una vía de entrada de  $\text{Na}^+$ ; el transporte de  $\text{NH}_4^+$  a través de HCN4 sería poco probable debido a que el gradiente de dicho catión en la ASDN va hacia el lumen (secreción). Durante mucho tiempo prevaleció la idea de que las células  $\alpha$ -intercaladas se encargan exclusivamente de la

regulación ácido-base, mientras que las células principales se relacionan con la homeostasis de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>. Sin embargo, este paradigma ha cambiado en la última década. Por ejemplo, se demostró la importancia de las células β-intercaladas no solo en la secreción de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, sino también en la reabsorción de Na<sup>+</sup> a través de la acción acoplada de la pendrina y NDCBE (Eladari et al. 2014), así como en la liberación de factores de señalización (e.g. prostaglandina E<sub>2</sub>, ATP) que actúan sobre sus receptores en las células principales (Rao et al. 2019). Lo anterior plantea la multifuncionalidad y complejidad de las células de la nefrona distal, cuya comunicación e interdependencia le permiten lograr la regulación fina del balance electrolítico y ácido-base.

## 2. Regulación por dietas de potasio

Ya que los canales HCN se expresan en más de un segmento de la nefrona, tanto en corteza como en médula externa, no es posible establecer una correlación entre los resultados obtenidos por Western blot y aquéllos de Inmunofluorescencia. No obstante, se pueden plantear hipótesis razonables respecto a las observaciones de los inmunoblots. Una regulación diferente entre regiones (corteza y médula externa), probablemente se debe a que la respuesta corresponde al segmento de la nefrona predominante en cada región renal, como se discutirá a continuación para cada uno de los canales con base en su posible papel fisiológico.

**Tabla 6. Resumen de los inmunoblots de HCN2 y HCN4 en corteza y médula externa**

Canal	Dieta KA		Dieta KD	
	Cx	OM	Cx	OM
<b>HCN2</b>	↓ *	↑ * Glic	↑ T	↑ T
<b>HCN4 95 kDa</b>	↓ *	↑ *	↓ T	↓ T
<b>HCN4 70 kDa</b>	---	↓ *	---	---

↑ Aumento, ↓ Disminución, \* Cambio significativo, --- sin cambio, Cx: corteza, Glic: glicosilación, OM: médula externa, T tendencia.

## **2.1. Inmunoblots del canal HCN2**

### **2.1.1. HCN2 en la dieta KA**

La disminución de la abundancia proteica de HCN2 en la corteza por la dieta KA podría asociarse con la localización del canal en los glomérulos, pues éstos superan tanto en número como en masa a los segmentos distales. Por lo tanto, es factible que el aumento de la inmunofluorescencia de HCN2 en CCD, provocado por la misma dieta, no se refleje en el inmunoblot de corteza al ser enmascarado por una disminución del canal a nivel glomerular. Para confirmarlo, se tendría que realizar un ensayo de Western blot con muestras provenientes del aislamiento o enriquecimiento de glomérulos.

La mayor abundancia del canal HCN2 glicosilado que se observa en el inmunoblot de médula externa (región carente de glomérulos), podría ser compatible con el aumento de la inmunofluorescencia del canal en OMCD por la dieta KA. Se sabe que la N-glicosilación de los canales HCN (sitio localizado entre el bucle de S5 y el poro) promueve su tráfico hacia la membrana plasmática, en particular de la isoforma HCN2 (Much et al. 2003; Hegle et al. 2010). Sin embargo, se desconoce si esta modificación postraduccional favorece la expresión del canal en la membrana interna mitocondrial o tiene algún papel en su heteromerización con otra isoforma HCN en la mitocondria.

### **2.1.2. HCN2 en la dieta KD**

La abundancia proteica del canal HCN2 no muestra cambios significativos en los inmunoblots de corteza y médula externa por la dieta KD, sin embargo, hay una tendencia de aumento en ambos casos. En la corteza, este ligero cambio sería inverso al inducido por la dieta KA (disminución), lo que parece lógico si se asocia a la respuesta del canal en el mismo sitio (glomérulos, que superan a los segmentos distales). Mientras que en la médula externa, la tendencia de regulación a la alta del canal podría relacionarse con su presencia en el intersticio medular, donde se observa un aumento de la marca inmunofluorescente de HCN2 por la dieta KD, y dado que la detección del canal en OMCD es muy escasa.

## 2.2. Inmunoblots del canal HCN4

En términos generales, es importante notar que en condiciones control, el fragmento de HCN4 más abundante en corteza es el de 95 kDa, y en médula externa, el de 70 kDa. La dificultad para observar al canal completo glicosilado en la mayoría de las condiciones probadas, y que la presencia de un cóctel de inhibidores de proteasas en la solución de lisis no evitara su aparición, sugieren que el canal es sustrato de una proteólisis endógena en el tejido renal, seguramente por una razón funcional. Como se mencionó al inicio de la sección, es complicado establecer una interpretación de los cambios debido a la diversidad de segmentos tubulares que contribuyen, y en el caso particular de HCN4, tampoco se conoce el mecanismo de producción de los fragmentos del canal. Si bien, se cree que son resultado de una proteólisis postraduccional, es incierto si son generados por la misma proteasa, al actuar en dos sitios distintos del canal completo, o por proteasas independientes. Dado que hay varias interrogantes por resolver, a continuación solo traté de plantear algunas hipótesis que podrían explicar la regulación observada de los fragmentos de HCN4 en las muestras enriquecidas en mitocondrias.

### **2.2.1. HCN4 en la dieta KA**

En el inmunoblot de corteza se observó una regulación a la baja de HCN4 (banda de ~95 kDa). Es posible que refleje una menor expresión del canal en el túbulo proximal. Lo anterior es congruente con la disminución de la reabsorción de  $\text{Na}^+$  a nivel proximal para favorecer su reabsorción distal a través de ENaC, y así estimular la secreción de  $\text{K}^+$ . Existe evidencia de que la abundancia proteica de NHE3, la vía reabsortiva de  $\text{Na}^+$  más importante en el túbulo proximal, disminuye por la dieta KA (Yang et al. 2017), lo que implicaría una menor actividad de la  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  ATPasa y, en consecuencia, menor requerimiento de ATP. Esto correlacionaría con la disminución de la abundancia del canal HCN4 en las mitocondrias, donde se cree que estos canales favorecen la síntesis de ATP.

La regulación a la alta de HCN4 (banda de ~95 kDa) que se observó en el inmunoblot de médula externa, probablemente se asocia a TAL, dado que este segmento tiene una

contribución importante en masa y número en dicha región renal. De manera interesante, la forma truncada de mayor peso (95 kDa) parece aumentar a expensas de la de menor peso (70 kDa), pues ésta última disminuye simultáneamente. La dieta KA disminuye la reabsorción de  $\text{Na}^+$  en TAL para que llegue mayor cantidad de  $\text{Na}^+$  a la región distal, lo cual es congruente con una menor expresión y fosforilación de NKCC2 (Yang et al. 2017, 2018). Contrario a lo que se esperaría considerando una menor reabsorción de  $\text{Na}^+$ , la actividad de la  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPasa en este segmento aumenta por la dieta KA (Doucet & Katz, 1980), quizá en respuesta a la alta concentración de  $\text{K}^+$  en el espacio extracelular (Therien & Blostein, 2000). Ante una mayor entrada de  $\text{K}^+$  y su consecuente aumento intracelular, es posible que la regulación a la alta de HCN4 en las mitocondrias de TAL favorezca tanto la internalización de  $\text{K}^+$  a la matriz mitocondrial para evitar su acumulación citosólica, como la síntesis de ATP para sustentar la actividad de la bomba.

### 2.2.2. HCN4 en la dieta KD

La dieta KD, al contrario de la dieta KA, promueve una mayor reabsorción de  $\text{Na}^+$  a nivel proximal como mecanismo adaptativo para disminuir la llegada de  $\text{Na}^+$  a los segmentos de la nefrona distal donde ocurre el intercambio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (i.e. CNT y CD), y de esta manera reducir la fuerza electromotriz para la secreción de  $\text{K}^+$ . En línea con esta idea, la abundancia proteica de NHE3 se regula a la alta por la dieta KD (Elkjaer et al. 2002); este intercambiador, además de favorecer la reabsorción de  $\text{Na}^+$ , tendría un papel importante en la secreción de  $\text{NH}_4^+$ , cuya producción (amoniagénesis) en el túbulo proximal se encuentra elevada por la dieta KD (Abu Hossain et al. 2011). Ante un aumento citosólico de los niveles del  $\text{NH}_4^+$ , la tendencia de regulación a la baja del canal HCN4 (banda ~95 kDa) en corteza (donde predomina el túbulo proximal) podría ayudar a limitar la entrada (o regreso) del  $\text{NH}_4^+$  a la mitocondria, considerando que los canales HCN permiten el paso de esta especie iónica (Carrisoza-Gaytán et al. 2011). Asimismo, ya que la deficiencia de  $\text{K}^+$  promueve la salida de  $\text{K}^+$  al espacio extracelular como mecanismo compensatorio, se espera que el  $\text{K}^+$  mitocondrial también se redistribuya. Entonces, sería lógico que las vías de entrada mitocondrial de  $\text{K}^+$ , como podría ser el canal HCN4, se reduzcan.

La tendencia de regulación a la baja de HCN4 (banda ~95 kDa) en la médula externa se podría atribuir a TAL, segmento en el que la dieta KD provoca una menor expresión de NKCC2 (Amlal et al. 1998; Elkjaer et al. 2002). Si la entrada de Na<sup>+</sup> apical a través de este cotransportador disminuye, también la concentración intracelular del catión y la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa. Un menor requerimiento de ATP podría explicar que la abundancia del canal HCN4 mitocondrial tienda a disminuir.

### 2.3. Inmunofluorescencias de los canales HCN2 y HCN4

**Tabla 7. Resumen de la regulación de la inmunofluorescencia de HCN2 y HCN4 en la nefrona distal**

Dieta	Canal	Segmento de la nefrona distal		
		CNT	CCD	OMCD
KA	HCN2	↑ intracelular	↑ intracelular en células principales	
KD	HCN4	--- apical en células α-intercaladas		↑ apical en células α-intercaladas

↑ Aumento, --- sin cambio, CCD: conducto colector de la corteza, CNT: túbulo conector, DCT2: túbulo contorneado distal tardío, OMCD: conducto colector de la médula externa.

#### 2.3.1. Regulación de HCN2 por la dieta KA

La regulación a la alta de la marca inmunofluorescente del canal HCN2 en las células principales de CNT y CCD, donde también se ha reportado un aumento de la inmunofluorescencia apical de ROMK por la dieta KA (Wade et al. 2011), sugiere que HCN2 puede contribuir a la adaptación renal para intensificar la secreción de K<sup>+</sup>, al menos indirectamente. HCN2 es casi imperceptible en OMCD en condiciones control, y el aumento de su inmunofluorescencia por la dieta KA, apunta al mismo papel del canal que en CCD. A pesar de que se desconoce el mecanismo molecular que conduce al aumento de HCN2 en estos segmentos, es muy probable que involucre una señalización mediada por aldosterona. El incremento intracelular del canal HCN2, semejante al aumento que se observa para HCN3 por la misma dieta en las células principales del CCD (López-González et al. 2020), podría relacionarse con su posible localización mitocondrial como se ha mencionado anteriormente.

De hecho, se ha observado un aumento del contenido mitocondrial en las células del CNT y principales del CD por la dieta KA (Kaissling & Le Hir, 1982), asociado al aumento de la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa (Doucet & Katz, 1980; Le Hir et al. 1982).

La localización del canal HCN2 en membrana plasmática es menos evidente que su presencia en compartimentos intracelulares. Sin embargo, no se puede descartar por completo que cierta proporción de los canales alcancen dicha membrana. En las células principales, su presencia en el dominio basolateral podría ayudar a reciclar parte del  $\text{Na}^+$  que está saliendo al intersticio debido a la intensa actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa por la dieta KA. El transporte electrogénico que media la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa (saca 3  $\text{Na}^+$  y mete 2  $\text{K}^+$ ) induce la hiperpolarización de la membrana basolateral (Giebisch, 1998), lo que también favorecería la apertura de los canales HCN2 y la entrada de  $\text{Na}^+$  a través de ellos, devolviendo así parte del  $\text{Na}^+$  reabsorbido en exceso para evitar su retención sistémica. En OMCD, HCN2 podría incluso permitir la entrada de  $\text{K}^+$ , ya que su concentración en el intersticio medular puede alcanzar 35-50 mM en condiciones de KA (Stokes, 1982). La presencia de HCN2 en la membrana apical tendría una función similar a ENaC, es decir, contribuir a la generación del gradiente electroquímico para sustentar la secreción de  $\text{K}^+$ . Se sabe que ENaC es el principal mecanismo de entrada luminal de  $\text{Na}^+$  en la ASDN. Frindt y Palmer (2009) demuestran que la excreción urinaria de  $\text{K}^+$  en condiciones control depende casi por completo de la actividad sensible a amilorida (mediada por ENaC), sin embargo, en ratas sometidas a una dieta KA, una parte de la excreción incrementada de  $\text{K}^+$  es independiente de ENaC, lo cual es compatible con la contribución de otras vías, entre las cuales podría estar el canal HCN2.

Finalmente, es importante discutir respecto a la expresión basolateral de AQP2 por la dieta KA. En condiciones control, AQP2 se ha detectado en regiones basolaterales en CNT e IMCD, pero raramente en CCD (Christensen et al. 2003). Sin embargo, se ha reportado que la dieta KA disminuye los niveles apicales de AQP2 y favorece su tráfico hacia membranas basolaterales en CCD y OMCD, y se ha planteado que es consecuencia de los altos niveles plasmáticos de aldosterona (De Seigneux et al. 2007), aunque el mecanismo molecular es incierto. La expresión de AQP2 en la membrana basolateral tal vez se requiera para regular el

volumen de las células de CNT y principales (CCD/OMCD), frente al aumento de la osmolaridad plasmática e intersticial inducida por la mayor concentración de  $K^+$ . Por otro lado, la disminución de la expresión de AQP2 en la membrana apical limitaría la entrada de agua desde la luz tubular, provocando el aumento del flujo luminal, el cual estimula la secreción de  $K^+$ , no solo al promover la activación de los canales BK (Pluznick & Sansom, 2006; Woda et al. 2001), sino también al arrastrar con mayor rapidez el  $K^+$  secretado y dejando un gradiente químico favorable para la secreción de más  $K^+$ .

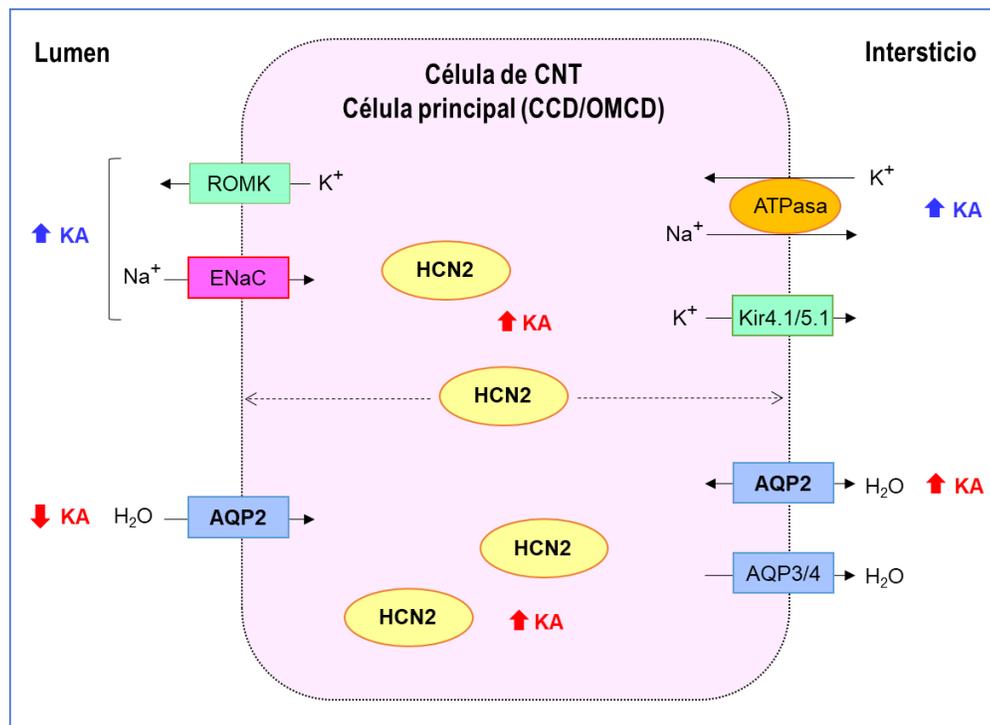


Fig. 23. Diagrama esquemático de la célula de CNT y principal de CCD/OMCD indicando las principales proteínas de transporte y la regulación inducida por una dieta con  $K^+$  alto (KA). En rojo aparecen las observaciones de la presente tesis. El canal HCN2 aumenta su expresión en compartimentos intracelulares, probablemente mitocondrias, y una porción de los canales podría dirigirse a la membrana plasmática (líneas punteadas) para contribuir a la entrada celular de  $Na^+$ . Se propone que HCN2 participa indirectamente en la secreción de  $K^+$ , ya sea por su actividad a nivel mitocondrial (i.e. favorecer la síntesis de ATP y en consecuencia, la función de la  $Na^+/K^+$  ATPasa) o el transporte que media en membrana plasmática. Por otro lado, AQP2 disminuye su expresión en la membrana apical pero aumenta en la membrana basolateral. AQP: Acuaaporina, ENaC: Canal epitelial de  $Na^+$ , Kir: Canal de  $K^+$  rectificador entrante, ROMK: canal de  $K^+$  Kir1.1.

