

97



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACION FUNCIONAL Y MOLECULAR DE UN COTRANSPORTADOR ENDOGENO DE K⁺:Cl⁻ EN OVOCITOS DE XENOPUS LAEVIS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

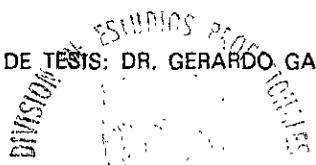
B I O L O G A

P R E S E N T A :

PAOLA ANA DE LOS HEROS RIOS



DIRECTOR DE TESIS: DR. GERARDO GAMBA AYALA



2001

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION DE CIENCIAS...



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
 a la División de Estudios Profesionales de la
 Facultad de Ciencias
 presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:
 Caracterización Funcional y Molecular de un Cotransportador
 Endógeno de K^+Cl^- en Ovocitos de Xenopus laevis

Elaborado por Paola Ana de los Heros Rios

número de cuenta 9650447-5, pasante de la carrera de Biología

Este trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
 Propietario

Dr. Gerardo Gamba Ayala

Propietario

M. en IBB Saúl Cano Colín

Propietario

Biol. Julio Alejandro Prieto Sagredo

Presidente

Q. Silvestre de Jesús Alavez Espidio

Presidente

Dra. María del Consuelo Plata Ramos

Consejo Departamental de Biología


 Dra. Patricia Ramos Morales

FACULTAD DE CIENCIAS
 UNAM



DEPARTAMENTO DE BIOLÓGICAS

Gracias

A mi papá y a mi hermana Mariana.

A mis compañeros y amigos del laboratorio
Paty, Elisa, Chelo, Adriana Monroy,
Carlitos, Erika, Israel, Norma y
especialmente a Adriana Mercado.

Z99337

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Regulación del volumen celular	2
Mecanismos de regulación del volumen celular	3
Regulación del incremento del volumen celular (RIV)	4
Regulación de la disminución del volumen celular (RDV)	5
Regulación del volumen celular en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	6
Cotransportadores electroneutros cloro-catiónicos	7
Cotransportador de K^+Cl^- (KCC)	11
Cotransportador endógeno de K^+Cl^- en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	16
HIPÓTESIS	17
OBJETIVOS	17
MATERIALES Y MÉTODOS	18
1. Caracterización funcional	18
-Cirugía extracción y preparación de ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	18
-Evaluación funcional y cinética	19
-Análisis Estadístico	23
2. Caracterización molecular	23
-Extracción de RNA total y mensajero (RNAt y RNAm) a partir de ovocitos y tejidos de <i>Xenopus laevis</i>	23
-Amplificación del KCCx a partir de RT-PCR	24
-Southern blot	24
-Distribución tisular del KCCx en <i>Xenopus laevis</i>	25
-Secuenciación del KCCx	25
RESULTADOS	27
Caracterización funcional	27
Caracterización molecular	37
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIÓN	47
APÉNDICES	48
BIBLIOGRAFÍA	56

RESUMEN

Introducción. Las células han desarrollado una serie de mecanismos para regular la disminución del volumen celular (RVD) por medio de la liberación de iones intracelulares. Uno de estos mecanismos, es el cotransportador de K^+Cl^- , del cual, a la fecha se han identificado cuatro isoformas denominadas KCC1, KCC2, KCC3 y KCC4. Los ovocitos de la rana africana *Xenopus laevis*, han sido ampliamente utilizados como herramienta para la clonación y caracterización de estos transportadores electroneutros, y últimamente, se ha obtenido evidencia funcional de que presentan un cotransportador de K^+Cl^- endógeno. En este trabajo se reporta la caracterización funcional y molecular de este transportador.

Metodología. La caracterización funcional del transportador fue determinada en ovocitos de *Xenopus* defoliculados, extraídos mediante cirugía, de ranas hembras anestesiadas con triclaína al 0.17%. Los ovocitos fueron incubados en Ringer de rana por cinco días, al término de los cuales, se determinó la captación de $^{86}Rb^+$ en soluciones con diferente osmolaridad, en ausencia de Na^+ extracelular y en presencia de diversos inhibidores. La captación por ovocito se midió mediante centellografía líquida. Se realizó un análisis de Southern blot a partir del análisis de RT-PCR de los productos obtenidos de RNA total de ovocitos usando iniciadores diseñados específicamente para KCC1, KCC3 y KCC4. Las sondas utilizadas fueron fragmentos de cDNA, marcados con digoxigenina específicas para éstas isoformas. A partir de una secuencia EST (expressed sequence tags) de *Xenopus* con homología significativa con todos las isoformas de KCCs, se diseñaron iniciadores específicos, para realizar RT-PCR a partir de RNA de ovocito. Este fragmento se purificó y se utilizó como sonda para determinar la distribución tisular del KCC endógeno, a partir de los productos de RT-PCR de los tejidos de rana.

Resultados. En condiciones isotónicas el cotransportador presenta una captación de $^{86}Rb^+$ dependiente de Cl^- , activable por aumento del volumen celular y el agente alquilante N-etilmaleimida (NEM). El análisis cinético mostró K_m de 22.2 ± 6.4 mM y 15.4 ± 4.7 mM para K^+ y Cl^- respectivamente. La serie de aniones para el transporte de K^+ fue: $Cl^- = PO_4 = Br^- > I^- > SCN^- > Gluconato$. La función del cotransportador endógeno se redujo en presencia de diuréticos de asa y DIOA. El inhibidor de la proteína fosfatasa 1, caliculina A, previno la activación del cotransportador por hipotonicidad. El Southern blot reveló una banda de 528 pb, que mostró 100 % de identidad con la secuencia reportada para el EST de *Xenopus*. Esta secuencia muestra un mayor grado de identidad con la subrama de KCC1/KCC3, que con la de KCC2/KCC4. Una banda de tamaño similar fue amplificada a partir de diversos tejidos de *Xenopus laevis*,

Conclusiones. Los ovocitos de *Xenopus laevis* expresan un cotransportador endógeno de K^+Cl^- activado por hipotonicidad, NEM y mercurio, inhibido por diuréticos de asa, DIOA y caliculina A, capaz de transportar otros aniones además del Cl^- , cuyas propiedades cinéticas y moleculares, sugieren que se trata de la versión anfibia de KCC1.

INTRODUCCIÓN

Regulación del volumen celular

Las membranas celulares son permeables al agua (1;2); así, su movimiento a través de ésta se debe en gran parte, a la existencia de gradientes de presión osmótica. De manera que, cualquier desequilibrio entre la osmolaridad intra y extracelular trae como consecuencia el movimiento de agua, a través de la membrana, así como alteraciones en el volumen celular (1;3).

Las células han desarrollado evolutivamente, una gran variedad de mecanismos reguladores del volumen celular, algunos siendo desencadenados por alteraciones mínimas del volumen. Estos mecanismos no solamente sirven para reajustar el volumen celular; además, modifican profundamente una amplia variedad de funciones celulares incluyendo el transporte epitelial, el metabolismo, la migración, la proliferación y la muerte celulares.

Con excepción de la médula renal, en donde la urea es el principal osmolito, en los otros tejidos y órganos los iones establecen la osmolaridad extra e intracelular. De manera que, el transporte iónico a través de la membrana celular constituye el medio más rápido y eficiente para alcanzar el equilibrio osmótico, ya que las alteraciones en la concentración iónica intracelular pueden provocar que ciertas funciones celulares se vean afectadas; como sucede con la estabilidad de las macromoléculas a concentraciones altas (1).

Para realizar sus funciones metabólicas, las células utilizan proteínas, carbohidratos y lípidos. La concentración de éstas biomoléculas, es mayor dentro de la célula que en el fluido extracelular. Dicha concentración mayor de osmolitos orgánicos, se compensa por una menor concentración iónica intracelular. La membrana celular es poco permeable al Na^+ y su salida intercambiando K^+ , a través de la ATPasa de $\text{Na}^+:\text{K}^+$ mantiene este gradiente iónico (1). Por otra parte, la membrana celular es muy permeable al K^+ , y su salida de éste crea un potencial de membrana positivo en el exterior, el cual mueve al ión Cl^- al exterior de la célula. La baja concentración intracelular de Cl^- compensa también, la gran concentración intracelular de osmolitos orgánicos (1). De esta manera, el volumen celular puede ser visto como un balance entre los efectos osmóticos de las altas concentraciones de aniones

para los cuales la membrana celular es impermeable y las bajas concentraciones de Cl^- dentro de la célula (4)

Mecanismos de regulación del volumen celular

Los mecanismos por los cuales las células regulan los cambios en el volumen celular, se denominan RIV, por regulación del incremento del volumen celular y RDV, por regulación de la disminución del volumen celular (fig. 1). Estos ocurren por medio de la activación de transportadores específicos de la membrana plasmática, que regulan el flujo de moléculas osmóticamente activas (4) y los movimientos de agua osmóticamente obligados. Durante el aumento del volumen celular, las células expulsan iones para llevar a cabo la RIV; mientras que, durante la disminución del volumen las células acumulan iones para realizar la RDV. La activación de los mecanismos de liberación de iones, durante la RIV, es paralela a la inhibición de los mecanismos de captación de iones y viceversa (1;5). En los últimos 25 años se han identificado algunos transportadores y canales iónicos específicos, responsables de reestablecer el volumen celular. Estos transportadores, generalmente, no están activos cuando el volumen celular se encuentra estable (4).

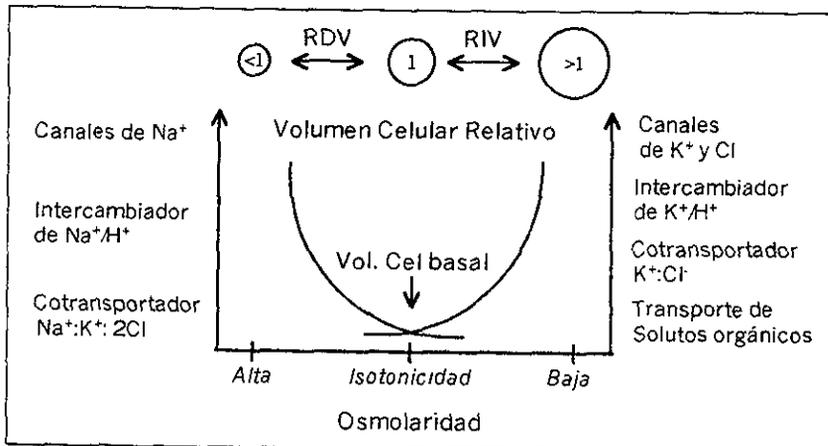


Figura 1. Mecanismos de regulación del volumen celular y principales transportadores involucrados. Cuando la osmolaridad de la solución aumenta y el agua sale de la célula obligatoriamente, el volumen disminuye e induce la entrada de iones (RIV). Inversamente cuando la osmolaridad es baja y el agua entra en la célula aumentando el volumen celular, ocurre la salida de iones y solutos (RDV).

Otra adaptación para evadir el efecto de las alteraciones en la composición iónica o estrés osmótico, es la producción y acumulación de osmolitos orgánicos; moléculas sintetizadas específicamente para crear osmolandad sin interferir en otras funciones celulares, en respuesta a un incremento de la fuerza iónica. Existen tres grupos de osmolitos utilizados en las células de mamífero: los polialcoholes, como el sorbitol y el inositol; las metilaminas, como la betaina; y los aminoácidos y derivados de aminoácidos, como la glicina, glutamina, aspartato y taurina (1;6-8). Estos compuestos reemplazan a las altas concentraciones de sales intracelulares que pueden perturbar la estructura proteica y la función enzimática, permitiendo a las células ser funcionales en altas osmolaridades. Un ejemplo son las células de la médula renal (1).

Regulación del incremento del volumen celular (RIV)

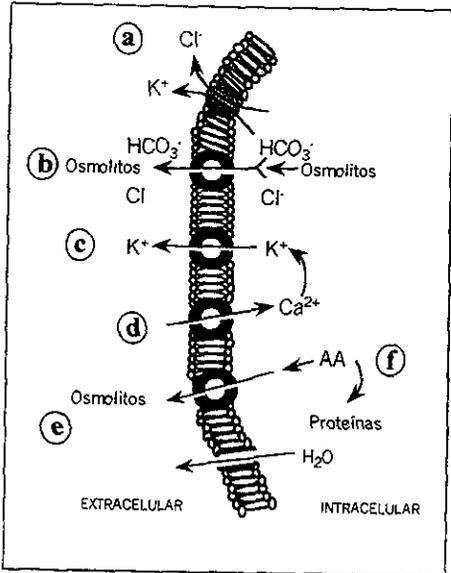


Figura 2. Principales mecanismos de la RIV. Activación del cotransportador de KCl (a), canales aniónicos que permiten el paso de Cl⁻ y HCO₃⁻ (b), canales de K⁺ (c), canales de Ca²⁺ o canales catiónicos no selectivos (d) que permiten la entrada de Ca²⁺ el cual activa canales de K⁺ sensibles a Ca²⁺, así como la liberación de osmolitos orgánicos (e), algunos de los cuales se liberan a través de canales aniónicos (b).

Los sistemas de transporte predominantes en la disminución del volumen celular son los canales de K⁺ y los canales aniónicos. Mientras que los canales de K⁺ son selectivos, los canales aniónicos permiten el paso de Cl⁻, HCO₃⁻, aniones orgánicos y osmolitos orgánicos neutros. Estos canales pertenecen a diferentes familias de proteínas. En este mecanismo puede participar también el cotransportador Na⁺(HCO₃⁻)(1, 89); además de los canales iónicos, existe otro sistema de transporte empleado durante el mecanismo de la RIV para la salida de KCl, se trata

del cotransportador electroneutro de K^+Cl^- (KCC), el cual transporta K^+ y Cl^- con una estequiometría 1:1, en cualquier dirección a través de la membrana plasmática (4;9). Este transportador se distingue por su independencia del Na^+ e insensibilidad a la bumetanida. Entre los aniones fisiológicos, requiere estrictamente del Cl^- y constituye el mecanismo principal para el RDV en células con altas concentraciones intracelulares de Cl^- , como los eritrocitos (4). Algunas células, de manera paralela, liberan KCl activando los intercambiadores de K^+/H^+ y de Cl^-/HCO_3^- (1). El H^+ y el HCO_3^- intercambiados por KCl forman CO_2 , el cual difunde al exterior de la célula y por lo tanto no es osmóticamente activo.

Se conoce poco de los mecanismos por los cuales el aumento del volumen celular activa los canales sensibles a volumen y al KCC. Para los primeros se sugiere una señalización por medio de Ca^{2+} en células epiteliales (4;10); mientras que, para el KCC se ha propuesto la inhibición de proteínas cinasas para la activación de este cotransportador en eritrocitos (4,11;12).

Regulación de la disminución del volumen celular (RDV)

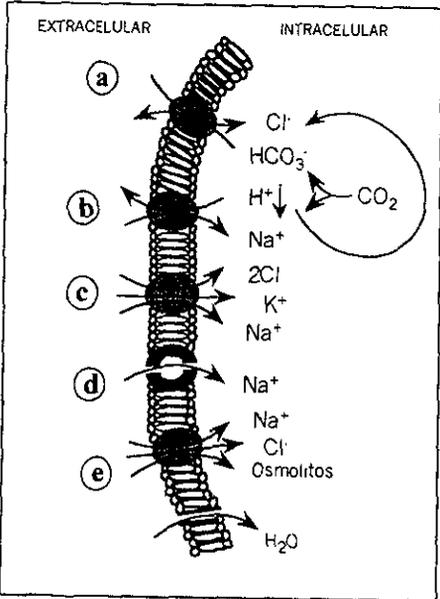


Figura 3. Principales mecanismos de la RDV Activación paralela del intercambio de Cl^-/HCO_3^- (a) y Na^+/H^+ (b), estimulación del cotransporte de $Na^+K^+2Cl^-$ (c), canales de Na^+ (d), así como la acumulación de osmolitos por el transporte acoplado de Na^+ (Cl^-) (e).

La disminución del volumen celular se regula principalmente, a través del cotransportador electroneutro $Na^+K^+2Cl^-$ (CSB2 o NKCC1) y el transportador antiporte Na^+/H^+ (NHE1). CSB2 regula el influjo acoplado de Na^+ , K^+ y Cl^- y se encuentra en, prácticamente, todos los tipos celulares y

se distingue por su sensibilidad a los diuréticos de asa como la bumetanida y la furosemida (4,67). NHE1 representa la isoforma ubicua de este transportador, produce un movimiento de iones al interior de la célula que la alcalinizan y activan al transportador antiporte $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. El resultado de lo anterior es una captación de NaCl con un flujo de H^+ y HCO_3^- , éstos últimos, se combinan para formar CO_2 , el cual difunde hacia el interior de la célula para regenerar el H^+ y el HCO_3^- .

La actividad de la bomba de $\text{Na}^+:\text{K}^+$ es necesaria durante la RDV, ya que provee la energía termodinámica para llevar a cabo este mecanismo, manteniendo una baja concentración intracelular de Na^+ e indirectamente, también una baja concentración de Cl^- dentro de la célula.

Se desconoce el mecanismo por el cual, la disminución del volumen celular activa a CSB2 o a NHE1. Debido a que la activación ocurre en cuestión de minutos, no puede deberse a un incremento en la síntesis de estos transportadores. Recientemente, se ha sugerido que la fosforilación de proteínas puede estar involucrada en esta activación (4) y por lo tanto alguna vía de señalización intracelular podría estar comprometida.

