



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**LOCALIZACIÓN, DISTRIBUCIÓN Y POLARIDAD
DE UN CANAL DE POTASIO (Kv1.3) EN LA
MÉDULA INTERNA RENAL.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

ROLANDO CARRISOZA GAYTÁN.



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**

MÉXICO, D. F.

2004.



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.

Jurado asignado:

Presidente Prof. Homero Hernández Montes.
Vocal Prof. Marco Antonio Cerbón Cervantes.
Secretario Prof. Leonila Irma Laura Escobar Pérez.
1er. Suplente Prof. Alberto Gómez Gutiérrez.
2º. Suplente Prof. Nora Andrea Gutiérrez Nájera.

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM.

ASESOR:



Dra. Leonila Irma Laura Escobar Pérez.

SUPERVISOR TÉCNICO:



Mta. en C. Moniça Salas García.

SUSTENTANTE:



Rolando Carrisoza Gaytán.

A MIS PADRES:

ZENaida GAYTÁN.
GREGORIO CARRISOZA.

AMIS HERMANOS:

MARBELLA, JAVIER Y HUGO.

Agradecimientos:

A la Dra. Laura Escobar Pérez.

Por su asesoría durante la realización de este proyecto

A la M en C Mónica Salas García.

Al M en C. Dagoberto Tapia Ramirez.

A la M en C Carolina Salvador Hernández.

A la M en C. Silvia Ivonne Mora Herrera.

Por su apoyo técnico

Al jurado asignado por sus comentarios en la revisión.

A mis compañeros de laboratorio.

El presente trabajo fue realizado con financiamiento de los proyectos
DGAPA IN233802
CONACyT 30570-M

INDICE.

INDICE.....	1
1. RESUMEN.....	2
2. INTRODUCCIÓN.....	4
2.1. Membrana plasmática y transporte.....	4
2.2. Canales iónicos.....	6
2.3. Canales de potasio.....	8
2.4. Canales de potasio activados por voltaje.....	10
2.5. Fisiología del ión potasio.....	11
2.6. Anatomía y fisiología renal.....	14
2.7. Manejo renal del potasio.....	21
3. ANTECEDENTES.....	24
4. OBJETIVOS.....	26
5. METODOLOGIA.....	27
5.1. Western blot.....	27
5.1.1. Fundamento.....	27
5.1.2. Método.....	28
5.2. Inmunohistoquímica.....	30
5.2.1. Fundamento.....	30
5.2.2. Método.....	31
6. RESULTADOS Y DISCUSION.....	33
6.1. Western blot.....	33
6.1.1. Estandarización del anticuerpo primario.....	33

6.1.2. Cuantificación de las proteínas en los extractos crudos..	34
6.1.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.....	34
6.1.4. Inmunodetección.....	35
6.1.5. La localización intracelular del canal Kv1.3	36
6.2. Inmunohistoquímica.....	37
6.2.1. Inmunoperoxidasa indirecta.....	37
6.2.2. Inmunofluorescencia indirecta.....	39
6.2.3. Inmunofluorescencia indirecta con doble marcaje.....	40
7. CONCLUSIONES.....	42
6. PERSPECTIVAS.....	43
9. REFERENCIAS.....	44
10. APENDICE.....	47
10.1 PROTOCOLOS EXPERIMENTALES.....	47
10.2 SOLUCIONES Y REACTIVOS.....	57

1. RESUMEN.

Los canales iónicos son proteínas de membrana que median el flujo de iones entre el interior y el exterior de la célula a través de un pequeño poro acuoso en la membrana, como parte de un sistema de transporte pasivo.

Los canales de potasio conforman la superfamilia de los canales iónicos más extendida en los organismos vivos con más de 200 genes identificados., de los cuales 90 se han encontrado en el genoma humano.

Los canales de potasio se agrupan en diferentes familias con base en la homología de sus genes. Una de estas familias son los canales de potasio activados por voltaje (Kv), cuyo papel crítico en la regulación del potencial de reposo, la duración y la frecuencia del potencial de acción en las neuronas de mamíferos ha sido ampliamente estudiado, así como su distribución en otras células excitables, (músculo esquelético y corazón); pero poco se sabe de la distribución y la función de estos canales en los epitelios.

El potasio (K^+) es el catión más abundante del cuerpo humano, 50 a 55 mEq / kg de peso corporal. El 98% se distribuye en el líquido intracelular (LIC) ~ 140 mM y el 2% restante en el líquido extracelular (LEC) ~ 4 mM. Esta diferencia de concentración de K^+ de casi 35 veces da lugar a que se establezca un gradiente de concentración a través de la membrana celular, el cual es empleado por la célula para generar sistemas de señalización y control.

El riñón es capaz de ajustar la excreción del potasio en la orina en respuesta a la ingesta diaria manteniendo el balance corporal de este ión.

La regulación urinaria final de los iones Na^+ y K^+ ocurre en el conducto colector de la médula interna (CCMI). A pesar de la importancia del transporte de éstos, los flujos de membrana a través de los canales de potasio en el CCMI no han sido suficientemente investigados.

En el presente trabajo de investigación se desarrollaron metodologías para identificar un canal de potasio sensible al voltaje (Kv1.3) en las células de los CCMI del riñón de rata. Mediante los métodos de Western blot e inmunohistoquímica se demostró por primera vez la presencia del Kv1.3 en las células epiteliales de estos conductos. Los resultados de ambas metodologías fueron correlacionados y permitieron establecer la polaridad de los canales Kv1.3 en las membranas basolaterales. Estos hallazgos fueron reportados por primera vez en la literatura por nuestro grupo de trabajo.

2. INTRODUCCION.

2.1. Membrana plasmática y transporte

La membrana plasmática es una estructura continua, delgada (de 5 a 10 nm de espesor), que presenta cierta fluidez, dependiendo de la proporción de sus componentes. Los cuales son lípidos, proteínas y carbohidratos, distribuidos de manera heterogénea dependiendo del tipo de células y la función que estas realicen (figura 1). La membrana celular mantiene la composición diferencial entre el citoplasma y el medio ambiente extracelular, media la comunicación celular y la relación con las matrices extracelulares. (Alberts, 1994).

Los lípidos forman la estructura base de la membrana celular mientras que las proteínas son las responsables de la mayoría de las funciones específicas de membrana. Existen dos tipos de proteínas de membrana: integrales, cuando están embebidas en la bicapa lipídica o periféricas, unidas a la superficie de la bicapa, del lado citoplásmico o del lado extracelular.

La manera en que las proteínas se asocian a la bicapa lipídica es indicativo de su función como: proteínas transportadoras de sustancias, hacia el interior y exterior de la célula; proteínas receptoras, que transmiten señales del exterior hacia el interior celular; proteínas de anclaje, para fijar las proteínas estructurales dentro y fuera de la célula (Smith, 1998).

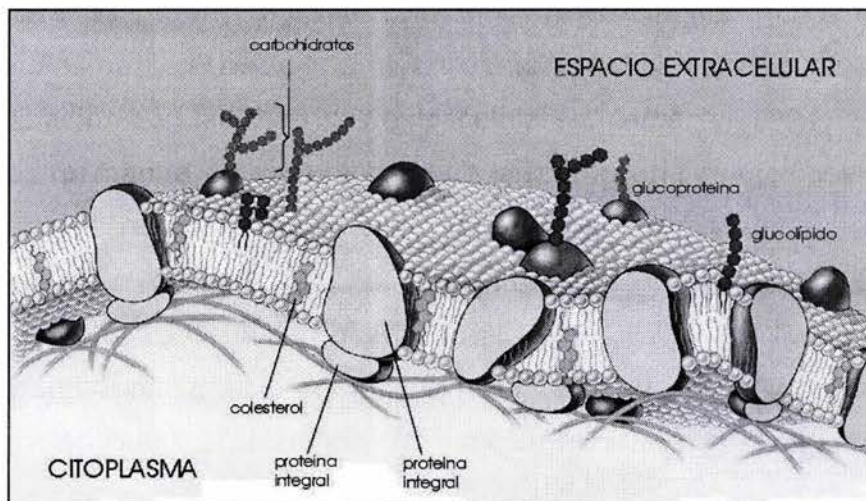


Figura 1. La membrana plasmática y sus componentes estructurales.

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

El transporte, es el intercambio de material entre el interior de la célula y su ambiente externo; casi siempre involucra proteínas transmembranales que median este intercambio. Existen diversos mecanismos de transporte, de moléculas de baja masa molecular, éstos se agrupan en transporte activo y transporte pasivo (figura 2).

El **transporte activo** involucra proteínas de membrana con actividad catalítica de hidrólisis de ATP acoplada al transporte de iones en contra de su gradiente electroquímico.

El **transporte pasivo** es un proceso de difusión de moléculas pequeñas a través de la membrana, siempre a favor de su gradiente. Este transporte se puede dar por la **difusión simple** a través de la bicapa (no involucra proteínas de transporte) de moléculas liposolubles como hormonas esteroideas, ciertos fármacos y moléculas no polares como el O_2 y el nitrógeno atmosférico; la **difusión facilitada** involucra proteínas transmembranales, que permiten el paso selectivo de pequeñas moléculas polares (aminoácidos y monosacáridos), llamadas transportadores; y de iones (Na^+ , K^+ , Cl^- y Ca^{2+}), llamadas canales iónicos (*Alberts, 1994*).