### 2.3.2. Regulación del canal HCN2 por la dieta KD

El aumento de la marca inmunofluorescente de HCN2 en el intersticio medular es un enigma, pues no se conoce específicamente en qué tipo celular intersticial se localiza. De hecho no hay ningún estudio que refiera la presencia de canales iónicos en este compartimento, y mucho menos su función. Por lo tanto, sería un área potencial de investigación.

La disminución de la inmunofluorescencia de AQP2 por la dieta KD es consistente con la regulación a la baja de dicha acuaporina a nivel de transcrito y proteína que se ha reportado (Amlal et al. 2000b, Marples et al. 1996).

### 2.3.3. Regulación del canal HCN4 por la dieta KD

El aumento notable de la inmunofluorescencia de HCN4 en las células  $\alpha$ -intercaladas del OMCD en condiciones KD, sugiere que el canal participa en la reabsorción de  $\text{Na}^+$ , la cual estaría acoplada a la reabsorción de  $\text{HCO}_3^-$ , a su vez dependiente de la secreción de  $\text{H}^+$ . La secreción de  $\text{H}^+$  a través de la V-ATPasa es electrogénica e induce la hiperpolarización de la membrana apical, lo cual favorecería la actividad del canal HCN4.

Esta hipótesis es congruente con la alcalosis metabólica inducida por la deficiencia de  $\text{K}^+$  (Jones et al. 1982), la cual está asociada en parte a: una mayor reabsorción de  $\text{HCO}_3^-$  en la nefrona distal (Capasso et al. 1987), en particular en OMCD (Nakamura et al. 1998b), y un aumento de la excreción urinaria de  $\text{NH}_4^+$  (Abu Hossain et al. 2011, Han et al. 2011). También sería consistente con la amplificación estructural y funcional de las células  $\alpha$ -intercaladas que induce la dieta KD: aumento del número y tamaño celular, así como del área de las membranas luminal y basolateral, particularmente en OMCD (Elger et al. 1992, Iervolino et al. 2020), la mayor expresión apical y actividad de las proteínas específicas relacionadas con la secreción de  $\text{H}^+$ , V-ATPasa (Bailey et al. 1998, Silver et al. 2000) y  $\text{H}^+/\text{K}^+$  ATPasa (Nakamura et al. 1998a, 1998b), y la regulación a la alta de AE1, la vía de salida basolateral de  $\text{HCO}_3^-$  (Barone et al. 2007).

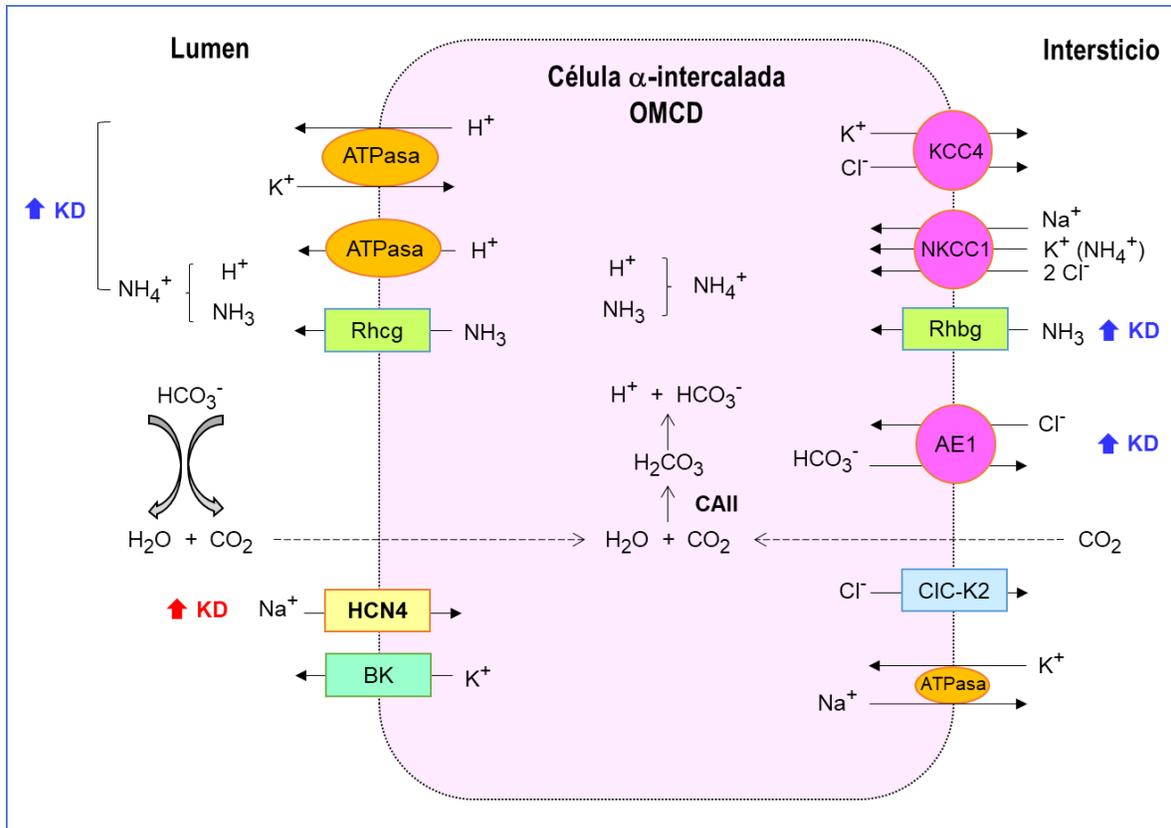


Fig. 24. Diagrama esquemático de la célula  $\alpha$ -intercalada de OMCD indicando las principales proteínas de transporte y la regulación inducida por una dieta deficiente de  $\text{K}^+$  ( $\text{KD}$ ). En este contexto aumenta la excreción urinaria de  $\text{NH}_4^+$  y los mecanismos subyacentes, es decir, la expresión y/o actividad de la  $\text{H}^+$ - $\text{ATPasa}$ ,  $\text{H}^+/\text{K}^+$   $\text{ATPasa}$ ,  $\text{Rhcg}$  y  $\text{Rhbg}$ . En rojo se indica el resultado de la presente tesis, es decir, una mayor expresión apical del canal  $\text{HCN4}$ . La entrada de  $\text{Na}^+$  a través de  $\text{HCN4}$  podría estar acoplada a la reabsorción de  $\text{HCO}_3^-$ , ya que el intercambiador aniónico  $\text{AE1}$ , su vía de salida en la membrana basolateral, también se regula a la alta.  $\text{AE1}$ : Intercambiador aniónico tipo 1,  $\text{BK}$ : Canal de  $\text{K}^+$  regulado por  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{CIC-K2}$ : canal de  $\text{Cl}^-$  renal,  $\text{KCC4}$ : Cotransportador  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  tipo 4,  $\text{NKCC1}$ : Cotransportador  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$  tipo 1,  $\text{Rhbg}/\text{Rhcg}$ : glicoproteínas Rh b/c,  $\text{ROMK}$ : canal de  $\text{K}^+$  Kir1.1.

## SECCIÓN II. Canales HCN en mitocondrias de corazón

### 2.1. Inmunodetección en tejido cardiaco de rata

Se observaron tres de las cuatro isoformas de los canales HCN en las mitocondrias de corazón de rata. El canal  $\text{HCN3}$  se detectó tanto completo ( $\sim 86$  kDa) como truncado en el N-terminal ( $\sim 70$  kDa), similar a las observaciones en el riñón de rata (López-González et al. 2016). Los canales  $\text{HCN2}$  y  $\text{HCN4}$  se inmunodetectaron a un peso molecular aparente distinto al teórico; en ambos casos a menor peso, posiblemente debido a una proteólisis endógena. Para el

canal HCN2 también se observa una banda a mayor peso del reportado para el canal glicosilado (~125 kDa) en cerebro (Zha et al. 2008); curiosamente, la banda a ~125 kDa se detectó solo en el sobrenadante. Esto apunta a que el canal HCN2 mitocondrial presenta modificaciones postraduccionales distintas al que se encuentra en otros compartimentos intracelulares y/o en membrana plasmática.

Debido a que el potencial de la membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) es muy negativo, probablemente los mecanismos regulatorios que favorecen el desplazamiento del voltaje de activación de los canales HCN hacia valores más positivos (e.g. unión de AMPc al CNBD), no sean necesarios o relevantes en este contexto. Entonces, se espera que las formas truncadas en el C-terminal (~70 kDa) para HCN2 y HCN4 que se detectaron en el inmunoblot y carecen del CNBD, tengan un papel funcional en la mitocondria.

Existen antecedentes de otros canales de  $K^+$  mitocondriales que se han detectado a menor peso molecular del esperado; por ejemplo, la subunidad  $\alpha$  del canal  $BK_{Ca}$  se observó a 55 y 80 kDa en preparaciones mitocondriales de corazón e hígado, respectivamente (Xu et al. 2002).

## **2.2. Ensayos de función mitocondrial en cardiomiocitos**

### **2.2.1 Efecto del ZD7288 sobre el potencial de membrana mitocondrial**

Con base en el efecto hiperpolarizante del ZD7288 sobre el potencial de membrana mitocondrial (30 y 60 min) de los cardiomiocitos (células H9c2), se cree que los canales HCN localizados en la mitocondria permiten la entrada de  $K^+$  a la matriz en favor de su gradiente electroquímico. La ligera despolarización inducida por el ZD7288 a los 10 min podría deberse a un efecto inespecífico del inhibidor y/o a una respuesta mitocondrial compensatoria.

Se espera que la entrada del  $K^+$  tenga un ligero efecto desacoplante al promover la fuga de  $H^+$ , pues es necesario 'gastar' parte la fuerza protón-motriz ( $\Delta p$ ) para sacar al  $K^+$  a través del intercambiador  $K^+/H^+$  en el llamado ciclo del  $K^+$  (Garlid & Paucek, 2003; O'Rourke, 2004). Aunque pareciera un proceso fútil, la presencia de canales de  $K^+$  mitocondriales extendida en

diferentes organismos apoya que este desacoplamiento moderado cumple una función adaptativa e importante, posiblemente como parte de los mecanismos regulatorios de OXPHOS y el balance energético celular (Laskowski et al. 2016).

El bombeo de  $H^+$  por la cadena respiratoria mantiene un  $\Delta\Psi_m$  alrededor de -180 mV (Leanza et al. 2015). Considerando que este valor es muy negativo y que el determinante principal de la apertura de los canales HCN es la hiperpolarización, se asume que los canales están abiertos y contribuyen a la entrada basal de  $K^+$ . Por el contrario, otros canales de  $K^+$  identificados en las mitocondrias cardiacas ( $K_{ATP}$ ,  $BK_{Ca}$ ,  $SK_{Ca}$ ,  $Kv7.4$ ,  $K_{Na1.2}$ ) dependen de mecanismos de activación específicos (ATP bajo,  $Ca^{2+}$ , despolarización,  $Na^+$ ), favorecidos solo en cierto contexto fisiológico y/o patológico. Una entrada basal de  $K^+$ , probablemente se requiere para mantener la concentración de  $K^+$  en la matriz mitocondrial, importante para regular el volumen mitocondrial (Garlid & Paucek, 2003), que a su vez afecta la oxidación de ácidos grasos, la cadena respiratoria y la síntesis de ATP (Harlestrap, 1989). La expresión de los canales HCN en la mitocondria podría contribuir a estabilizar el  $\Delta\Psi_m$  al evitar una hiperpolarización excesiva. Además, ya que el  $\Delta\Psi_m$  es un parámetro determinante de la producción de ROS (Brookes, 2005), los canales HCN mitocondriales también podrían estar involucrados en la regulación de los niveles de ROS y su señalización celular.

Un aspecto importante que diferencia a los canales HCN de otros, es que su conductancia es de las más pequeñas conocidas, lo cual es compatible con que estén abiertos en condiciones basales; además, son regulables por diversos mecanismos, entre ellos el pH (Stevens et al. 2001; Zong et al. 2001), factor de gran relevancia en la mitocondria. Asimismo, los parámetros biofísicos obtenidos de los registros de *patch clamp* en mitoplastos de cardiomiocitos, sugieren que los canales HCN forman heteromultímeros (Padilla-Flores et al. 2020), lo cual amplía su diversidad funcional.

### **2.2.2. Efecto del ZD7288 sobre los parámetros respiratorios**

El abatimiento de la respiración basal tras 30 min de la adición de ZD7288 al cultivo de cardiomiocitos indica que los canales HCN están abiertos en condiciones normales y su

actividad está relacionada con la función normal de la cadena respiratoria y por ende, el consumo de  $O_2$ . Hay una tendencia de disminución de la respiración debida a la fuga en el mismo tiempo (30 min), la cual se podría deber a que el bloqueo de la entrada de  $K^+$  a través de los canales HCN implica una menor compensación mediada por el intercambiador  $K^+/H^+$ . Resalta que el consumo de  $O_2$  asociado a OXPHOS cae significativamente desde los 10 min y disminuye aún más a los 30 min, lo cual sugiere que el transporte catiónico mediado por los canales HCN está vinculado de alguna manera a la síntesis de ATP. Se cree que permiten principalmente la entrada de  $K^+$ , debido al gradiente electroquímico, pero no se descarta la posibilidad de que los canales HCN también contribuyan a la entrada de  $Na^+$  e incluso de  $Ca^{2+}$ . Se ha reportado que las isoformas HCN2 y HCN4 permiten el flujo de  $Ca^{2+}$  (Michels et al. 2008; Yu et al. 2004, 2007)

El papel de las mitocondrias es particularmente importante para la función adecuada de un órgano de alta demanda energética como el corazón. Se ha documentado que la ivabradina tiene efectos cardioprotectores independientes de la reducción de la frecuencia cardiaca en modelos experimentales de isquemia/reperfusión en cerdo y ratón (Heusch et al. 2008, Kleinbongard et al. 2015). En estos estudios se observó que la ivabradina disminuía el tamaño de la zona infartada y los niveles de ROS, tanto al administrarse antes de inducir el evento isquémico como durante la reperfusión. Dichos efectos se conservaron incluso tras contrarrestar la reducción de la frecuencia cardiaca a través de la estimulación auricular, lo que les permitió a los autores concluir que eran independientes de la acción de la ivabradina sobre la corriente  $I_f$  de SAN, y por ende, de la frecuencia cardíaca. Asimismo, intuyeron que los canales HCN en tejido ventricular podían estar involucrados, e incluso el hecho de que la ivabradina afectara ROS, les condujo a plantear la posible expresión de los canales HCN en mitocondria.

El efecto cardioprotector de la activación de canales de  $K^+$  mitocondriales (e.g.  $mitoK_{ATP}$ ,  $mitoBK_{Ca}$ ) contrasta con el efecto benéfico de bloquear a los canales HCN con ivabradina. Quizá esto se relacione con el contexto en el cual se ha demostrado que la apertura farmacológica de  $mitoK_{ATP}$  y  $mitoBK_{Ca}$  resulta útil, es decir, en condiciones de isquemia/

reperfusión. En dicho escenario, se alteran las concentraciones intracelulares de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  (Murphy & Eisner, 2009; Testai et al. 2014). Los canales HCN, al no ser selectivos y ante el aumento intracelular de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  en condiciones de isquemia, podrían contribuir a la entrada de dichos cationes. Por el contrario, la activación de canales selectivos a  $\text{K}^+$ , al permitir una mayor entrada exclusivamente de  $\text{K}^+$  e inducir la despolarización del  $\Delta\Psi_m$ , se espera que reduzca el gradiente eléctrico para la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Holmuhamedov et al. 1999). La atenuación de la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial evitaría la transición de la permeabilidad mitocondrial y liberación del citocromo *c* (Korge et al. 2002). Por lo tanto, el efecto benéfico de la ivabradina en un contexto similar, probablemente se debe al bloqueo de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria a través de los canales HCN. Adicionalmente, la reducción de ROS por el bloqueo de los canales HCN en un modelo de isquemia/reperfusión (Heusch et al. 2008, Kleinbongard et al. 2015) sugiere que éstos podrían estar involucrados con la producción excesiva de ROS en un contexto patológico cardiovascular.

---

## CONCLUSIONES

---

- ◆ El canal HCN2 se inmunolocalizó en el túbulo conector (CNT), conducto colector de la corteza (CCD) y médula externa (OMCD), así como en otras estructuras del riñón de rata: glomérulos, vasos y células intersticiales.
- ◆ El canal HCN4 se inmunolocalizó en el túbulo proximal, asa gruesa ascendente del asa de Henle, y células  $\alpha$ -intercaladas de la nefrona distal (CNT, CCD, OMCD).
- ◆ La abundancia proteica de los canales HCN2 y HCN4 en muestras enriquecidas en mitocondrias se reguló diferencialmente por las dietas alta y baja en  $K^+$ , tanto en corteza como médula externa renal.
- ◆ La dieta alta en  $K^+$  aumentó la inmunofluorescencia intracelular del canal HCN2 en CNT, así como en las células principales de CCD y OMCD, lo cual podría contribuir indirectamente a la secreción de  $K^+$  en la nefrona distal.
- ◆ La deficiencia de  $K^+$  intensificó la inmunofluorescencia apical del canal HCN4 en las células  $\alpha$ -intercaladas de OMCD, probablemente asociado a una mayor reabsorción distal de  $Na^+$ .
- ◆ Los canales HCN2, HCN3 y HCN4 se expresaron en su forma proteolizada en mitocondrias de corazón de rata.
- ◆ La adición de un bloqueador de los canales HCN (ZD7288) a un cultivo de cardiomiocitos hiperpolarizó el potencial de membrana mitocondrial.
- ◆ La inhibición de los canales HCN con ZD7822 en cardiomiocitos disminuyó el índice de control respiratorio y el consumo de oxígeno asociado a la fosforilación oxidativa.