Regulación del volumen celular en ovocitos de *Xenopus laevis*

Las ranas, durante la reproducción, depositan sus ovocitos en estanques, los cuales presentan una osmolaridad más baja que la del plasma celular (200 mOsm), lo cual genera una fuerza de influjo de agua al ovocito, incrementando su volumen celular significativamente (13). Bajo estas circunstancias, los ovocitos deben poseer mecanismos de regulación del volumen para sobrevivir esta temporada. Con relación a lo anterior, se han identificado en los ovocitos, canales de Cl^- activados por hipotonicidad (14). Una vez que los ovocitos son fecundados, adquieren la capacidad de mantener su volumen y, aparentemente, se vuelven resistentes al incremento del volumen celular, a pesar de ser también permeables al agua. Esto puede deberse a cambios conformacionales del citoesqueleto (13), funcionando como un mecanismo de protección, ya que reduce la posibilidad de que la célula se expanda cuando se expone a un medio hipotónico, permitiéndole sobrevivir en el agua.

Hasta 1995 (13) se tenía la hipótesis de que los ovocitos no llevaban a cabo RIV, es decir, que no regulaban el incremento del volumen celular por medio de un flujo de KCl a través de transportadores, ni por flujo de osmolitos orgánicos. Se pensaba que esta regulación estaba dada por medio de canales iónicos sensibles a estiramiento. En 1997, Kelly et al (15) demostraron que aunque la envoltura vitelina de los ovocitos domina las propiedades elásticas del ovocito, la tensión que generan la membrana celular y la corteza, durante el aumento del volumen celular no es suficiente para activar los canales iónicos sensibles a estiramiento por los cuales puede ocurrir el flujo de osmolitos. Sin embargo, recientemente se ha obtenido evidencia preliminar de que los ovocitos de *Xenopus laevis* presentan la función de un cotransportador electroneutro de K^+Cl^- , el cual está relacionado con el control del volumen celular por medio de la RIV (16;17).

La envoltura vitelina rígida y la presencia de transportadores iónicos son algunas de las características requeridas por los ovocitos, dadas las grandes fuerzas externas a las que son expuestos durante la ovulación, la maduración y la embriogénesis.

Cotransportadores electroneutros cloro-catiónicos

Los cotransportadores electroneutros cloro-catiónicos constituyen una familia de proteínas de membrana, llamados así debido a que cada ión cloro que transportan, de un lado a otro de la membrana se acompaña de un catión, (sodio y/o potasio) de manera que no se produce cambio alguno en el potencial de membrana (18). Estos transportadores comparten dos características principales: requieren la presencia simultánea de todos los iones que van a transportar y una sensibilidad diferencial a los diuréticos de asa o a las tiazidas (19). Estas características funcionales han sido de gran utilidad para facilitar la identificación y clonación de los diferentes miembros de esta familia, en los últimos años. Hasta la fecha, se han identificado cuatro tipos de cotransportadores electroneutros cloro catiónicos: el cotransportador Na^+Cl^- sensible a tiazidas, los cotransportadores $Na^+K^+2Cl^-$ (CSB1 y CSB2) y el cotransportador Na^+Cl^- sensibles a diuréticos de asa (20) y los cotransportadores K^+Cl^- .

Los cotransportadores electroneutros cloro catiónicos, se expresan en una gran variedad de tejidos con funciones fisiológicas muy diversas (fig. 4). Cuando se localizan en la membrana apical de células epiteliales su función es la absorción y reabsorción de iones. En cambio, cuando están polarizados hacia la membrana basolateral su función es proveer a la célula con suficientes iones como Na^+ o Cl^- que serán posteriormente excretados hacia la luz a través de canales conductivos. En células no epiteliales como los fibroblastos y las neuronas, su función es mantener el volumen celular. El cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ incrementa su función en caso de hipertonicidad, mientras que el cotransportador de $\text{K}^+:\text{Cl}^-$ responde a hipotonicidad. Recientemente, se ha demostrado que los transportadores de $\text{K}^+:\text{Cl}^-$ son importantes para generar y mantener el gradiente de Cl^- intraneuronal, afectando de manera secundaria la respuesta a GABA y a otros neurotransmisores.

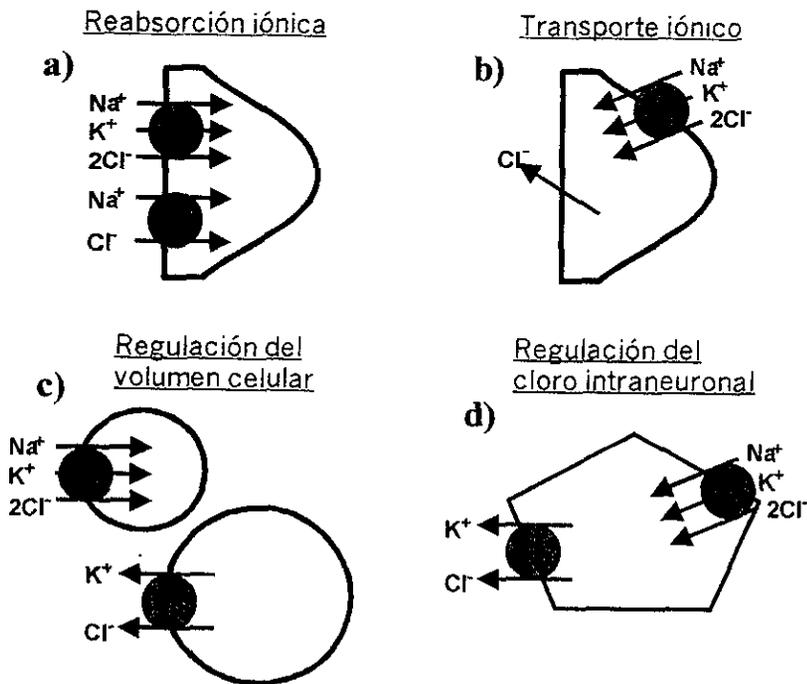


Figura 4. Funciones de los cotransportadores electroneutros. En la membrana basolateral (a) o apical (b), de células epiteliales, su función principal es la absorción o excreción de iones. En células no epiteliales están involucrados en la regulación del volumen celular (c) mientras que en el cerebro, intervienen en la regulación del cloro intraneuronal (d).

De la familia de los cotransportadores electroneutros cloro catiónicos se han identificado, a la fecha, ocho genes: dos genes para el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ sensible a bumetanida; uno que codifica para la isoforma apical específica del asa ascendente de Henle, denominada CSB1 y clonada a partir de rata (21), ratón (22) conejo (23) y humano (24), y otro para la isoforma basolateral o no epitelial, CSB2, clonada de tiburón (25;26), ratón (27), bovino (28), humano (29) y de la planta del tabaco (30). Del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ sensible a tiazidas (CST1) se conoce un sólo gen, clonado del pez lenguado (31), rata (21) y humano (32).

Del cotransportador de $\text{K}^+:\text{Cl}^-$ se han identificado cuatro genes; tres que codifican para isoformas ubicuas, KCC1 a partir de conejo (33) KCC3 de ratón y humano y KCC4 a partir de humano (16); y otro para una isoforma neuronal, KCC2 a partir de rata (34). Por último, recientemente se identificó otro cotransportador cloro catiónico llamado CCC8, a partir de una biblioteca genómica de corazón humano, del cual se desconoce aún su función (35). Además de los múltiples cDNA de cotransportadores electroneutros en vertebrados, se han encontrado posibles cDNA y/o secuencias EST (Expressed Sequence Tags) de éstos en *Manduca sexta*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, levaduras y cianobacterias (36).

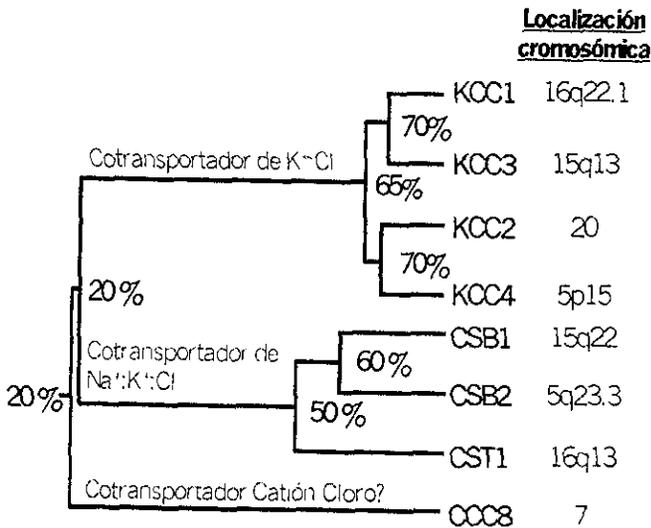


Figura 5. Arbol filogenético de los cotransportadores electroneutros cloro-catiónicos. Se muestran las dos ramas principales de la familia ($\text{K}^+:\text{Cl}^-$ y $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{Cl}^-$), los porcentajes de homología entre los miembros, así como la localización cromosómica de cada gen.

La figura 5 muestra el árbol filogenético de la familia de los cotransportadores electroneutros, así como los porcentajes de similitud que existen entre ellos. En éste se observan dos ramas principales; una de los transportadores que acoplan Na^+ : CSB1, CSB2 y CST, con una identidad entre ellos del 50%, y 60% entre CSB1 y CSB2 y otra rama de los que acoplan K^+ : KCC1, 2, 3 y 4 con una identidad del 65% entre ellos y del 70% entre las subramas KCC1/KCC3 y KCC2/KCC4. El porcentaje de identidad entre estas dos ramas principales es del 20%.

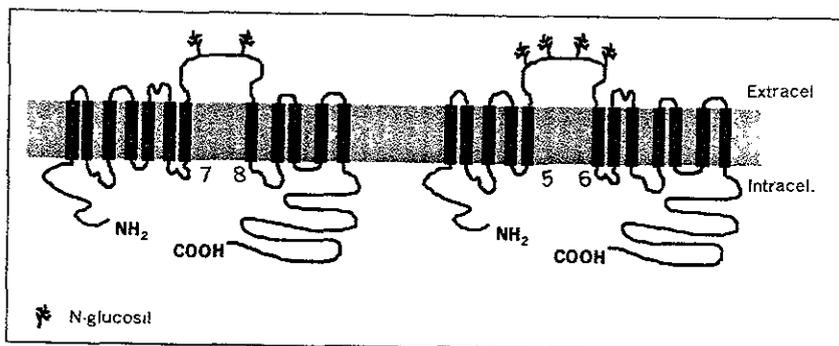


Figura 8. Topología básica de los cotransportadores electroneutros. Las secuencias de aminoácidos sugieren 12 segmentos transmembranales, delimitados por dominios amino y carboxi terminales intracelulares largos. Los transportadores de Na^+ (izq.) y K^+ (der.), difieren en la posición del asa extracelular.

Los cotransportadores electroneutros son proteínas de membrana de 1000 a 1200 residuos de aminoácidos y, a pesar de que presentan diferencias en la sensibilidad a diuréticos, tipo de iones que transportan y estequiometría, su estructura primaria sugiere por análisis de hidropatía, una topología básica similar en todos ellos (figura 6). Ésta consiste de 3 dominios principales: una región central hidrofóbica con 12 α -hélices, que probablemente corresponden a segmentos transmembranales, con un asa hidrofílica extracelular glicosilada, entre los segmentos transmembranales 7 y 8, para CSB y CST y entre el 5 y el 6, para los KCCs, un dominio amino terminal hidrofílico intracelular, relativamente corto, de 130 a 270 residuos de aa y un dominio carboxilo terminal hidrofílico intracelular largo, de 50 a 450 residuos de aminoácidos en el que existen múltiples sitios para fosforilación vía proteína cinasa C y proteína cinasa A (36). La homología entre los miembros de la familia es mayor en los

dominios transmembranales, aunque también es evidente en el dominio carboxilo terminal y las asas intracelulares.

Cotransportador de K^+Cl^- (KCC)

El cotransportador de potasio-cloro, miembro de la familia de cotransportadores cloro-catiónicos, regula el movimiento electroneutro acoplado de K^+ y Cl^- , a través de la membrana plasmática de la célula, contribuyendo a mantener la homeostasis celular tanto del agua, como de los electrolitos (34). Como mecanismo de transporte electroneutro, la dirección del movimiento neto de los iones está determinada, únicamente, por la suma de los potenciales químicos de cada ión. En condiciones fisiológicas normales, el cotransportador de K^+Cl^- es una vía de eflujo, favorecida por el potencial químico del K^+ , que lo dirige hacia el exterior y que es, a su vez, mantenido por la ATPasa de Na^+K^+ .

El KCC se distingue de los otros cotransportadores cloro-catiónicos por tres características principales: 1) no es dependiente de sodio; 2) puede ser activado por aumento del volumen celular y por el agente reductor de grupos sulfhidrilos *N*-etilmaleimida (NEM); 3) su sensibilidad al ácido acético $R(+)$ -[(2-*n*-butil-6,7-dicloro-2-ciclopentil-2,3-dihidro-1-oxo-1-*H*-indenil-5-yl)-oxy] (DIOA).

Este transportador presenta afinidad, ligeramente mayor, por la furosemida que por la bumetanida; sin embargo, su afinidad, en general, por los diuréticos de asa es significativamente menor que la del CSB (37).

En la mayoría de las células, donde se ha descrito el cotransporte de K^+Cl^- , su función primaria parece ser la de regular el volumen celular durante el mecanismo de RVD (9;16), por medio de un eflujo de K^+ , Cl^- y agua dirigida por ósmosis. El KCC también parece estar involucrado en el movimiento vectorial de sal y agua, a través de epitelios de secreción y absorción (37;38); así como en la secreción renal de K^+ (16;39). Además de las funciones anteriores, una isoforma del cotransportador, aparentemente lleva a cabo una función única en las neuronas, la cual es, mantener una baja concentración de cloro intraneuronal (37). Estas funciones o mecanismos fisiológicos pueden estar involucrados en fenómenos fisiológicos mayores; por ejemplo, los mecanismos de regulación del volumen celular parecen estar relacionados con el crecimiento celular y la apoptosis. (1;17).

El cotransportador de K^+Cl^- , se describió por primera vez, en 1937 por Davson, quien demostró un incremento en la permeabilidad del K^+ en eritrocitos de conejo, caballo y buey, cuando éstos aumentaron su volumen en hipoosmolaridad. Efectos similares se han demostrado en eritrocitos de perro y pato, así como en otros tipos celulares. También se ha estudiado, de forma amplia, la activación del cotransporte de K^+Cl^- por aumento del volumen celular y por NEM en eritrocitos de diferentes vertebrados (12;34;40). Actualmente, los eritrocitos permanecen como el modelo primario para el estudio de esta clase de transporte iónico; sin embargo, aún no se ha identificado qué isoforma del KCC presentan (17). En esta célula, los estudios con fosfatasa e inhibidores de cinasas, indican que la activación del cotransportador de K^+Cl^- , involucra un paso de defosforilación (41).

El transportador se ha identificado, también, en otras células y tejidos, por ejemplo, en neuronas (42), tejido epitelial (43), riñón (44;45), células del miocardio (46) músculo esquelético (47) y células de músculo vascular liso (48). Del mismo modo se han encontrado cotransportadores de K^+Cl^- en otras células, aparte de las de mamífero, como en las células hepáticas y eritrocitos de los peces teleósteos (49-52) y en glóbulos rojos de anfibios (53). En invertebrados también se han descubierto; por ejemplo, en las neuronas de langosta (54), túbulos de Malpigio de *Drosophila melanogaster* (55), en la hormiga de bosque *Formica polyctena* (56) y en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (57).

A la fecha, a partir de las bases de datos genómicas, se han identificado y clonado, con base en su semejanza con otros cotransportadores electroneutros cloro-catiónicos, cuatro genes que codifican para las isoformas del cotransportador de K^+Cl^- , denominados KCC1, KCC2, KCC3 y KCC4.

KCC1, se clonó a partir de eritrocitos de ratón (44), riñón humano y de cerdo, *Caenorhabditis elegans* (57), riñón de conejo y cerebro de rata (41); KCC2, a partir de cerebro de rata (34). KCC3 se clonó de células vasculares endoteliales (58), placenta (59) y cerebro humano (16;60) y, por último, KCC4 a partir de riñón de ratón y humano (16). Los análisis de hidropatía determinados por el algoritmo Kyte-Doolittle, a partir de las secuencias de amino ácidos de las cuatro isoformas, sugieren una estructura proteíca, similar a la de los otros cotransportadores cloro-catiónicos: 12 segmentos transmembranales y

dominios amino y carboxi terminales hidrofílicos, intracelulares. La diferencia estructural más aparente entre los cotransportadores de K^+Cl^- y los cotransportadores de Na^+ es el asa extracelular, con sitios potenciales de glicosilación, ya que en los KCC se encuentra entre los segmentos transmembranales 5 y 6 (ver figura 6) (41).

Respecto a las semejanzas y diferencias entre los cuatro transportadores, estos difieren en las secuencias de amino ácidos correspondientes a los segmentos transmembranales, principalmente en los dominios 2 (TM-2) y 4 (TM-4); ya que, a pesar de que se encuentran altamente conservadas, ningún dominio transmembranal en los cuatro KCC es idéntico. Datos previos de un amplio estudio de afinidad iónica en el cotransportador $Na^+K^+2Cl^-$, relacionan al dominio TM-2 con el transporte del catión, y al TM-4 con el del anión (16;61). Difieren también en la distribución de posibles sitios de fosforilación por tirosinas cinasas, proteína cinasa A (PKA) y proteína cinasa C (PKC) dentro de los dominios amino y carboxi terminales. Las asas extracelulares de los cuatro KCC se encuentran poco conservadas; sin embargo, todas contienen tres secuencias idénticas para sitios de glicosilación. El dominio carboxilo terminal contiene segmentos con gran homología entre los KCCs, intercalados con un número de regiones variables, mientras que el extremo carboxilo terminal es idéntico en las cuatro isoformas (16). Aparentemente, algunos de los segmentos citoplásmicos conservados están involucrados en interacciones proteína-proteína; sin embargo, ninguno de los KCC posee dominios proteicos de señalización reconocibles (16;62).