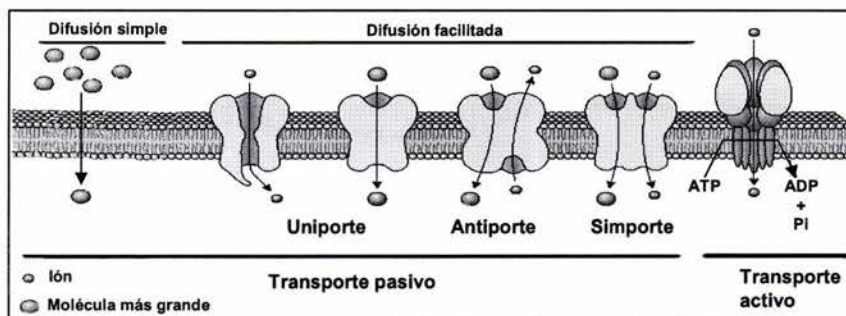


Figura 2. Tipos de transporte.

Las propiedades de permeabilidad de la membrana plasmática son atribuibles no solo al número y variedad de proteínas de transporte presentes sino también a la distribución de estas en dominios específicos de la membrana.

En las células epiteliales, la membrana plasmática se divide en los dominios apical y basolateral, separados uno de otro por las uniones estrechas. El dominio basolateral entra en contacto con una lámina celular basal y el dominio apical confronta hacia un lumen. La distribución asimétrica de las proteínas de transporte entre estas superficies, es la responsable de la capacidad del epitelio para mediar el transporte vectorial de solutos o fluidos en contra de sus gradientes de concentración. Tal distribución también determina si el transporte será de secreción o de absorción (*Muth, 2003*).

2.2. Canales Iónicos.

Los canales iónicos son proteínas de membrana que forman un poro acuoso a través de la membrana plasmática, el cual permite un flujo selectivo de iones extraordinariamente alto (mayor de 10^6 iones por segundo) de un lado al otro de la membrana (*Hille, 1992*). Este movimiento de iones produce una corriente eléctrica que puede ser detectada con instrumentos altamente sensibles al movimiento de cargas.

Los canales iónicos se encuentran ampliamente distribuidos en las células eucariontes. Desempeñan un papel central en la regulación de una gran variedad de procesos celulares que van desde la producción de señales en células excitables hasta la regulación del volumen celular y la proliferación. En los miocitos, los canales iónicos acoplan la entrada de una señal neuronal para la contracción. En las neuronas, los canales iónicos son los responsables de señales eléctricas complejas que forman las bases de la comunicación celular en el sistema nervioso.

Los canales iónicos catalizan la difusión pasiva de iones a través de la membrana celular. Pero en un contexto biológico, pueden mostrar diferentes propiedades. Por ejemplo, cuando se trata de coordinar señales eléctricas, los canales iónicos deben abrirse y cerrarse en respuesta a señales externas tales

como el cambio de potencial de membrana o la unión de un ligando específico a un receptor (*Hille, 1992*).

Existe una gran variedad de canales iónicos, los cuales son descritos comúnmente en términos de su selectividad iónica y su mecanismo de apertura y cierre (gating).

Por su selectividad iónica:

Canales Catiónicos

- **Canales de Sodio**
- **Canales de Potasio**
- **Canales de Calcio**
- **Canales Catiónicos no selectivos**

Canales Aniónicos

- **Canales de Cloro**

De acuerdo a la regulación de su mecanismo de apertura y cierre los canales pueden agruparse en (figura 3):

- Canales regulados por ligando (neurotransmisores como la acetilcolina, el glutamato, la glicina, el ácido α -amino butírico o la serotonina).
- Canales activados por voltaje.
- Canales activados por segundos mensajeros (ATP, Nucleótidos cíclicos o proteínas G).
- Canales sensibles a la tensión (presión osmótica, curvatura de membrana).
- Canales de uniones estrechas o intercomunicantes, son canales intercelulares que conectan el citoplasma de células adyacentes y permiten el flujo de pequeñas moléculas del interior de una célula al interior de otra (*Aidley, 1998*).

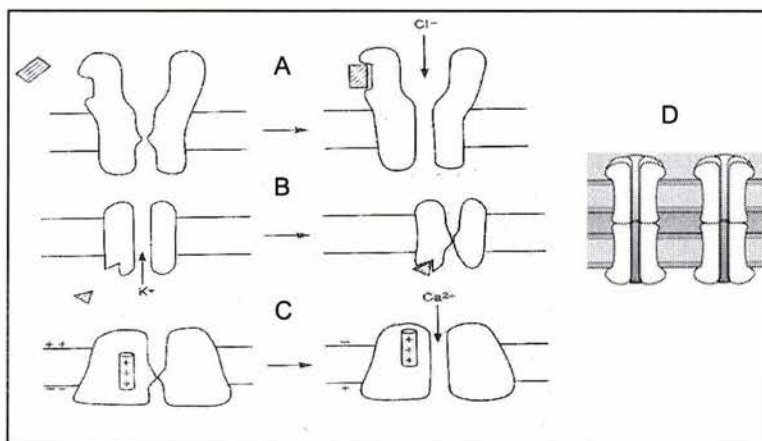


Figura 3. Diferentes tipos de canales iónicos.

A). Canal de cloro que se abre por la unión de un ligando; B). Canal de potasio que se cierra por la unión de un segundo mensajero; C). Canal selectivo a iones calcio sensible al voltaje, se abre, al ocurrir una despolarización en la membrana; D) Canal de unión intercomunicante, permite el flujo de sustancias e iones entre dos células, ejemplo las sinapsis eléctricas en las neuronas. Tomado de Aidley.

2.3. Canales de potasio

Los canales de K^+ desempeñan papeles críticos en los procesos de señalización celular que regulan la liberación de neurotransmisores, la excitabilidad neuronal, el ritmo cardiaco, la contracción de músculo esquelético y músculo liso, la secreción de la insulina, el transporte epitelial de los electrolitos, la regulación del volumen celular y la diferenciación celular (Warth, 2003).

Los canales selectivos al K^+ conforman la superfamilia de los canales iónicos más extendida en los organismos vivos. Se han identificado más de 200 genes que codifican para diferentes proteínas relacionadas con los canales de potasio, y 90 genes en el genoma humano (Shieh, 2000; <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily/kcn.shtml>).

La clasificación actual de los canales de potasio es con base en la homología de sus genes. Así los canales de potasio se dividen en canales activados por voltaje (K_v), dependientes de calcio (K_{Ca}) y rectificadores entrantes (K_{ir}) (Coetzee, 1999).

Los canales de potasio constan de cuatro subunidades transmembranales (subunidades α) que se agregan para formar un canal funcional; las subunidades α frecuentemente se asocian con otras cuatro subunidades reguladoras (β) en la región citoplásmica (figura 4). Cada subunidad α comprende de dos a 8 dominios transmembranales (S1 a S8) unidos por regiones citoplásmicas y extracelulares, uno o dos dominios formadores del poro (P loop), y los dominios citoplásmicos amino y carboxilo terminales.

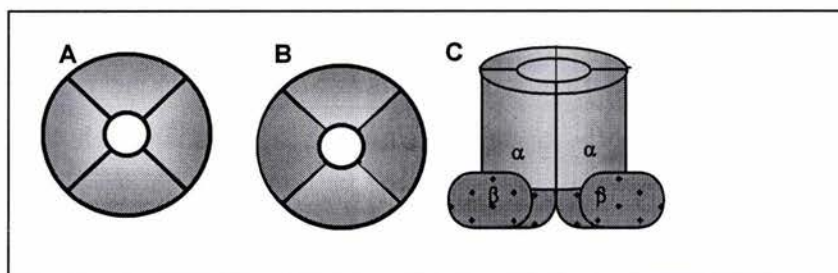


Figura 4. Agregación multimérica de los canales de potasio.
A). Homotetrámero. **B).** Heterotetrámero. **C).** Octámero con las 4 subunidades α y las cuatro subunidades reguladoras β .

En la figura siguiente se esquematizan las cuatro topologías de subunidades α en los canales de potasio (Choe, 2002).

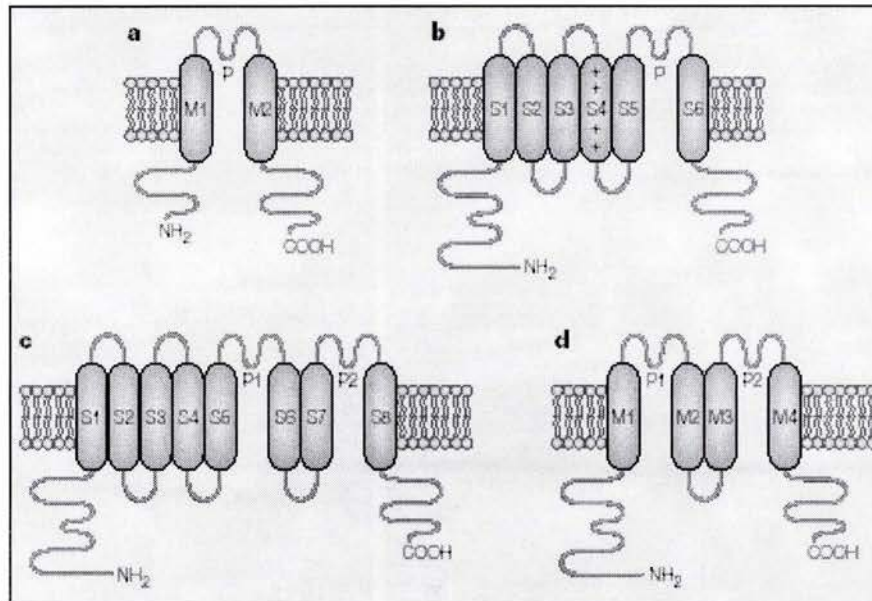


Figura 5. Topología de los canales de potasio.

a). Canales 2TM/P. Constan de dos helices transmembranales (TM), y un poro (P). Ejemplo: K_r .

b). Canales 6TM/P. Constan de seis TM y un P. Ejemplo Kv.