---

## REFERENCIAS

---

Abu Hossain S, Chaudhry FA, Zahedi K, Siddiqui F, Amlal H (2011) Cellular and molecular basis of increased ammoniogenesis in potassium deprivation. *Am J Physiol Renal Physiol* 301, F969-F978.

Adam WR, Koretsky AP, Weiner MW (1986)  $^{31}\text{P}$ -NMR in vivo measurement of renal intracellular pH: effects of acidosis and  $\text{K}^+$  depletion in rats. *Am J Physiol* 251, F904-F910.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2008) Molecular biology of the cell, 5th ed. Garland Science, Taylor & Francis Group, New York. p. 651-694.

Alexander SP, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Sharman JL, Catterall WA, Spedding M, Peters JA, Harmar AJ; CGTP Collaborators (2013) The Concise Guide to Pharmacology 2013/14: ion channels. *Br J Pharmacol* 170, 1607-1651.

Alexander SPH, Mathie A, Peters JA, Veale EL, Striessnig J, Kelly E, Armstrong JF, Faccenda E, Harding SD, Pawson AJ, Sharman JL, Southan C, Davies JA; CGTP Collaborators (2019) The Concise Guide to Pharmacology 2019/20: Ion channels. *Br J Pharmacol* 176 Suppl 1, S142-S228.

Ando K, Matsui H, Fujita M, Fujita T (2010) Protective effect of dietary potassium against cardiovascular damage in salt-sensitive hypertension: possible role of its antioxidant action. *Curr Vasc Pharmacol* 8, 59-63.

Angelova PR, Abramov AY (2016) Functional role of mitochondrial reactive oxygen species in physiology. *Free Radic Biol Med* 100, 81-85.

Amlal H, Habo K, Soleimani M (2000a) Potassium deprivation upregulates expression of renal basolateral  $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$  cotransporter (NBC-1). *Am J Physiol Renal Physiol* 279, F532-F543.

Amlal H, Krane CM, Chen Q, Soleimani M (2000b) Early polyuria and urinary concentrating defect in potassium deprivation. *Am J Physiol Renal Physiol* 279, F655-F663.

Amlal H, Wang Z, Soleimani M (1998) Potassium depletion downregulates chloride-absorbing transporters in rat kidney. *J Clin Invest* 101, 1045-1054.

Appel LJ, Moore TJ, Obarzanek E, Vollmer WM, Svetkey LP, Sacks FM, Bray GA, Vogt TM, Cutler JA, Windhauser MM, Lin PH, Karanja N (1997) A clinical trial of the effects of dietary

patterns on blood pressure. DASH Collaborative Research Group. *N Engl J Med* 336, 1117-1124.

Aronson PS, Giebisch G (2011) Effects of pH on potassium: new explanations for old observations. *J Am Soc Nephrol* 22, 1981-1989.

Arroyo JP, Ronzaud C, Lagnaz D, Staub O, Gamba G (2011) Aldosterone paradox: differential regulation of ion transport in distal nephron. *Physiology (Bethesda)* 26, 115-123.

Babilonia E, Wei Y, Sterling H, Kamiski P, Wolin M, Wang WH (2005) Superoxide anions are involved in mediating the effect of low K intake on c-Src expression and renal K secretion in the cortical collecting ducts. *J Biol Chem* 280, 10790-10796.

Babilonia E, Lin D, Zhang Y, Wei Y, Yue P, Wang WH (2007) Role of gp91<sup>phox</sup>-containing NADPH oxidase in mediating the effect of K restriction on ROMK channels and renal K excretion. *J Am Soc Nephrol* 18, 2037-2045.

Bailey MA, Cantone A, Yan Q, MacGregor GG, Leng Q, Amorim JBO, Wang T, Hebert SC, Giebisch G, Malnic (2006) Maxi-K channels contribute to urinary potassium excretion in the ROMK-deficient mouse model of type II Bartter's syndrome and in adaptation to a high-K diet. *Kidney Int* 70, 51-59.

Bailey MA, Fletcher RM, Woodrow DF, Unwin RJ, Walter SJ (1998) Upregulation of H<sup>+</sup>-ATPase in the distal nephron during potassium depletion: structural and functional evidence. *Am J Physiol Renal Physiol* 275, F878-F884.

Barone S, Amlal H, Kujala M, Xu J, Karet F, Blanchard A, Kere J, Soleimani M (2007) Regulation of the basolateral chloride/base exchangers AE1 and SLC26A7 in the kidney collecting duct in potassium depletion. *Nephrol Dial Transplant* 22, 3462-3470.

Baruscotti M, Bucchi A, DiFrancesco D (2005) Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker ("funny") current. *Pharmacol Ther* 107, 59-79.

Baskin DG, Stahl WL (1982) Immunocytochemical localization of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in the rat kidney. *Histochemistry* 73, 535-548.

Berl T, Linas SL, Aisenbrey GA, Anderson RJ (1977) On the mechanism of polyuria in potassium depletion. *J Clin Invest* 60, 620-625.

Biel M, Wahl-Schott C, Michalakakis S, Zong X (2009) Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiol Rev* 89, 847-885.

Bishop JM, Lee H-W, Handlogten ME, Han K-W, Verlander JW, Weiner ID (2013) Intercalated cell-specific Rh B glycoprotein deletion diminishes renal ammonia excretion response to hypokalemia. *Am J Physiol Renal Physiol* 304, F422-F431.

Bolívar JJ, Tapia D, Arenas G, Castañón-Arreola M, Torres H, Galarraga E (2008) 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* 294, C893-906.

Borer JS, Fox K, Jaillon P, Lerebours G; Ivabradine Investigators Group (2003) Antianginal and antiischemic effects of ivabradine, an  $I_f$  inhibitor, in stable angina: a randomized, double-blind, multicentered, placebo-controlled trial. *Circulation* 107, 817-823.

Boros S, Bindels RJ, Hoenderop JG (2009) Active  $Ca^{2+}$  reabsorption in the connecting tubule. *Pflugers Arch* 458, 99-109.

Bourgeois S, Meer LV, Wootla B, Bloch-Faure M, Chambrey R, Shull GE, Gawenis LR, Houillier P (2010) NHE4 is critical for the renal handling of ammonia in rodents. *J Clin Invest* 120, 1895-1904.

Brandis M, Keyes J, Windhager EE (1992) Potassium-induced inhibition of proximal tubular fluid reabsorption in rats. *Am J Physiol* 222, 421-427.

Brandt MC, Endres-Becker J, Zagidullin N, Motloch LJ, Er F, Rottlaender D, Michels G, Herzig S, Hoppe UC (2009) Effects of KCNE2 on HCN isoforms: distinct modulation of membrane expression and single channel properties. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297, H355-H363.

Brookes PS (2005) Mitochondrial  $H^+$  leak and ROS generation: an odd couple. *Free Radic Biol Med* 38, 12-23.

Brown DA, Perry JB, Allen ME, Sabbah HN, Stauffer BL, Shaikh SR, Cleland JG, Colucci WS, Butler J, Voors AA, Anker SD, Pitt B, Pieske B, Filippatos G, Greene SJ, Gheorghide M (2017) Expert consensus document: Mitochondrial function as a therapeutic target in heart failure. *Nat Rev Cardiol* 14, 238-250.

Capasso G, Jaeger P, Giebisch G, Guckian V, Malnic G (1987) Renal bicarbonate reabsorption in the rat. II. Distal tubule load dependence and effect of hypokalemia. *J Clin Invest* 80, 409-414.

Cadenas S (2018) Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1859, 940-950.

Calderone V, Testai L, Martelli A, Rapposelli S, Digiacomo M, Balsamo A, Breschi MC (2010) Anti-ischemic properties of a new spiro-cyclic benzopyran activator of the cardiac mito-KATP channel. *Biochem Pharmacol* 79, 39-47.

Carrisoza-Gaytán R, Rangel C, Salvador C, Saldaña-Meyer R, Escalona C, Satlin LM, Liu W, Zavilowitz B, Trujillo J, Bobadilla NA, Escobar LI (2011) The hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated HCN2 channel transports ammonium in the distal nephron. *Kidney Int* 80, 832-840.

Carrisoza-Gaytán R, Salvador C, Satlin LM, Liu W, Zavilowitz B, Bobadilla NA, Trujillo J, Escobar LI (2010) Potassium secretion by voltage-gated potassium channel Kv1.3 in the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 299, F255-F264.

Castro H, Raj L. Potassium in hypertension and cardiovascular disease. *Semin Nephrol* 33, 277-289.

Chandel NS (2014) Mitochondria as signaling organelles. *BMC Biol* 12, 34.

Checchetto V, Azzolini M, Peruzzo R, Capitanio P, Leanza L (2018) Mitochondrial potassium channels in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 500, 51-58.

Cheng KT, Chan FL, Huang Y, Chan WY, Yao X (2003) Expression of olfactory-type cyclic nucleotide-gated channel (CNGA2) in vascular tissues. *Histochem Cell Biol* 120, 475-481.

Cheng CJ, Kuo E, Huang CL (2013) Extracellular potassium homeostasis: insights from hypokalemic periodic paralysis. *Semin Nephrol* 33, 237-247.

Chistiakov DA, Shkurat TP, Melnichenko AA, Grechko AV, Orekhov AN (2018) The role of mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease: a brief review. *Ann Med* 50, 121-127.

Christensen BM, Wang W, Frøkiaer J, Nielsen S (2003) Axial heterogeneity in basolateral AQP2 localization in rat kidney: effect of vasopressin. *Am J Physiol Renal Physiol* 284, F701-F717.

Christensen BM, Perrier R, Wang Q, Zuber AM, Maillard M, Mordasini D, Malsure S, Ronzaud C, Stehle JC, Rossier BC, Hummler E (2010) Sodium and potassium balance depends on  $\alpha$ ENaC expression in connecting tubule. *J Am Soc Nephrol* 21, 1942-1951.

Chu PY, Quigley R, Babich V, Huang CL (2003) Dietary potassium restriction stimulates endocytosis of ROMK channel in rat cortical collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 286, F1179-F1187.

Clase CM, Carrero JJ, Ellison DH, Grams ME, Hemmelgarn BR, Jardine MJ, Kovesdy CP, Kline GA, Lindner G, Obrador GT, Palmer BF, Cheung M, Wheeler DC, Winkelmayer WC, Pecoits-Filho R; Conference Participants (2020) Potassium homeostasis and management of dyskalemia in kidney diseases: conclusions from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney Int* 97, 42-61.

Cotton CU (2000) Basolateral potassium channels and epithelial ion transport. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23, 270-272.

Craven KB, Zagotta WN (2006) CNG and HCN channels: two peas, one pod. *Annu Rev Physiol* 68, 375-401.

Curthoys NP, Moe OW. Proximal tubule function and response to acidosis (2014) *Clin J Am Soc Nephrol* 9, 1627-1638.

De Seigneux S, Nielsen J, Olesen ETB, Dimke H, Kwon TH, Frøkiaer J, Nielsen S (2007) Long-term aldosterone treatment induces decreased apical but increased basolateral expression of AQP2 in CCD of rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 293, F87-F99.

Deka S, Borah P, Bania R, Das S, Deb PK (2020) Pharmacology of Potassium Channels. In Kumar P, Deb PK (eds) *Frontiers in Pharmacology of Neurotransmitters*. Springer, Singapore. p. 635-681.

DiFrancesco D (2006) Funny channels in the control of cardiac rhythm and mode of action of selective blockers. *Pharmacol Res* 53, 399-406.

DiFrancesco D, Borer JS (2007) The funny current: cellular basis for the control of heart rate. *Drugs* 67 Suppl 2, 15-24.

DiFrancesco D, Camm JA (2004) Heart rate lowering by specific and selective  $I_f$  current inhibition with ivabradine: a new therapeutic perspective in cardiovascular disease. *Drugs* 64, 1757-1765.

Divakaruni AS, Brand MD (2011) The regulation and physiology of mitochondrial proton leak. *Physiology (Bethesda)* 26, 192-205.

Doucet A, Katz AI (1980) Renal potassium adaptation: Na-K-ATPase activity along the nephron after chronic potassium loading. *Am J Physiol* 238, F380-F386.

DuBose TD Jr, Good DW (1992) Chronic hyperkalemia impairs ammonium transport and accumulation in the inner medulla of the rat. *J Clin Invest* 90, 1443-1449.

Eiam-Ong S, Kurtzman NA, Sabatini S. Regulation of collecting tubule adenosine triphosphatases by aldosterone and potassium. *J Clin Invest* 1993, 2385-2392.

Eladari D, Chambrey R, Picard N, Hadchouel J (2014) Electroneutral absorption of NaCl by the aldosterone-sensitive distal nephron: implication for normal electrolytes homeostasis and blood pressure regulation. *Cell Mol Life Sci* 71, 2879-2895.

Elger M, Bankir L, Kriz W (1992) Morphometric analysis of kidney hypertrophy in rats after chronic potassium depletion. *Am J Physiol* 262, F656-F667.

El-Kholy W, MacDonald PE, Fox JM, Bhattacharjee A, Xue T, Gao X, Zhang Y, Stieber J, Li RA, Tsushima RG, Wheeler MB (2007) Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels in pancreatic beta-cells. *Mol Endocrinol* 21, 753-764.

Elkjær M-L, Kwon T-H, Wang W, Nielsen J, Knepper MA, Frokiær J, Nielsen S (2002) Altered expression of renal NHE3, TSC, BSC-1, and ENaC subunits in potassium-depleted rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 283, F1376-F1388.

Ewart HS, Klip A (1995) Hormonal regulation of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. *Am J Physiol* 269, C295-C311.

Facundo HT, de Paula JG, Kowaltowski AJ (2005) Mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels prevent oxidative stress, permeability transition and cell death. *J Bioenerg Biomembr* 37, 75-82.

Férraille E, Doucet A (2001) Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. *Physiol Rev* 81, 345-418.

Fik-Kolodziej B, Pourcho RG (2007) Differential distribution of hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated channels in cone bipolar cells of the rat retina. *J Comp Neurol* 501, 891-903.

Foster DB, Ho AS, Rucker J, Garlid AO, Chen L, Sidor A, Garlid KD, O'Rourke B (2012) Mitochondrial ROMK channel is a molecular component of mitoK(ATP). *Circ Res* 111, 446-454.

Fox SI (2013) *Fisiología Humana*, 13<sup>a</sup> ed. McGraw-Hill Interamericana, México. p. 581-590.

Fox K, Ford I, Steg PG, Tardif JC, Tendera M, Ferrari R; SIGNIFY Investigators (2014). Ivabradine in stable coronary artery disease without clinical heart failure. *N Engl J Med* 371, 1091-1099.

Fox K, Ford I, Steg PG, Tendera M, Ferrari R; BEAUTIFUL Investigators (2008) Ivabradine for patients with stable coronary artery disease and left-ventricular systolic dysfunction (BEAUTIFUL): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 372, 807-816.

Frindt G, Palmer LG (2004a) Apical potassium channels in the rat connecting tubule. *Am J Physiol* 287, F1030–F1037.

Frindt G, Palmer LG (2004b). Na channels in the rat connecting tubule. *Am J Physiol* 286, F669–F674.

Frindt G, Palmer LG (2009) K<sup>+</sup> secretion in rat kidney: Na<sup>+</sup>-channel dependent and independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol* 297, F389-F396.

Frindt G, Palmer LG (2010) Effects of dietary K on cell-surface expression of renal ion channels and transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 299, F890-F897.

Frindt G, Shah A, Edvinsson J, Palmer LG (2009) Dietary K regulates ROMK channels in connecting tubule and cortical collecting duct of rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 296: F347-F354.

Garg LC, Narang N (1989) Suppression of ouabain-insensitive K-ATPase activity in rabbit nephron segments during chronic hyperkalemia. *Ren Physiol Biochem* 12, 295-301.

Garlid KD, Dos Santos P, Xie ZJ, Costa AD, Paucek P (2003) Mitochondrial potassium transport: the role of the mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in cardiac function and cardioprotection. *Biochim Biophys Acta* 1606, 1-21.

Garlid KD, Paucek P (2003) Mitochondrial potassium transport: the K<sup>+</sup> cycle. *Biochim Biophys Acta*. 1606, 23-41.

Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray HN, Darbenzio RB, D'Alonzo AJ, Lodge NJ, Smith MA, Grover GJ (1997) Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res* 81, 1072-1082.

Gennari FJ (1998) Hypokalemia. *N Engl J Med* 339, 451-458.

Gennari FJ (2002) Disorders of potassium homeostasis. Hypokalemia and hyperkalemia. *Crit Care Clin* 18, 273-288.

Giacomello M, Pyakurel A, Glytsou C, Scorrano L (2020) The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 204-224.

Giebisch G (1998) Renal potassium transport: mechanisms and regulation. *Am J Physiol* 274, F817-F833.

Giebisch G, Wang W (2000) Renal tubule potassium channels: function, regulation and structure. *Acta Physiol Scand* 170, 153-73.

Goel M, Sinkins WG, Zuo CD, Hopfer U, Schilling WP (2007) Vasopressin-induced membrane trafficking of TRPC3 and AQP2 channels in cells of the rat renal collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 293, F1476-F1488.

Good DW (1988) Active absorption of  $\text{NH}_4^+$  by rat medullary thick ascending limb: inhibition by potassium. *Am J Physiol*. 255, F78-F87.

Gumz ML, Lynch IJ, Greenlee MM, Cain BD, Wingo CS (2010) The renal  $\text{H}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPases: physiology, regulation and structure. *Am J Physiol Renal Physiol* 298, F12-F21.

Gutsche HU, Peterson LN, Levine DZ (1984) In vivo evidence of impaired solute transport by the thick ascending limb in potassium-depleted rats. *J Clin Invest* 73, 908-916.

Haddy FJ, Vanhoutte PM, Feletou M (2006) Role of potassium in regulating blood flow and blood pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290, R546-R552.