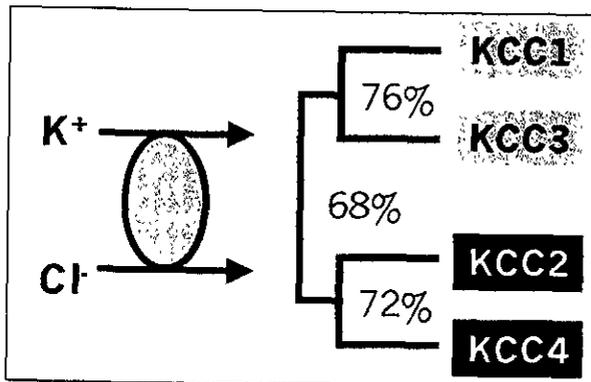


Figura 7. Relaciones filogenéticas entre los cotransportadores de K^+Cl^- de mamífero. Los KCCs se dividen en dos grupos. Se muestran los porcentajes de identidad entre éstos, así como entre los miembros de cada grupo.

El porcentaje de identidad entre los KCC es de 65-71%. Los análisis filogenéticos y genómicos indican que KCC1 y KCC3 forman un subgrupo, mientras que KCC2 y KCC4 forman otro, con base en el porcentaje de identidad entre ellos: 69% para el primero y 71% para el segundo (Fig. 7).

El cotransporte de K^+Cl^- , presenta gran heterogeneidad molecular y fisiológica, debido a esto, se conoce poco de sus propiedades funcionales, farmacológicas y fisiológicas. A partir de diferentes estudios de caracterización, clonación e hibridación; así como análisis funcionales y cinéticos, se ha podido obtener información de cada isoforma: KCC1 es una isoforma ubicua localizada en el cromosoma humano 16q22.1 (20), aparentemente constituye una vía de eflujo, relacionada con la regulación del volumen celular (17) y la reabsorción de K^+ y Cl^- en el riñón humano (63). Debido a su amplia distribución tisular, se considera como la principal isoforma involucrada en la regulación del volumen celular (41). KCC2 constituye una isoforma específica del cerebro, en donde puede funcionar como una vía de influjo y eflujo, relacionada en la regulación del cloro intraneuronal y, por lo tanto, en el efecto inhibitor/ excitador del GABA (20). KCC3 presenta dos isoformas, resultado de un mecanismo de empalme alternativo: KCC3a y KCC3b, su localización genómica está en el cromosoma 15q14, en una sección que se ha relacionado con dos subtipos de epilepsia idiopática, pudiendo representar un gen candidato para esta enfermedad (58;64). Se han encontrado transcritos de ambas isoformas en corazón, cerebro, músculo esquelético, riñón, placenta, pulmón, hígado y páncreas. Dada su distribución tisular, KCC3 probablemente cumpla varias funciones: puede estar involucrado potencialmente como una vía de influjo en la regulación del volumen celular y el transporte epitelial de sal y agua. Mientras que en los tejidos donde se expresa ampliamente, como en el corazón, músculo esquelético y cerebro, puede funcionar como regulador o amortiguador de las concentraciones de K^+ y Cl^- en las células y el espacio intersticial (59). Por último, KCC4 se localiza en el cromosoma 5p15 y se distribuye ampliamente en el corazón y riñón, en éste último puede estar relacionado con el transporte iónico basolateral, como vía de influjo y eflujo; en la porción gruesa del asa ascendente de Henle (16;65) y con los casos de síndrome de Bartter, no ocasionados por mutaciones en otros transportadores o canales como el CSB1 (NKCC2), el canal de K^+ sensible a ATP (ROMK) y/o el canal renal de cloro

(CLC-NKB) (16;66) Dados los patrones de expresión de los cuatro KCC, es muy probable que algunos tipos celulares expresen más de una isoforma.

Tabla 1. Características Biofísicas y Farmacológicas de los KCC

Isoforma	Localización cromosómica	Tamaño de la proteína (KDa)	Km (mM) K ⁺ Cl ⁻		Activadores	Inhibidores	Tejidos
KCC1	16q22.1,8	1085	>25	>50	Aumento del volumen cel NEM Estaurosporina Mg _i ²⁺ ↓	Bumetanida Furosemida DIDS	Ubicua
KCC2	20	1116	7	>50	NEM	Furosemida	Neurona
KCC3a	15q13	1150	10	32	Aumento del volumen cel NEM Estaurosporina Mg _i ²⁺ ↓	DIOA Furosemida	Corazón Riñón Cerebro Músculo Estómago Eritrocito
KCC3b	15q13	1099	?	?			Riñón
KCC4	5p15	1083	17.5	17.2	Aumento del volumen celular NEM	Furosemida Bumetanida DIOA	Riñón Corazón

A partir de esta comparación funcional y estructural es claro que, los KCC's difieren en algunas características importantes, incluyendo la respuesta al cambio en el volumen celular y la afinidad iónica; sin embargo, los cuatro comparten las siguientes características: 1) un cotransporte de K⁺:Cl⁻ activado por aumento del volumen celular inducido por condiciones hipotónicas, 2) un cotransporte de K⁺:Cl⁻ activable con el agente alquilante NEM y con estaurosporina, 3) requieren de un evento de desfosforilación para la activación del transporte, por aumento del volumen celular, 4) el cotransporte puede ser inhibido con caliculina y ácido okadaico. (9;37;41;57).

La regulación fisiológica de la subfamilia de los KCC es compleja. Además del gradiente electroquímico de sus ligandos, la evidencia experimental sugiere que la activación de este transporte pasivo está regulada también por

rearrreglos del citoesqueleto, cambios en la concentración intracelular de Mg^{2+} (9;58;67) del pH intracelular, concentración de oxígeno, niveles de ATP (68) e incluso se ha demostrado que, la diferenciación celular también está asociada con cambios en la expresión génica de los KCC (69).

Cotransportador endógeno de K^+ : Cl^- en ovocitos de *Xenopus laevis*.

Las cuatro isoformas del transportador de K^+ : Cl^- se han estudiado con diferentes técnicas de biología molecular y en diferentes sistemas de expresión heteróloga; principalmente en el sistema de células HEK 293 correspondiente a células embrionarias de riñón humano (37;41;44;57;59); sin embargo, con el fin de ampliar y conocer nuevos sistemas de expresión, recientemente se ha utilizado el sistema de expresión en ovocitos de la rana africana *Xenopus laevis*, en el cual también se han realizado estudios de los cuatro KCC (16;17). Los ovocitos de *Xenopus*, inicialmente se utilizaron en estudios de biología del desarrollo (Hediger, M. A., Nature 1987, Dascal, N, Nature, 1984) (70;71) y comenzaron a utilizarse para la expresión de RNA exógenos que codifican para canales, transportadores y cotransportadores. Su utilidad se debe a la capacidad de traducir fielmente estos RNA, y a la facilidad con que el material genético, puede ser introducido por microinyección. Asimismo, constituyen un sistema de fácil manejo, debido al gran tamaño de las células y su producción que además de asincrónica es continua, facilitando de esta manera los análisis funcionales.

Con los estudios de expresión funcional de las isoformas del cotransportador de K^+ : Cl^- en este sistema, se ha obtenido evidencia preliminar de que los ovocitos de *Xenopus* presentan la función de un cotransportador de K^+ : Cl^- (16).

HIPÓTESIS

Si los ovocitos de *Xenopus laevis* presentan un cotransportador endógeno de K^+Cl^- entonces éste compartirá propiedades funcionales y moleculares con las otras isoformas del cotransportador de K^+Cl^- expresadas en otros organismos. Así mismo, ya que la evidencia sugiere que esta proteína incrementa su función en medios hipotónicos, es posible que el KCCx tenga un papel importante en la regulación del volumen celular del ovocito.

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es:

-Caracterizar, funcional y molecularmente, el cotransportador de K^+Cl^- que expresan los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*, de manera que esta información pueda utilizarse para minimizar las interpretaciones erróneas en los experimentos de expresión funcional de proteínas heterólogas; así como para la comprensión de la fisiología del transporte de K^+Cl^- mediado por dicho transportador.

Los objetivos particulares son:

- Obtener los principales parámetros cinéticos del cotransportador y compararlos con los de las otras isoformas, ya descritos
- Evaluar el efecto de agentes inhibidores y activadores de las otras isoformas en la función del KCCx, con el fin de obtener su perfil regulador.
- Identificar, mediante diferentes análisis moleculares y funcionales, la isoforma presente en los ovocitos.

HIPÓTESIS

Si los ovocitos de *Xenopus laevis* presentan un cotransportador endógeno de K^+Cl^- entonces éste compartirá propiedades funcionales y moleculares con las otras isoformas del cotransportador de K^+Cl^- expresadas en otros organismos. Así mismo, ya que la evidencia sugiere que esta proteína incrementa su función en medios hipotónicos, es posible que el KCCx tenga un papel importante en la regulación del volumen celular del ovocito.

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es:

-Caracterizar, funcional y molecularmente, el cotransportador de K^+Cl^- que expresan los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*, de manera que esta información pueda utilizarse para minimizar las interpretaciones erróneas en los experimentos de expresión funcional de proteínas heterólogas; así como para la comprensión de la fisiología del cotransporte de K^+Cl^- mediado por dicho transportador.

Los objetivos particulares son:

- Obtener los principales parámetros cinéticos del cotransportador y compararlos con los de las otras isoformas, ya descritos.
- Evaluar el efecto de agentes inhibidores y activadores de las otras isoformas en la función del KCCx, con el fin de obtener su perfil regulador.
- Identificar, mediante diferentes análisis moleculares y funcionales, la isoforma presente en los ovocitos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Caracterización funcional

La caracterización funcional del cotransportador endógeno se llevó a cabo, según los siguientes procedimientos:

Cirugía, Extracción y Preparación de Ovocitos de *Xenopus laevis*

Ranas hembras adultas del género *Xenopus* (Carolina Biological Supply Company) se mantuvieron, en peceras, en el bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", en condiciones de temperatura y humedad constantes (16° C y 65 % respectivamente). Se alimentaron con alimento seco para rana (Carolina Biological Supply Company) y el agua se les cambió dos veces por semana. Para la cirugía, las ranas se anestesiaron por inmersión en una solución de tricaina (ácido etil éster 3-aminobenzoico, SIGMA) al 0.17%. Una vez anestesiadas se les hizo una incisión, en la parte inferior del abdomen, para exponer los ovarios, y cortar suficientes lóbulos ováricos. Posteriormente los lóbulos se colocaron en una caja de petri con solución ND96 sin calcio [mM: 96.0 NaCl, 2.0 KCl, 1.8 CaCl₂, 1.0 MgCl₂, y 5.0 HEPES/Tris, pH 7.4]. La rana se suturó con seda del no. 5, y una vez recuperada, se regresó a su pecera. Los lóbulos se cortaron en pequeños racimos, y para separar los ovocitos se incubaron 1 h. en solución ND96 sin Ca²⁺, con agitación constante, a la cual se le agregaron 2 mg/ml de colagenasa. Transcurrido este tiempo los ovocitos se lavaron cuatro veces en ND96 sin Ca⁺ y se les retiró la capa folicular con unas pinzas finas y bajo el microscopio estereoscópico(72).

Los ovocitos defoliculados se incubaron durante dos días en ND96 a 18° C en un medio con 2.5 mM de piruvato de sodio y gentamicina a 5.0 µg/ml. El medio de incubación se cambió cada 24 hrs. El día de los experimentos, los ovocitos se transfirieron a un medio ND96 sin cloro [mM: 96.0 isetonato de Na⁺, 2.0 gluconato de K⁺, 1.8 gluconato de Ca²⁺, 1.0 gluconato de Mg²⁺, 5.0 Hepes, pH 7.4], 2 h. antes del ensayo de captación.

El análisis de la función y cinética del cotransportador se evaluó midiendo la captación de rubidio radiactivo (⁸⁶Rb⁺) (New England Nuclear), en grupos de

hasta 15 ovocitos, dado que este isótopo puede transportarse por las mismas vías que el K^+ . La captación se midió bajo condiciones isotónicas e hipotónicas, siguiendo, en general, el siguiente protocolo: un período de precaptación o incubación de 30 minutos en un medio hipotónico libre de Cl^- y K^+ (en mM: 50 N-metil-D-glucamina-(NMDG)-gluconato, 4.6 gluconato de Ca^{2+} , 1.0 gluconato de Mg^{2+} , 5.0 HEPES/Tris, pH 7.4) con 1.0 mM de ouabaína, seguido por un período de captación, de 60 minutos, en un medio hipotónico libre de Na^+ que contenía KCl con concentraciones variables de K^+ y Cl^- (en mM: 0-50 NMDG-Cl, 0-50 KCl, 0-50 NMDG-gluconato, 1.8 $CaCl_2$, 1.0 $MgCl_2$, 5.0 HEPES/Tris, pH7.4), adicionado con 1.0 mM de ouabaína y 2.5 μCi de $^{86}Rb^+$. Los experimentos, en condiciones isotónicas, se llevaron a cabo utilizando las mismas soluciones que para los de condiciones hipotónicas, pero adicionadas con sacarosa a una concentración de 3.5mg/ml para incrementar la osmolaridad de las soluciones a las condiciones isosmolares de los ovocitos (210 mOsm/Kg). La ouabaína se añadió para bloquear la $Na^+:K^+:ATPasa$ e impedir la captación de $^{86}Rb^+$ por esta vía. La ausencia de Na^+ extracelular y la hipotonicidad del medio de captación, evitan la entrada de $^{86}Rb^+$ o el intercambio de $^{86}Rb^+-K^+$, a través del cotransportador endógeno de $Na^+:K^+:2Cl^-$ del ovocito.

Se midió también la captación de $^{36}Cl^-$ siguiendo el mismo protocolo para la precaptación. La captación se realizó en un medio isotónico o hipotónico libre de Na^+ durante 30 minutos en presencia de 1 $\mu Ci/ml$ de $^{36}Cl^-$.

Todas las captaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Al final del período de captación de cada experimento, los ovocitos se lavaron cinco veces en solución de captación fría, libre de isótopo, para remover los restos extracelulares de éste. Después, los ovocitos se disolvieron en dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% y se determinó la incorporación de $^{86}Rb^+$ para cada ovocito, por medio de un contador de centelleo β (Beckman).

Con base en el protocolo anterior, para evaluar la función y cinética del cotransportador, se realizaron los siguientes experimentos:

a) Captación de $^{86}Rb^+$ a través del tiempo: Para analizar la activación del KCCx a través del tiempo, los ovocitos se mantuvieron 30 minutos en precaptación en

un medio hipotónico en ausencia de K^+ y Cl^- y, después, en captación de $^{86}Rb^+$ en tiempos de 5, 10, 30, 60, 90 y 120 minutos en un medio con 10.0 mM de K^+ , en ausencia o presencia de 50.0 mM de Cl^- .

b) Eflujo de ^{86}Rb : Los ovocitos se incubaron 1h. en ND96 isotónico en presencia de 5.0 $\mu Ci/ml$ de $^{86}Rb^+$. Al final de este período se lavaron cinco veces y fueron transferidos a una solución hipotónica que contenía: (en mM) 48.0 gluconato de NMDG, 2.0 KCl, 1.8 $CaCl_2$, 1.0 $MgCl_2$, 5.0 HEPES/Tris y 1.0 ouabaina sin $^{86}Rb^+$ extracelular, en ausencia o presencia de 2.0 mM de furosemida extracelular. A continuación, se midió el remanente de $^{86}Rb^+$ en los ovocitos y la concentración de éste en el medio extracelular, a través del tiempo, con el fin de comprobar el eflujo de iones en el ovocito activado por el aumento del volumen celular

c) Sensibilidad a inhibidores: Los ovocitos se expusieron a bumetanida y furosemida, inhibidores de los cotransportadores electroneutros; y a DIOA y DIDS (ácido 4,4-disotiocianoestilbeno-2,2-disulfónico), dos inhibidores del transporte de K^+ y Cl^- ; en una concentración de 100.0 μM en el período de captación, para analizar su efecto en la función del cotransportador.

d) Efecto de otros aniones: Se midió la captación de $^{86}Rb^+$ del KCCx en presencia de otros aniones además del Cl^- , en ovocitos expuestos a un medio con 40.0 mM de NMDG-gluconato y 10.0 mM de alguno de los siguientes compuestos: KBr, KH_2PO_4 , KI, gluconato de K^+ o tiocianato de K^+ (KSCN). Los ovocitos control se expusieron a una solución de captación con 40.0 mM de gluconato de NMDG y 10.0 mM de KCl en un tiempo de 60 minutos. El período de precaptación para ambos grupos se realizó en una solución con 50.0 mM de gluconato de NMDG.

e) Análisis cinético de la captación de $^{86}Rb^+$: Las captaciones para determinar la afinidad del transportador por el K^+ y el Cl^- se realizaron en un medio extracelular con una osmolaridad de $\sim 110 mOsm/kg$, con una concentración fija de 50.0 mM de Cl^- ó 20.0 mM de K^+ y concentraciones variables del contraión, entre 0.0 y 50.0 mM, en un período de 60 minutos. Para mantener la

osmolaridad y la fuerza iónica se utilizó gluconato como sustituto del Cl^- y NMDG como sustituto del K^+

f) Análisis cinético de la inhibición por diuréticos de asa: Para analizar el efecto de diferentes concentraciones de furosemida y bumetanida, en la actividad del cotransportador endógeno, se expusieron grupos de aproximadamente 10 ovocitos en los periodos de precaptación y captación, a concentraciones crecientes de 20.0 a 2000.0 μM de estos diuréticos, administradas en siete dosis.

g) Activación por el agente alquilante N-etilmaleimida (NEM): Dado que el agente NEM activa el transporte de K^+ y Cl^- en algunos tipos celulares (9), se analizó el efecto de éste en ovocitos incubados en condiciones isotónicas en presencia de 10 mM de K^+ y ausencia o presencia de 50 mM de Cl^- , los cuales se expusieron a una concentración 1.0 mM de NEM, 10 minutos antes de la captación.

h) Efecto de la inhibición de fosfatasa: Se ha propuesto que la activación en los cotransportadores de $\text{K}^+:\text{Cl}^-$, inducida por hipotonicidad, aparentemente involucra un paso de desfosforilación (73); debido a lo anterior, se analizó el efecto de la inhibición de algunas fosfatasas, para lo cual los ovocitos se expusieron a 100.0 nM de caliculina A, que inhibe la función de las fosfatasas 1 y 2a (PP1 y PP2A), 1.0 nM de ácido okadaico, inhibidor específico de PP2A ó 100.0 μM de cipermetrina, inhibidor de la proteína fosfatasa 2b (PP2B), durante el periodo de precaptación y captación. La captación se realizó en condiciones isotónicas o hipotónicas en presencia o ausencia de Cl^- extracelular y 10mM de K^+ .

i) Efecto del cloruro de mercurio (HgCl_2) y el agente reductor ditioneitol (DTT): Se ha reportado que la función de muchos transportadores iónicos es afectada cuando se exponen a mercurio (74-76). Por esto se analizó el efecto del HgCl_2 en la captación de $^{86}\text{Rb}^+$. En precaptación, los ovocitos se expusieron a alguno de los siguientes tratamientos: 10.0 mM DTT por 30 minutos, 150.0 μM HgCl_2 durante 15 minutos ó 10.0 mM DTT 30 por minutos. y 150.0 μM HgCl_2 durante

los últimos 15 minutos. Ni el HgCl_2 ni el DTT estuvieron presentes en el período de captación, el cual se llevó a cabo en condiciones isotónicas, en presencia o ausencia de Cl^- extracelular.