Los canales 2TM/P y 6TM/P forman tetrámeros.

c). Canales 8TM/2P. Canales híbridos de 6TM/P y 2TM/P.

d). Canales 4TM/2P. Consisten de dos repeticiones de canales 2TM/P.

Los canales 8TM/2P y 4TM/2P, probablemente se asocian en dímeros para formar un canal funcional.

(Tomado de Potassium Channel Structures; Senyon Choe).

2.4. Canales de potasio activados por Voltaje.

Los Kv juegan un papel crítico en la regulación del potencial de reposo, la duración y la frecuencia del potencial de acción en las neuronas de mamíferos.

Las membranas celulares se encuentran polarizadas, con mayor cantidad de cargas positivas acumuladas en la fase extracelular. Una despolarización de las membranas ocurre por el movimiento de estas cargas (principalmente el ión Na^+ y Ca^{2+}) hacia el lado citoplásmico de las membranas. Los canales Kv se abren en respuesta a la despolarización del voltaje transmembrana y facilitan el flujo del potasio al exterior celular, de esta forma el potencial de la membrana regresa a su estado de reposo (polarizado). Esta es la manera en que los Kv sensan la despolarización y la inhiben (Hille, 1992).

Los Kv comprenden la familia de los canales iónicos más grande y diversa de los canales de potasio. Se han caracterizado 38 genes en el genoma humano, y se agrupan en 11 subfamilias (Kv1 a Kv9, KvLQT y EAG). Los Kv se han identificado principalmente en el sistema nervioso central y en los músculos (Schmidt, 1999).

Un canal Kv funcional está compuesto por cuatro subunidades α idénticas (homotetrámero) o similares (heterotetrámero), las cuales forman el poro. Pueden asociarse con cuatro subunidades auxiliares β . Cada subunidad α tiene seis dominios transmembranales (S1-S6), entre los dominios S5 y S6 se encuentra un asa extracelular que forma el filtro de selectividad del poro (Yellen, 2002; Wray, 2003), en el segmento S4, existen siete aminoácidos con carga positiva (5 argininas, 1 lisina y 1 histidina) y constituye el sensor del voltaje (figura 6).

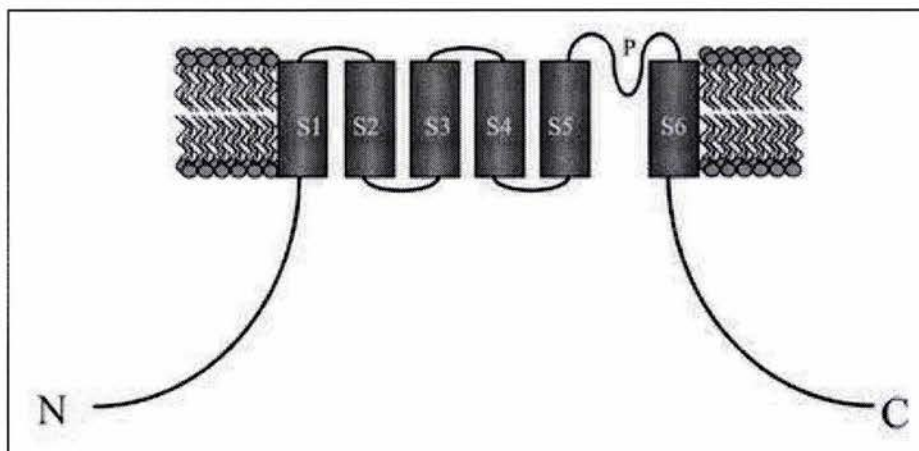


Figura 6. Arreglo de los segmentos transmembranales de un Kv. Tomado de Wray.:

2.5. Fisiología del ión potasio

El potasio (K^+) es el catión más abundante del cuerpo humano, 50 a 55 mEq / kg de peso corporal.

El potasio tiene dos funciones fisiológicas primordiales:

- Mantener las propiedades eléctricas de la membrana celular (repolarización durante un potencial de acción), tanto en tejidos excitables (nervioso y muscular) como en los que no son excitables (epitelios).
- Regular muchos procesos celulares tales como: división celular, síntesis de proteínas celulares y ADN, regulación del volumen celular, regulación del estado ácido base intracelular, glucólisis (cofactor enzimático de la piruvato cinasa), hidrólisis de ATP por la ATPasa sodio potasio (*Stanton, 1992*).

El 98% del potasio se distribuye en el líquido intracelular (LIC) ~ 140 mM y el 2% restante en el líquido extracelular (LEC) ~ 4 mM. Esta diferencia de concentración de K^+ de casi 35 veces da lugar a que se establezca un gradiente de concentración a través de la membrana celular. La ingesta de potasio diaria en promedio es de ~ 75 -100 mEq. El 90 al 95% del K^+ es excretado en la orina y el restante es excretado en las heces y el sudor (figura 7). La distribución interna del K^+ necesita una regulación precisa ya que la salida de tan solo 2 % de este catión del interior celular hacia el fluido extracelular, duplicaría la concentración del K^+ en el plasma provocando la despolarización de las membranas celulares, lo cual traería consecuencias fisiológicas fatales (*Muto, 2001*).

En el hombre la ingesta de K^+ es esporádica y éste no puede ser excretado rápidamente. La homeostasis del K^+ es regulada por dos mecanismos: uno controla el balance interno del potasio a corto plazo y el otro controla el balance externo del potasio a largo plazo.

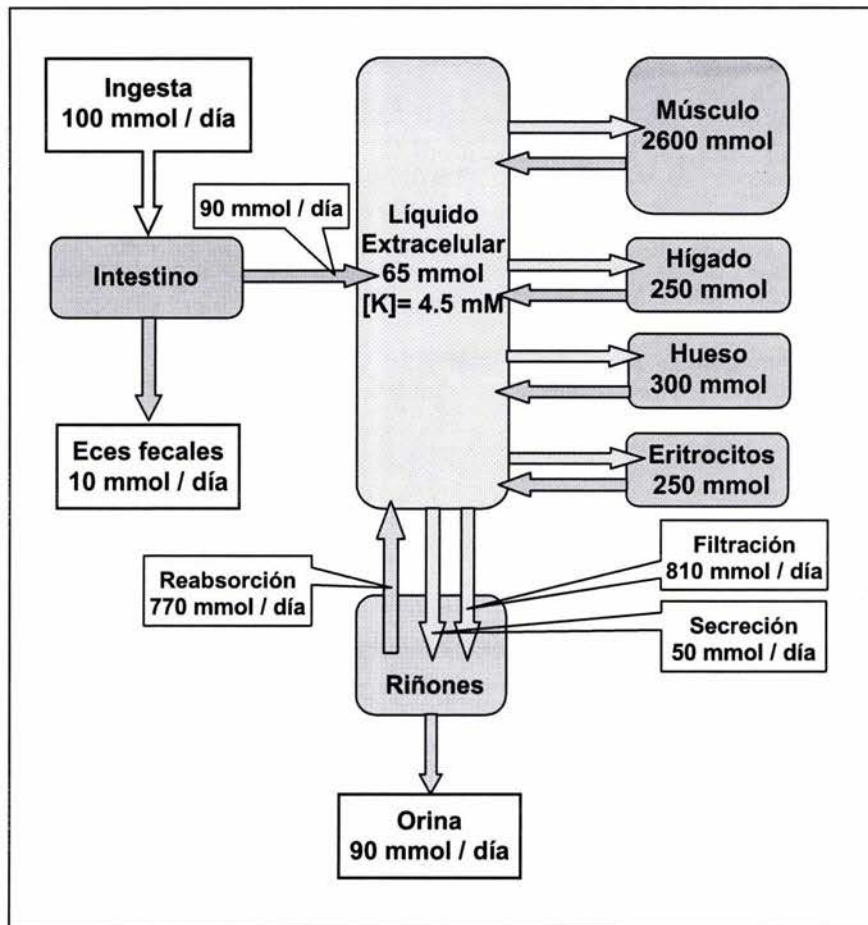


Figura 7. Distribución y balance del K^+ en el organismo.

Balance Interno del K^+ :

El balance interno del K^+ se refiere a la distribución del K^+ en los compartimentos del cuerpo (figura 7). Más notablemente entre el LEC y el LIC. Este proceso es regulado por diferentes factores hormonales y no hormonales, que activan mecanismos de transporte en las membranas celulares.

La concentración alta de K^+ en el citoplasma se genera por la ATPasa de Na^+/K^+ , la cual es ubicua en todas las células. Las células en reposo son muy permeables al K^+ por lo cual la cantidad de este catión que es bombeado al interior de las células por la ATPasa es igual a la que difunde en forma pasiva hacia fuera de las células.

El K^+ ingerido por vía oral con los alimentos se distribuye inicialmente en el líquido extracelular, y rápidamente se redistribuye hacia las células tisulares,

principalmente las del músculo esquelético. Las células captan rápidamente este exceso momentáneo de K^+ extracelular gracias a que la actividad de la ATPasa de Na^+/K^+ es estimulada por un aumento en las concentraciones de K^+ e insulina del líquido extracelular (figura 8).