Halestrap AP (1989) The regulation of the matrix volume of mammalian mitochondria in vivo and in vitro and its role in the control of mitochondrial metabolism. *Biochim Biophys Acta* 973, 355-382.

Hamilton KL, Devor DC (2012) Basolateral membrane  $\text{K}^+$  channels in renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 302, F1069-F1081.

Hamm LL, Nakhoul N, Hering-Smith KS (2015) Acid-Base Homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol* 10, 2232-2242.

Hamm LL, Nakhoul NL (2007) Renal acidification. In Brenner BM (ed) Brenner and Rector's The Kidney, 8th ed. Saunders, Philadelphia. p. 248-279.

Han KH, Lee HW, Handlogten ME, Bishop JM, Levi M, Kim J, Verlander JW, Weiner ID (2011) Effect of hypokalemia on renal expression of the ammonia transporter family members, Rh B glycoprotein and Rh C glycoprotein, in the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 301, F823-F832.

Harzheim D, Pfeiffer KH, Fabritz L, Kremmer E, Buch T, Waisman A, Kirchhof P, Kaupp UB, Seifert R (2008) Cardiac pacemaker function of HCN4 channels in mice is confined to embryonic development and requires cyclic AMP. *EMBO J* 27, 692–703.

Harris AN, Grimm PR, Lee HW, Delpire E, Fang L, Verlander JW, Welling PA, Weiner ID (2018) Mechanism of Hyperkalemia-Induced Metabolic Acidosis. *J Am Soc Nephrol* 29, 1411-1425.

He C, Chen F, Li B, Hu Z (2014) Neurophysiology of HCN channels: from cellular functions to multiple regulations. *Prog Neurobiol* 112, 1-23.

He FJ, MacGregor GA (2001) Fortnightly review: Beneficial effects of potassium. *BMJ* 323, 497-501.

He P, Deng J, Zhong X, Zhou Z, Song B, Li L (2012) Identification of a hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel and its subtypes in the urinary bladder of the rat. *Urology* 79, 1411.e7-1411.e13.

Hebert SC, Desir G, Giebisch G, Wang WH (2005) Molecular diversity and regulation of renal potassium channels. *Physiol Rev* 85, 319-371.

Hebert SC, Mount DB, Gamba G (2004) Molecular physiology of cation-coupled Cl<sup>-</sup> cotransport: the SLC12 family. *Pflugers Arch* 447, 580–593.

Hegle AP, Nazzari H, Roth A, Angoli D, Accili EA (2010) Evolutionary emergence of N-glycosylation as a variable promoter of HCN channel surface expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 298, C1066-C1076.

Heusch G, Skyschally A, Gres P, van Caster P, Schilawa D, Schulz R (2008) Improvement of regional myocardial blood flow and function and reduction of infarct size with ivabradine: protection beyond heart rate reduction. *Eur Heart J* 29, 2265-2275.

Herrmann S, Layh B, Ludwig A (2011) Novel insights into the distribution of cardiac HCN channels: an expression study in the mouse heart. *J Mol Cell Cardiol* 51, 997-1006.

Hickish T, Farmery AD (2012) Acid–base physiology: new concepts. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* 13, 567-572.

Holmuhamedov EL, Wang L, Terzic A (1999) ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel openers prevent Ca<sup>2+</sup> overload in rat cardiac mitochondria. *J Physiol* 519 Pt 2, 347-360.

Holtzclaw JD, Grimm PR, Sansom SC (2010) Intercalated cell BK- $\alpha/\beta$ 4 channels modulate sodium and potassium handling during potassium adaptation. *J Am Soc Nephrol* 21, 634-645.

Hoorn EJ, Gritter M, Cuevas CA, Fenton RA (2020) Regulation of the renal NaCl cotransporter and its role in potassium homeostasis. *Physiol Rev* 100, 321-356.

Houston MC. The importance of potassium in managing hypertension (2011) *Curr Hypertens Rep* 13, 309-317.

Kaczmarek LK, Aldrich RW, Chandy KG, Grissmer S, Wei AD, Wulff H (2017) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. C. Nomenclature and Properties of Calcium-Activated and Sodium-Activated Potassium Channels. *Pharmacol Rev* 69, 1-11.

Iervolino A, Prosperi F, De La Motte LR, Petrillo F, Spagnuolo M, D'Acierno M, Siccardi S, Perna AF, Christensen BM, Frische S, Capasso G, Trepiccione F (2020) Potassium depletion induces cellular conversion in the outer medullary collecting duct altering Notch signaling pathway. *Sci Rep* 10, 5708.

Ingwall JS (2009) Energy metabolism in heart failure and remodelling. *Cardiovasc Res* 81, 412-419.

Jackson HA, Marshall CR, Accili EA (2007) Evolution and structural diversification of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel genes. *Physiol Genomics* 29, 231-245.

Jones JW, Sebastian A, Hulter HN, Schambelan M, Sutton JM, Biglieri EG (1982) Systemic and renal acid-base effects of chronic dietary potassium depletion in humans. *Kidney Int* 21, 402-410.

Kahle KT, Wilson FH, Leng Q, Lalioti MD, O'Connell AD, Dong K, Rapson AK, MacGregor GG, Giebisch G, Hebert SC, Lifton RP (2003) WNK4 regulates the balance between renal NaCl reabsorption and K<sup>+</sup> secretion. *Nat Genet* 35, 372-376.

Kaissling B, Le Hir M (1982) Distal tubular segments of the rabbit kidney after adaptation to altered Na- and K-intake. I. Structural changes. *Cell Tissue Res* 224, 469-92.

Karet FE (2009) Mechanisms in hyperkalemic renal tubular acidosis. *J Am Soc Nephrol* 20, 251-254.

Katz AI, Doucet A, Morel F (1979) Na-K-ATPase activity along the rabbit, rat, and mouse nephron. *Am J Physiol* 237, F114-F120.

Kinne R, Kinne-Saffran E, Schütz H, Schölermann B (1986) Ammonium transport in medullary thick ascending limb of rabbit kidney: involvement of the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>-cotransporter. *J Membr Biol* 94, 279-284.

Kleinbongard P, Gedik N, Witting P, Freedman B, Klöcker N, Heusch G (2015) Pleiotropic, heart rate-independent cardioprotection by ivabradine. *Br J Pharmacol* 172, 4380-4390.

Koeppen BM, Stanton BA (2013) *Renal Physiology*, 5th ed. Mosby, Elsevier.

Korge P, Honda HM, Weiss JN (2002) Protection of cardiac mitochondria by diazoxide and protein kinase C: implications for ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 3312-3317.

Koruth JS, Lala A, Pinney S, Reddy VY, Dukkipati SR (2017) The Clinical Use of Ivabradine. *J Am Coll Cardiol* 70, 1777-1784.

Kriz W, Bankir L (1988) A standard nomenclature for structures of the kidney. The Renal Commission of the International Union of Physiological Sciences (IUPS). *Kidney Int* 33,1-7.

Kriz W, Kaissling B (2013) Structural organization of the mammalian kidney. In Alpern RJ, Moe OW, Caplan M (eds) *Seldin and Giebish's The Kidney Physiology & Pathophysiology*, 5th ed. Academic Press, Elsevier. p. 595-691.

Lampl T, Crum JA, Davis TA, Milligan C, Del Gaizo Moore V (2015) Isolation and functional analysis of mitochondria from cultured cells and mouse tissue. *J Vis Exp* 97, e52076.

Laskowski M, Augustynek B, Kulawiak B, Koprowski P, Bednarczyk P, Jarmuszkiewicz W, Szewczyk A (2016) What do we not know about mitochondrial potassium channels? *Biochim Biophys Acta* 1857, 1247-1257.

Laskowski M, Augustynek B, Bednarczyk P, Żochowska M, Kalisz J, O'Rourke B, Szewczyk A, Kulawiak B (2019) Single-Channel Properties of the ROMK-Pore-Forming Subunit of the Mitochondrial ATP-Sensitive Potassium Channel. *Int J Mol Sci* 20, 5323.

Leanza L, Venturini E, Kadow S, Carpinteiro A, Gulbins E, Becker KA (2015) Targeting a mitochondrial potassium channel to fight cancer. *Cell Calcium* 58, 131-138.

Le Hir M, Kaissling B, Dubach UC (1982) Distal tubular segments of the rabbit kidney after adaptation to altered Na- and K-intake. II. Changes in Na-K-ATPase activity. *Cell Tissue Res* 224, 493-504.

Lee HW, Verlander JW, Bishop JM, Handlogten ME, Han KH, Weiner ID (2013) Renal ammonia excretion in response to hypokalemia: effect of collecting duct-specific Rh C glycoprotein deletion. *Am J Physiol Renal Physiol* 304, F410-F421.

León-Aparicio D, Salvador C, Aparicio-Trejo OE, Briones-Herrera A, Pedraza-Chaverri J, Vaca L, Sampieri A, Padilla-Flores T, López-González Z, León-Contreras JC, Hernández-Pando R, Escobar LI (2019) Novel potassium channels in kidney mitochondria: the hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated HCN channels. *Int J Mol Sci* 20, 4995.

Leviel F, Hübner CA, Houillier P, Morla L, El Moghrabi S, Brideau G, Hatim H, Parker MD, Kurth I, Kougioumtzes A, Sinning A, Pech V, Riemondy KA, Miller RL, Hummler E, Shull GE, Aronson PS, Doucet A, Wall SM, Chambrey R, Eladari D (2010) The Na<sup>+</sup>-dependent chloride-bicarbonate exchanger SLC4A8 mediates an electroneutral Na<sup>+</sup> reabsorption process in the renal cortical collecting ducts of mice. *J Clin Invest* 120, 1627–1635.

Li C-H, Zhang Q, Teng B, Mustafa SJ, Huang JY, Yu HG (2008) Src tyrosine kinase alters gating of hyperpolarization-activated HCN4 pacemaker channel through Tyr<sup>531</sup>. *Am J Physiol Cell Physiol* 294, C355-C362.

Lin DH, Sterling H, Lerea KM, Welling P, Jin L, Giebisch G, Wang WH (2002) K depletion increases protein tyrosine kinase-mediated phosphorylation of ROMK. *Am J Physiol Renal Physiol* 283, F671-F677.

Linás SL, Peterson LN, Anderson RJ, Aisenbrey GA, Simon FR, Berl T (1979) Mechanism of renal potassium conservation in the rat. *Kidney Int* 15, 601-611.

Loffing J, Zecevic M, Féraille E, Kaissling B, Asher C, Rossier BC, Firestone GL, Pearce D, Verrey F (2001) Aldosterone induces rapid apical translocation of ENaC in early portion of renal collecting system: possible role of SGK. *Am J Physiol Renal Physiol* 280, F675-F682.

Loffing J, Kaissling B (2003) Sodium and calcium transport pathways along the mammalian distal nephron: from rabbit to human. *Am J Physiol Renal Physiol* 284, F628-F643.

Loffing J, Korbmacher C (2009) Regulated sodium transport in the renal connecting tubule (CNT) via the epithelial sodium channel (ENaC). *Pflugers Arch* 458, 111-135.

Loffing J, Kaissling B (2003) Sodium and calcium transport pathways along the mammalian distal nephron: from rabbit to human. *Am J Physiol Renal Physiol* 284, F628-F643.

López-González Z, Ayala-Aguilera C, Martínez-Morales F, Galicia-Cruz O, Salvador-Hernández C, Pedraza-Chaverri J, Medeiros M, Hernández AM, Escobar LI (2016) 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.

López-González Z, Padilla-Flores T, León-Aparicio D, Gutiérrez-Vásquez E, Salvador C, León-Contreras JC, Hernández-Pando R, Escobar LI (2020) Metabolic acidosis and hyperkalemia differentially regulate cation HCN3 channel in the rat nephron. *J Mol Histol* 51, 701-716.

Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F, Biel M (1998) A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* 393, 587-591.

Ludwig A, Zong X, Stieber J, Hullin R, Hofmann F, Biel M (1999) Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *EMBO J* 18, 2323-2329.

Mader F, Müller S, Krause L, Springer A, Kernig K, Protzel C, Porath K, Rackow S, Wittstock T, Frank M, Hakenberg OW, Köhling R, Kirschstein T (2018) Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Non-selective (HCN) Ion Channels Regulate Human and Murine Urinary Bladder Contractility. *Front Physiol* 9, 753.

Madsen KM, Nielsen S, Tisher CC (2007) Anatomy of the kidney. In: Brenner BM (ed) Brenner and Rector's The Kidney, 8th ed. Saunders, Philadelphia. p. 25-90.

Malnic G, Giebisch G, Muto S, Wang W, Bailey MA, Satlin LM (2013) Regulation of K<sup>+</sup> excretion. In Alpern RJ, Moe OW, Caplan M (eds) Seldin and Giebisch's The Kidney Physiology & Pathophysiology, 5th ed. Academic Press, Elsevier. p. 1659-1715.

Marples D, Frøkiær J, Dørup J, Knepper MA, Nielsen Søren (1996) Hypokalemia-induced downregulation of aquaporin-2 water channel expression in rat kidney medulla and cortex. *J Clin Invest* 97, 1960-1968.

Marples D, Knepper MA, Christensen EI, Nielsen S (1995) Redistribution of aquaporin-2 water channels induced by vasopressin in rat kidney inner medullary collecting duct. *Am J Physiol Cell Physiol* 269, C655 –C664.

Matlin KS, Caplan MJ (2013) Epithelial cell structure and polarity. In Alpern RJ, Moe OW, Caplan M (eds) Seldin and Giebisch's The Kidney Physiology & Pathophysiology, 5th ed. Academic Press, Elsevier, 2013. p. 3-43.

McCormick JA, Mount DB, Ellison DH (2020) Transport of sodium, chloride, and potassium. In: Brenner BM (ed) Brenner and Rector's The Kidney, 11th ed. Elsevier, Philadelphia. p. 156-198.

Meneton P, Loffing J, Warnock DG (2004) Sodium and potassium handling by the aldosterone-sensitive distal nephron: the pivotal role of the distal and connecting tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 287, F593-F601.

Mennitt PA, Frindt G, Silver RB, Palmer LG (2000) Potassium restriction downregulates ROMK expression in rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 278, 916-924.

Michael J, Sircar S (2012) Fisiología Humana. Ed. El Manual Moderno, México. p. 353-362.

Michels G, Brandt MC, Zagidullin N, Khan IF, Larbig R, van Aaken S, Wippermann J, Hoppe UC (2008) Direct evidence for calcium conductance of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels and human native  $I_f$  at physiological calcium concentrations *Cardiovasc Res* 78, 466-475.

Mitchell P (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144-148.

Monteggia LM, Eisch AJ, Tang MD, Kaczmarek LK, Nestler EJ (2000) Cloning and localization of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel family in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 81, 129-139.

Moosmang S, Biel M, Hofmann F, Ludwig A (1999) Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain. *Biol Chem* 380, 975-980.

Morton MJ, Hutchinson K, Mathieson PW, Witherden IR, Saleem MA, Hunter M (2004) Human podocytes possess a stretch-sensitive,  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel: potential implications for the control of glomerular filtration. *J Am Soc Nephrol* 15, 2981-2987.

Mount DB (2014) Thick ascending limb of the loop of Henle. *Clin J Am Soc Nephrol* 9, 1974-1986.

Mount DB, Zandi-Nejad K (2007) Disorders of potassium balance. In: Brenner BM (ed) Brenner and Rector's The kidney, 8th ed. Saunders, Philadelphia. p. 547-587.

Mount DB, Yu AS (2007) Transport of inorganic solutes: sodium, potassium, calcium, magnesium, and phosphate. In: Brenner BM (ed) Brenner and Rector's The kidney, 8th ed. Saunders, Philadelphia. p. 156-213.

Much B, Wahl-Schott C, Zong X, Schneider A, Baumann L, Moosmang S, Ludwig A, Biel M (2003) Role of subunit heteromerization and N-linked glycosylation in the formation of

functional hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *J Biol Chem* 278, 43781-43786.

Müller F, Scholten A, Ivanova E, Haverkamp S, Kremmer E, Kaupp UB (2003) HCN channels are expressed differentially in retinal bipolar cells and concentrated at synaptic terminals. *Eur J Neurosci* 17, 2084–2096.

Murphy E, Eisner DA (2009) Regulation of intracellular and mitochondrial sodium in health and disease. *Circ Res* 104, 292-303.

Murphy MP, Hartley RC (2018) Mitochondria as a therapeutic target for common pathologies. *Nat Rev Drug Discov* 17, 865-886.

Nagami GT (1990) Effect of bath and luminal potassium concentration on ammonia production and secretion by mouse proximal tubules perfused in vitro. *J Clin Invest* 86, 32-39.

Najjar F, Zhou H, Morimoto T, Bruns JB, Li HS, Liu W, Kleyman TR, Satlin LM (2005) Dietary K<sup>+</sup> regulates apical membrane expression of maxi-K channels in rabbit cortical collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 289:F922–F932.

Nakamura S, Amlal H, Galla JH, Soleimani M (1998a) Colonic H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase is induced and mediates increased HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> reabsorption in inner medullary collecting duct in potassium depletion. *Kidney Int* 54, 1233-1239.

Nakamura S, Wang Z, Galla JH, Soleimani M (1998b) K<sup>+</sup> depletion increases HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> reabsorption in OMCD by activation of colonic H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase. *Am J Physiol* 274, F687-92.

Neupert W, Herrmann JM (2007) Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem* 76, 723-749.

Nielsen S, Frøkiaer J, Marples D, Kwon TH, Agre P, Knepper MA (2002) Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. *Physiol Rev* 82, 205-244.

Nomura N, Shoda W, Uchida S (2019) Clinical importance of potassium intake and molecular mechanism of potassium regulation. *Clin Exp Nephrol* 23, 1175-1180.

Notomi T, Shigemoto R (2004) Immunohistochemical localization of I<sub>h</sub> channel subunits, HCN1-4, in the rat brain. *J Comp Neurol* 471, 241-276.