A continuación, en la tabla 2 se presentan los reactivos empleados en los diferentes experimentos así como una breve descripción de su efecto.

Tabla 2. Drogas utilizadas en los experimentos y descripción de su función.

DROGA	FUNCIÓN
Ouabaina	Inhibir la bomba $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{ATPasa}$
Bumetanida y Furosemida	Diuréticos de asa. Inhibidores de los cotransportadores electroneutros de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ y $\text{K}^+:\text{Cl}^-$
DIOA	Inhibidor del transporte de $\text{K}^+:\text{Cl}^-$ en concentraciones de $100 \mu\text{M}$
DIDS	Inhibidor del transporte aniónico
NEM	Activador del transporte de $\text{K}^+:\text{Cl}^-$
Caliculina A	Inhibidor específico de la fosfatasa 1 en concentraciones de 100.0 nM
ácido okadaico	Inhibidor específico de la fosfatasa 2a en concentraciones de 1.0 nM
Cipermetrina	Inhibidor específico de la fosfatasa 2b en concentraciones de 100.0 pM
HgCl_2	Altera la función de las proteínas reaccionando con los grupos cisteino sulfhidrilo (SH_2)
DTT	Agente reductor de enlaces disulfuro

Análisis Estadístico

El nivel de $p < 0.05$ de dos colas se tomó como significativo y los resultados se presentan como la media \pm el error estándar (\pm SE). La significancia de las diferencias entre los grupos se analizó con las pruebas paramétricas de ANOVA, de una sola vía con comparación múltiple, utilizando la corrección de Bonferroni o con el análisis de Kruskal-Wallis, de una sola vía de varianza en rangos y con el método de Dunn para procedimientos de comparaciones múltiples donde fuera necesario.

2. Caracterización molecular

La caracterización molecular del KCCx se llevó a cabo de la siguiente manera:

Extracción de RNA total y mensajero (RNAt y RNAm) a partir de Ovocitos y Tejidos de *Xenopus*

A partir de ovocitos desfoliculados y de los tejidos de una rana *Xenopus* sacrificada, se realizó la extracción del RNAt siguiendo el método de homogeneización en isotiocianato de guanidina y ultracentrifugación en gradientes de cloruro de cesio (CsCl_2) (Apéndice B) y el método de "Tripure Isolation Reagent". Los tejidos empleados fueron: bazo, cerebro, corazón, estómago, hígado, intestino, músculo esquelético y pulmón. A partir del RNAt se obtuvo el RNAm con el estuche "mRNA Isolation Kit" (Boehringer). La calidad del RNAt obtenido se corroboró mediante electroforesis en gel de agarosa-formaldehído al 1% (Apéndice C) teñido con bromuro de etidio y expuesto a luz ultravioleta para observar la integridad de las bandas correspondientes a las subunidades ribosomales 28s y 18s. La concentración de ambos RNAs se determinó por espectrofotometría de luz ultravioleta a 260 nm con un espectrofotómetro Beckman DU640.

Amplificación del KCCx a partir de RT-PCR

Se realizó transcripción reversa (RT) a partir de 10 µg de RNAm de ovocitos para obtener el DNA complementario de esta célula (cDNAovo) (Apéndice D) Aproximadamente, una décima parte de las muestras de RT se empleó para la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Apéndice D), en presencia de unos iniciadores específicos llamados KCCx (Life Technologies, MD), diseñados a partir de una secuencia idéntica de los cuatro KCCs: iniciador sentido 5'-CTGGGCAATAGGACTCTGTCT-3' y el antisentido TGAAGGCCAGGCCAAGGT-3' y que amplifican un fragmento de 582 pb que incluye parte del segmento transmembranal 5 hasta el 8. También se realizó PCR a partir del cDNA de KCC1 de conejo (rbKCC1), cDNA de KCC3 de humano (hKCC3) y cDNA de KCC4 de ratón (mKCC4) como molde con iniciadores diseñados, específicamente, para cada cDNA (Life Technologies, MD).

Para la PCR se realizaron 35 ciclos, de acuerdo con el siguiente protocolo: 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 1 minuto de alineación a 55°C y 1 minuto de extensión a 72°C. El último ciclo seguido por un paso adicional de extensión de 5 minutos a 72°C. Los productos de la PCR se separaron en un gel de acrilamida-bis acrilamida al 5% (Apéndice C) y su presencia se detectó mediante tinción con bromuro de etidio y visualizados bajo una lámpara de luz ultravioleta.

Southern Blot

Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 1.5% y se transfirieron a una membrana de nylon utilizando metodología convencional (77). El Southern blot se realizó en condiciones de baja severidad (Apéndice E), con sondas no radiactivas específicas para el cDNAovo y para el cDNA de KCC1, 3 y 4, sintetizadas mediante PCR con el estuche "PCR DIG probe synthesis kit" (Boehringer Mannheim, Germany), a partir de cada cDNA y sus iniciadores correspondientes. La hibridación de las bandas se detectó mediante inmunodetección con el estuche "DIG Nucleic Acid Detection Kit" (Boehringer Mannheim, Germany).

Distribución Tisular del KCCx en *Xenopus laevis*

Se realizó una búsqueda BLAST en la base de datos NCBI EST (Expressed Sequence Tags database) del GenBank, y se encontró un cDNA de *Xenopus* con una identidad de 76% con el KCC1 de rata. A partir de esta secuencia se diseñaron dos pares de iniciadores específicos llamados KCCx1 (iniciador sentido 5'-ACAGTACTTCTGGGAGACTACC-3' y antisentido 5'-ATACGTAAATGATAAAGAAAGG-3') y KCCx2 (iniciador sentido 5'-AGCAGAGCAGGCACTGAAACAC-3' e iniciador antisentido 5'-GGAAGGGCAGAAGCATAAGC-3') que amplifican un fragmento de 528 pb y de 359 pb, respectivamente.

Paralelamente, se realizó RT con 10 µg del RNAt de los tejidos de rana y con una décima parte de estas muestras se hizo PCR con los iniciadores KCCx1 siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Los productos de PCR se separaron en un gel de acrilamida-bis acrilamida al 5% y su presencia se detectó mediante tinción con bromuro de etidio y visualizados bajo una lámpara de luz ultravioleta.

A continuación se realizó un Southern blot con los productos de PCR en condiciones de alta severidad (Apéndice E) con una sonda no radiactiva sintetizada mediante PCR a partir de cDNAovo y los iniciadores KCCx1, con el estuche "PCR DIG probe synthesis kit" (Boehringer Mannheim, Germany). La hibridación de las bandas fue detectada mediante inmunodetección con el estuche "DIG Nucleic Acid Detection Kit" (Boehringer Mannheim, Germany).

Secuenciación del KCCx

Se realizó PCR con cDNAovo y los iniciadores KCCx1 con el protocolo descrito anteriormente. El producto de PCR se separó en un gel de agarosa al 1.5% y su presencia se detectó mediante tinción con bromuro de etidio y visualizado bajo una lámpara de luz ultravioleta, para extraerlo y purificarlo con el estuche "QIAquick Gel Extraction Kit" (QIAGEN), según las instrucciones del fabricante. El producto final se secuenció con un secuenciador automático en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Una vez obtenida esta secuencia de *Xenopus*, se alineó como secuencia de amino ácidos con los cDNAs de cuatro

RESULTADOS

Caracterización Funcional

Las siguientes gráficas muestran la captación de $^{86}\text{Rb}^+$ en ovocitos de *Xenopus laevis*. Cada gráfica muestra en las ordenadas la captación de $^{86}\text{Rb}^+$ en picomoles por ovocito por hora (pmol/ovocito/h) y en las abscisas las condiciones a las que fueron sometidos. Cada barra representa el valor promedio \pm el error estándar de un grupo de aproximadamente 15 ovocitos.

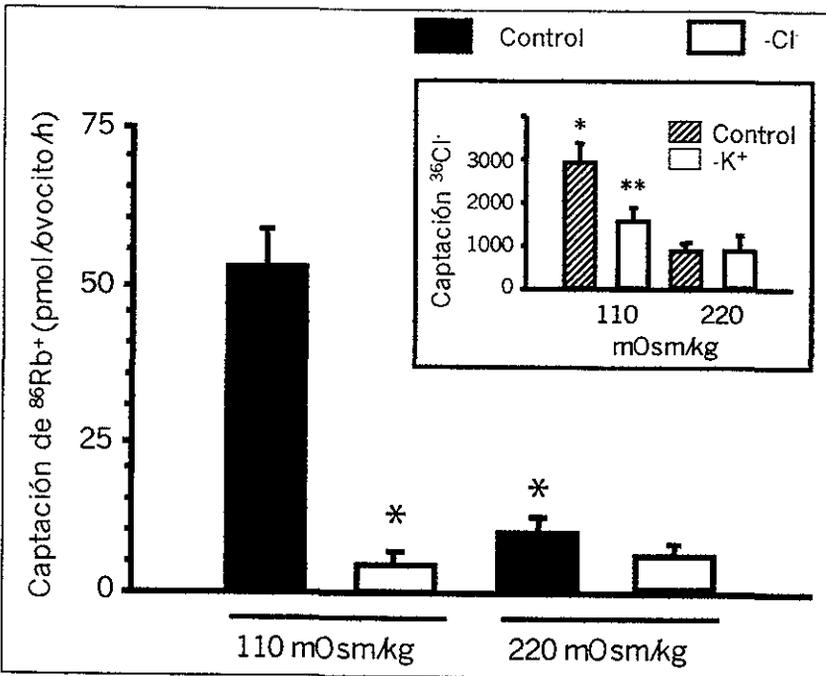


Figura 8. Actividad del cotransportador endógeno de $\text{K}^+:\text{Cl}^-$. Las captaciones de $^{86}\text{Rb}^+$ se llevaron a cabo en condiciones hipo e isotónicas, en presencia de 2mM de K^+ . Cada barra representa el promedio de 7 experimentos con diferentes ranas. * Significativamente diferente del grupo control en 110 mOsm/kg ($P < 0.001$). Recuadro: análisis de la captación de $^{36}\text{Cl}^-$ en condiciones hipo e isotónicas. * $P < 0.01$ vs. la captación en 220 mOsm/kg. ** $P < 0.01$ vs. la captación en el grupo control en 110 mOsm/kg.

La figura 8 muestra la caracterización del cotransportador endógeno de $\text{K}^+:\text{Cl}^-$ de los ovocitos de *Xenopus laevis* en un medio hipotónico (110 mOsm/kg) e isotónico (220 mOsm/kg). La actividad del cotransportador (captación de $^{86}\text{Rb}^+$) bajo condiciones hipotónicas en presencia de Cl^- incrementó a un valor de 52.5

± 11.0 pmol/ovocito/h ($P < 0.00001$); éste incremento en la captación fue dependiente de Cl^- , ya que en el medio hipotónico libre de éste ion, se redujo a 5.22 ± 1.0 pmol/ovocito/h ($p < 0.001$). En condiciones isotónicas la captación fue de 10.1 ± 1.4 pmol/ovocito/h, la cual se redujo a 6.3 ± 1.3 pmol/ovocito/h cuando los ovocitos se sometieron a un medio libre de Cl^- . Sin embargo, no existe una diferencia significativa. Lo anterior demuestra que los ovocitos de *Xenopus laevis* expresan un cotransportador endógeno de $\text{K}^+:\text{Cl}^-$ activable en hipotonicidad y dependiente de Cl^- .

En el recuadro se muestra la captación de $^{36}\text{Cl}^-$ en los ovocitos en presencia de 10 mM y 50 mM de K^+ y Cl^- extracelular, respectivamente. En condiciones isotónicas en presencia o ausencia de K^+ , la captación fue similar [908 ± 124 vs. 912 ± 346 pmol/ovocito/h, $P =$ no significativa (NS)]. Mientras que en condiciones hipotónicas se indujo un incremento en la captación de $^{36}\text{Cl}^-$ de 2960 ± 455 pmol/ovocito/h ($P < 0.01$) el cual fue dependiente de K^+ (1615 ± 296 pmol/ovocito/h, $P < 0.01$). Es decir, que el transporte de $^{36}\text{Cl}^-$ presente en los ovocitos es dependiente de K^+ y aparente, sólo durante el aumento de volumen celular.

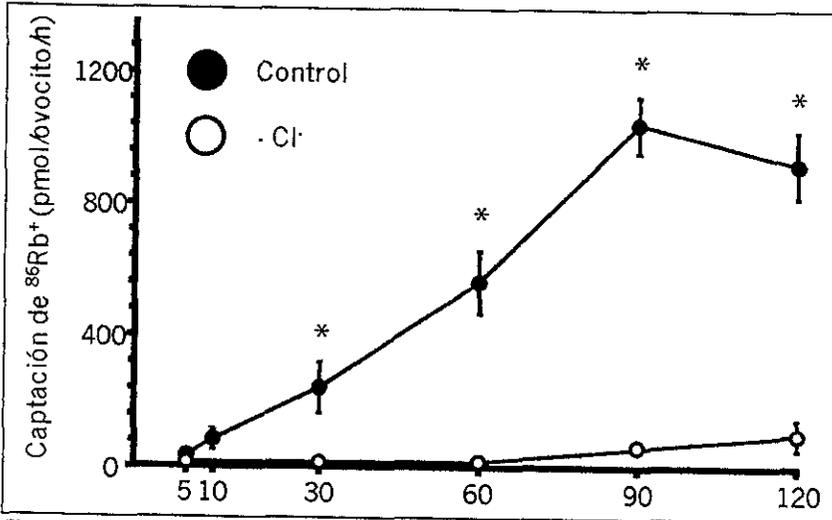


Figura 9. Curso temporal en minutos, de la captación de $^{86}\text{Rb}^+$ en ovocitos de *Xenopus laevis*. Los ovocitos se incubaron en ausencia (○) o presencia (●) de Cl^- , durante los períodos indicados. Cada punto representa la media de 15 ovocitos. * $P < 0.001$ vs. el grupo sin Cl^- .

En la figura 9 se muestra el curso temporal de la captación de $^{86}\text{Rb}^+$ en un medio hipotónico con y sin Cl^- y observamos que en presencia de Cl^- extracelular, la actividad del transportador incrementó de manera proporcional al tiempo durante los primeros 90 minutos. Mientras que sin Cl^- la captación fue mínima debido a la dependencia del cotransportador por este ión.

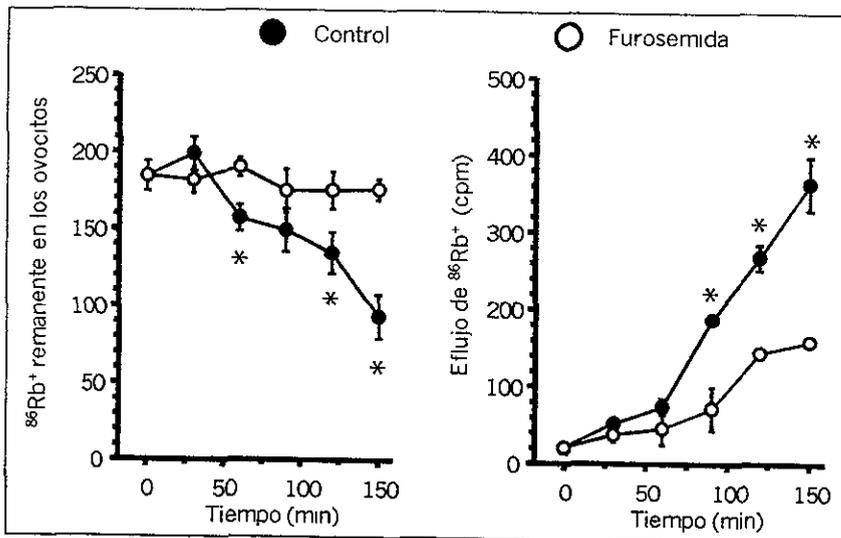


Figura 10. Eflujo de $^{86}\text{Rb}^+$ en ovocitos de *X. laevis* en ausencia (●) o presencia (○) de 2mM de furosemida. Izq: curso temporal del $^{86}\text{Rb}^+$ remanente en los ovocitos (en pmol/ovocito). Cada punto representa la media de 15 ovocitos. Der: curso temporal de la aparición de $^{86}\text{Rb}^+$ en el medio extracelular (cpm = cuentas por minuto). Cada punto representa la media de 3 experimentos. * $P < 0.01$ vs. el mismo punto en presencia de furosemida.