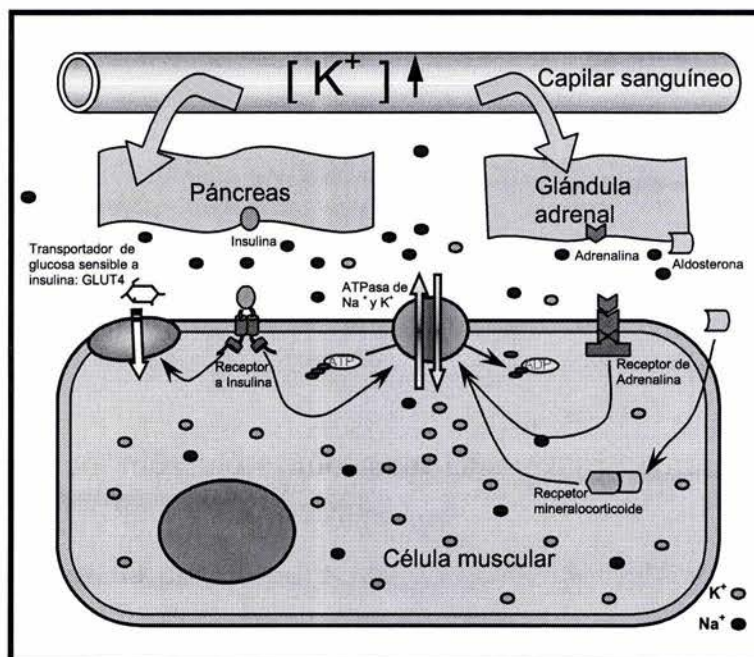


Figura 8. Control hormonal de la captación de potasio en las células musculares (Modificada de Boron)

La actividad de la ATPasa de Na^+/K^+ y la captación de K^+ por las células puede ser estimulada por diversas hormonas tales como la propia insulina, los agonistas β -adrenérgicos (Fig. 8), el glucagon, los mineralocorticoides y los glucocorticoides. Por el contrario, los agonistas α -adrenérgicos inhiben la captación de K^+ (Stanton, 1992).

Hay otros que no dependen de las hormonas, como son las alteraciones del equilibrio ácido-base que también afectan el desplazamiento de K^+ entre los líquidos intra y extracelular. Así, la alcalosis favorece la captación de K^+ por las células, mientras que la acidosis metabólica promueve su salida desde las células. Además de esto, el flujo de K^+ desde las células hacia el líquido extracelular puede aumentar como resultado de la muerte celular. Los tejidos dañados por quemaduras o traumatismos graves pueden liberar K^+ y producir hiperpotasemia.

Balance externo del potasio.

El K^+ al igual que el Na^+ puede salir del organismo por tres rutas: el sudor, las heces y la orina. La concentración promedio del K^+ en el sudor es igual a la del plasma; por consiguiente, la cantidad de K^+ que se pierde con el sudor en condiciones normales es despreciable. La pérdida promedio de K^+ en las heces es de sólo 5-10 meq / día. La regulación fisiológica de la salida de K^+ , al igual que la del Na^+ , está regulada principalmente por cambios en la cantidad excretada en la orina. En un adulto la excreción urinaria de K^+ promedio es de 45-90 meq/día, aunque puede variar desde 10 hasta 500 meq/día. El mantenimiento de la constancia del K^+ corporal depende del equilibrio entre su ingesta y su excreción. La ingesta de K^+ depende básicamente de las costumbres alimenticias del individuo. La conservación del balance de K^+ recae en los procesos fisiológicos que regulan su excreción renal, la cual responde por el 90 a 95% de la excreción total. El riñón es capaz de ajustar la excreción de K^+ en la orina para establecer un balance entre el K^+ excretado y el ingerido en la dieta (*Stanton, 1992*).

2.6. Anatomía y fisiología renal.

Los riñones, junto con la vejiga, uréteres y uretra, constituyen el aparato urinario. Desempeñan un papel vital en el mantenimiento de un ambiente químico estable para el cuerpo. Los riñones son los responsables de filtrar las impurezas de la sangre al drenar los productos metabólicos de desecho del cuerpo, xenobióticos y fármacos, así como de mantener el balance en el líquido corporal, el equilibrio electrolítico y equilibrio ácido base. (*Clark, 2001*).

Los riñones también desempeñan importantes funciones endócrinas: la producción de hormonas como la renina (para la regulación de la presión arterial), eritropoyetina (producción de eritrocitos) y la hidroxilación de Vitamina D, así como la gluconeogénesis, que en periodos de ayuno prolongados contribuye a regular la glucemia transformando aminoácidos en glucosa. (*Guyton, 2001; Houssay, 2000*).

Los riñones son órganos en par, situados en el espacio retroperitoneal, bajo el diafragma, en la pared abdominal posterior, a ambos lados de la columna

vertebral. El borde superior de los riñones se encuentra a nivel de la doceava vértebra torácica y el borde inferior a nivel de la tercera vértebra lumbar (figura 9). En el humano adulto cada riñón pesa en promedio entre 140 y 150 g y mide 10 cm de largo por 5 cm de ancho. La superficie externa del riñón es lisa y presenta depresiones lineales superficiales que marcan los límites de los segmentos que conforman el órgano. Cada riñón tiene dos polos, superior e inferior, y dos caras, anterior y posterior, un borde externo convexo y uno interno cóncavo. El borde interno presenta una hendidura longitudinal llamada *hilio renal*, a través de la cual pasan la arteria y la vena renal, los vasos linfáticos, los nervios y el uréter; llevando a una cavidad en cuyo interior se encuentran los vasos renales y la pelvis renal (Guyton, 2001).

El riñón está cubierto por una capa delgada de tejido conectivo, denominada cápsula renal. En un corte sagital del parénquima renal se distinguen dos regiones:

- *La corteza* (región externa) de 1 cm de grosor es de color marrón y de aspecto granuloso donde se observan unas estrías longitudinales conocidas como pirámides de Ferrein. Todos los conductos contorneados, los conductos colectores corticales, y los corpúsculos se localizan en la corteza.
- *La médula* (región interna). Es de color más pálido y de aspecto estriado por la disposición de las asas de Henle, los túbulos colectores medulares y los vasos sanguíneos medulares le dan un. La médula está formada por numerosas estructuras cónicas (8 a 12), conocidas como pirámides de Malpighi (figura 10).

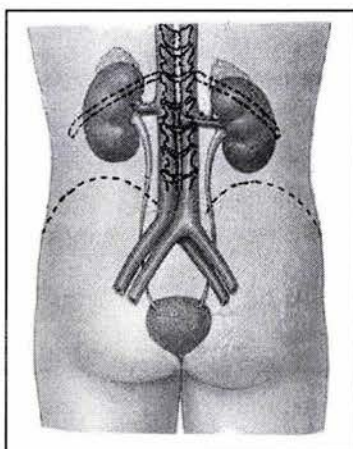


Figura 9. Localización anatómica de los riñones

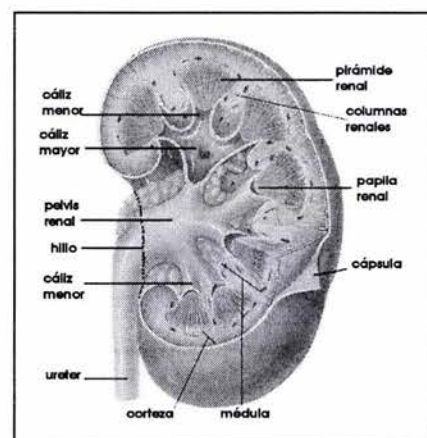


Figura 10. Corte Sagital de un riñón humano.

La médula a su vez se divide en *médula externa*, que es la porción más cortical de la médula, subdividida a su vez en banda externa e interna de la médula externa, y la *médula interna*. Estas subdivisiones obedecen a características fisiológicas más que a características anatómicas (Guyton, 2001 y Houssay, 2000).

La nefrona.

La nefrona es la unidad anatómica funcional del riñón. Es un sistema tubular continuo donde se lleva a cabo la formación de la orina, a través de los siguientes mecanismos: **la filtración glomerular la reabsorción y la secreción tubular**. Se estima que cada riñón humano contiene un millón de nefronas. Cada nefrona está formada por el corpúsculo renal y una porción tubular, la cual se puede dividir en varios segmentos sucesivos con distinta estructura y función (Guyton, 2001 y Boron, 2003).

Existen dos tipos de nefronas: corticales y yuxtamedulares (figura 11). La posición del corpúsculo renal determina el tipo de la nefrona. Además las nefronas corticales presentan asas de Henle cortas, que solo penetran en la médula externa, mientras que las nefronas yuxtamedulares (que son el 30% de la población) presentan asas de Henle más largas que penetran hasta la médula interna del riñón y participan de forma activa en la concentración de la orina (Boron, 2003 y Geneser, 2002).

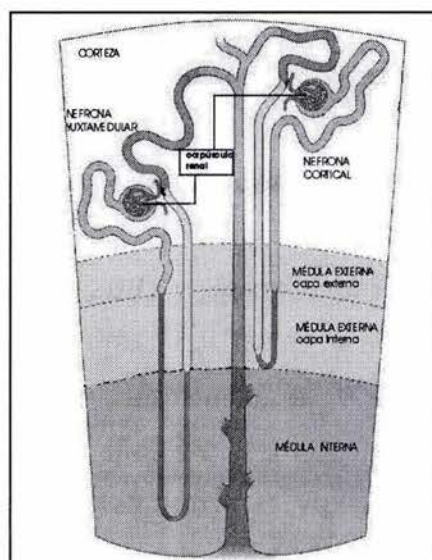


Figura 11. Estructura de las nefronas yuxtamedular y cortical.
(Modificada de Boron)

El corpúsculo renal es la primera porción de la nefrona, de estructura redondeada que mide aproximadamente 200 μm de diámetro. Se ubica en la corteza y esta formado por el glomérulo y la cápsula de Bowman.