Nunnari J, Suomalainen A (2012) Mitochondria: in sickness and in health. *Cell* 148, 1145-1159.

Obradovic M, Stanimirovic J, Panic A, Zaric B, Isenovic ER (2018) Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. In: Choi S (ed) Encyclopedia of Signaling Molecules. Springer, Cham. p. 3338-3343.

O'Grady SM. Ion Transport: Potassium Channels. In Reference Module in Biomedical Sciences, Elsevier, 2020. p. 1-9.

O'Rourke B (2004) Evidence for mitochondrial K<sup>+</sup> channels and their role in cardioprotection. *Circ Res* 94, 420-432.

Padilla-Flores T, López-González Z, Vaca L, Aparicio-Trejo OE, Briones-Herrera A, Riveros-Rosas H, Pedraza-Chaverri J, León-Aparicio D, Salvador C, Sampieri A, Escobar LI (2020) "Funny" channels in cardiac mitochondria modulate membrane potential and oxygen consumption. *Biochem Biophys Res Commun* 524, 1030-1036.

Palmer BF (2004) Managing hyperkalemia caused by inhibitors of the renin-angiotensin-aldosterone system. *N Engl J Med* 351, 585-592.

Palmer BF (2010) A physiologic-based approach to the evaluation of a patient with hyperkalemia. *Am J Kidney Dis* 56, 387-393.

Palmer BF (2015) Regulation of potassium homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol* 10, 1050-1060.

Palmer BF, Clegg DJ (2016a) Achieving the benefits of a high-potassium, paleolithic diet, without the toxicity. *Mayo Clin Proc* 91, 496-508.

Palmer BF, Clegg DJ (2016b) Physiology and pathophysiology of potassium homeostasis. *Adv Physiol Educ* 40, 480-490.

Palmer BF, Clegg DJ (2019) Physiology and pathophysiology of potassium homeostasis: core curriculum 2019. *Am J Kidney Dis* 74, 682-695.

Palmer LG, Frindt G (2007a) High-conductance K channels in intercalated cells of the rat distal nephron. *Am J Physiol Renal Physiol* 292, F966-F973.

Palmer LG, Frindt G (2007b) Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transport by the renal connecting tubule. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 16, 477-483.

Paucek P, Mironova G, Mahdi F, Beavis AD, Woldegiorgis G, Garlid KD (1992) Reconstitution and partial purification of the glibenclamide-sensitive, ATP-dependent K<sup>+</sup> channel from rat liver and beef heart mitochondria. *J Biol Chem* 267, 26062-26069.

Penton D, Czogalla J, Loffing J (2015) Dietary potassium and the renal control of salt balance and blood pressure. *Pflugers Arch* 467, 513-530.

Pluznick JL, Sansom SC (2006) BK channels in the kidney: role in K<sup>+</sup> secretion and localization of molecular components. *Am J Physiol Renal Physiol* 291, F517-F529.

Piala AT, Moon TM, Akella R, He H, Cobb MH, Goldsmith EJ (2014) Chloride sensing by WNK1 involves inhibition of autophosphorylation. *Sci Signal* 7, ra41.

Pirici D, Mogoanta L, Kumar-Singh S, Pirici I, Margaritescu C, Simionescu C, Stanescu R (2009) Antibody elution method for multiple immunohistochemistry on primary antibodies raised in the same species and of the same subtype. *J Histochem Cytochem* 57, 567-575.

Postea O, Biel M (2011) Exploring HCN channels as novel drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 10, 903-914.

Rao R, Bhalla V, Pastor-Soler NM (2019) Intercalated cells of the kidney collecting duct in Kidney Physiology. *Semin Nephrol* 39, 353-367.

Reeves WB, Andreoli TE (2008) Sodium chloride transport in the loop of Henle, distal convoluted tubule and collecting duct. In Alpern RJ, Hebert SC (eds) *Seldin and Giebish's The Kidney Physiology and Pathophysiology*, 4th ed. Academic Press, Elsevier. p. 849-887.

Reiser J, Polu KR, Möller CC, Kenlan P, Altintas MM, Wei C, Faul C, Herbert S, Villegas I, Avila-Casado C, McGee M, Sugimoto H, Brown D, Kalluri R, Mundel P, Smith PL, Clapham DE, Pollak MR (2005) TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat Genet* 37, 739-744.

Rector FC Jr, Bloomer HA, Seldin DW (1964) Effect of potassium deficiency on the reabsorption of bicarbonate in the proximal tubule of the rat kidney. *J Clin Invest* 43, 1976-1982.

Rengarajan S, Lee DH, Oh YT, Delpire E, Youn JH, McDonough AA (2014) Increasing plasma [K<sup>+</sup>] by intravenous potassium infusion reduces NCC phosphorylation and drives kaliuresis and natriuresis. *Am J Physiol Renal Physiol* 306, F1059-F1068.

Ring AM, Leng Q, Rinehart J, Wilson FH, Kahle KT, Hebert SC, Lifton RP (2007) An SGK1 site in WNK4 regulates Na<sup>+</sup> channel and K<sup>+</sup> channel activity and has implications for aldosterone signaling and K<sup>+</sup> homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 4025-4029.

Robinson RB, Siegelbaum SA (2003) Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function. *Annu Rev Physiol* 65, 453-480.

Rubera I, Loffing J, Palmer LG, Frindt G, Fowler-Jaeger N, Sauter D, Carroll T, McMahon A, Hummler E, Rossier BC (2003) Collecting duct-specific gene inactivation of  $\alpha$ ENaC in the mouse kidney does not impair sodium and potassium balance. *J Clin Invest* 112, 554-565.

Sabolić I, Herak-Kramberger CM, Breton S, Brown D (1999) Na/K-ATPase in intercalated cells along the rat nephron revealed by antigen retrieval. *J Am Soc Nephrol* 10, 913-922

Sachs AN, Pisitkun T, Hoffert JD, Yu MJ, Knepper MA (2008) LC-MS/MS analysis of differential centrifugation fractions from native inner medullary collecting duct of rat. *Am J Physiol Renal Physiol* 295, F1799-F1806.

Sahni V, Gmurczyk A, Rosa RM (2013) Extrarenal potassium metabolism. In Alpern RJ, Moe OW, Caplan M (eds) Seldin and Giebish's *The Kidney Physiology & Pathophysiology*, 5th ed. Academic Press, Elsevier. p. 1629-1657.

Satlin LM (2009) Potassium. In: Avner ED, Harmon WE, Niaudet P, Yoshikawa N (eds) *Pediatric Nephrology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p. 185-204.

Santoro B, Liu DT, Yao H, Bartsch D, Kandel ER, Siegelbaum SA, Tibbs GR (1998) Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell* 93, 717-729.

Santoro B, Chen S, Luthi A, Pavlidis P, Shumyatsky GP, Tibbs GR, Siegelbaum SA (2000) Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS. *J Neurosci* 20, 5264-5275.

Sebastián D, Palacín M, Zorzano A (2017) Mitochondrial Dynamics: Coupling Mitochondrial Fitness with Healthy Aging. *Trends Mol Med* 23, 201-215.

Seifert R, Scholten A, Gauss R, Mincheva A, Lichter P, Kaupp UB (1999) Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9391-9396.

Sena LA, Chandel NS (2012) Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell* 48, 158-167.

Shi W, Wymore R, Yu H, Wu J, Wymore RT, Pan Z, Robinson RB, Dixon JE, McKinnon D, Cohen IS (1999) Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues. *Circ Res* 85: e1–e6.

Shieh CC, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M (2000) Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev* 52, 557-594.

Shieh CC, Gopalakrishnan M (2008) Potassium Channels. In Offermanns S, Rosenthal W (eds) *Encyclopedia of Molecular Pharmacology*. Springer, Berlin, Heidelberg. p. 990-997.

Shoda W, Nomura N, Ando F, Mori Y, Mori T, Sohara E, Rai T, Uchida S (2017) Calcineurin inhibitors block sodium-chloride cotransporter dephosphorylation in response to high potassium intake. *Kidney Int* 91, 402-411.

Silva P, Hayslett JP, Epstein FH (1973) The role of Na-K-activated adenosine triphosphatase in potassium adaptation. Stimulation of enzymatic activity by potassium loading. *J Clin Invest* 52, 2665-2671.

Silver RB, Breton S, Brown (2000) Potassium depletion increases proton pump (H<sup>+</sup>-ATPase) activity in intercalated cells of cortical collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 297, F195-F202.

Smith CO, Wang YT, Nadtochiy SM, Miller JH, Jonas EA, Dirksen RT, Nehrke K, Brookes PS (2018) Cardiac metabolic effects of K<sub>Na</sub>1.2 channel deletion and evidence for its mitochondrial localization. *FASEB J* 32, 6135-6149.

Smith RA, Hartley RC, Cochemé HM, Murphy MP (2012) Mitochondrial pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 33, 341-352.

Soleimani M, Bergman JA, Hosford MA, McKinney TD (1990) Potassium depletion increases luminal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange and basolateral Na<sup>+</sup>:CO<sub>2</sub>:HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransport in rat renal cortex. *J Clin Invest* 86, 1076-1083.

Sorensen MV, Grossmann S, Roesinger M, Gresko N, Todkar AP, Barmettler G, Ziegler U, Odermatt A, Loffing-Cueni, Loffing J (2013) Rapid dephosphorylation of the renal sodium chloride cotransporter in response to oral potassium intake in mice. *Kidney Int* 83, 811-824.

Spät A. Glomerulosa cell--a unique sensor of extracellular K<sup>+</sup> concentration. *Mol Cell Endocrinol*. 2004;217(1-2):23-26.

Staub O, Loffing J (2013) Mineralocorticoid action in the aldosterone sensitive distal nephron. In Alpern RJ, Moe OW, Caplan M (eds) Seldin and Giebish's The Kidney Physiology & Pathophysiology, 5th ed. Academic Press, Elsevier. p. 1181-1211.

Stevens DR, Seifert R, Bufe B, Müller F, Kremmer E, Gauss R, Meyerhof W, Kaupp UB, Lindemann B (2001) Hyperpolarization-activated channels HCN1 and HCN4 mediate responses to sour stimuli. *Nature* 2001, 413, 631-635.

Stowe DF, Gadicherla AK, Zhou Y, Aldakkak M, Cheng Q, Kwok WM, Jiang MT, Heisner JS, Yang M, & Camara AK (2013) Protection against cardiac injury by small Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channels identified in guinea pig cardiac inner mitochondrial membrane. *Biochim Biophys Acta* 1828, 427-442.

Stokes JB (1982) Consequences of potassium recycling in the renal medulla. Effects of ion transport by the medullary thick ascending limb of Henle's loop. *J Clin Invest* 70, 219-229.

Strober W (2015) Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol* 111, A3.B.1-A3.B.3.

Su Y, Al-Lamki RS, Blake-Palmer KG, Best A, Golder ZJ, Zhou A, Karet Frankl FE (2015) Physical and functional links between anion exchanger-1 and sodium pump. *J Am Soc Nephrol* 26, 400-409.

Subramanya AR, Ellison DH (2012) Distal convoluted tubule. *Clin J Am Soc Nephrol* 9, 2147-2163.

Swedberg K, Komajda M, Böhm M, Borer JS, Ford I, Dubost-Brama A, Lerebours G, Tavazzi L; SHIFT Investigators (2010) Ivabradine and outcomes in chronic heart failure (SHIFT): a randomised placebo-controlled study. *Lancet* 376, 875-885.

Sweeney G, Klip A (1998) Regulation of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase by insulin: why and how? *Mol Cell Biochem* 182, 121-133.

Szewczyk A, Bednarczyk P, Jędraszko J, Kampa, RP, Koprowski P, Krajewska M, Kucman S, Kulawiak B, Laskowski M, Rotko D, Sęk, A, Walewska A, Żochowska M, Wrzosek A (2018) Mitochondrial potassium channels - an overview. *Postepy Biochem* 64, 196-212.

Taegtmeyer H. Energy metabolism of the heart: from basic concepts to clinical applications (1994) *Curr Probl Cardiol* 19, 59-113.

Takada T, Yamamoto A, Omori K, Tashiro Y (1992) Quantitative immunogold localization of Na, K-ATPase along rat nephron. *Histochemistry* 98, 183-197.

Tannen RL (1970) The effect of uncomplicated potassium depletion on urine acidification. *J Clin Invest* 49, 813-827.

Tannen RL (1977) Relationship of renal ammonia production and potassium homeostasis. *Kidney Int* 11, 453-465.

Tannen RL, Wedell E, Moore R (1973) Renal adaptation to a high potassium intake. The role of hydrogen ion. *J Clin Invest* 52, 2089-2101.

Tardif JC, Ford I, Tendera M, Bourassa MG, Fox K; INITIATIVE Investigators (2005) Efficacy of ivabradine, a new selective I(f) inhibitor, compared with atenolol in patients with chronic stable angina. *Eur Heart J* 26, 2529-2536.

Terker AS, Zhang C, McCormick JA, Lazelle RA, Zhang C, Meermeier NP, Siler DA, Park HJ, Fu, Y, Cohen DM, Weinstein AM, Wang WH, Yang CL, Ellison DH (2015) Potassium modulates electrolyte balance and blood pressure through effects on distal cell voltage and chloride. *Cell Metab* 21, 39-50.

Terker AS, Zhang C, Erspamer KJ, Gamba G, Yang CL, Ellison DH (2016) Unique chloride-sensing properties of WNK4 permit the distal nephron to modulate potassium homeostasis. *Kidney Int* 89, 127-134.

Testai L, Barrese V, Soldovieri MV, Ambrosino P, Martelli A, Vinciguerra I, Miceli F, Greenwood IA, Curtis MJ, Breschi MC, Sisalli MJ, Scorziello A, Canduela MJ, Grandes P, Calderone V, Tagliatalata M (2016) Expression and function of Kv7.4 channels in rat cardiac mitochondria: possible targets for cardioprotection. *Cardiovasc Res* 110, 40-50.

Testai L, Rapposelli S, Martelli A, Breschi MC, Calderone V (2015) Mitochondrial potassium channels as pharmacological target for cardioprotective drugs. *Med Res Rev* 35, 520-553.

Therien AG, Blostein R (2000) Mechanisms of sodium pump regulation. *Am J Physiol Cell Physiol* 279, C541-C566.

Thomas W, McEaney, Harvey BJ (2008) Aldosterone-induced signalling and cation transport in the distal nephron. *Steroids* 73, 979-984.

Unwin R, Capasso G, Giebisch G (1994) Potassium and sodium transport along the loop of Henle: effects of altered dietary potassium intake. *Kidney Int* 46, 1092-1099.

Unwin RJ, Luft FC, Shirley DG (2011) Pathophysiology and management of hypokalemia: a clinical perspective. *Nat Rev Nephrol* 7, 75-84.

Vallon V, Schroth J, Lang F, Kuhl D, Uchida S (2009) Expression and phosphorylation of the Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter NCC in vivo is regulated by dietary salt, potassium and SGK1. *Am J Physiol Renal Physiol* 297, F704-F712.

van der Lubbe N, Moes AD, Rosenbaek LL, Schoep S, Meima ME, Danser AH, Fenton RA, Zietse R, Hoorn, EJ (2013) K<sup>+</sup>-induced natriuresis is preserved during Na<sup>+</sup> depletion and accompanied by inhibition of the Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol* 305, F1177-F1188.

Verrey F, Loffing J, Zecevic M, Heitzmann D, Staub O (2003) SGK1: aldosterone-induced relay of Na<sup>+</sup> transport regulation in distal kidney nephron cells. *Cell Physiol Biochem* 13, 21-28.

Vilaine JP (2006) The discovery of the selective I<sub>f</sub> current inhibitor ivabradine. A new therapeutic approach to ischemic heart disease. *Pharmacol Res* 53, 424-434.

Wade JB, Fang L, Coleman RA, Liu J, Grimm PR, Wang T, Welling PA (2011) Differential regulation of ROMK (Kir1.1) in distal nephron segments by dietary potassium. *Am J Physiol Renal Physiol* 300, F1385-F1393.

Wade JB, Liu J, Coleman R, Grimm PR, Delpire E, Welling PA (2015) SPAK-mediated NCC regulation in response to low-K<sup>+</sup> diet. *Am J Physiol Renal Physiol* 308, F923-F931.

Wahl-Schott C, Biel M (2009) HCN channels: structure, cellular regulation and physiological function. *Cell Mol Life Sci* 66, 470-494.

Wai T, Langer T (2016) Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol Metab* 27, 105-117.

Wald H, Garty H, Palmer LG, Popovtzer MM (1998) Differential regulation of ROMK expression in kidney cortex and medulla by aldosterone and potassium. *Am J Physiol* 275, F239-F245.

Wang MX, Cuevas CA, Su XT, Wu P, Gao ZX, Lin DH, McCormick JA, Yang CL, Wang WH, Ellison DH (2018) Potassium intake modulates the thiazide-sensitive sodium-chloride cotransporter (NCC) activity via the Kir4.1 potassium channel. *Kidney Int* 93, 893-902.

Wang ZJ, Sun P, Xing W, Pan C, Lin DH, Wang WH (2010) Decrease in dietary K intake stimulates the generation of superoxide anions in the kidney and inhibits secretory channels in the CCD. *Am J Physiol Renal Physiol* 298, F1515-22.

Wang WH, Giebisch G (2009) Regulation of potassium (K) handling in the renal collecting duct. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 458, 157-168.

Wei Y, Zamilowicz B, Satlin LM, Wang WH (2007) Angiotensin II inhibits the ROMK-like small conductance K channel in renal cortical collecting duct during dietary potassium restriction. *J Biol Chem* 282, 6455-6462.

Weiner ID, Hamm LL (2007) Molecular mechanisms of renal ammonia transport. *Annu Rev Physiol* 69, 317-340.