Se ha demostrado que el cotransportador de $\text{K}^+:\text{Cl}^-$ constituye una de las principales vías de eflujo durante el aumento del volumen celular, como parte del mecanismo de RIV (1). Para conocer si el KCCx constituye también una vía de eflujo, en la figura 10 se presenta el eflujo de $^{86}\text{Rb}^+$ en los ovocitos en un medio hipotónico y en presencia o ausencia de furosemida. En la gráfica del lado izquierdo se observa que en ausencia del diurético, la cantidad de $^{86}\text{Rb}^+$ intracelular se fue reduciendo de forma progresiva a lo largo de un período de 150 minutos, mientras que en la gráfica del lado derecho, en el mismo período de tiempo, se observa un incremento gradual en la cantidad del isótopo en el medio extracelular. En los grupos con furosemida, el eflujo de $^{86}\text{Rb}^+$ se redujo, significativamente, a partir de los 50 min para el remanente y a los 100 min

para la aparición en el exterior celular, indicando la proporción del eflujo que se llevo a cabo a través del cotransportador de K^+Cl^- .

En la figura 11 se analiza el efecto de diferentes inhibidores de los cotransportadores electroneutros cloro catiónicos. Se observa que la furosemida redujo la captación del cotransportador en un 74%, mientras que la bumetanida lo hizo en un 65% en comparación con el grupo control. Ambas reducciones fueron estadísticamente significativas. La adición de DIOA y DIDS al medio extracelular redujo la captación 58 y 27% respectivamente, sin embargo, únicamente el efecto del DIOA fue significativo. El DIDS no inhibió de manera significativa al KCCx, a pesar de haberse demostrado que este agente a esa concentración, puede inhibir el cotransporte de K^+Cl^- en las isoformas de mamífero (59), como la que se encuentra en los eritrocitos de borrego (78).

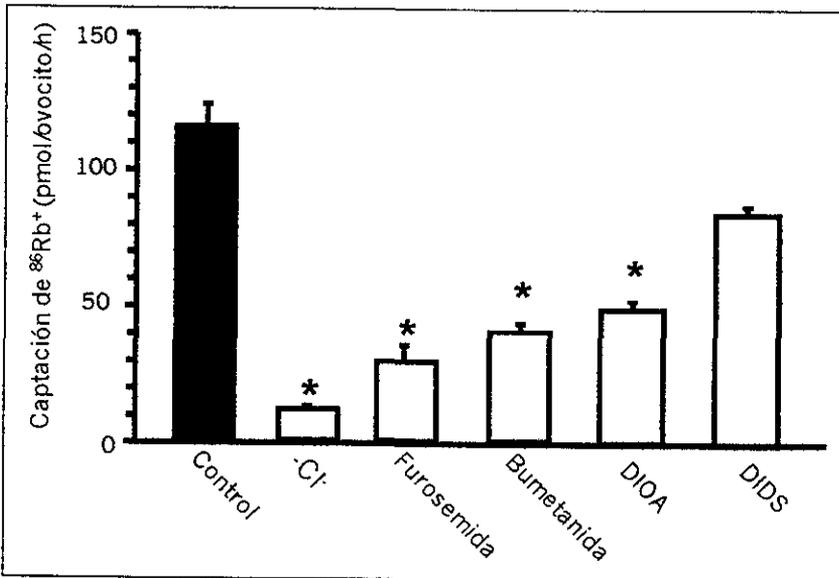


Figura 11. Efecto de algunos inhibidores del transporte en la función del KCCx. La captación se realizó en un medio hipotónico con 10 mM de K^+ y 50 mM de Cl^- . En el grupo $-Cl^-$ se utilizó gluconato como sustituto. La concentración de todos los inhibidores fue de 100 μM . * $P < 0.05$ vs. la captación en condiciones control. Cada barra representa la media de 15 ovocitos.

Dado que se ha comprobado que el cotransportador de K^+Cl^- del eritrocito de borrego y de humano pueden transportar otros aniones extracelulares además del Cl^- (79), se analizó la captación de $^{88}Rb^+$ en los ovocitos en presencia de

una serie de aniones extracelulares. En la figura 12, se muestra que con Cl^- (129 ± 18 pmol/ovo/h), fosfato (130 ± 21 pmol/ovo/h) o bromo (101 ± 16 pmol/ovo/h), no hay una reducción significativa de la captación, mientras que con los aniones yodo (67 ± 15 pmol/ovo/h), tiocianato (44 ± 12 pmol/ovo/h) y gluconato (25 ± 5 pmol/ovo/h), la captación se redujo significativamente ($P < 0.001$) a la mitad o menos de la mitad del control. Así, a partir de estos datos la serie de aniones que se dedujo para el cotransportador endógeno fue: $\text{Cl}^- = \text{PO}_4^{3-} = \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{SCN}^- > \text{GNT}^-$.

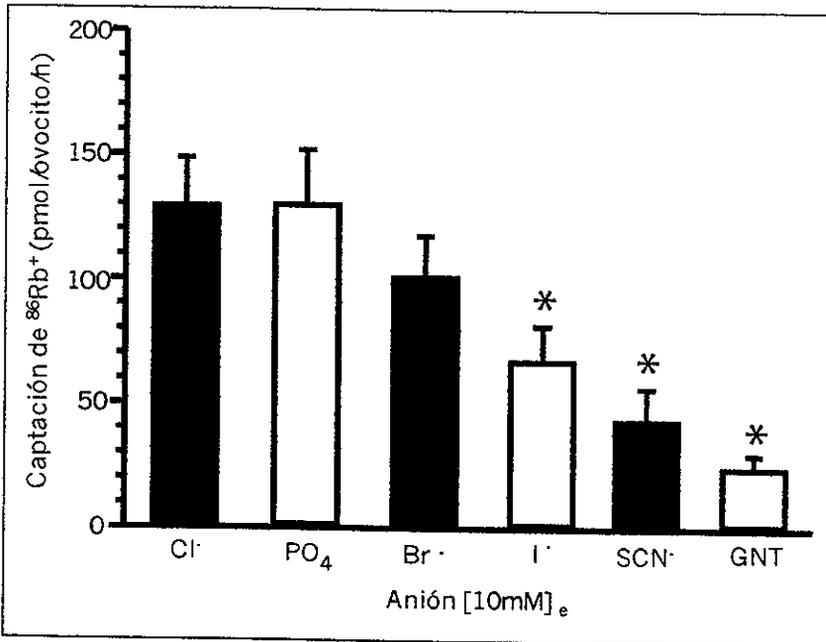


Figura 12. Serie de aniones del cotransportador endógeno de $\text{K}^+:\text{Cl}^-$. La captación de $^{86}\text{Rb}^+$ se llevó a cabo en un medio hipotónico con 40 mM de gluconato de NMDG y 10 mM de KCl (grupo control) o 10 mM de sales de potasio de cada uno de los aniones sustitutos (KPO_4 , KBr , KI , KSCN y gluconato de potasio). Los datos se normalizaron tomando la captación en el grupo control KCl como el 100%. Cada barra representa la media de 15 ovocitos.

En el siguiente experimento (figura 13) se determinaron las características cinéticas del KCCx . Del lado izquierdo se muestra la curva de afinidad para $^{86}\text{Rb}^+$ y del lado derecho la curva de afinidad para Cl^- . En ambas la captación de $^{86}\text{Rb}^+$ se midió en función de la concentración del ión que se estaba transportando. Como se muestra, el influjo de $^{86}\text{Rb}^+$ se incrementó conforme

aumentó la concentración de cada ión, hasta concentraciones iónicas de 50 mM, mostrando un comportamiento tipo Michaelis-Menten. Los valores calculados de K_m y V_{max} para el $^{86}\text{Rb}^+$ extracelular fueron 27.8 ± 3 mM y 1531 ± 78 pmol/ovocito/hr respectivamente y para el Cl^- extracelular 15.4 ± 4.7 mM y 318 ± 39 pmol/ovocito/hr también respectivamente. Se calculó el coeficiente de Hill para ambos iones y éste de acuerdo con el proceso de transporte electroneutro, se mantuvo cercano a uno: 1.04 ± 0.17 para $^{86}\text{Rb}^+$ y 1.07 ± 0.14 para Cl^- .

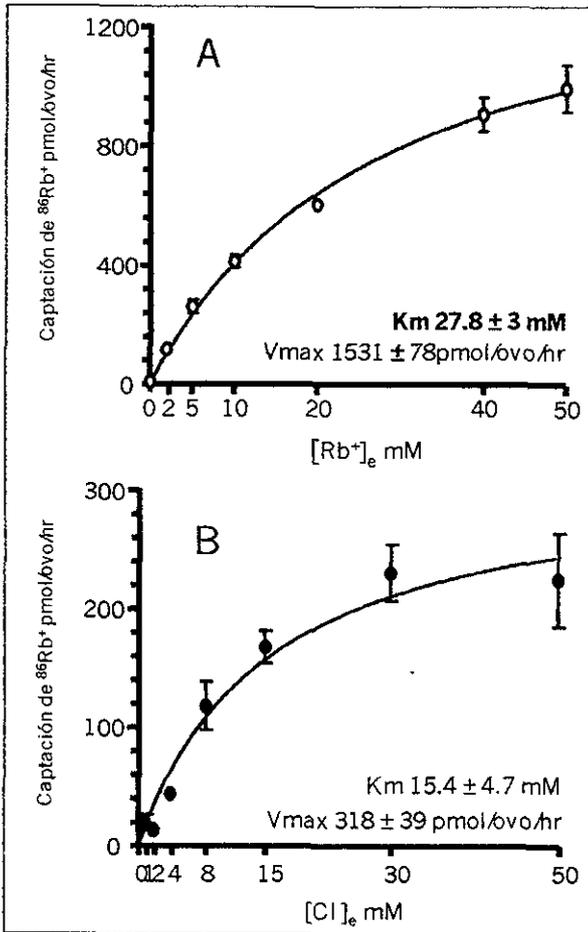


Figura 13. Análisis cinético de la captación de $^{86}\text{Rb}^+$ en ovocitos de *Xenopus laevis*.
A: captación de $^{86}\text{Rb}^+$ dependiente de Rb^+ . Las captaciones se llevaron a cabo en un medio hipotónico con una concentración fija de Cl^- de 50 mM cambiando la concentración de Rb^+ extracelular ($[\text{Rb}^+]_e$). **B:** captación de $^{86}\text{Rb}^+$ dependiente de Cl^- . Las captaciones se llevaron a cabo en hipotonicidad con una concentración fija de K^+ de 20 mM y concentraciones variables de Cl^- extracelular ($[\text{Cl}]_e$). Para los datos de A, las captaciones se midieron también en ausencia de Cl^- , y la media de los valores se restó al grupo correspondiente con RbCl para analizar únicamente la captación de $^{86}\text{Rb}^+$ dependiente de Cl^- . Para los datos en B, se restó la captación observada con una solución 20 mM de K^+ y 0 mM de Cl^- a las captaciones en los otros grupos. Las curvas se ajustaron con la ecuación de Michaelis-Menten. Cada punto representa la media de 15 ovocitos.

Ya que los cotransportadores de K^+Cl^- , son menos afines a los diuréticos de asa que los otros miembros de la familia cloro-catiónica (63), para analizar la sensibilidad del KCCx a estas drogas, se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de furosemida y bumetanida en la inhibición del cotransportador. En la figura 14 se observa que en ambos casos la reducción en la función fue dependiente de la concentración de cada diurético. La función del cotransportador se inhibió 50% en concentraciones de 0.2 mM de furosemida y 0.5 mM de bumetanida, sin embargo, con ambos diuréticos fueron necesarias concentraciones altas para disminuir significativamente la actividad. Se observa también que, como se había demostrado en el experimento de la figura 11, el cotransportador endógeno fue más sensible a la furosemida que a la bumetanida, la primera logró inhibir totalmente su función, mientras que la segunda a la misma concentración e incluso a mayor, no lo inhibe totalmente. Los valores de IC50 para furosemida y bumetanida, se calcularon en 200 y 500 μ M respectivamente.

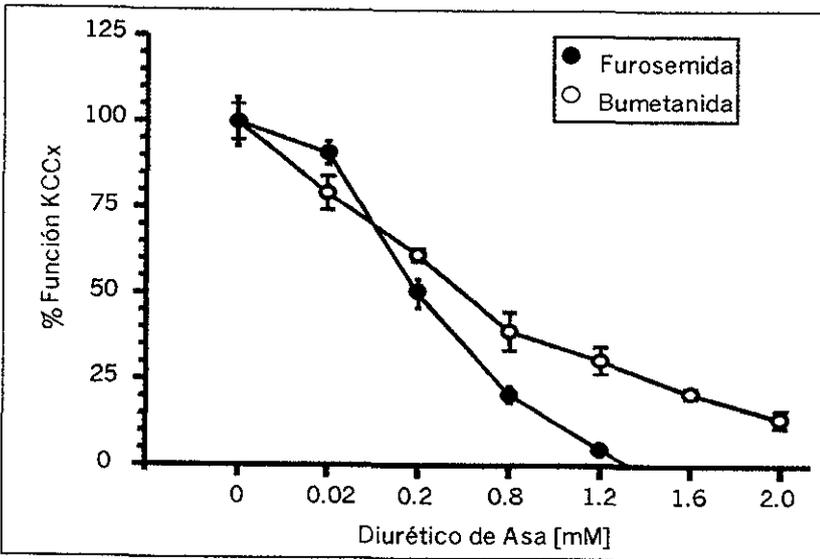


Figura 14. Análisis cinético de la inhibición del KCCx por diuréticos de asa. Las captaciones se llevaron a cabo en un medio hipotónico. Grupos de 10 ovocitos fueron expuestos a concentraciones crecientes de furosemida o bumetanida (de 20 a 2,000 mM). Los datos se normalizaron en porcentaje de captación, tomando el 100% como el valor en ausencia de diurético.

Una de las principales características del transporte de K^+Cl^- , es la activación por el agente alquilante N-etilmaleimida (NEM) (41;80). Debido a esto en el experimento que presenta en la figura 15, se analizó el efecto del NEM en la captación de $^{86}Rb^+$ en los ovocitos. Se encontró que en condiciones isotónicas el NEM en presencia de Cl^- extracelular, incrementó la captación de $^{86}Rb^+$ en los ovocitos aproximadamente al doble de la del grupo control, de 117 ± 6.3 a 227 ± 29 pmol/ovocito/h ($p < 0.001$). El incremento en la captación inducido por NEM, fue dependiente de Cl^- ya que en ausencia de este ión extracelular, la captación entre la del grupo control y la de los ovocitos tratados con NEM, fue similar (88 ± 7 vs. 60 ± 11 pmol/ovocito/h, ($P = NS$)). De tal manera que bajo condiciones isotónicas, la adición de NEM incrementa la función del cotransportador KCCx.

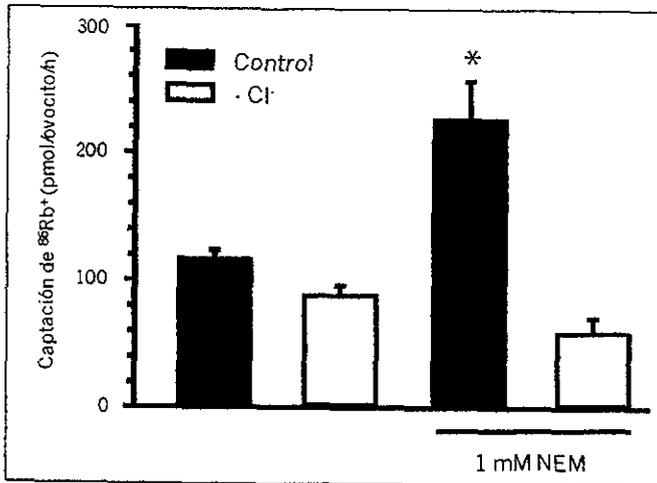


Figura 15. Efecto del NEM en la activación del KCCx. Los ovocitos fueron incubados en un medio isotónico, en presencia de 10 mM de K^+ y en presencia o ausencia de 50 mM de Cl^- y 1mM de NEM. Cada barra representa el promedio de 5 experimentos con diferentes ranas. *Significativamente diferente del grupo control sin NEM ($P < 0.001$).

Se ha demostrado que la activación del cotransportador de K^+Cl^- del eritrocito, por aumento del volumen celular o por NEM (81), involucra un paso de defosforilación (11;12;63) de tal manera que al inhibir a las proteínas fosfatasas, se estaría impidiendo la activación de éste. Para comprobar lo anterior y analizar la función de las fosfatasas en la regulación del KCCx, en la figura 17 se muestra el efecto de la inhibición específica de las fosfatasas 1, 2a y 2b por caliculina A, ácido okadaico y cipermetrina respectivamente. Como se observa, el incremento en la captación de $^{86}Rb^+$ inducido por hipotonicidad, fue

anulado significativamente por calcicolina A, inhibidor de la fosfatasa 1; mientras que el ácido okadaico y la cipermetrina, inhibidores de las fosfatasa 2a y 2b respectivamente; no ocasionan efecto significativo en la actividad del transportador. Los resultados anteriores indican aparentemente que la fosfatasa 1 es la proteína involucrada en el proceso de activación del KCCx por hipotonicidad. Esta fosfatasa también parece estar involucrada en la activación de las isoformas KCC1 y KCC4 (17).