El glomérulo es un ovillo de capilares ramificados que se anastomosan entre sí. Se agrupan en 8 a 10 lobulillos dispuestos en forma helicoidal alrededor de un eje, correspondiente a la porción interna del mesangio (figura 12).

La cápsula de Bowman es la estructura que rodea al glomérulo y está conformada por dos capas celulares. La capa externa de la cápsula o capa parietal, forma el límite exterior del corpúsculo renal. La capa interna o capa visceral, se compone de una capa de células epiteliales denominadas podocitos, con largas prolongaciones de su cuerpo celular que recubren los capilares del glomérulo.

El espacio entre las dos capas se denomina espacio urinario. El proceso de **filtración**, con producción de un ultrafiltrado de la sangre, tiene lugar desde los capilares del glomérulo, a través de sus paredes y la capa de epitelio visceral, y hacia el espacio urinario. En uno de los polos del corpúsculo renal, el polo urinario, el espacio capsular se comunica con la luz de la primera porción tubular, denominada túbulo proximal. De esta forma el ultrafiltrado pasa desde el espacio capsular al túbulo proximal. Opuesto al polo urinario se encuentra el polo vascular, por el que ingresa una arteriola aferente y egresa una arteriola eferente (Geneser, 2003).

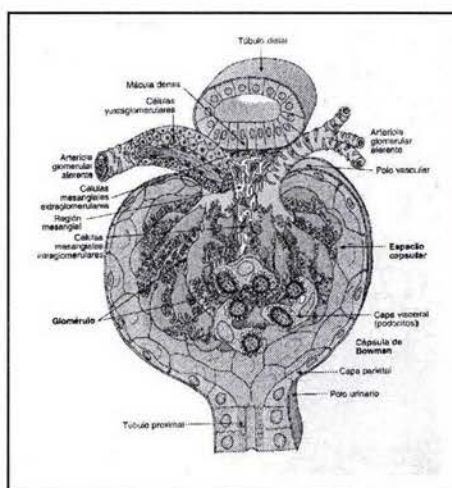


Figura 12. Componentes del corpúsculo renal. (Tomada de Finn).

El primer componente tubular de la nefrona es el túbulo proximal, el cual puede ser dividido en túbulo contorneado proximal (TCP) y túbulo recto proximal (TRP). El túbulo proximal se subdivide en tres segmentos: S1, S2 y S3. El segmento S1, comienza en el corpúsculo renal y comprende la primera porción del TCP. El segmento S2 inicia en la segunda mitad del TCP y termina en la primera mitad del TRP. El segmento S3 incluye la mitad distal del TRP que se extiende al interior de la médula. Las células que conforman estos segmentos tubulares, presentan membranas lumbales con numerosas microvelocidades llamadas borde de cepillo, a través de las cuales se lleva a cabo la **reabsorción** de una gran parte del filtrado glomerular (60 - 70%).

La siguiente porción tubular a partir del segmento S3 del túbulo proximal es el asa de Henle en sus porciones delgadas descendente (dDAH) y ascendente (dAAH). Las células que conforman esta porción no presentan grandes prolongaciones en sus membranas (*Boron, 2003*).

A continuación se encuentra la porción gruesa ascendente del asa de Henle (GAH), que se extiende hasta la mácula densa. Las células de esta porción tubular presentan interdigitaciones en su membrana apical y extensas invaginaciones basolaterales. El papel principal de estas células es la generación de un medio hiperosmótico en el intersticio de la médula renal.

La mácula densa es una región de células especializadas que entra en contacto con las arteriolas aferente y eferente del glomérulo. Por otro lado, las células de la pared de la arteriola aferente que están en contacto con las células de la mácula densa, son células musculares lisas especializadas en la producción de renina. Estas células, junto con la mácula densa y la matriz extraglomerular conforman el aparato yuxtglomerular (*Boron, 2003*).

El túbulo contorneado distal (TCD), comienza a partir de la mácula densa y se extiende hasta la transición con el túbulo conector; las células que lo conforman son muy similares a las que conforman la GAH.

El túbulo conector (TCN) es la siguiente porción a partir del TCD, conformado por dos tipos de células, las células del túbulo conector y las células intercaladas. El siguiente segmento: el conducto colector inicial (CCI) se presenta a partir del TCN y hasta la primera confluencia con otra nefrona. A partir de esta convergencia se denomina conducto colector cortical (CCC). Ambas porciones

son idénticas y están conformadas por dos tipos de células, las principales y las intercaladas. Las células principales constituyen el 70% de la población celular de estos túbulos y presentan invaginaciones basolaterales poco desarrolladas. Las células intercaladas son iguales a las presentes en el TCN y se distribuyen en dos subpoblaciones: las células intercaladas- α (secretoras de H^+) y las células intercaladas- β (secretoras de HCO_3^-) (Muto, 2001 y Boron, 2003).

El conducto colector medular es la porción tubular que recibe el fluido de diferentes nefronas, que confluyen en el CCC (aproximadamente 10 nefronas por conducto colector). Este se subdivide en conducto colector de la médula externa (CCME) y Conducto Colector de la Médula Interna (CCMI), El número de células intercaladas disminuye a lo largo del túbulo a medida que se penetra en la médula predominando las células principales como única población celular. El trayecto tubular, encuentra su porción final en la papila renal con el Conducto de Bellini, cuyas células son de mayor tamaño que las descritas en los segmentos anteriores (Muto, 2001 y Boron, 2003).

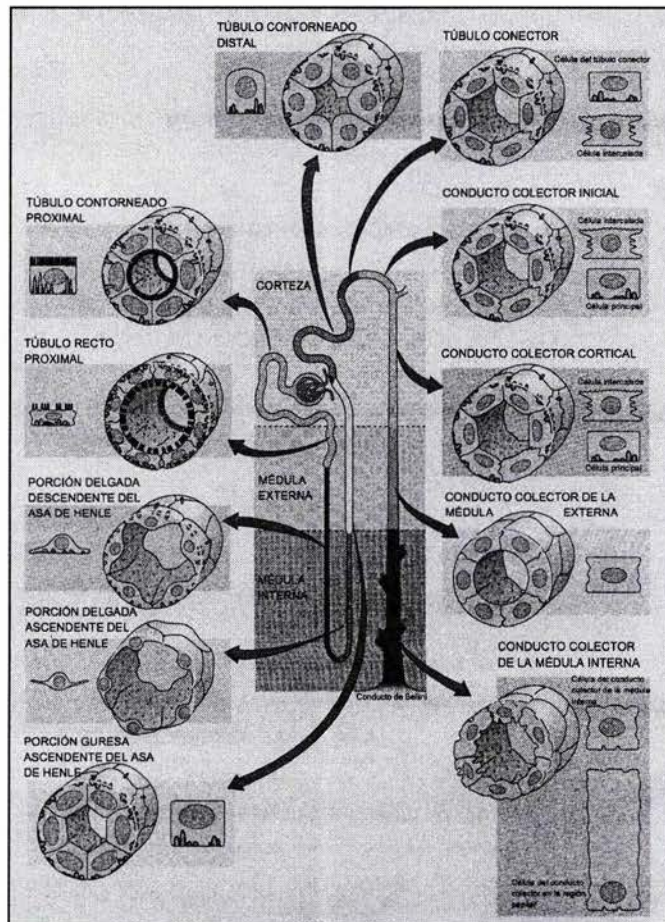


Figura 13. Tipos celulares que conforman los diferentes segmentos tubulares de la nefrona. (Tomada de Boron).

En el cuadro siguiente se muestran los diferentes procesos de transporte de agua y los diferentes solutos involucrados a lo largo del componente tubular de la nefrona (Boron, 2003).

SEGMENTO TUBULAR	TIPO CELULAR	TRANSPORTE.
Túbulo contorneado proximal (TCP).	S1 S2	Reabsorción: Cl^- , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , H_2O , fosfato, sulfato, glucosa, aminoácidos, mono y dicarboxilatos, urea, HCO_3^- . Secreción: H^+ y NH_3 y urato.
Túbulo recto proximal (TRP).	S3	Reabsorción: Na^+ , Cl^- , glucosa, urato. Secreción: K^+ .
Porción delgada descendente del asa de Henle (dDAH).	Células dDAH	Reabsorción: Na^+ . Secreción: K^+ , urea y NH_4^+ .
Porción delgada ascendente del asa de Henle (dAAH).	Células dAAH	Reabsorción: Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , NH_4^+ , HCO_3^- .
Porción gruesa ascendente del asa de Henle (GAH).	Células GAH	Reabsorción: Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} , H_2O , fosfato, HCO_3^- .
Túbulo contorneado distal (TCD).	TCD	Reabsorción: Na^+ , Cl^- .
Túbulo conector (TCN).	Células TCN Células Intercaladas	Reabsorción: Na^+ , Cl^- .
Conducto colector inicial (CCI).	Células Principales	Secreción: K^+ .
	Células Intercaladas	Reabsorción: Na^+ , Cl^- . Secreción: K^+ .
Conducto colector cortical (CCC).	Células Principales	Reabsorción: Na^+ . Secreción: K^+ .
	Células Intercaladas	(α) Reabsorción: K^+ . Secreción: H^+ . (β) Reabsorción: Na^+ , Cl^- .
Conducto colector de la médula externa (CCME).	Células principales	Reabsorción de Ca^{2+} , HCO_3^- . Secreción: NH_4^+
Conducto colector de la médula interna (CCMI).	Células CCMI	Reabsorción de K^+ , Urea, HCO_3^- . Secreción: H^+

(Boron, 2003 y Guyton, 2001).