Weiner ID, Verlander JW (2011) Role of NH<sub>3</sub> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> transporters in renal acid-base transport. *Am J Physiol Renal Physiol* 300, F11-F23.

Weiner ID, Verlander JW (2014) Ammonia transport in the kidney by Rhesus glycoproteins. *Am J Physiol Renal Physiol* 306, F1107-F1120.

Weiner ID, Verlander JW (2020) In: Brenner BM (ed) Brenner and Rector's The Kidney, 11th ed. Elsevier, Philadelphia. p. 247-273.

Weiner ID, Verlander JW (2017) Ammonia transporters and their role in acid-base balance. *Physiol Rev* 97, 465-494.

Welling PA (2013) Regulation of renal potassium secretion: molecular mechanisms. *Semin Nephrol* 33, 215-228.

Whitaker RM, Corum D, Beeson CC, Schnellmann RG (2016) Mitochondrial biogenesis as a pharmacological target: a new approach to acute and chronic diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 56, 229-249.

World Health Organization (WHO). *Guideline: Potassium intake for adults and children*. Geneva, WHO, 2012.

Woda CB, Bragin A, Kleyman TR, and Satlin LM (2001) Flow-dependent K<sup>+</sup> secretion in the cortical collecting duct is mediated by a maxi-K channel. *Am J Physiol Renal Physiol* 280, F786-F793.

Xu W, Liu Y, Wang S, McDonald T, Van Eyk JE, Sidor A, O'Rourke B (2002) Cytoprotective role of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in the cardiac inner mitochondrial membrane. *Science* 298, 1029-1033.

Yang L, Frindt G, Lang F, Kuhl D, Vallon V, Palmer LG (2017) SGK1-dependent ENaC processing and trafficking in mice with high dietary K intake and elevated aldosterone. *Am J Physiol Renal Physiol* 312, F65-F76.

Yang L, Xu S, Guo X, Uchida S, Weinstein AM, Wang T, Palmer LG (2018) Regulation of renal Na transporters in response to dietary K. *Am J Physiol Renal Physiol* 315, F1032-F1041.

Yao X, Leung PS, Kwan HY, Wong TP, Fong MW (1999) Rod-type cyclic nucleotide-gated cation channel is expressed in vascular endothelium and vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 41, 282-290.

Ye B, Balijepalli RC, Foell JD, Kroboth S, Ye Q, Luo YH, Shi NQ (2008) Caveolin-3 associates with and affects the function of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel. *Biochemistry* 47, 12312-12318.

Yeh J, Kim BS, Gaines L, Peresie J, Page C, Arroyo A (2008) 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.

Yoo D, Kim BY, Campo C, Nance L, King A, Maouyo D, Welling PA (2003) Cell surface expression of the ROMK (Kir 1.1) channel is regulated by the aldosterone-induced kinase, SGK-1, and protein kinase A. *J Biol Chem* 278, 23066-23075.

Youn JH (2013) Gut sensing of potassium intake and its role in potassium homeostasis. *Semin Nephrol* 33, 248-256.

Youn JH, McDonough (2009) Recent advances in understanding integrative control of potassium homeostasis. *Annu Rev Physiol* 71, 381-401.

Yu FH, Catterall WA (2004) The VGL-channome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Sci STKE* 2004(253), re15.

Yu X, Chen XW, Zhou P, Yao L, Liu T, Zhang B, Li Y, Zheng H, Zheng LH, Zhang CX, Bruce I, Ge JB, Wang SQ, Hu ZA, Yu HG, Zhou Z (2007) Calcium influx through  $I_f$  channels in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C1147-C1155.

Yu X, Duan KL, Shang CF, Yu HG, Zhou Z (2004) Calcium influx through hyperpolarization-activated cation channels ( $I_h$  channels) contributes to activity-evoked neuronal secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1051-1056.

Zeisberg M, Kalluri R (2015) Physiology of the Renal Interstitium. *Clin J Am Soc Nephrol* 10, 1831-1840.

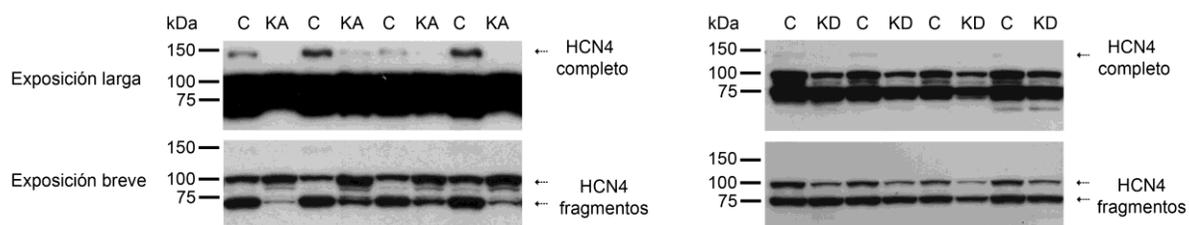
Zha Q, Brewster AL, Richichi C, Bender RA, Baram TZ (2008) Activity-dependent heteromerization of the hyperpolarization-activated, cyclic-nucleotide gated (HCN) channels: role of N-linked glycosylation. *J Neurochem* 105, 68-77.

Zhang Q, Huang A, Yen-Chang Lin YC, Yu HG (2009) Associated changes in HCN2 and HCN4 transcripts and  $I_f$  pacemaker current in myocytes. *Biochim Biophys Acta* 1788, 1138-1147.

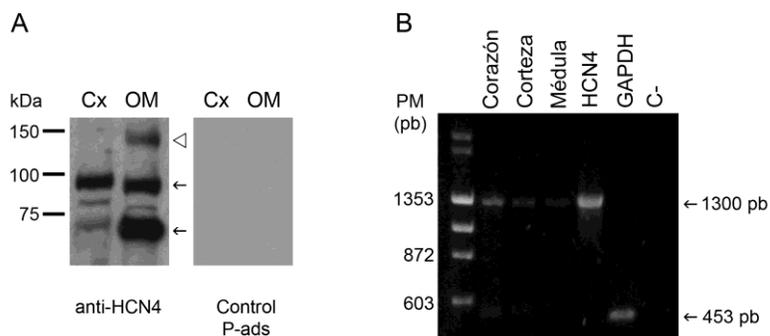
Zong X, Stieber J, Ludwig A, Hofmann F, Biel M (2001) A single histidine residue determines the pH sensitivity of the pacemaker channel HCN2. *J Biol Chem* 276, 6313-6319.

## ANEXOS

### Figuras suplementarias



**Fig. 1 Suplementaria.** Inmunoblots del canal HCN4 en médula externa renal. Las imágenes superiores corresponden a una exposición prolongada de las placas fotográficas y las de abajo a una exposición breve. La presencia del canal completo glicosilado (alrededor de 140 kDa) en tejido renal solo es evidente tras una sobreexposición de la placa y esto provoca que las bandas más abundantes (fragmentos a 95 y 70 kDa aproximadamente) se encimen. El canal completo es más abundante en condiciones control respecto a las dietas de  $K^+$  alto (KA, izquierda) y bajo (KD, derecha).



**Fig. 2 Suplementaria. A.** Inmunoblot del canal HCN4 en tejido renal. El canal completo se inmunodetecta alrededor de 140 kDa en la médula externa (OM), bandas inmunoreactivas de menor peso se observan aproximadamente a 95 y 70 kDa tanto en corteza (Cx) como en OM, y una banda intermedia entre estas últimas dos se distingue en mucha menor proporción. **B.** mRNA de HCN4 en tejido renal y cardiaco de rata. A través de una RT-PCR se logró amplificar un fragmento del canal de 1300 pb en corazón (10  $\mu$ L), corteza y médula renal (50  $\mu$ L), este producto se observa al mismo peso que el control positivo pcDNA3 HCN4 (2  $\mu$ L, línea 5). Se usó a GAPDH (5  $\mu$ L) como control de la reacción. En el control negativo (C-, 10  $\mu$ L) se omitió el cDNA del canal en la mezcla de reacción. Los marcadores de peso molecular (línea 1) fueron  $\phi$ X174 RF DNA/Hae III (0.5  $\mu$ g) y  $\lambda$ DNA/HindIII (0.5  $\mu$ g).



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ybbrc](http://www.elsevier.com/locate/ybbrc)

## “Funny” channels in cardiac mitochondria modulate membrane potential and oxygen consumption



Teresa Padilla-Flores <sup>a</sup>, Zinaeli López-González <sup>a</sup>, Luis Vaca <sup>b, e</sup>,  
Omar Emiliano Aparicio-Trejo <sup>c</sup>, Alfredo Briones-Herrera <sup>c</sup>, Héctor Riveros-Rosas <sup>d</sup>,  
José Pedraza-Chaverri <sup>c</sup>, Daniel León-Aparicio <sup>a</sup>, Carolina Salvador <sup>a</sup>, Alicia Sampieri <sup>b</sup>,  
Laura I. Escobar <sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, 04510, Mexico

<sup>b</sup> Departamento de Biología Celular y del Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, 04510, Mexico

<sup>c</sup> Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, 04510, Mexico

<sup>d</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, 04510, Mexico

<sup>e</sup> Department of Physiology and Biophysics, University of Washington School of Medicine, Seattle, WA, 98124, USA

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 23 January 2020

Accepted 5 February 2020

Available online 14 February 2020

#### Keywords:

HCN channels  
Mitochondria  
Potassium channels  
Cardiomyocyte  
ZD7288  
Ivabradine

### ABSTRACT

The hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels are encoded by a family of four genes (HCN1–4). All isoforms are expressed in the heart, HCN4 being the most abundant in the sinoatrial node (SAN). HCN channels are responsible for the “funny” current ( $I_f$ ) associated with the generation and autonomic control of the diastolic depolarization phase of cardiac action potential. In this work we performed a proteomic analysis of HCN4 transfected in HEK293 cells. Most of the identified proteins in the HCN4 network belonged to mitochondria. The subcellular localization of HCN channels was predicted in plasma membrane, mitochondria and nucleus. Experimentally, HCN2 (full-length, truncated), HCN3 (full-length, truncated) and HCN4 (truncated) were detected in rat heart mitochondria by immunoblotting.  $I_f$  sensitive to ZD7288, was recorded by patch-clamp in mitoplasts from cardiomyocytes. Mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) assessment in H9c2 cells revealed that ZD7288 induced almost 50% higher hyperpolarization respect to control at 30 min. Furthermore, ZD7288 reduced oxygen consumption attributed to ATP synthesis in H9c2 cells. In conclusion, we identify for the first time functional HCN channels in mammalian cardiac mitochondria and demonstrate their impact on  $\Delta\Psi_m$  and respiration.

© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

The contractile function of the heart depends on myocardial electrical activity. Cardiac cycle begins with the action potential originating in the sinoatrial node (SAN), propagating through atria to the atrioventricular node. The mammalian SAN expresses channels that conduct inward currents triggered by hyperpolarization in the

diastolic range of voltages, contributing to the generation of the rhythmic cardiac activity. The inward current was originally named “funny” ( $I_f$ ) because of its unusual characteristics: mixed  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  permeability, activation by hyperpolarization and slow activation and deactivation kinetics [1].

The molecular determinants of  $I_f$  are the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels encoded by a family of four genes (HCN1–4). In addition to SAN pacemaker cells,  $I_f$  has been recorded in Purkinje fibers, atrioventricular node, atrium and ventricles.  $I_f$  is activated around  $-60$  to  $-90$  mV, but in ventricles at more negative potentials [2]. Inhibition of cardiac  $I_f$  by bradycardic agents such as ivabradine has been useful to reduce incidence of cardiovascular mortality and hospitalization for some cases of heart failure [3].

Heart is one of the most energy demanding tissues because its continuous contraction and relaxation is dependent on ATP

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [mhaytte@hotmail.com](mailto:mhaytte@hotmail.com) (T. Padilla-Flores), [zinaeli\\_lopezglz@hotmail.com](mailto:zinaeli_lopezglz@hotmail.com) (Z. López-González), [lvaca@ifc.unam.mx](mailto:lvaca@ifc.unam.mx) (L. Vaca), [emilianoaparicio91@gmail.com](mailto:emilianoaparicio91@gmail.com) (O.E. Aparicio-Trejo), [bhalfredo@gmail.com](mailto:bhalfredo@gmail.com) (A. Briones-Herrera), [hriveros@unam.mx](mailto:hriveros@unam.mx) (H. Riveros-Rosas), [pedraza@unam.mx](mailto:pedraza@unam.mx) (J. Pedraza-Chaverri), [daleb4@gmail.com](mailto:daleb4@gmail.com) (D. León-Aparicio), [caro.unam@gmail.com](mailto:caro.unam@gmail.com) (C. Salvador), [asampier@ifc.unam.mx](mailto:asampier@ifc.unam.mx) (A. Sampieri), [laurae@unam.mx](mailto:laurae@unam.mx) (L.I. Escobar).

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.02.033>

0006-291X/© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

produced by the mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS). The electron transport chain and ATP synthase, located in the inner mitochondrial membrane (IMM), are essential components for the generation and preservation of energy metabolism. The high negative value of the IMM potential ( $\Delta\Psi_m$ ) required for OXPHOS is a powerful driving force for mitochondria  $K^+$  uptake. Mitochondria also play an active role in  $Ca^{2+}$  homeostasis, reactive oxygen species (ROS) production and apoptosis [4].

Several  $K^+$  channels have been identified in heart mitochondria: ATP-sensitive ROMK (mitoK<sub>ATP</sub>) [5,6],  $Ca^{2+}$ -sensitive (mitoBK<sub>Ca</sub>, SK<sub>Ca</sub>) [7,8], K<sub>Na</sub>1.2 [9] and Kv7.4 [10]. Paradoxically, all these  $K^+$  channels are closed in physiological conditions. MitoK<sub>ATP</sub> has been the most widely  $K^+$  channel studied as a mediator of heart protection in ischemic preconditioning [11]. Pharmacological activation of mitoK<sub>ATP</sub> by diazoxide reduces mitochondrial  $Ca^{2+}$  uptake, inhibits the permeability transition pore opening [12] and increases ROS production by the electron transport chain [13].

In a previous report, we presented evidence of the functional expression of HCN3 channel in kidney mitochondria [14]. The aim of this work was to study the presence and physiological role of HCN channels in cardiac mitochondria.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents and antibodies

Most reagents used in this study were purchased from Sigma-Aldrich (MO, USA). ZD7288 was obtained from Tocris (MN, USA); 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1, T3168) was purchased from Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). For more information about reagents see [14]. Voltage-dependent anion channel (VDAC) antibody (ab34726) was from Abcam (Cambridge, United Kingdom) and  $\alpha$ -tubulin antibody (t9026) was from Sigma-Aldrich. Anti-HCN1 (AGP-203), anti-HCN2 (APC-030), anti-HCN3 (APC-057) and anti-HCN4 (APC-050) were purchased from Alomone (Jerusalem, Israel). N-terminal HCN3 directed antibody (LS-C154764) was from LifeSpan Biosciences (WA, USA). Monoclonal rat anti-HCN4 (NB100-74439) was obtained from Novus Biologicals (CO, USA).

### 2.2. Experimental animals and cell culture

Wistar rats and Balb/c mice were used in this study to obtain heart tissue. Animal experiments were approved by the Committee on Animal Research and Ethics from Facultad de Medicina, UNAM. HEK293 and H9c2(2–1) cells were grown up to 80% confluence in high-glucose DMEM supplemented with 1.5 g/L or 3.7 g/L NaHCO<sub>3</sub>, respectively, 100 U/mL penicillin, 10 mg/mL streptomycin and 10% FBS in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C.

### 2.3. Sequence analysis

The subcellular localization of HCN channels was predicted with CELLO2GO web server (<http://cello.life.nctu.edu.tw/cello2go/>) [15]. Amino acid sequences belonging to the HCN family were retrieved using BlastP searches against the complete human, rat and mouse genomes available at NCBI site (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), using the human HCN4 (NCBI accession number NP\_005468) as bait. Multiple amino acid sequence alignments were performed with MUSCLE [16]. Phylogenetic analyses were conducted using the MEGA7 software suite (<http://www.megasoftware.net>) [17]; see details in [Supplementary material](#).

### 2.4. Proteomic assay

HEK293 cells were transfected with pcDNA3-hHCN4. After 48 h of transfection, cells were lysed with RIPA buffer supplemented with protease inhibitor cocktail. For immunoprecipitation, monoclonal rat anti-HCN4 was used. Procedure, reagents and equipment are described in [14].

### 2.5. Enrichment of rat heart mitochondria

Heart mitochondria for immunoblotting were isolated by differential centrifugation as previously described [18].

### 2.6. Immunoblotting

The procedure is described in [14]. Dilution of HCN primary antibodies was 1:400–1:700.

### 2.7. Isolation of cardiomyocytes mitochondria and mitoplasts

Isolation of cardiomyocytes was conducted as previously described [19], and cultured for 24 h. Mitochondria from HEK293 cells and cardiomyocytes were isolated as described in [14]. Mitochondria were incubated with 1 mL of digitonin buffer (2 mg/mL). Suspension was mixed intensely for 15 min, and an equal volume of isolation buffer was added to stop digitonin. Finally, suspension was centrifuged at 10,000 x g for 10 min at 4 °C to recover mitoplasts (IMM plus matrix).

### 2.8. Patch-clamp recordings in mitoplasts

The procedure is described in [14]. The voltage protocol consisted of 20 mV steps from –140 mV to +40 mV with a holding potential of 0 mV with a duration of 5 s.

### 2.9. Mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) monitored by JC-1 staining

$\Delta\Psi_m$  was measured in H2c9 cells cultured in 96-wells plate by incubating them with the fluorometric dye JC-1 (1  $\mu$ g/mL) for 20 min at 37 °C. Fluorescence emission peaks at 525 and 590 nm, obtained at 488 nm excitation, were measured in a Cell Imaging Multi-Mode reader (BioTek Instruments Cytation 5, VT, USA), at different times after addition of PBS alone (control), ZD7288 or carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) at 50  $\mu$ M. Representative images were obtained with GFP and RFP filters.