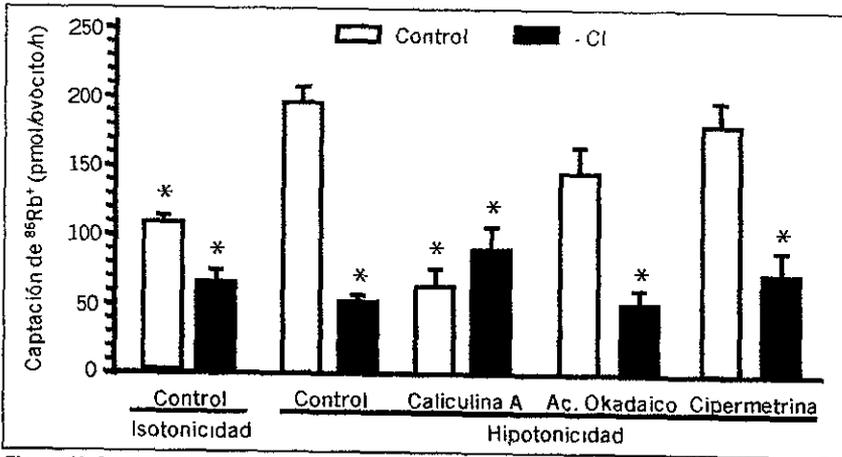


Figura 16. Efecto de la inhibición de proteínas fosfatasa en la activación del cotransportador endógeno por hipotonicidad. Los ovocitos fueron expuestos a calcicolina A, ácido okadaico o cipermetrina en un medio con 10 mM de K⁺ y con o sin Cl⁻ extracelular, en condiciones isotónicas e hipotónicas. *P < 0.001 vs. la captación del grupo control en hipotonicidad.

Algunos metales pesados como el mercurio (Hg²⁺), afectan la función de ciertos transportadores iónicos, activándolos o inhibiéndolos (75). Por ejemplo, la isoforma basolateral del cotransportador de Na⁺:K⁺:2Cl⁻ es inhibida al ser expuesta a mercurio (74) mientras que la acuaporina 6 es activada por este metal (76). Debido a lo anterior se analizó el efecto del Hg²⁺ y del agente reductor ditioneitol (DTT), en la captación de ⁸⁶Rb⁺. En el lado izquierdo de la figura 17 se observa que en condiciones isotónicas únicamente en presencia de Cl⁻ extracelular ([Cl]_e) existe captación de ⁸⁶Rb⁺, la cual se redujo cuando se agregó una concentración de 10 mM de DTT. Lo anterior sucedió igualmente en presencia de este agente y la adición de 150 μM de HgCl₂. Se utilizó esta dosis por que fue con la que se observó la respuesta máxima. Por otra parte,

en ausencia de ambos compuestos y de $[Cl^-]_e$, también hubo captación de $^{86}Rb^+$, sin embargo, debido a la dependencia del cotransportador por este ion, es probable que ésta, corresponda a otra vía de entrada del Cl^- . En la gráfica del lado derecho notamos también, que en condiciones isotónicas cuando se agregó $HgCl_2$ durante la precaptación en ausencia de DTT y presencia de $[Cl^-]_e$, éste, incrementó la captación de $^{86}Rb^+$ hasta 4000 pmol/ovo/h, sin embargo, este efecto fue totalmente anulado cuando además se añadió DTT, como se muestra en la gráfica del lado izquierdo, sugiriendo que el $HgCl_2$ puede estar involucrado en la activación de KCCx en condiciones isotónicas, mientras que el DTT podría estar inhibiendo esta activación.

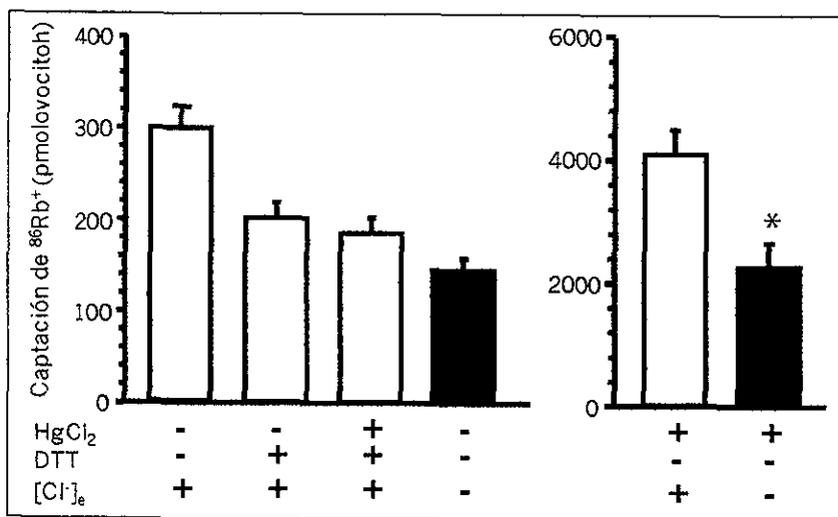


Figura 17. Efecto del $HgCl_2$ y el DTT en la captación de $^{86}Rb^+$ en ovocitos de *Xenopus laevis*. La captación se llevó a cabo en condiciones isotónicas. Antes del período de captación, los ovocitos fueron expuestos alguno de los siguientes tratamientos: DTT, $HgCl_2$ ó DTT + $HgCl_2$. Como se indica, las captaciones se realizaron en ausencia o presencia de Cl^- extracelular. Cada barra representa la media \pm ES de 30 ovocitos. * $P < 0.001$ vs. el grupo control de $HgCl_2$.

Así mismo, los experimentos con y sin Cl^- extracelular en presencia únicamente de $HgCl_2$, revelaron que el incremento en la captación de $^{86}Rb^+$ inducido por este metal, involucra al menos dos rutas o vías, cada una de las cuales contribuye con aproximadamente el 50% de la captación total. Una de estas rutas es dependiente de Cl^- , correspondiente con las características del cotransportador de K^+Cl^- del ovocito, mientras que la otra es independiente de

Cl, pudiéndose tratar de un canal catiónico activado por HgCl₂ o de una ruta independiente tanto de Cl como de HgCl₂, la cual podría corresponder con la captación de la última barra de la gráfica del lado izquierdo.

Caracterización Molecular

La amplificación del cotransportador endógeno del ovocito se realizó mediante la técnica de RT-PCR. Inicialmente, se realizó una búsqueda BLAST en la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information) de secuencias EST (Expressed Sequence Tags) de *Xenopus laevis*, de alguna secuencia con homolog[a significativa con los KCC's. De esta búsqueda surgió una secuencia del ovocito, que posee una identidad de 76% con KCC1 (No. de acceso AW646505), la cual fue adquirida. A partir de esta secuencia EST se diseñaron los iniciadores KCCx1, los cuales como se muestra en la figura 18, amplifican un fragmento de 528 pb (1s-1a) a partir de cDNA de ovocito en la reacción de PCR. También a partir de esta secuencia se diseñaron como controles positivos, unos iniciadores "internos" llamados KCCx2 (2s-2a), los cuales amplifican un fragmento de 349 pb empleando el fragmento de 528 pb como templado.

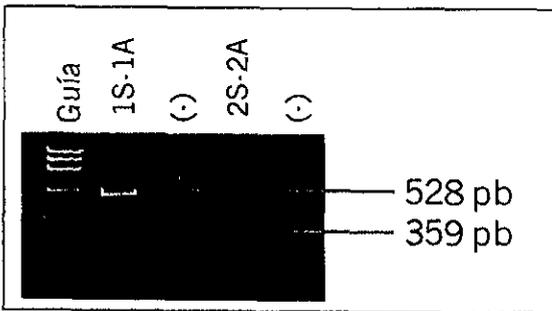


Figura 18. Productos de PCR, en gel de acrilamida al 5%, obtenidos a partir de cDNA de ovocito. Las flechas indican el número de pares de bases que amplifica cada par de iniciadores. 528 para KCCx1 (1s-2a) y 359 para KCCx2 (2s-2a).

El fragmento de 528 pb se separó y se purificó para ser secuenciado. La figura 19 presenta la secuencia deducida a partir de éste fragmento en amino ácidos (xKCC), alineada con las secuencias también en amino ácidos de los cDNAs de algunos transportadores de K⁺:Cl⁻ de mamífero: KCC1 de rata (RATKCC1),

KCC2 de rata (RATKCC2), KCC3 de humano (HKCC3) y KCC4 de ratón (MKCC4), con los segmentos en común encerrados en cajas. El fragmento amplificado y secuenciado corresponde al extremo carboxilo terminal de la proteína y presenta 71.6% de identidad con el KCC1 de rata, 66.1% con el KCC2 también de rata, 74.9% con el KCC3 de humano y 67.2% con KCC4 de humano. Es decir nuevamente comparte mayor identidad con la sub-rama KCC1/KCC3, y en este caso, un porcentaje mayor con KCC3.

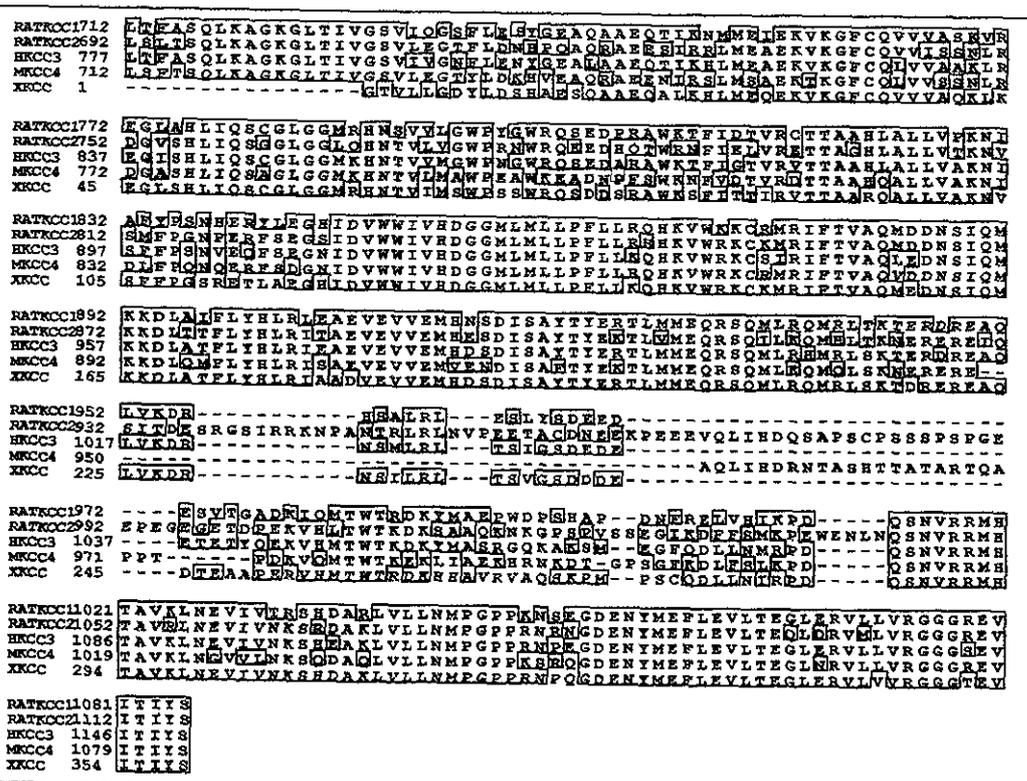


Figura 19. Alineamiento de la secuencia proteica de los cotransportadores de K⁺:Cl⁻ de mamífero, KCC1, 2, 3 y 4 con la secuencia en amino ácidos, del cotransportador de K⁺:Cl⁻ del ovocito de *Xenopus* (XKCC) deducida. El fragmento corresponde a una parte del extremo carboxilo terminal aparentemente intracelular.

Por otra parte se llevo a cabo un análisis de Southern blot en condiciones de alta severidad, con los productos RT-PCR de diferentes tejidos de rana *Xenopus laevis*, empleando el fragmento amplificado con los iniciadores KCCx1 como sonda no radioactiva, con el fin de conocer la distribución tisular del cotransportador de K^+Cl^- del ovocito.

Como se observa en la figura 20, la sonda específica para el KCC endógeno, hibridó con todos los productos PCR de los diferentes tejidos a la altura correspondiente a su tamaño (528 pb), es decir, que el KCCx se expresa ampliamente en los tejidos de la rana *Xenopus*, con un patrón aparentemente ubicuo. Este tipo de expresión tisular, lo presenta únicamente la isoforma KCC1.

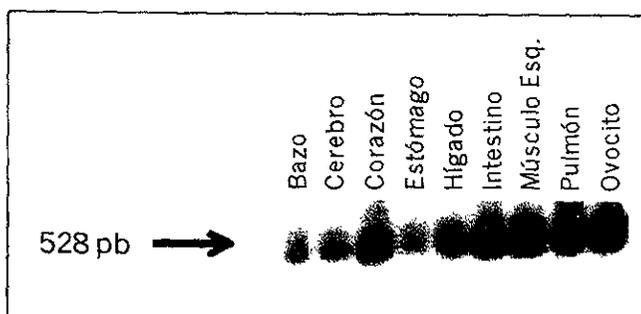


Figura 20. Análisis de Southern blot de productos RT-PCR obtenidos a partir de RNAol de diferentes tejidos de *X. laevis* que muestra la expresión del KCCx en éstos. El análisis se realizó en condiciones de alta severidad con una sonda construida a partir del fragmento de 528 pb de KCCx

Con el fin de identificar a que isoforma corresponde el cotransportador endógeno de los ovocitos, a partir de una secuencia de dos regiones donde los cuatro KCCs de mamífero identificados son 100% idénticos al nivel de aminoácidos, se diseñaron los iniciadores KCCx. Estas regiones corresponden a los residuos de aminoácidos 310-316 (LGNRTLS) y 498-503 (TLAWPS) en la secuencia de la isoforma KCC1 de rata.

La figura 21 muestra que estos iniciadores amplificaron un fragmento de 582 pb a partir de cDNA de ovocito y cDNA de KCC1. Estos también amplificaron a partir de cDNA de KCC3 y 4, sin embargo, el fragmento esperado era difícil de identificar, ya que aparecía con fragmentos inespecíficos. Debido a esto se diseñaron iniciadores específicos para KCC3 y para KCC4, llamados KCC3x (iniciador sentido 5'-CAGAACAACGTCACCGAAATC-3' e iniciador anti sentido

5'-GAAGGAGCCGATGACGATGAC-3') y KCC4x (iniciador sentido 5'-CGCAACTTTGATACCTGTGCC-3' e iniciador anti sentido 5'-GAGGATACCGGTCTCACAGAT-3'), los cuales como se observa en la figura, amplificaron fragmentos de 464 y 738pb respectivamente.

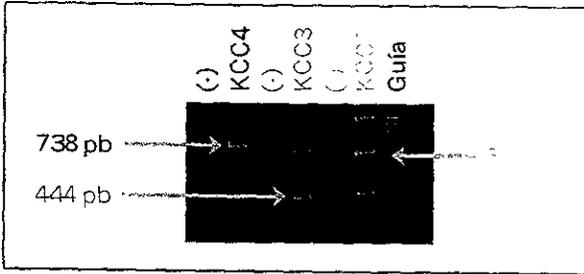


Figura 21. Productos RT-PCR en gel de acrilamida al 5%, obtenidos a partir de las isoformas KCC1, 3 y 4. Se muestra la amplificación de un producto de 738 pb, 444 pb y 582 pb para el cDNA de KCC4, KCC3 y KCC1 respectivamente.

Los productos de la figura anterior, se emplearon para llevar a cabo un análisis de Southern Blot en condiciones de baja severidad, el cual se muestra en la figura 22.

En este análisis como controles positivos, se emplearon sondas amplificadas a partir de los iniciadores de cada isoforma, los cuales se observan en la figura como bandas de hibridación con el número de pares de bases esperado para cada isoforma: 582, 444 y 738 respectivamente. Así mismo, se colocó también una reacción de cDNA ovo, a la cual se dirigió cada una de las sondas, para tratar de identificar la isoforma presente en el ovocito. Como se observa en la figura, únicamente la sonda de KCC1 logró hibridar con el cDNA del ovocito.

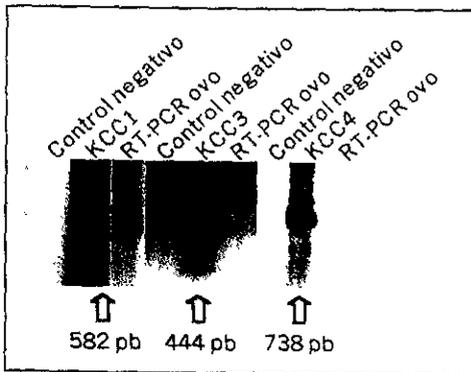


Figura 22. Análisis de Southern blot de productos RT-PCR obtenidos a partir de la amplificación del CDNA de cada isoforma y de ovocito con sus iniciadores específicos: KCCx, KCC3x y KCC4x. Se muestra la hibridación, en condiciones de baja severidad, de la sonda construida específicamente para cada isoforma con su respectivo cDNA y también, que únicamente la sonda de la isoforma KCC1 hibrida con el cDNA de ovocito.

Este resultado, así como el obtenido con las reacciones de PCR, la secuenciación y la distribución tisular, sugieren que la isoforma del cotransportador endógeno del ovocito, pertenece a la sub rama KCC1/KCC3 y probablemente corresponde a la isoforma KCC1.

DISCUSIÓN

El análisis de los principales aspectos funcionales, cinéticos y moleculares del cotransportador de K^+Cl^- que se expresa en los ovocitos de *Xenopus laevis*, mostró las características básicas de un sistema de transporte de K^+ y Cl^- . El transportador KCCx presentó una captación de $^{86}Rb^+$ dependiente de Cl^- que se activa en hipotonicidad, con NEM (fig. 1 y 8), con $HgCl_2$ y es sensible a los diuréticos de asa, principalmente a la furosemina y a otros inhibidores del transporte de K^+Cl^- como el DIOA (fig. 4). La activación por hipotonicidad es anulada por caliculina A, inhibidor específico de la fosfatasa 1 (fig. 9), mientras que el transporte de K^+ y Cl^- muestra un comportamiento cinético tipo Michaelis-Menten, interdependiente y con coeficientes de Hill consistentes con el cotransporte electroneuro (fig.6). Al nivel molecular, mediante PCR y análisis de Southern blot se identificó y amplificó a partir del ovocito de *Xenopus laevis*, un transcrito que comparte un alto porcentaje de identidad (> 70%) con las cuatro isoformas del transportador de K^+Cl^- de mamífero, principalmente con la sub rama KCC1/KCC3 (fig. 14).