2.7. Manejo renal del potasio

El K^+ se filtra libremente en el glomérulo. La carga filtrada de K^+ es del orden de 700 mEq por día. La mayor parte del K^+ filtrado (70%) se reabsorbe en el TCP como consecuencia de la reabsorción del Na^+ , de otros solutos y de agua (figura14).

Generalmente ocurre una secreción pasiva de K^+ en el TRP y en la porción dDAH, el K^+ es reabsorbido de manera pasiva en la porción dAAH y de manera activa en la porción GAH. El transporte activo del K^+ ocurre durante la reabsorción del Na^+ y es mediada por el cotransportador $Na^+-K^+-2Cl^-$ de la membrana apical y el transporte pasivo por los canales de K^+ de la membrana basolateral, de manera que al final del túbulo contorneado distal solo 10-15% de la carga filtrada de K^+ permanece en la luz tubular (*Stanton, 1992; Boron, 2003*).

El TCN secreta K^+ mediante un mecanismo similar al CCC, y esta secreción es mínima en comparación a la que ocurre en el próximo segmento. En el CCC la secreción de K^+ se lleva a cabo por las células principales. Esta secreción de K^+ depende de varios canales de la membrana apical (uno de Na^+ sensible a amilorida y varios canales de K^+), de la actividad de la bomba de Na^+/K^+ y de los canales de K^+ de la membrana basolateral. La secreción de K^+ esta acoplada a la reabsorción de Na^+ . La actividad de la bomba de Na^+/K^+ responde a una concentración alta de K^+ y baja de Na^+ intracelular. La actividad de los canales de K^+ basolaterales responde a un potencial de membrana intracelular negativo, el cual puede producir un potencial intracelular negativo en la membrana apical. Esto proporciona la fuerza electroquímica necesaria para la reabsorción de Na^+ a través del canal de Na^+ apical. El gradiente de concentración de K^+ brinda la fuerza química para la secreción de éste a través de los canales apicales. El epitelio del CCC es de tipo hermético, por lo que la permeabilidad de la vía paracelular es baja, de manera que la mayor parte del K^+ secretado permanece en el interior de este conducto. Esto hace que en condiciones normales la carga tubular de K^+ que abandona el CCC corresponda a cerca del 40% de la carga filtrada. Puesto que a este nivel la carga tubular de agua corresponde comúnmente al 5% de la carga filtrada, la concentración luminal de K^+ al final

del CCC es mucho mayor que en el plasma (*Muto, 2001; Stanton y Giebisch 1998*).

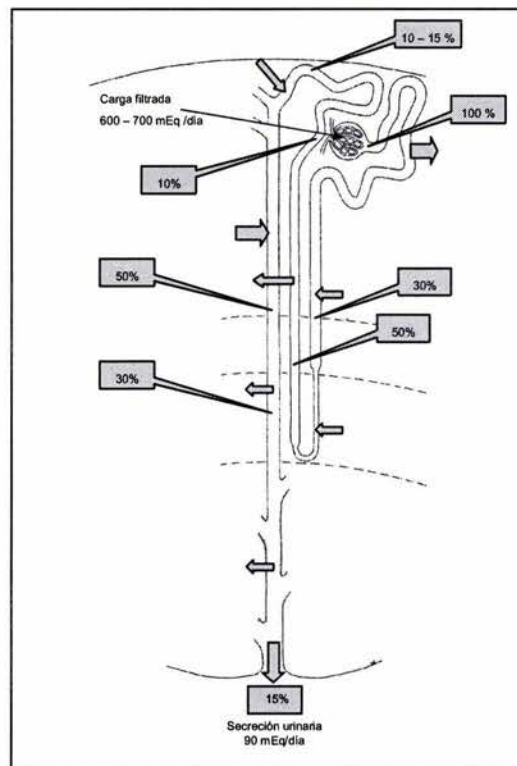


Figura 14. Manejo del potasio en las nefronas corticales (Tomada de Boron y Muto).

Los mecanismos de transporte de membrana en las células principales son favorables para la secreción de K^+ pero no para su reabsorción. Sin embargo, se sabe que cuando la ingesta de K^+ está restringida o en condiciones de hipokalemia el CCC puede reabsorber K^+ . Esta reabsorción ocurre a través de la bomba de H^+/K^+ de la membrana apical de las células intercaladas (*Stanton, 1992; Muto, 2001*).

El CCME consta de dos segmentos: el segmento de la banda externa y el segmento de la banda interna. El de la banda externa es muy similar al CCC, aunque su participación en la secreción de K^+ es menor. El conducto de la banda interna está formado por células similares a las del CCC, pero se diferencia de éste en que su epitelio es de tipo no hermético, por lo que la permeabilidad de su vía paracelular es alta. Debido a ello y a que la concentración luminal de K^+ es muchas veces mayor que en el plasma, en este epitelio puede producirse la

reabsorción pasiva de K^+ , que forma parte del mecanismo de reciclamiento de K^+ (figura15).

El CCMI puede reabsorber o secretar K^+ dependiendo de las necesidades para el equilibrio de K^+ , pero los mecanismos de transporte no están completamente aclarados. Al igual que en el conducto colector de la banda interna de la médula externa, el epitelio del CCMI es de tipo no hermético y la permeabilidad de su vía paracelular es alta, por lo cual participa en el reciclamiento del K^+ (figura15).

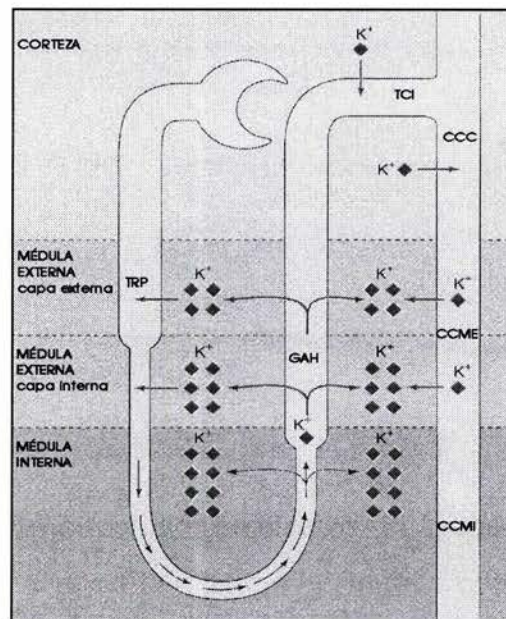


Figura 15. Reciclamiento del potasio.

Se lleva a cabo en la región medular, a cargo de las nefronas yuxtamedulares. (Tomada de Boron).

Regulación de la excreción urinaria de K^+ .

El TCI y el CCC son los sitios principales de control de la excreción renal de K^+ . Estos segmentos se distinguen por su marcada heterogeneidad celular y el transporte neto de potasio en dirección de la secreción o reabsorción resulta de la velocidad de secreción de K^+ a través de las células principales y de la reabsorción de K^+ a través de las células intercaladas (Stanton, 1992).

Los factores luminales incluyen la tasa del fluido distal, la carga tubular de Na^+ y la composición del fluido que llega al CCC. Los factores peritubulares incluyen cambios en la concentración de los iones K^+ , H^+ y HCO_3^- y de las hormonas aldosterona y vasopresina (Muto, 2001).

3. ANTECEDENTES

Los canales de potasio dependientes de voltaje, de la subfamilia Kv1 (*Shaker*) han sido ampliamente investigados. Su identificación y caracterización ha sido principalmente en el sistema nervioso central, donde participan en el control de la excitabilidad neuronal. Por el gran número de las diferentes combinaciones multiméricas que pueden presentar los Kv, éstos mantienen las condiciones óptimas para el estricto control del patrón de disparo de los potenciales de acción en los tejidos excitables (*Grunnet, 2003*). Pero a excepción del Kv1.3, que ha sido identificado y estudiado en células del sistema inmunológico (linfocitos-T), existe muy poca información de la distribución y funcionamiento de los canales Kv en otro tipo de tejidos no excitables, como los epitelios, donde recientemente se ha identificado la presencia de canales de la subfamilia Kv1 en los alvéolos pulmonares, epitelio papilar renal, próstata y colon (*Lee, 2003; Fergus, 2003; Ahidouch, 1999; Grunnet, 2003*).

Los canales de K^+ en la membrana basolateral de las células epiteliales, permiten la recirculación del K^+ a través de esta membrana, de este modo participan como elementos importantes en el mecanismo del transporte transepitelial de Na^+ , cuando la membrana apical no tiene canales de K^+ o la conductancia de estos es pequeña, los canales basolaterales pueden contribuir al mantenimiento de la fuerza motriz para el transporte de Na^+ a través de la membrana apical.

La regulación final de la excreción urinaria de Na^+ ocurre en el conducto colector de la médula interna (CCMI) del riñón. Estudios *in vivo* han demostrado que en el CCMI se reabsorbe del 2 al 3 % de la carga filtrada de Na^+ y que se presentan velocidades de transporte comparadas con las observadas en el túbulo contorneado proximal. Pese a la importancia de esta actividad de transporte, los flujos de membrana a través de los canales de potasio en el CCMI no han sido suficientemente investigados (*Escobar y col., 2004*).