### 2.10. Cell respirometry

Oxygen consumption in H9c2 cells was determined using the respirometry equipment O2k (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). Briefly, measurements were performed using 2 mL of culture medium. Each experiment was initiated by adding cells; respiratory parameters were defined as: 1. Routine respiration: oxygen consumption of cells incubated with ZD7288 (50  $\mu$ M) or water (vehicle). 2. Leak of respiration: oxygen consumption in the presence of 7.5  $\mu$ M oligomycin. 3. Respiratory control index (RCI): Routine/Leak ratio. 4. Respiration attributable to oxidative phosphorylation (P): Routine - Leak. 5. Percentage of respiration attributable to OXPHOS was estimated as (P/Routine) x 100. All parameters were corrected by subtracting the non-mitochondrial oxygen consumption, obtained by the addition of 2  $\mu$ M rotenone, 10  $\mu$ M antimycin A, and normalized by the number of cells determined with trypan blue staining.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Proteomic analysis of HCN4 channel

Since HCN4 is the predominant isoform expressed in SAN, we performed a proteomic assay to establish its protein-protein interaction network. Mitochondrial proteins were the most prominent

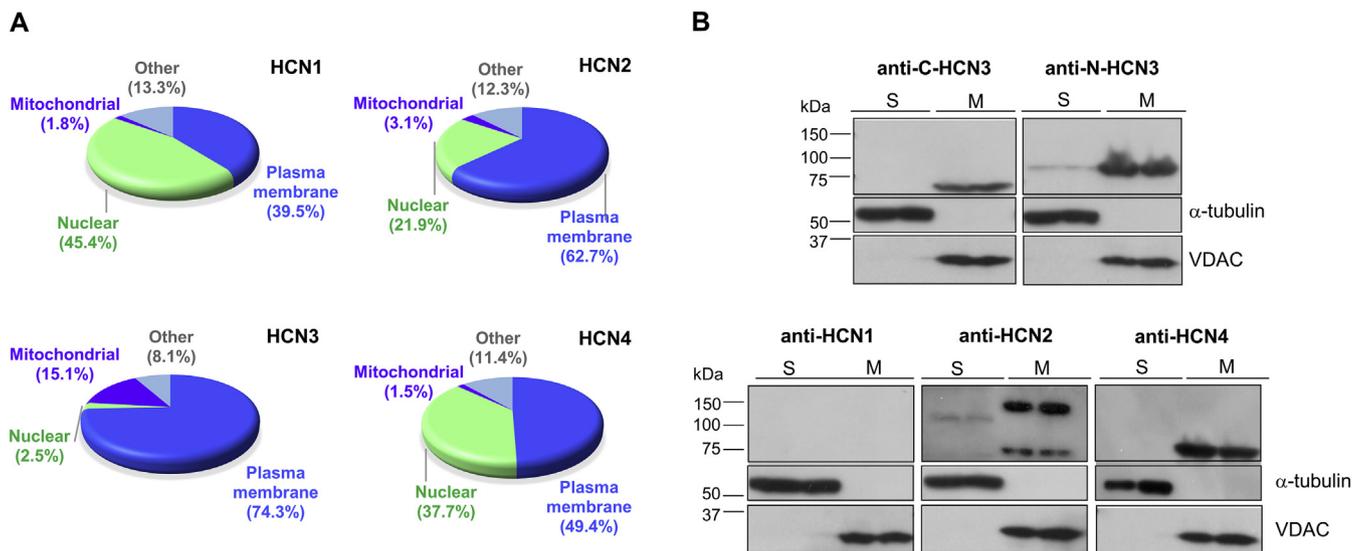
protein family associated to HCN4 (Table 1) as it was for HCN3 in our previous study [14].

#### 3.2. Subcellular localization prediction of HCN channels and its identification in heart mitochondria

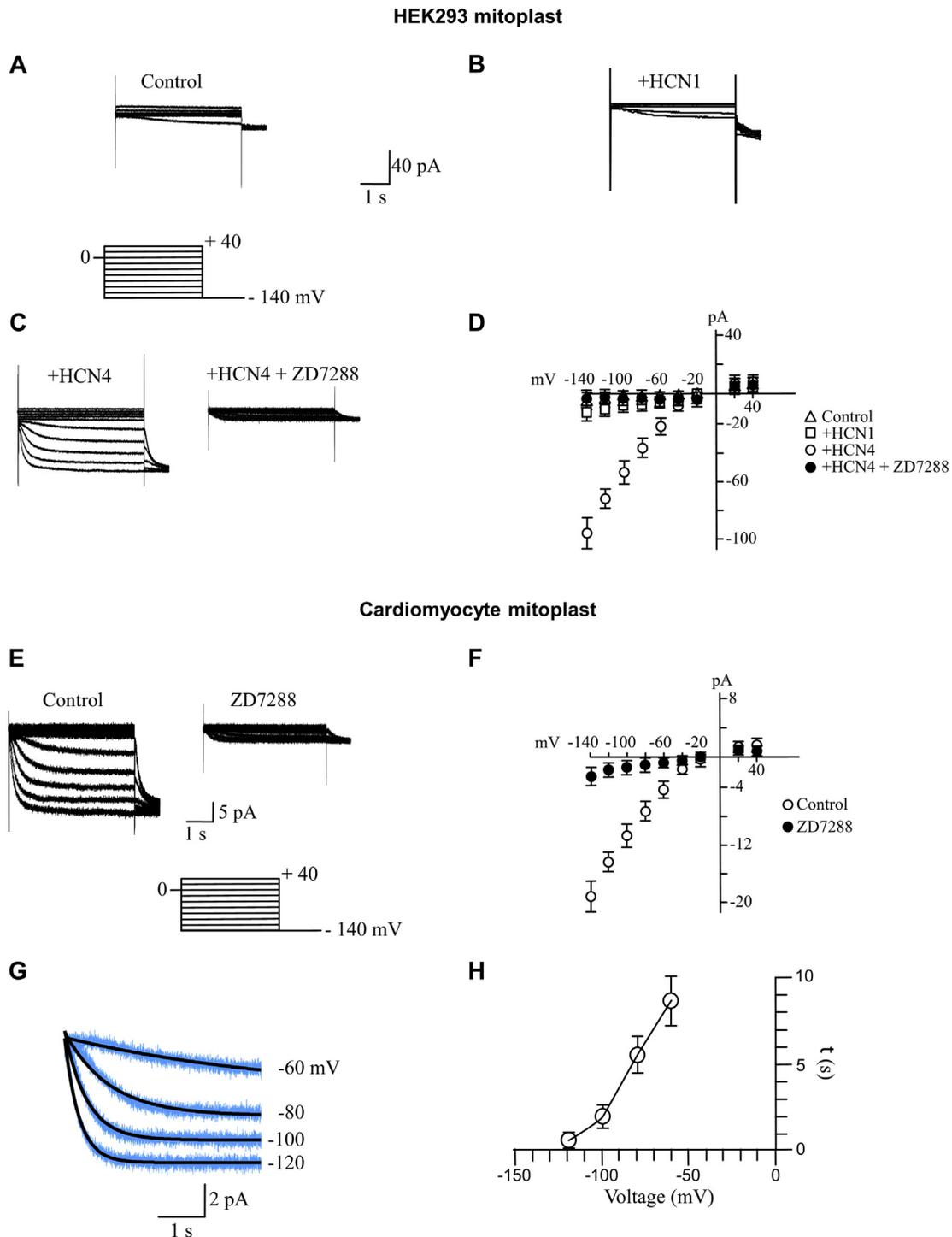
As expected, all HCN channels were found in plasma membrane.

**Table 1**  
HCN4 interacting proteins found by mass spectrometry in transfected HEK293 cells. The resulting candidate proteins had a percentage  $\geq 95\%$  of reliability (Protein AutoCurate green).

Protein name	UniProt accession	UniProt Entry name	Gene name	Molecular Mass (kDa)
14-3-3 protein epsilon (fragment)	K7EM20	K7EM20_HUMAN	YWHAE	12.9
14-3-3 protein eta	Q04917	1433F_HUMAN	YWHAH	28.4
14-3-3 protein gamma	P61981	1433G_HUMAN	YWHAQ	28.5
14-3-3 protein theta	P27348	1433T_HUMAN	YWHAQ	28.0
28S ribosomal protein S22, mitochondrial	G5E9V5	G5E9V5_HUMAN	MRPS22	41.4
28S ribosomal protein S25, mitochondrial	E7EPW2	E7EPW2_HUMAN	MRPS25	12.9
39S ribosomal protein L22, mitochondrial	Q9NWU5	RM22_HUMAN	MRPL22	23.8
39S ribosomal protein L4, mitochondrial (fragment)	K7ES61	K7ES61_HUMAN	MRPL4	33.8
39S ribosomal protein L44, mitochondrial	Q9H9J2	RM44_HUMAN	MRPL44	37.9
39S ribosomal protein L49, mitochondrial	Q13405	RM49_HUMAN	MRPL49	19.3
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	P10809	CH60_HUMAN	HSPD1	61.2
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	P25705	ATPA_HUMAN	ATP5A1	59.9
CDK5 regulatory subunit-associated protein 2	Q96SN8	CK5P2_HUMAN	CDK5RAP2	216.6
Clathrin heavy chain 2	A0A087WX41	A0A087WX41_HUMAN	CLTCL1	144.1
Cytochrome <i>b-c1</i> complex subunit 1, mitochondrial	P31930	QCR1_HUMAN	UQCRC1	53.3
Dihydropyridyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	P36957	ODO2_HUMAN	DLST	49.1
Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial (fragment)	H0YL12	H0YL12_HUMAN	ETFA	25.0
Elongation factor Tu, mitochondrial	P49411	EFTU_HUMAN	TUFM	49.9
Isoform 2 of Poly(A) RNA polymerase, mitochondrial	Q9NVV4-2	PAPD1_HUMAN	MTPAP	79.7
Isoform 3 of Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	O95831-3	AIFM1_HUMAN	AIFM1	66.6
Mitochondrial dicarboxylate carrier (fragment)	I3L1E8	I3L1E8_HUMAN	SLC25A10	12.3
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	O75489	NDUS3_HUMAN	NDUF53	30.4
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial (fragment)	Q5JPU2	Q5JPU2_HUMAN	PDHA1	13.9
Septin-2 (Fragment)	C9J2Q4	C9J2Q4_HUMAN	SEPT2	21.3
Stress-70 protein, mitochondrial	P38646	GRP75_HUMAN	HSPA9	74.0
Threonine-tRNA ligase, mitochondrial	Q9BW92	SYTM_HUMAN	TARS2	81.9
Vimentin	P08670	VIME_HUMAN	VIM	53.7



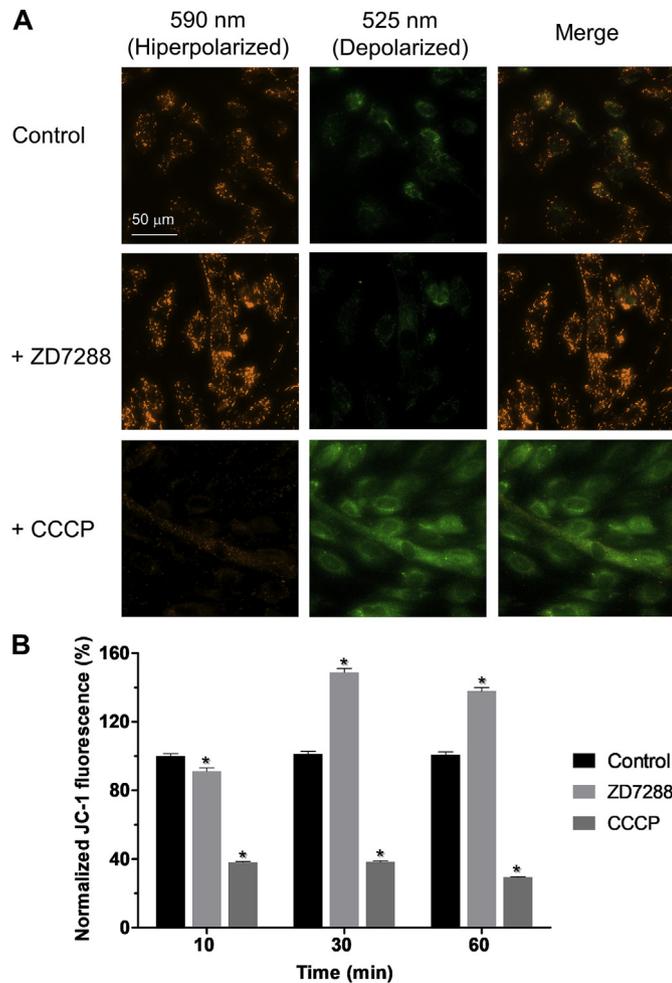
**Fig. 1. Subcellular localization of HCN channels.** (A) Computational subcellular localization predictions for full-length isoforms of HCN channels from human, rat and mouse. Amino acid sequences were retrieved from NCBI site. Mean predictions for each HCN channel were represented by pie charts. (B) Immunoblotting of HCN channels from rat heart mitochondria (ventricles). HCN3 was detected both as N-truncated protein (~70 kDa) with a C-terminal epitope directed antibody (anti-C-HCN3), and as a full-length protein (~86 kDa) with an antibody that recognizes an N-terminal epitope (anti-N-HCN3). Bands for HCN2 (~140 and ~70 kDa, probably corresponding to full-length posttranslationally modified and C-truncated protein, respectively) and HCN4 (~70 kDa, C-truncated protein) were also immunodetected in mitochondria using antibodies that recognize an N-terminal epitope; in contrast, no bands were observed for HCN1 isoform. HCN2, HCN3 and HCN4 channels were more abundant in mitochondria-enriched fraction (M) than in supernatant (S). To assess mitochondrial enrichment,  $\alpha$ -tubulin (~55 kDa) and voltage-dependent anion channel (VDAC, ~31 kDa) were used as negative and positive controls, respectively.



**Fig. 2.** Patch clamp recordings of  $I_f$  in whole mitoplasts from HEK293 cells and from cardiomyocytes. Mitoplast currents from HEK293 cells (A) non-transfected, (B) transfected with HCN1 channel and (C) transfected with HCN4 channel under control conditions (left) and after 2 min of ZD7288 addition (right). (D) Current-voltage ( $I/V$ ) relationships for each group of mitoplasts from HEK293 cells. (E) Mitoplast currents from cardiomyocytes under control conditions (left) and after 2 min of ZD7288 addition (right). (F)  $I/V$  relationships for control (open circles) and after ZD7288 addition (filled circles) from cardiomyocyte mitoplasts. (G) Mitoplast currents obtained from cardiomyocytes (blue lines) and the fit to a single exponential function (black lines) for the voltages of  $-60$ ,  $-80$ ,  $-100$  and  $-120$  mV. (H) Time activation constants ( $\tau$ ) obtained from the fit illustrated in panel G.  $50 \mu\text{M}$  ZD7288 was used in the assays. In all panels, symbols indicate the mean  $\pm$  standard deviation,  $n = 10$ . (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

However, they exhibit other subcellular locations. Besides plasma membrane, HCN1, HCN2 and HCN4 showed a predominant nuclear location, whereas HCN3 was more abundant in mitochondria (Fig. 1A). This last prediction agrees with results obtained previously

in kidney [14]. Since all isoforms are expressed in the heart [20], Western blot experiments were performed to identify each HCN channel in rat cardiac mitochondria. VDAC and  $\alpha$ -tubulin were used as positive and negative controls of mitochondria enrichment,



**Fig. 3.** Effect of ZD7288 and CCCP on mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) of H9c2 cells. (A) Visualization by Cyation 5 showing JC-1 red (595 nm), JC-1 green (525 nm) and merge images of cells after 30 min of treatment. (B) JC-1 fluorescence is reported as the ratio of red fluorescence (590 nm) to green fluorescence (525 nm); values were normalized with control cells (without inhibitor). ZD7288 or CCCP (50  $\mu$ M). Data are mean  $\pm$  SEM,  $n = 10$ , \* $p < 0.001$  vs control. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

respectively (Fig. 1B). Immunoblotting of HEK293 cells transfected with all HCN isoforms were previously conducted to confirm antibodies specificity [14]. Surprisingly, besides HCN3 (~86 and ~70 kDa), HCN2 and HCN4 were also detected in mitochondria from heart. Apparent molecular weight was higher (~140 kDa) and lower (~70 kDa) for HCN2, and lower (~70 kDa) for HCN4, with respect to that predicted by their amino acid sequence (95 and 129 kDa, respectively). Interestingly, HCN2 appeared around 120 kDa in supernatant as reported in brain for the glycosylated form. HCN2 band at ~140 kDa in mitochondria probably contains additional post-translational modifications.

There are few reports showing immunoblots of cardiac mitochondrial  $K^+$  channels; recently an N-truncated SK3 splice variant was documented in cardiac mitochondria from human and guinea pig [21]. Thus, further studies are needed to establish the mechanisms involved in the generation of truncated forms of HCN channels in rat heart mitochondria.