Funcionalmente el transportador en condiciones isotónicas presentó una captación baja de $^{86}Rb^+$ dependiente de Cl^- aunque significativa, mientras que en condiciones hipotónicas, esta función incrementó varias veces su actividad. Estos experimentos se llevaron a cabo en ausencia de Na^+ extracelular, de manera que el transporte no fue realizado por el cotransportador endógeno de $Na^+K^+2Cl^-$ del ovocito (21). La captación de $^{36}Cl^-$ fue similar tanto en ausencia como en presencia de K^+ en condiciones isotónicas, mientras que en hipotonicidad incrementó al doble y fue dependiente de K^+ (fig. 1). El incremento en la actividad del transportador en hipotonicidad celular, se relacionó de forma lineal con el transcurso del tiempo (fig. 2). Así mismo, representa un mecanismo de los ovocitos para enfrentar al medio en el que son depositados, el cual al tener una osmolaridad mucho más baja que la del plasma materno, genera un gradiente osmótico que dirige agua hacia el interior celular incrementando su volumen pudiendo alterar las funciones celulares (13).

En varios tipos celulares este incremento, es seguido por un regreso lento al volumen original por el mecanismo de RVD, el cual activa diferentes sistemas

de transporte, entre ellos el transportador de K^+Cl^- (1). La activación en hipotonicidad y el eflujo de K^+ y Cl^- (fig. 3) en los ovocitos, nos muestra que estas células poseen los sistemas necesarios para liberar iones y reducir el volumen celular y poder así, sobrevivir en los medios hipotónicos hasta ser fecundados, etapa en la cual Kelly *et al.* (13) sugieren que se desarrollan cambios conformacionales del citoesqueleto que les confieren resistencia a los cambios de volumen celular.

Al igual que los transportadores de K^+Cl^- de otras especies, el transportador de *Xenopus laevis* fue sensible también a los dos diuréticos de asa principales, furosemida y bumetanida, sin embargo, mostró mayor sensibilidad por la furosemida (fig. 4) (37;41;58)

También el inhibidor específico del cotransporte de K^+Cl^- , DIOA, redujo la captación de $^{86}Rb^+$ del KCCx de forma significativa (82). Este inhibidor posee el mismo efecto en las isoformas KCC1, 2 y 4. Sin embargo, el inhibidor del transporte aniónico DIDS, no disminuyó de manera importante la función (fig 4), a pesar de que en las isoformas antes mencionadas, sí reduce significativamente su actividad.

El análisis cinético mostró que la captación de $^{86}Rb^+$ en los ovocitos, requiere de la presencia tanto del K^+ como del Cl^- , mientras que el coeficiente de Hill se mantuvo cercano a la unidad, de acuerdo con el transporte electroneutro con estequiometría de 1:1. La afinidad del KCCx para el K^+ extracelular presentó un valor K_m aproximadamente de 22 mM y para el Cl^- de aproximadamente 15 mM. Estos parámetros cinéticos son similares a los de las isoformas KCC1 y KCC4 de mamífero, sin embargo, son más parecidos a los de KCC1 (aprox. 25.5 y 17.2 mM respectivamente) (17). En general, los valores de afinidad para el Cl^- en las cuatro isoformas no difieren de gran manera cuando se analizan con el mismo modelo o sistema de expresión, por ejemplo en ovocitos o células HEK (17;37;59), sin embargo los valores para el K^+ extracelular aún en el mismo sistema de expresión, presentan grandes diferencias. La isoforma con mayor afinidad por el K^+ , es KCC2 de rata (~5mM) (37), después KCC4 con K_m de ~17 mM, seguida por KCC1 (K_m ~25mM) (17) y KCC3 (K_m ~51mM) (83). Estas diferencias en la afinidad por el K^+ extracelular confieren características funcionales importantes a las isoformas del cotransportador de K^+Cl^- . Se ha propuesto que aquellas con mayor afinidad

por el K^+ como KCC2 y KCC4 pueden funcionar tanto como vías de eflujo como de influjo en condiciones fisiológicas donde el K^+ extracelular incrementa, por ejemplo durante la actividad neuronal. Mientras que las que poseen menor afinidad como KCC1, KCC3 y KCCx funcionan exclusivamente como vías de eflujo, ya que el gradiente de este catión siempre favorece su salida (37). Isenring et al. (61) propuso que las diferencias en las características cinéticas, podrían ser debidas a las variaciones del segmento transmembrana 2, una región de los cotransportadores cloro-catiónicos, probablemente relacionada con el transporte catiónico.

Los valores semejantes de afinidad que presentan KCC2 con KCC4, al igual que KCC1 con KCC3 y KCCx, coinciden con las homologías de las subfamilias de la familia de los KCCs.

A pesar de que la afinidad por el Cl^- extracelular no varía en gran forma entre las cuatro isoformas, cada una presenta una serie de aniones diferente (83). El cotransportador de *Xenopus laevis* en presencia de los aniones extracelulares PO_4^- y Br^- , mantuvo su función cercana a la que presenta con Cl^- , mientras que con I^- , SCN^- y GNT el transporte de $^{86}Rb^+$ disminuyó. Aún no se conoce el mecanismo por el cual los aniones pueden afectar a los transportadores de K^+Cl^- (9), sin embargo, cualquiera que sea éste, estos iones pueden resultar útiles para el estudio de la regulación y el transporte de Cl^- acoplado a K^+ .

Desde su identificación (84), se observó que el cotransporte de K^+Cl^- podía ser activado por el agente NEM ("efecto NEM"). En el KCCx el NEM en una concentración baja (1 mM), activó el transporte de $^{86}Rb^+$ (fig. 8), característica en común con los KCCs. Sin embargo, este efecto es complicado, ya que el NEM en concentraciones y temperaturas bajas, activa el cotransporte, mientras que en concentraciones y temperaturas altas, lo inhibe (84;85). Se ha propuesto que ambos efectos involucran modificaciones de los grupos tiol al nivel del transportador (9;84). Jennings y Al-Rohil (86), propusieron que al igual que el aumento en el volumen celular, el NEM puede inhibir a una cinasa sensible a volumen, permitiendo que una fosfatasa active el transporte de K^+Cl^- por defosforilación (9). Tanto la fosforilación como la defosforilación de ciertas proteínas conducen a la activación de diferentes rutas de transporte. Actualmente es aceptado de manera general que se requiere de un paso de defosforilación para la activación del cotransportador de K^+Cl^- por aumento del

volumen celular o NEM. La modificación o inhibición de las proteínas fosfatasa nos puede brindar información a cerca de la regulación o los eventos involucrados en la activación de este transporte. En este estudio se analizaron los efectos de la inhibición específica de las fosfatasa 1 (PP1), 2a (PP2A) y 2b (PP2B) y observamos que únicamente el compuesto caliculina A, inhibidor de la PP1, anuló el transporte de $^{86}\text{Rb}^+$ activado por hipotonicidad (fig 9). La inhibición de la PP2A y la PP2B por ácido okadaico y cipermetrina respectivamente, no afectó la actividad del KCCx. De tal manera que la PP1, es probablemente la fosfatasa involucrada en la activación del cotransportador de $\text{K}^+:\text{Cl}^-$ de *Xenopus laevis* durante el aumento del volumen celular. La relación de la PP1 con la activación del cotransporte por hipotonicidad, se había propuesto anteriormente en eritrocitos de humano (12) y de conejo (87). Por otra parte, se reportó que las isoformas KCC1 y KCC4, también son reguladas por esta fosfatasa durante el aumento del volumen celular (17).

En diversos cotransportadores, principalmente del riñón, se han investigado los efectos de algunos metales pesados (75;76). Los estudios con mercurio (Hg^{2+}) han demostrado que éste puede inhibir la función de los transportadores $\text{Na}^+:\text{S}_i$ y NaPi-3 , aunque en otras proteínas como la acuaporina 6 (88), presenta el efecto contrario. El resultado de exponer a los ovocitos de *Xenopus laevis* a una determinada concentración de HgCl_2 (150 μM), fue un gran incremento en la captación de $^{86}\text{Rb}^+$, mismo que fue anulado por el agente reductor DTT. Aparentemente uno de los mecanismos por el cual el Hg^{2+} actúa, es mediante la oxidación de grupos tiol intracelulares del cotransportador, localizados en residuos cisteinicos, lo cual explicaría el efecto del DTT. Así mismo el HgCl_2 incrementó la captación gracias a la activación de al menos dos vías de transporte de K^+ , una dependiente de Cl^- y otra independiente de Cl^- . Ya que las captaciones se realizaron en ausencia de Na^+ extracelular, es poco probable que la vía dependiente de Cl^- , se debiera a la actividad del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ (21). Por lo tanto, esta fracción del transporte de $^{86}\text{Rb}^+$ inducida por Hg^{2+} corresponde a la función del KCCx.

Por otra parte, en este estudio mediante la técnica de RT-PCR se confirmó la expresión de una isoforma del cotransportador de $\text{K}^+:\text{Cl}^-$ en los ovocitos de *Xenopus laevis*. La primera serie de reacciones así como el análisis de Southern blot mostraron que únicamente la sonda amplificada a partir de la

isoforma KCC1, hibridó con el cDNA del ovocito (fig. 11 y 12). También mediante PCR se pudo amplificar la reacción a partir de la secuencia EST, de gran homología con los KCC's y éste cDNA (fig. 13). La secuenciación de esta última reacción (fig. 14), mostró que el KCCx presenta una mayor homología con la subfamilia KCC1/KCC3 (~73.2%) que con la subfamilia KCC2/KCC4 (~66.6%) de la familia de los cotransportadores de K^+Cl^- . Finalmente, se comprobó que el transportador de K^+Cl^- del ovocito de *Xenopus*, se expresa ampliamente en diferentes tejidos de esta rana (fig. 15). La clonación del cDNA completo del KCCx permitirá una definición más amplia de su estructura y su función, así como el estudio de las relaciones estructura-función de este cotransportador y las que mantiene con los otros miembros de la familia. Los resultados de estos estudios, podrán brindar nueva información sobre la regulación del cotransporte de K^+Cl^- y su papel en la función celular, particularmente la del KCCx, en cuanto a su relación con el control del volumen celular.

CONCLUSIÓN

Los ovocitos de *Xenopus laevis* expresan un cotransportador electroneutro de K^+Cl^- en la membrana plasmática dependiente de Cl^- activado por aumento del volumen celular (hipotonicidad), NEM y $HgCl_2$ e inhibido por diuréticos de asa y DIOA, cuyas propiedades funcionales y moleculares son muy similares a las de la isoforma KCC1 de mamífero, lo cual sugiere que podría tratarse de un gen de anfibio ortólogo de esta isoforma.

APÉNDICE A

EXTRACCIÓN Y PREPARACIÓN DE OVOCITOS DE *Xenopus laevis*

1. Anestesiarse una rana por inmersión en tricaina al 0.17% (ácido etil éster 3-aminobenzoico, durante 25-30 min.
2. Hacer una pequeña incisión con bisturí en la parte inferior del abdomen
3. Exponer el ovario y cortar suficientes lóbulos ováricos para obtener los ovocitos necesarios. Colocarlos en una caja de Petri con Ringer de rana (ND96). Suturar la herida incluyendo peritoneo interno con seda del no. 5.0
4. Cortar los lóbulos del ovario en pequeños racimos de 20 a 30 ovocitos cada uno.
5. Incubar los racimos en solución ND96 adicionada con 2 mg/ml de colagenasa B durante 60 min. con agitación constante.
6. Eliminar la solución de colagenasa por decantación y lavarlos cuatro veces en ND96.
7. Retirar la capa folicular de cada ovocito utilizando pinzas finas bajo un microscopio estereoscópico.
8. Incubarlos durante dos días a 18 °C en ND96 que contenga 2.5 mM de piruvato de sodio y 5.0 mg/100.0 ml de gentamicina.
9. Cambiar el medio de incubación, cada 24 horas.

ENSAYO DE CAPTACIÓN

1. Transferir los ovocitos a un medio ND96 sin Cl⁻, dos horas antes del ensayo. Para cada grupo experimental, se emplean de 20 a 30 ovocitos.
2. Precaptación en el mismo medio hipotónico o isotónico durante 30 min. pero con adición de 1.0 mM de ouabaina.
3. Captación durante 60 min. en solución hipotónica o isotónica libre de Na⁺ adicionada con 1.0 mM de ouabaina y 2.5 µCi de ⁸⁶Rb⁺
4. Lavar los ovocitos tres veces en la misma solución correspondiente a cada osmolaridad, pero sin ⁸⁶Rb⁺ y a 4°C.
5. Transferir cada ovocito con una pipeta Pasteur a tubos o viales de centelleo con 350µl de SDS al 10%. Asegurarse que el ovocito es lisado por el SDS.
6. Agregar 3.0 ml de líquido de centelleo y contar las emisiones de cada tubo en el contador de centelleo β Beckman (para conocer la actividad específica en cada grupo preparar tres alíquotas con 10 µl de líquido de captación cada una).

SOLUCIONES EN APÉNDICE A

-ND96 (1 lt):

Concentración (mM)

96.0 NaCl
2.0 KCl
1.8 CaCl₂
1.0 MgCl₂
5.0 HEPES

Llevar a pH 7.4 con NaOH 1.0 M. La osmolaridad debe ser de ~ 230 mOsm

-Solución isotónica de precaptación sin Cl⁻

Concentración (mM)

62.0 Gluconato de Na⁺
10.0 Gluconato de K⁺
4.6 Gluconato de Ca²⁺
1.0 Gluconato de Mg⁺
5.0 HEPES/Tris

Llevar el pH a 7.4 con ácido metano sulfónico y filtrarlo. La osmolaridad debe de ser de ~ 230 mOsm.

-Solución hipotónica de precaptación sin Cl⁻

Concentración (mM)

58.0 Gluconato de Na⁺
1.8 mM Gluconato de Ca²⁺
1.0 mM Gluconato de Mg⁺
10.0 mM Gluconato de Ba⁺
5.0 mM HEPES/Tris

Llevar a pH a 7.4 con 1.0 M NMDG-OH, llevar el volumen a 1 lt. y filtrar.

-Solución hipotónica de captación sin Na⁺

Concentración

75.0 mM NMDG-Cl
1.8 mM CaCl₂
1.0 mM MgCl₂
5.0 mM HEPES/Tris

Llevar el pH a 7.4 con NMDG-OH 1.0 M, llevar el volumen a 1 lt. y filtrar.
Para isotonicidad, agregar sacarosa en una concentración de 3.5g/100ml

-Solución hipotónica para captación de $^{86}\text{Rb}^+$

Concentración (mM)

58.0 NaCl
1.8 CaCl₂
1.0 MgCl₂
10.0 BaCl
5.0 HEPES/Tris

Llevar a pH 7.4 con NMDG-OH 1.0 M , llevar el volumen a 1 lt. y filtrar.

Para llevarla a isotonicidad agregar 38 mM NMDG-Cl

Para hacerla sin cloro este ion se rempaza con gluconato

APÉNDICE B

EXTRACCION DE RNA CON GUANIDINA Y CsCl

Día 1

1. Preparar 8 ml de tiocianato de guanidina (TG) y 4 ml de cloruro de cesio (CsCl) por cada 0.5-1.0 g de tejido.
2. Transferir de 0.5 a 1.0 gr de tejido congelado a un tubo de plástico de 50 ml nuevo que contenga 8 ml de isotiocianato de guanidina.
3. Homogeneizar 15 seg x 4 a 30,000 rpm.
4. Agregar 400 µl de sarcosil al 10%, mezclar con cuidado.
5. Centrifugar 15 min a 9,000 x g (11,500 rpm) a 4 °C.
6. Transferir el sobrenadante a un tubo de ultracentrifuga en el que previamente se colocaron 4 ml de CsCl.
7. Ultracentrifugar a 22,000 x g (29,000 rpm) durante 18 horas a 18 °C.

Día 2

8. Vaciar el sobrenadante con cuidado y cortar el tubo para obtener en ¼ parte el pellet.
9. Lavar el pellet con 300 µl de agua para eliminar basura.
10. Resuspender el precipitado con 600 µl de agua (hacerlo con 300 µl x 2). Mezclar bien con la pipeta, transferirlo a un tubo ependorf etiquetado y luego agitar en vortex.
11. Dejar resuspendiendo mínimo 1 hora.
12. Tomar 20 µl de RNA + 480 µl de agua para espectrofotometría.
13. Separar los 600 µl en dos tubos de 1.5 ml (300 µl por tubo) y precipitarlos con 0.1 volumen (30 µl) de acetato de Na⁺ a pH 5.2 y con 3 volúmenes (990 µl) de etanol al 100%.
14. Guardar a -20 °C.

Día 3

15. Centrifugar 30 min a 9,200 x g (12,000 rpm) a 4 °C.
16. Quitar el sobrenadante y lavar con etanol al 70% (900 µl).
17. Centrifugar 5 min a 9,200 x g (12,000 rpm) a 4 °C.
18. Sacar el etanol (-100 µl).
19. Centrifugar 30 seg a 9,200 x g (12,000 rpm) a 4 °C.
20. Sacar todo el etanol.
21. Secar la muestra por 2 min.
22. Resuspender en 100-300 µl de agua.
23. Guardar a -80 °C.
24. Tomar 2 µl de RNA + 498 µl de agua para espectrofotometría. Correr un gel de agarosa al 1% formaldehído para evaluar la calidad del RNA.