Recientemente, en nuestro grupo se estudiaron las conductancias selectivas al K^+ en las células del CCMI del riñón de rata, usando las técnicas electrofisiológicas de parche perforado y de la célula completa. Se identificó por primera vez una corriente saliente de K^+ con características de rectificadora saliente tardía, activada por voltaje (figura 16). Los resultados sugieren que las corrientes registradas corresponden a un tipo de canal de la familia Kv. (Escobar y col., 2004).

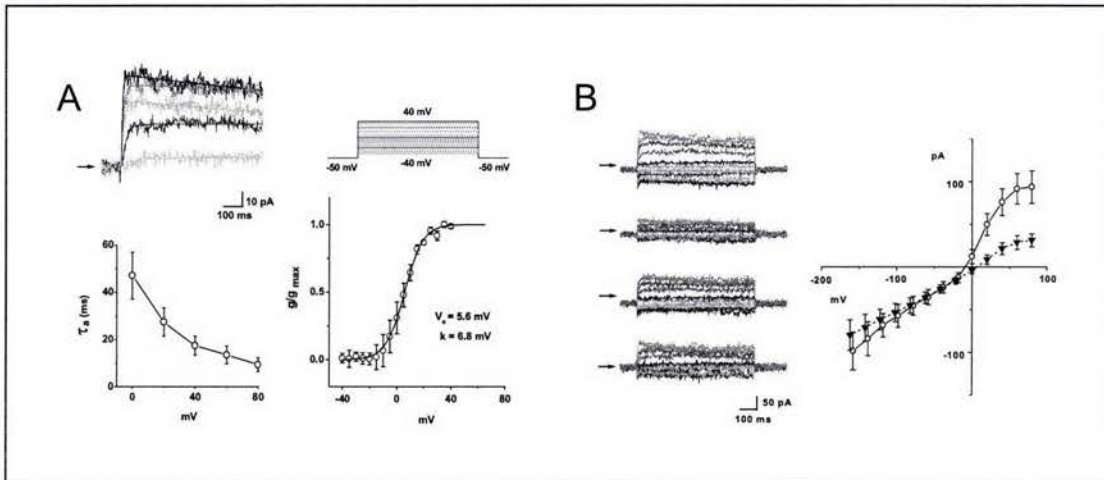


Figura 16. A) Corriente saliente de potasio con característica de rectificadora tardía, dependencia de voltaje y tiempo. B) El bloqueo de la corriente por tetraetil amonio es reversible.

A partir del RNA de las células del CCMI, se logró amplificar un fragmento de cDNA de 891 pares de bases con la técnica de RT-PCR. El análisis de la secuenciación del fragmento identificó al canal Kv1.3 (Escobar y col., 2004).

Las células del CCMI presentan membranas plasmáticas polarizadas, es decir, dominios basolateral y apical. La identificación del gen de un canal iónico (Kv1.3) en estas células, conlleva a demostrar la presencia de la proteína correspondiente (subunidad α del Kv1.3) en las membranas plasmáticas. De este modo se contribuye al estudio de la distribución de los canales Kv en los epitelios renales y la elucidación de su papel en el manejo renal del potasio.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Demostrar la presencia, distribución y polaridad del canal de potasio Kv1.3 en el conducto colector de la médula interna del riñón de la rata.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Identificar la presencia de los canales Kv1.3 en cortes histológicos de la médula renal de rata.
- Detectar la presencia de la subunidad α del Kv1.3 en extractos de membranas de la médula interna del riñón de rata.
- Establecer la polaridad del Kv1.3 en las células epiteliales del conducto colector de la médula interna.

5. METODOLOGIA

Con el objeto de estudiar la presencia y la distribución de la subunidad α del canal Kv1.3 en las células epiteliales del CCMI en el riñón de la rata, se propuso una estrategia experimental que involucra dos métodos para el análisis de las proteínas a partir de los tejidos: WESTERN BLOT, a partir de extractos de membranas de la médula interna, e INMUNOHISTOQUÍMICA, en cortes histológicos de la médula interna.

5.1. Western blot.

5.1.1. Fundamento

El método de Western blot consiste en la **transferencia** de las proteínas (separadas electroforéticamente) de un gel a un soporte sólido y la **detección** de éstas, con reactivos específicos para una secuencia particular de aminoácidos presentes en su estructura. Los anticuerpos son los reactivos que se unen de manera específica a los epítopes antigénicos mostrados por la proteína blanco unida al soporte sólido (*Sambrook, 1989*).

El método de Western blot utilizado (ECL: Enhanced Chemiluminescence), es un método de emisión de luz no radiactivo (quimioluminiscencia) para la detección de antígenos, con anticuerpos conjugados con la peroxidasa del rábano (figura 17). La peroxidasa del rábano cataliza la reacción de quimioluminiscencia del luminol (una diacilhidrazida cíclica) en presencia de peróxido de hidrógeno (figura 18). El producto de la oxidación alcanza un estado energético excitado que al decaer emite luz (Amersham Biosciences).

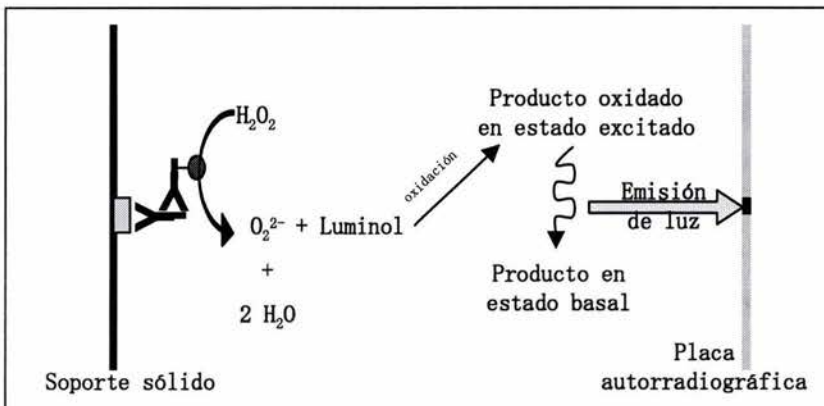


Figura 17.
Principio del
método ECL para
Western blot.

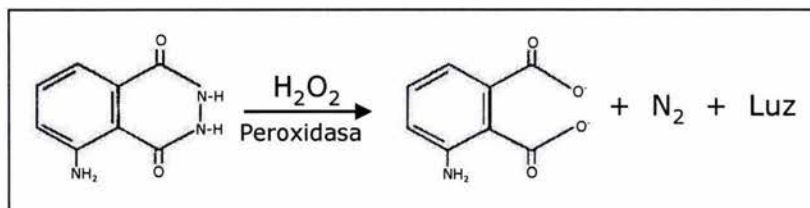
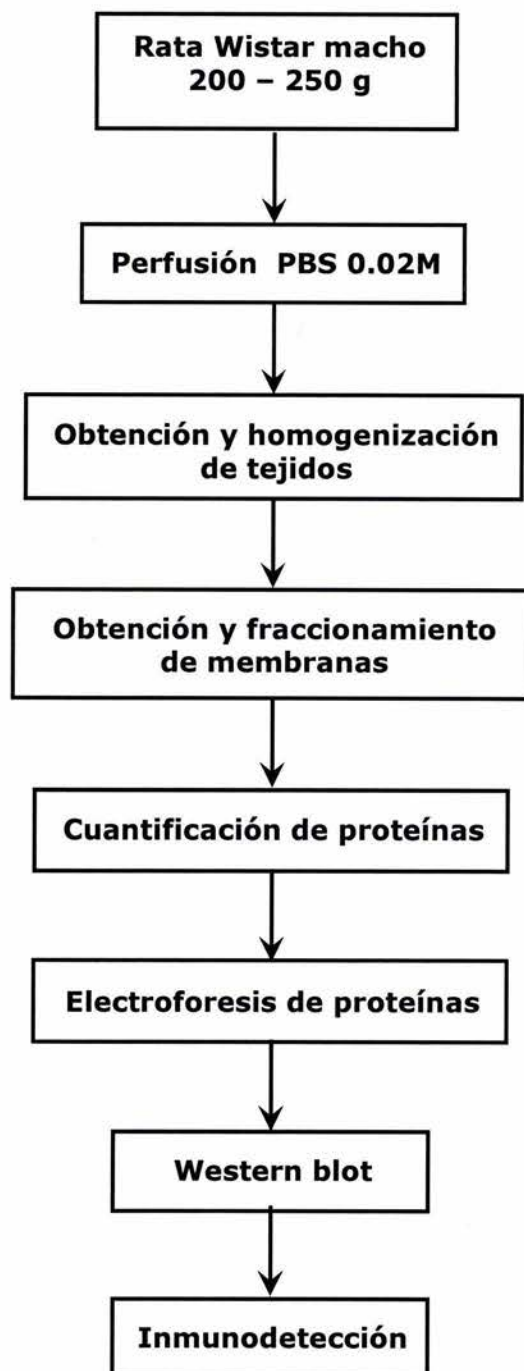


Figura 18. Reacción quimioluminiscente por oxidación del luminol

5.1.2. Método

Se utilizaron los extractos membranosos completos, así como las fracciones membranales de alta densidad y de baja densidad, enriquecidas con membranas plasmáticas y membranas microsomales obtenidas siguiendo las metodologías descritas en los apéndices 1.2 y 1.3. Como control positivo se utilizó el extracto de cerebelo, el cual expresa según Chung y colaboradores al Kv1.3 (2001).