Dual targeting of proteins can be achieved at the level of transcription, splicing or translation, and results in two or more translation products that either harbor or lack specific targeting signals. Dual targeting of a single translation product has also been

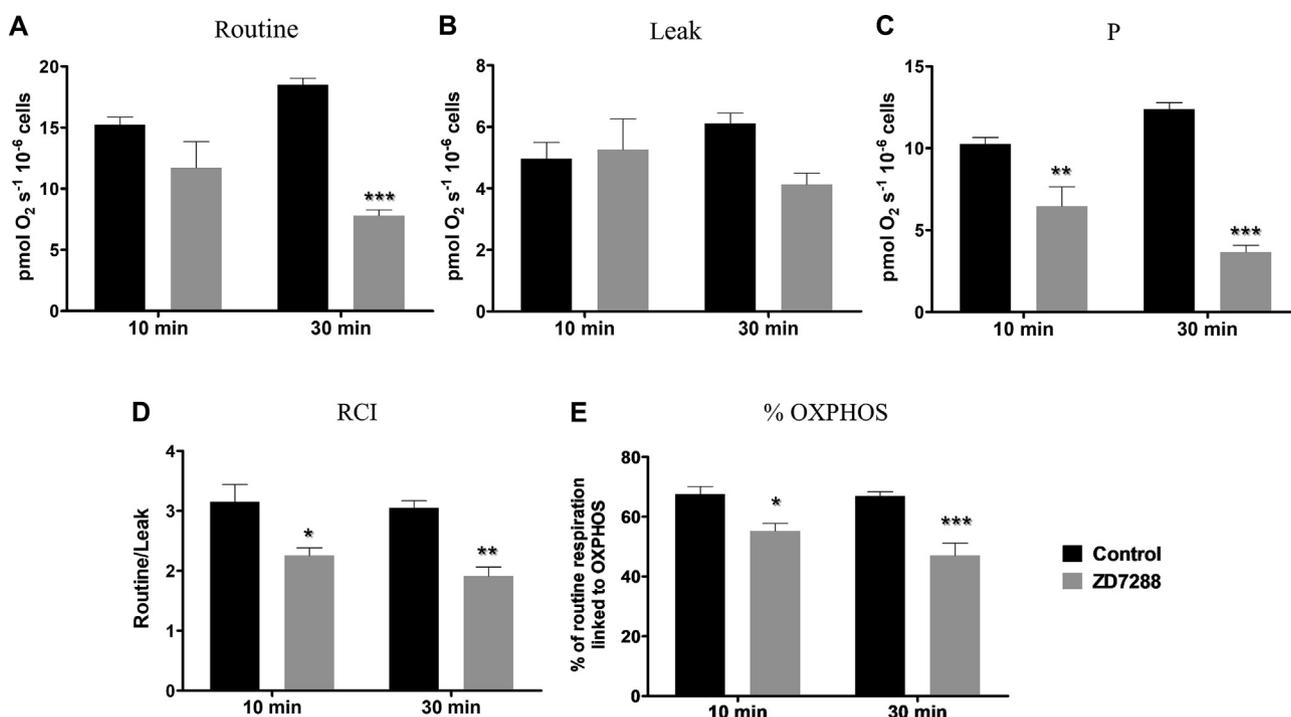
described [22]. Interestingly, dual-targeted proteins tend to be more evolutionarily conserved [23]. The fact that HCN channels can be located in more than a single subcellular compartment, suggests that they have different functional roles inside each compartment. The core region of mammalian HCN1–4, including the conserved cyclic nucleotide-binding domain exhibit 80–90% sequence identity. Differences in both sequence and length among HCN channels occur mainly in the N- and C-terminal domains. The sequence divergence in these terminal domains is probably determinant to differentiate their physiological roles. Phylogenetic tree in Fig. S1 shows that HCN1 and HCN2 are located in the same branch, and this agrees with data from Jackson et al. [24] suggesting that these two isoforms are the product of a duplication event that occurred early in the evolution of vertebrates.

### 3.3. Electrophysiological recordings of hyperpolarization-activated currents ( $I_f$ ) in mitoplasts from HEK293 cells transfected with HCN4 and mitoplasts from cardiomyocytes

Patch-clamp recordings of mitoplasts from HEK293 cells non-transfected (Fig. 2A) and transfected with HCN1 (Fig. 2B) were used as negative controls.  $I_f$  were recorded in the range of +40 to –140 mV (Fig. 2C, E) in mitoplasts from HEK293 cells transfected with HCN4 and untransfected cardiomyocytes. The current/voltage ( $I/V$ ) relationship showed stable voltage-dependent inward currents.  $I_f$  were inhibited by 50  $\mu$ M ZD7288, a blocker of HCN channels. The activation midpoint ( $V_{1/2}$ ) of HCN channels recorded in cardiomyocytes mitoplasts was  $-95 \pm 7$  mV, similar to that reported for hHCN2 ( $-95.6 \pm 3.8$  mV) [25]. A hallmark used to differentiate between HCN isoforms is the kinetics of activation. HCN1 is the fastest activating channel with an activation time constant ( $\tau$ ) in the range of 30–300 ms, HCN4 represents the most slowly activating isoform ( $\tau$  between 300 ms to several seconds depending on its modulation by cAMP), whereas HCN2 and HCN3 display intermediate activation kinetics. Interestingly, we observed that kinetics of  $I_f$  current recorded in mitoplasts from HEK293 cells transfected with HCN4 (Fig. 2C) and from cardiomyocytes (Fig. 2E) were very similar. However,  $\tau$  at –100 mV ( $\tau_{-100}$ ) was  $2000 \pm 1000$  ms for HCN channels recorded in cardiomyocytes mitoplasts (Fig. 2G and H), an intermediate value in comparison with hHCN3 and hHCN4 ( $\tau_{-100}$ :  $1244 \pm 526$  and  $5686 \pm 2234$  ms) [25]. Based on immunoblots (Fig. 1B) and biophysical parameters (Fig. 2), cardiac mitoHCN channel is possibly a heteromultimer of HCN2/HCN3/HCN4 isoforms.

### 3.4. ZD7288 hyperpolarized cardiomyocyte mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ )

The lipophilic cationic dye JC-1 forms aggregates with intense red fluorescence in healthy mitochondria with high  $\Delta\Psi_m$  (hyperpolarized), and monomers with green fluorescence when  $\Delta\Psi_m$  diminishes (depolarized). As expected, in control conditions mitochondria were hyperpolarized (Fig. 3A). Interestingly, ZD7288 had a slight but significant depolarizing effect at 10 min (Fig. 3B); this can be due to an unspecific effect of the inhibitor and/or to a compensatory mitochondrial response, since after 30 min and 1 h of ZD7288 incubation, a higher hyperpolarization (~50%) was reached respect to control cells (Fig. 3). Based on these results, mitochondrially located HCN channels are open and favor  $K^+$  influx to the matrix in physiological conditions; however, its depolarizing effect is mild in comparison to that caused by CCCP (Fig. 3). Since HCN channels are activated at hyperpolarized voltages, they should contribute to steady  $K^+$  influx to maintain an optimal  $\Delta\Psi_m$  for ATP synthesis and to regulate mitochondria volume [4].



**Fig. 4.** Effect of ZD7888 (50  $\mu\text{M}$ ) on the respiratory parameters of H2c9 cells. (A) Cellular routine respiration = Routine; (B) leak of respiration; (C) respiration associated to oxidative phosphorylation = P; (D) respiratory control index = RCI; (E) percentage of basal respiration attributable to OXPHOS. Data are presented as mean  $\pm$  SEM,  $n = 3-4$ , \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs control.

It has been documented that ivabradine has a protective effect beyond that induced by heart rate reduction alone [26,27]. As underlying mechanisms, attenuation of damage by ROS and reduced  $\text{Na}^+$  influx through the plasma membrane  $I_f$  current, with secondary decrease of  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange and  $\text{Ca}^{2+}$  overload have been suggested [28]. Ivabradine targeting of cardiac mitoHCN channels can also help explain the additional benefits of this bradycardic.

### 3.5. ZD7288 decreased cardiac mitochondrial oxygen consumption

To elucidate the role of HCN channels in the cardiac mitochondria bioenergetics, the effect of ZD7288 on OXPHOS was evaluated in H9c2 cells at 10 and 30 min. Cell respiration *in vitro* is regulated by aerobic ATP demand but also by mitochondrial processes that are required for cell growth, and by events that reduce mitochondrial coupling, such as proton leak and electron leak (ROS production). Cells maintained a “routine respiration” (Fig. 4A). The oxygen consumption of mitochondrial processes that do not produce ATP was evaluated through oligomycin induction of the non-phosphorylating resting state (leak respiration) (Fig. 4B); although, there was a tendency of reduction at 30 min, it was not statistically significant. The values of respiration attributable to oxidative phosphorylation (P) (Fig. 4C), RCI (Fig. 4D) and % OXPHOS (Fig. 4E) decreased with ZD7288. These results clearly support that HCN channels participate in cardiomyocyte respiration.

The mitochondrial electrochemical equilibrium is continuously maintained by the coupling of  $\text{K}^+$  entry by channels and  $\text{K}^+$  efflux mediated by exchangers. The proton pump of the respiratory chain keeps  $\Delta\Psi_m$  between  $-150$  to  $-180$  mV in the IMM. At these  $\Delta\Psi_m$  values, HCN channels are open; in contrast, other  $\text{K}^+$  channels identified in heart mitochondria ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ,  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ,  $\text{SK}_{\text{Ca}}$ ,  $\text{K}_{\text{Na}1.2}$ ,  $\text{Kv7.4}$ ) are closed. Opening of mitochondrial  $\text{K}^+$  channels

has been associated with cytoprotection, while its inhibition may facilitate cell death [29].

Based on our findings, cardiac mitoHCN channels drive a steady diffusive  $\text{K}^+$  influx into the matrix, that should be balanced by the  $\text{K}^+/\text{H}^+$  antiporter [4]. This remarkable finding contributes to understand the pleiotropic effects of HCN blockers in cardiac patients who are currently under this medication.

### Declaration of competing interest

The authors declare no conflicts of interest.

### Acknowledgments

Teresa Padilla-Flores is a student of “Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas” at Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received a scholarship (289190) from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México). Grants from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA, UNAM) IN224919 and CONACYT A1-S-8731 (L.I.E.). Postdoctoral Scholarship Program DGAPA at UNAM (D.L.A.). Fulbright-Garcia Robles grant (L.V.). The authors thank Dr. Emmanuel Ríos Castro, “Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica LaNSE-CINVESTAV” for his technical assistance, and Dr. Jorge A. Sánchez for providing the H9c2 cell line.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.02.033>.

### References

- [1] M. Baruscotti, A. Bucchi, D. DiFrancesco, Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker (“funny”) current, *Pharmacol. Ther.* 107 (2005) 59–79,

- <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.01.005>.
- [2] R.B. Robinson, S.A. Siegelbaum, Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function, *Annu. Rev. Physiol.* 65 (2003) 453–480, <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.65.092101.142734>.
- [3] K. Swedberg, M. Komajda, M. Böhm, J.S. Borer, I. Ford, A. Dubost-Brama, G. Lerebours, L. Tavazzi, Ivabradine and outcomes in chronic heart failure (SHIFT): a randomised placebo-controlled study, *Lancet* 376 (2010) 875–885, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61198-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61198-1).
- [4] K.D. Garlid, P. Paucek, Mitochondrial potassium transport: the K<sup>+</sup> cycle, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1606 (2003) 23–41, [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(03\)00108-7](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(03)00108-7).
- [5] P. Paucek, G. Mironova, F. Mahdi, A.D. Beavis, G. Woldegiorgis, K.D. Garlid, Reconstitution and partial purification of the glibenclamide-sensitive, ATP-dependent K<sup>+</sup> channel from rat liver and beef heart mitochondria, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 26062–26069.
- [6] D.B. Foster, A.S. Ho, J. Rucker, A.O. Garlid, L. Chen, A. Sidor, K.D. Garlid, B. O'Rourke, Mitochondrial ROMK channel is a molecular component of mitoKATP, *Circ. Res.* 111 (2012) 446–454, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.266445>.
- [7] W. Xu, Y. Liu, S. Wang, T. McDonald, J.E. Van Eyk, A. Sidor, B. O'Rourke, Cytoprotective role of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in the cardiac inner mitochondrial membrane, *Science* 298 (2002) 1029–1033, <https://doi.org/10.1126/science.1074360>.
- [8] D.F. Stowe, A.K. Gadicherla, Y. Zhou, M. Aldakkak, Q. Cheng, W.M. Kwok, M.T. Jiang, J.S. Heisner, M. Yang, A.K.S. Camara, Protection against cardiac injury by small Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channels identified in Guinea pig cardiac inner mitochondrial membrane, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1828 (2013) 427–442, <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2012.08.031>.
- [9] C.O. Smith, Y.T. Wang, S.M. Nadtochiy, J.H. Miller, E.A. Jonas, R.T. Dirksen, K. Nehrke, P.S. Brookes, Cardiac metabolic effects of K<sub>Na</sub>1.2 channel deletion and evidence for its mitochondrial localization, *Faseb. J.* 32 (2018) 6135–6149, <https://doi.org/10.1096/fj.201800139R>.
- [10] L. Testai, V. Barrese, M.V. Soldovieri, P. Ambrosino, A. Martelli, I. Vinciguerra, F. Miceli, I.A. Greenwood, M.J. Curtis, M.C. Breschi, M.J. Sisalli, A. Scorziello, M.J. Canduela, P. Grandes, V. Calderone, M. Tagliatalata, Expression and function of Kv7.4 channels in rat cardiac mitochondria: possible targets for cardioprotection, *Cardiovasc. Res.* 110 (2016) 40–50, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv281>.
- [11] K.D. Garlid, P. Dos Santos, Z.J. Xie, A.D.T. Costa, P. Paucek, Mitochondrial potassium transport: the role of the mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in cardiac function and cardioprotection, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1606 (2003) 1–21, [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(03\)00109-9](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(03)00109-9).
- [12] P. Korge, H.M. Honda, J.N. Weiss, Protection of cardiac mitochondria by diazoxide and protein kinase C: implications for ischemic preconditioning, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99 (2002) 3312–3317, <https://doi.org/10.1073/pnas.052713199>.
- [13] T. Pain, X.M. Yang, S.D. Critz, Y. Yue, A. Nakano, G.S. Liu, G. Heusch, M.V. Cohen, J.M. Downey, Opening of mitochondrial K(ATP) channels triggers the preconditioned state by generating free radicals, *Circ. Res.* 87 (2000) 460–466, <https://doi.org/10.1161/01.RES.87.6.460>.
- [14] D. León-Aparicio, C. Salvador, O.E. Aparicio-Trejo, A. Briones-Herrera, J. Pedraza-Chaverri, L. Vaca, A. Sampieri, T. Padilla-Flores, Z. López-González, J.C. León-Contreras, R. Hernández-Pando, L.I. Escobar, Novel potassium channels in kidney mitochondria: the hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated HCN channels, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 4995, <https://doi.org/10.3390/ijms20204995>.
- [15] C.-S. Yu, C.-W. Cheng, W.-C. Su, K.-C. Chang, S.-W. Huang, J.-K. Hwang, C.-H. Lu, CELLO2GO: a web server for protein subCELLular Localization prediction with functional gene ontology annotation, *PLoS One* 9 (2014), e99368, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099368>.
- [16] R.C. Edgar, MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 1792–1797, <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>.
- [17] S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura, MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets, *Mol. Biol. Evol.* 33 (2016) 1870–1874, <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
- [18] V. Calderone, L. Testai, A. Martelli, S. Rapposelli, M. Digiacomo, A. Balsamo, M.C. Breschi, Anti-ischemic properties of a new spiro-cyclic benzopyran activator of the cardiac mito-KATP channel, *Biochem. Pharmacol.* 79 (2010) 39–47, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.07.017>.
- [19] D. Li, J. Wu, Y. Bai, X. Zhao, L. Liu, Isolation and culture of adult mouse cardiomyocytes for cell signaling and in vitro cardiac hypertrophy, *J. Vis. Exp.* (2014), <https://doi.org/10.3791/51357>.
- [20] S. Herrmann, B. Layh, A. Ludwig, Novel insights into the distribution of cardiac HCN channels: an expression study in the mouse heart, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 51 (2011) 997–1006, <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.09.005>.
- [21] M.Y. Yang, A.K.S. Camara, M. Aldakkak, W.M. Kwok, D.F. Stowe, Identity and function of a cardiac mitochondrial small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel splice variant, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1858 (2017) 442–458, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2017.03.005>.
- [22] S. Karnieli, O. Pines, Single translation—dual destination: mechanisms of dual protein targeting in eukaryotes, *EMBO Rep.* 6 (2005) 420–425, <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400394>.
- [23] I. Kisslov, A. Naamati, N. Shakarchy, O. Pines, Dual-targeted proteins tend to be more evolutionarily conserved, *Mol. Biol. Evol.* 31 (2014) 2770–2779, <https://doi.org/10.1093/molbev/msu221>.
- [24] H.A. Jackson, C.R. Marshall, E.A. Accili, Evolution and structural diversification of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel genes, *Physiol. Genom.* 29 (2007) 231–245, <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00142.2006>.
- [25] J. Stieber, G. Stöckl, S. Herrmann, B. Hassfurth, F. Hofmann, Functional expression of the human HCN3 channel, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 34635–34643, <https://doi.org/10.1074/jbc.M502508200>.
- [26] G. Heusch, A. Skyschally, P. Gres, P. van Caster, D. Schilawa, R. Schulz, Improvement of regional myocardial blood flow and function and reduction of infarct size with ivabradine: protection beyond heart rate reduction, *Eur. Heart J.* 29 (2008) 2265–2275, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehn337>.
- [27] P. Kleinbongard, N. Gedik, P. Witting, B. Freedman, N. Klöcker, G. Heusch, Pleiotropic, heart rate-independent cardioprotection by ivabradine, *Br. J. Pharmacol.* 172 (2015) 4380–4390, <https://doi.org/10.1111/bph.13220>.
- [28] H. Gewirtz, “Funny” current: if heart rate slowing is not the best answer, what might be? *Cardiovasc. Res.* 84 (2009) 9–10, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp245>.
- [29] M. Laskowski, B. Augustynek, B. Kulawiak, P. Koprowski, P. Bednarczyk, W. Jarmuszkiewicz, A. Szewczyk, What do we not know about mitochondrial potassium channels? *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1857 (2016) 1247–1257, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.03.007>.