SOLUCIONES PARA EXTRACCION DE RNA

Isotiocianato de Guanidina (8 ml)

- 4.0 M Guanidina: 3.78 g
- 25.0 mM Citrato de Na: 200 μ l de citrato de Na 1.0 M pH 7.0
- Llevar el volumen a 8 ml con agua BM
- Calentar para disolver ($\sim 40^{\circ}\text{C}$). Enfriar en hielo.
- 0.7% β -mercaptoetanol: 56 μ l (se agrega hasta que la guanidina esté fría y lista para ser usada)
- Esterilizar por filtración

Cloruro de Cesio (4 ml)

- 5.7 M CsCl: 3.83 g
- 25.0 mM Acetato de Na: 33.3 μ l de 3 M acetato de Na pH 5.2
- Llevar el volumen a 4 mls con agua BM
- Esterilizar por filtración

APÉNDICE C

GEL DE POLIACRILAMIDA PARA DNA

Para preparar 10 ml de gel al 5 % agregar:

- 7.4 ml de agua bidestilada
- 2 ml de TBE (Tris-borato/EDTA buffer de electroforesis) 5x *
- 1.5 ml de acrilamida/bisacrilamida 1:29
- 100 μ l de persulfato de amonio 10 % (APS*)
- 10 μ l de TEMED (N,N,N',N' -tetrametiletil-enediamina).

Mezclar y vaciar inmediatamente en la caja.

Poner el peine y esperar cuando menos 10 minutos.

Vaciar las muestras en el gel sumergido en TBE 1x.

Correr el gel a 100 V durante 40 minutos.

Para teñir el gel ponerlo en un recipiente con 100 ml de agua y 2 μ l de bromuro de etidio (10 mg/ml).

Enjuagarlo en agua durante 10 minutos.

* TBE 5x (1 litro)

- 54.0 gr tris
- 27.5 gr ácido bórico
- 20 ml EDTA 0.5 M pH 8

*APS 10% (50ml)

- 5.0 gr de persulfato de amonio
- 50.0 ml de H₂O
- Almacenar a 4°C

GEL DE AGAROSA PARA DNA

Para preparar 30 ml de gel al 1% agregar:

- 0.3 gr de agarosa
- 30 ml de 1x TAE* (Tris-acetato/EDTA buffer de electroforesis)

Disolver por calentamiento (horno de microondas 50 seg).

Dejar que enfríe a ~ 50°C.

Vaciar sobre la caja de gel y dejarlo secar cuando menos por 20 min antes de usarlo.

Para correr el DNA mezclarlo con colorante de electroforesis para DNA*, a razón de 1:4 μ l.

Vaciar las muestras en el gel sumergido en 1x TAE*

Correr el gel a 60 V durante 1.5 h

Para teñirlo poner el gel en un recipiente con 100 ml de agua y 7 μ l de bromuro de etidio (10 mg/ml).

Enjuagarlo en agua durante 10 min.

* TAE 50x (500 ml)

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

*Colorante de electroforesis para DNA (2ml)

- 1.0 ml de glicerol (50%)
- 40.0 μ l de EDTA 0.5 M, pH 8.0
- 5.0 mg de azul de bromofenol (0.25%)
- 5.0 mg de Xylene lyanol FF (0.25%)

APÉNDICE D
ANÁLISIS DE RT-PCR

Transcripción reversa

- Tomar 10µg/µl de RNA total y llevarlos a 12 µl con agua.
- Calentar el RNA +H₂O a 65°C por 10 min

<u>RT Mix</u>	<u>RT +</u>	<u>RT-</u>
Buffer RT 4µl	12µl RNA	12µl RNA
ddNTPs* 1µl	11µl RT mix	11µl RT mix
DTT** 0.1 M 2µl	2µl transcriptasa reversa	2µl agua BM
Agua BM 3µl		
Hexámeros <u>1µl</u>		
11µl	<hr style="width: 50%; margin: 0 auto;"/>	
	25 µl de volumen total	

Incubar 1hr. A 37°C

*ddNTPs: 2',3' -Dideoxyribonucleosido 5' -trifosfato.

**DTT: ditiotreitál.

PCR

<u>PCR Mix</u>	<u>PCR+</u>	<u>PCR-</u>
Agua BM 12.0 µl	17 µl PCR mix	17 µl PCR mix
Buffer PCR 2.5 µl	1 µl primers	1 µl primers
MgCl ₂ 1.0 µl	<u>2.5 µl RT+</u>	<u>2.5 µl RT-</u>
dNTP's 1.0 µl	20 µl	20 µl
Taq pol <u>0.5 µl</u>		
17 µl		

Las reacciones se colocan en un termociclador y son sometidas a un programa de acuerdo a la temperatura de anidación de los iniciadores y características de la enzima.

APÉNDICE E
ANÁLISIS DE SOUTHERN BLOT

Condiciones de baja severidad

- Lavar con SSC 2x + SDS 0.5% durante 3 min. a una temperatura 5 grados mayor que la T_m de los primers.
- Lavar con SSC 1x + SDS 0.1% durante 3 min. a la temperatura anterior.

SSC 2x + SDS 0.5% (1lt)

- 100ml. de SSC 20x
- 10 ml. de SDS 10%
- Llevar a 1lt. con agua destilada

SSC 1x + SDS 0.1%

- 50 ml. de SSC 20x
- 10 ml. de SDS 10%
- Llevar a 1lt. con agua destilada

Condiciones de alta severidad

- Lavar con SSC 2x + SDS 0.5% durante 3 min. a una temperatura 5 grados mayor que la T_m de los primers.
- Lavar con SSC 0.1% + SDS 0.1% durante 3 min. a la temperatura anterior.

SSC 0.1x + SDS 0.1%

- 5 ml. De SSC 20x
- 10 ml. de SDS 10%
- Llevar a 1lt. con agua destilada

SSC 20x

- 175.3 gr. de NaCl
- 88.2 gr. de citrato de Na^+
- Ajustar el pH a 7 con HCl
- Aforar a 1 lt. con agua destilada

- SDS 10% (100ml)** 10 gr. de SDS
Llevar el volumen a 100 ml. con agua destilada

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Lang F, Busch GL, Ritter M, Volkl H, Waldegger S, Gulbins E et al. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev* 1998; 78(1):247-306.
- (2) Macknight ADC. Principles of cell volume regulation *Renal Physiol Biochem* 1988; 11:114-141.
- (3) Macknight ADC, L.G.M.Gordon, and R.D.Purves. Problems in the understanding of cell volume regulation. *J Exp Zool* 1994; 268:80-89.
- (4) O'neill W C. Physiological significance of volume-regulatory transporters. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 1999; 276:C995-C1011.
- (5) Foskett J K, M.M.Wong, G.Sue A Quan, M.A.Robertson. Involvement of calcium and cytoskeleton in gallbladder epithelial cell volume regulation. *Am J Physiol* 1985; 248:C27-C36.
- (6) Burg M B. Molecular basis for osmoregulation of organic osmolytes in renal medullary cells. *J Exp Zool* 1994; 268:171-175.
- (7) Garcia-Perez A, M.B Burg. Role of organic osmolytes in adaptation of renal cells to high osmolality. *J Membr Biol* 1991; 119:1-13.
- (8) Garcia-Perez A, M.B Burg. Renal medullary organic osmolytes. *Physiol Rev* 1991; 71:1081-1115.
- (9) Lauf P K, Bauer J, Adragna N C, Fujise H, Zade-Oppen A M M, Ryu K H et al. Erythrocyte K-Cl cotransport: Properties and regulation. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 1992; 263:C917-C932.
- (10) Christensen O. Mediation of cell volume regulation by Ca^{2+} influx through stretch-activated channels. *Nature* 1987; 330:66-68.
- (11) Jennings ML, Schulz RK. Okadaic acid inhibition of KCl cotransport. Evidence that protein dephosphorylation is necessary for activation of transport by either cell swelling or N-ethylmaleimide. *J Gen Physiol* 1991; 97(4):799-817.
- (12) Kaji D M, Tsukitani Y. Role of protein phosphatase in activation of KCl cotransport in human erythrocytes. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 1991; 260:C178-C182.
- (13) Kelly S M, Butler J P, Macklem P T. Control of cell volume in oocytes and eggs from *Xenopus laevis*. *Comp Biochem Physiol* 1995; 111A:681-691.
- (14) Ackerman M J, Wickman K D, Clapham D E. Hypotonicity activates a native chloride current in *Xenopus* oocytes. *J Gen Physiol* 1994; 103:153-179.

- (15) Kelly S M, Jia Y L, Macklem P T. Measurement of elastic properties of *Xenopus* oocytes. *Comp Biochem Physiol* 1997; 118A:607-613.
- (16) Mount D B, Mercado A, Song L, Xu J, Geroge Jr A L, Delpire E et al. Cloning and characterization of KCC3 and KCC4, new members of the cation-chloride cotransporter gene family. *J Biol Chem* 1999; 274:16355-16362.
- (17) Mercado A, Song L, Vazquez N, Mount DB, Gamba G. Functional Comparison of the K⁺-Cl⁻ Cotransporters KCC1 and KCC4. *J Biol Chem* 2000; 275(39):30326-30334.
- (18) Geck P, Heinz E. Secondary active transport: Introductory remarks. *Kidney Int* 1989; 36:334-341.
- (19) Mount D B, Hoover R S, Hebert S C. The molecular physiology of electroneutral cation-chloride cotransport. *J Membrane Biol* 1997; 158:177-186.
- (20) Gamba G. Electroneutral chloride-coupled co-transporters. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000; 9(5):535-540.
- (21) Gamba G, Miyanoshita A, Lombardi M, Lytton J, Lee WS, Hediger MA et al. Molecular cloning, primary structure and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney. *J Biol Chem* 1994; 269:17713-17722.
- (22) Igarashi P, Vanden Heuver G B, Payne J A, Forbush III B. Cloning, embryonic expression, and alternative splicing of a murine kidney-specific Na-K-Cl cotransporter. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1995; 269:F406-F418.
- (23) Payne J A, Forbush III B. Alternatively spliced isoforms of the putative renal Na-K-Cl cotransporter are differentially distributed within the rabbit kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:4544-4548.
- (24) Simon D B, Karet F E, Hamdan J M, Di Pietro A, Sanjad S A, Lifton R P. Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nature Genetics* 1996; 13:183-188.
- (25) Xu J, Lytle C, Zhu T, Benz Jr.E, Forbush III B. Cloning and expression of the Na-K-Cl cotransporter of shark rectal gland. *J Gen Physiol* 1992; 100:39a-40a.
- (26) Xu J-C, Lytle C, Zhu T T, Payne J A, Benz Jr.E, Forbush III B. Molecular cloning and functional expression of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:2201-2205.
- (27) Delpire E, Rauchman M I, Beier D R, Hebert S C, Gullans S R. Molecular cloning and chromosome localization of a putative basolateral Na⁺-K⁺-

- 2Cl⁻ cotransporter from mouse inner medullary collecting duct (mIMCD-3) cells. *J Biol Chem* 1994; 269:25677-25683.
- (28) Yerby T R, Vibat C R T, Sun D, Payne J A, O'Donnell M E. Molecular characterization of the Na-K-Cl cotransporter of bovine aortic endothelial cells. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 1997; 273:C188-C197.
- (29) Payne J A, Forbush III B. Molecular characterization of the epithelial Na-K-Cl cotransporter isoforms. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7:493-503.
- (30) Harling H, Czaja I, Schell J, Walden R. A plant cation-chloride cotransporter promoting auxin-independent tobacco protoplast division. *EMBO J* 1997; 16:5855-5866.
- (31) Gamba G, Saltzberg S N, Lombardi M, Miyanoshita A, Lytton J, Hediger M A et al. Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the thiazide-sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:2749-2753.
- (32) Simon D B, Nelson-Williams C, Johnson-Bia M, Ellison D, Karet F E, Morey-Molina A et al. Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Nature Genetics* 1996; 12:24-30.
- (33) Hostteter T H, Rennke H G, Brenner B M. The case for intrarenal hypertension in the initiation and progression of diabetic and other glomerulopathies. *Am J Med* 1982; 72:375.
- (34) Payne J A, Stevenson T J, Donaldson L F. Molecular characterization of a putative K-Cl cotransporter in rat brain. A neuronal-specific isoform. *J Biol Chem* 1996; 271:16245-16252.
- (35) Caron L, Rousseau F, Gagnon E, Isenring P. Cloning and functional characterization of a cation Cl⁻-cotransporter interacting protein. *J Biol Chem* 2000; 275:32027-32036.
- (36) Mount D B, Delpire E, Gamba G, Hall AE, Poch E, Hoover Jr. RS et al. The electroneutral cation-chloride cotransporters. *J Exp Biol* 1998; 201:2091-2102.
- (37) Payne J A. Functional characterization of the neuronal-specific K-Cl cotransporter: implications for [K⁺]_o regulation. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 1997; 273:C1516-C1525.
- (38) Reuss L. Basolateral KCl cotransport in a NaCl -reabsorbing epithelium. *Nature* 1983; 305:723-726.
- (39) Wingo C S. *Am J Physiol* 1989; 256:F697-F704.
- (40) Brugnara C, Thuong Van Ha, Daniel C. Tosteson. Role of chloride in potassium transport through a K-Cl cotransport system in human red blood cells. *Am J Physiol* 1989; 256:C994-C1003.

- (53) Gusev GP, Agalakova NI, Lapin AV Potassium transport in red blood cells of frog *Rana temporaria*: demonstration of a K-Cl cotransport. *J Comp Physiol [B]* 1995; 165(3):230-237
- (54) Theander S, Edman A, Fahraeus C, Akoev GN, Grampp W. Cl- transport in the lobster stretch receptor neurone *Acta Physiol Scand* 1999; 167(4):285-298.
- (55) Linton SM, O'Donnell MJ. Contributions of K⁺:Cl⁻ cotransport and Na⁺/K⁺-ATPase to basolateral ion transport in malpighian tubules of *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol* 1999; 202 (Pt 11):1561-1570.
- (56) Leysens A, Dijkstra S, Van Kerkhove E, Steels P. Mechanisms of K⁺ uptake across the basal membrane of malpighian tubules of *Formica polyctena*: the effect of ions and inhibitors. *J Exp Biol* 1994; 195:123-145.
- (57) Holtzman E J, Kumar S, Faaland C A, Warner F, Louge P J, Erickson S J et al. Cloning, characterization, and gene organization of K-Cl cotransporter from pig and human kidney and *C. elegans*. *Am J Physiol (Renal Physiol)* 1998; 275:F550-F564.
- (58) Hiki K, D'Andrea R J, Furze J, Crawford J, Woollatt E, Sutherland G R et al. Cloning, characterization, and chromosomal location of a novel human K⁺-Cl⁻ cotransporter. *J Biol Chem* 1999; 274:10661-10667.
- (59) Race JE, Makhlof FN, Logue PJ, Wilson FH, Dunham PB, Holtzman EJ. Molecular cloning and functional characterization of KCC3, a new K-Cl cotransporter. *Am J Physiol* 1999; 277(6 Pt 1):C1210-C1219.
- (60) Mount D B, Mercado A, Song L, Xu J, Geroge Jr. A L, Delpire E et al. Cloning and characterization of KCC3 and KCC4, new members of the cation-chloride cotransporter gene family. *J Biol Chem* 1999; 274:16355-16362.
- (61) Isenring P, Jacoby S C, Forbush III B. The role of transmembrane domain 2 in cation transport by the Na-K-Cl cotransporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:7179-7184.
- (62) Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:5857-5864.
- (63) Liapis H, Nag M, Kaji DM. K-Cl cotransporter expression in the human kidney. *Am J Physiol* 1998; 275(6 Pt 1):C1432-C1437.
- (64) Elmslie FV, Rees M, Williamson MP, Kerr M, Kjeldsen MJ, Pang KA et al. Genetic mapping of a major susceptibility locus for juvenile myoclonic epilepsy on chromosome 15q. *Hum Mol Genet* 1997; 6(8):1329-1334.
- (65) Greger R. *Physiol Rev* 2001; 65:760-797.

- (66) Simon D B, Bindra R S, Mansfield TA, Nelson-Williams C, Mendonca E, Stone R et al. Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III. *Nature Genetics* 1997; 17:171-178
- (67) Haas M. The Na-K-Cl cotransporters. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 1994; 267:C869-C885
- (68) Lauf PK. *Am J Physiol* 1983; 245:C445-C448.
- (69) Matthews JB, Hassan I, Meng S, Archer SY, Hrnjez BJ, Hodin RA. Na-K-2Cl cotransporter gene expression and function during enterocyte differentiation. Modulation of Cl⁻ secretory capacity by butyrate. *J Clin Invest* 1998; 101(10):2072-2079.
- (70) Shetlar R E, Scholermann B, Morrison A I, Kinne R K H. Characterization of the Na⁺K⁺2Cl⁻ cotransport system in oocytes from *Xenopus laevis*. *Biochem Biophys Acta* 1990; 1023:184-190.
- (71) Ludwig A, Burckhardt G, Burckhardt BC. NH₄⁺ conductance in *Xenopus laevis* oocytes. II. Effect Of hypoosmolality. *Pflugers Arch* 1999; 437(3):484-490.
- (72) Dumont J N. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morph* 1970; 136:153-180.
- (73) Cossins AR, Gibson JS. Volume-sensitive transport systems and volume homeostasis in vertebrate red blood cells. *J Exp Biol* 1997; 200 (Pt 2):343-352.
- (74) Jacoby SC, Gagnon E, Caron L, Chang J, Isenring P. Inhibition of Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransport by mercury. *Am J Physiol* 1999; 277(4 Pt 1):C684-C692.
- (75) Markovich D, Knight D. Renal Na-Si cotransporter NaSi-1 is inhibited by heavy metals. *Am J Physiol* 1998; 274(2 Pt 2):F283-F289.
- (76) Wagner CA, Waldegger S, Osswald H, Biber J, Murer H, Busch AE et al. Heavy metals inhibit Pi-induced currents through human brush-border NaPi-3 cotransporter in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol* 1996; 271(4 Pt 2):F926-F930.
- (77) Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Extraction, purification, and analysis of messenger RNA from eukaryotic cells. In: Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, editors. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 7.3-7.6.
- (78) Delpire E, Lauf P K. Kinetics of DIDS inhibition of swelling-activated K-Cl cotransport in low K shepp erythrocytes. *J Membrane Biol* 1992; 126:89-96.