Las proteínas contenidas en los extractos fueron solubilizadas y separadas con la técnica de electroforesis vertical en geles de poliacrilamida al 10%. Las proteínas separadas fueron electrotransferidas a un soporte sólido (membrana de nitrocelulosa), en el cual se realizó la inmunodetección de las proteínas que corresponden a la subunidad α del Kv1.3. Para ello se utilizaron anticuerpos primarios específicos para el canal (IgG de conejo anti Kv1.3; Chemicon Inc.), así como la técnica ECL (*enhanced chemiluminescence*; Amersham Biosciences), que incluye el uso de anticuerpos secundarios (IgG de cabra anti IgG de conejo) marcados con peroxidasa de rábano. La peroxidasa de rábano cataliza la reacción de oxidación de un sustrato (luminol) cuyo producto es luminiscente, en un medio alcalino que incrementa la emisión de luz.



5.2. Inmunohistoquímica.

5.2.1. Fundamento

Toda sustancia o estructura celular o tisular con capacidad antigénica es susceptible de ser visualizada en la célula *in situ* mediante métodos inmunohistoquímicos.

Los métodos inmunohistoquímicos directos se basan en la utilización de anticuerpos dirigidos contra determinantes antigénicos a las que se unen para formar el complejo antígeno-anticuerpo. Tales anticuerpos se marcan mediante un enlace químico a una sustancia que puede ser visible (fluorescente, o enzima cuyo producto de reacción es colorido), sin afectar su capacidad para formar un complejo con el antígeno (*Peinado, 1996*).

Actualmente los métodos inmunohistoquímicos directos han sido reemplazados por métodos indirectos, en los cuales se hace reaccionar el preparado a analizar con un anticuerpo primario no marcado dirigido contra el componente que se desea demostrar. Cuando el anticuerpo primario reacciona con el preparado se elimina el exceso, no fijado, y se hace reaccionar el preparado con un anticuerpo secundario marcado (con fluoresceína o peroxidasa), dirigido contra el anticuerpo primario. Este método es más sensible por que cada molécula del anticuerpo primario reacciona con varias moléculas del anticuerpo secundario marcado (*Geneser*). En la figura siguiente se esquematiza una reacción inmunohistoquímica indirecta (figura 19).

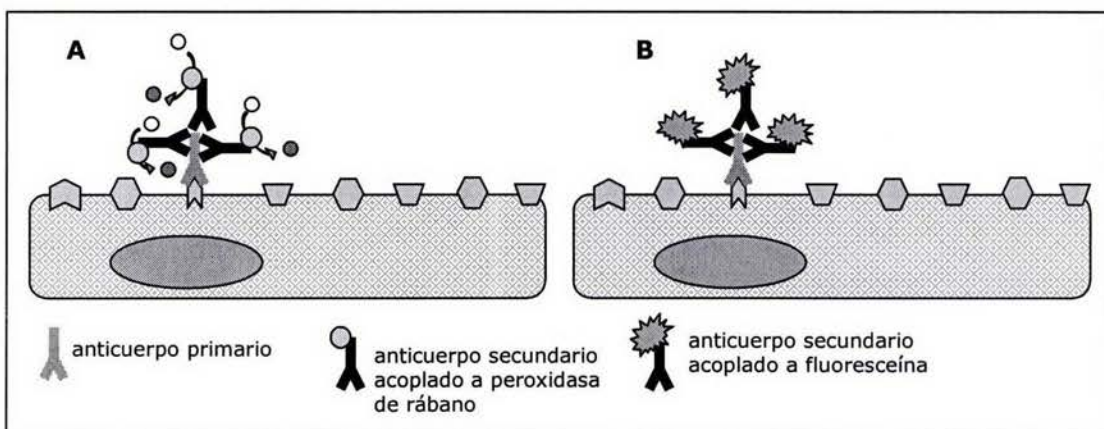
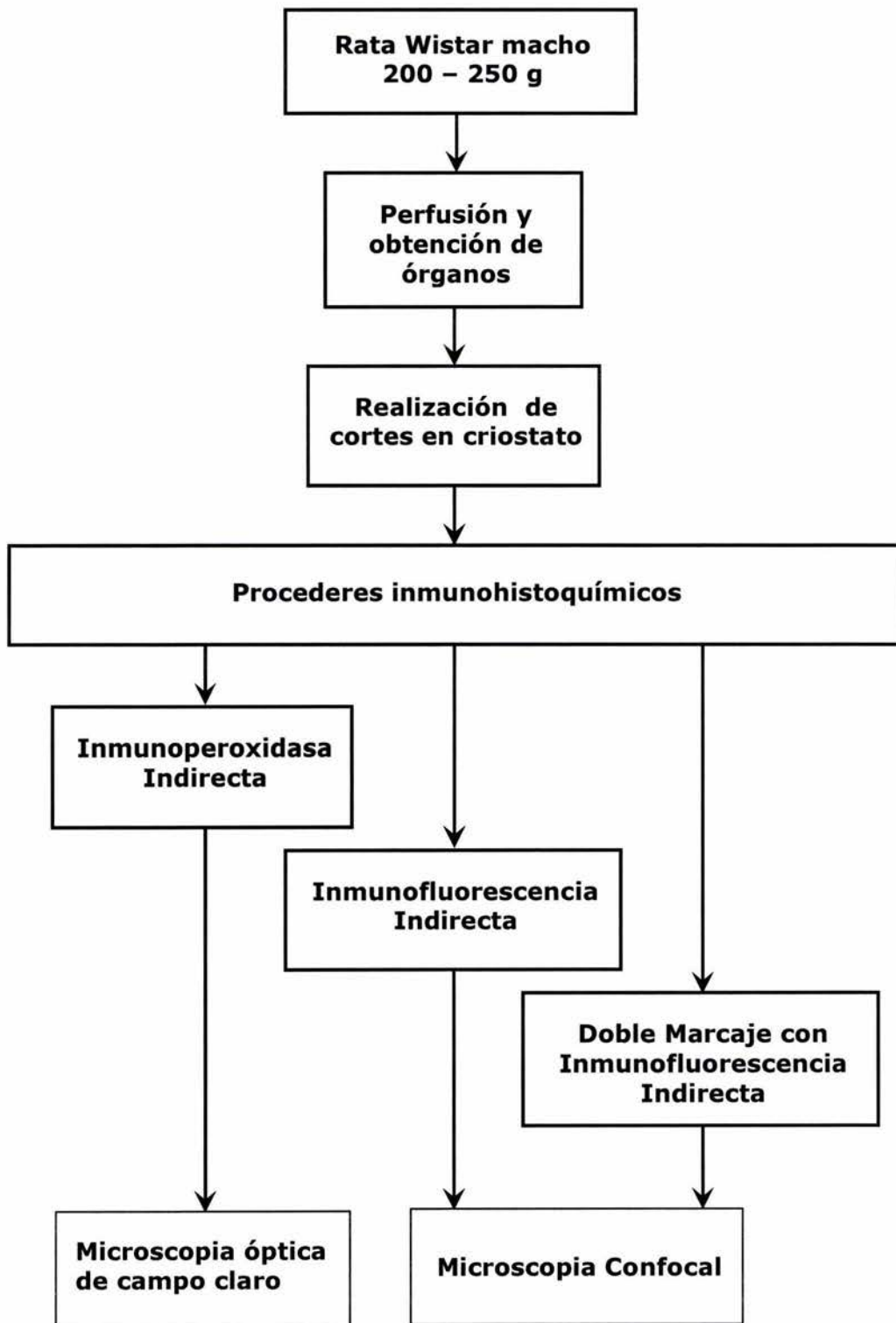


Figura 19. Inmunoperoxidasa indirecta(A) e inmunofluorescencia indirecta (B).

5.2.2. Método.

Se utilizaron dos técnicas inmunohistoquímicas para revelar la presencia del Kv1.3 en cortes histológicos de la médula interna del riñón de rata: la inmunoperoxidasa indirecta y la inmunofluorescencia indirecta. Para la inmunoperoxidasa indirecta se utilizaron los mismos anticuerpos primario y secundario que se usaron para el Western blot. El revelado de la reactividad positiva se realizó con diaminobencidina, una sustancia que al ser oxidada forma un polímero de color marrón que precipita y tiñe al tejido. La observación se realizó en un microscopio óptico de campo claro. La técnica de inmunofluorescencia indirecta implica el uso de anticuerpos secundarios unidos a moléculas con capacidad de fluorescer con luz UV (fluoróforos). Los fluoróforos usados para esta técnica fueron la fluoresceína—IgG de cabra anti IgG de conejo (Vector laboratorios). La reactividad positiva de color verde se observó en un microscopio confocal y evidenció detalles sobre la distribución celular del Kv1.3 en el epitelio de los CCMI. Cortes histológicos del cerebelo se utilizaron como control positivo de Kv1.3 en las células de Purkinje (*Chung y colaboradores, 2001*).

Comarcaje con inmunofluorescencia indirecta. En este caso, el Kv1.3 se marcó de la manera descrita previamente, pero también se marcó otra proteína, la ATPasa para sodio y potasio. Un anticuerpo primario (IgG de ratón anti ATPasa Na⁺/K⁺; SIGMA) y un anticuerpo secundario (rojo de Texas—IgG de caballo anti IgG de ratón), permitió la identificación de esta proteína con fluorescencia roja en las membranas basolaterales.



6. RESULTADOS Y DISCUSION.

6.1 Western blot.

6.1.1. Estandarización del anticuerpo primario

Se estudió la presencia de la subunidad α del canal de potasio Kv1.3, en extractos membranosos de la médula interna del riñón de rata. Primero fue necesario estandarizar la dilución del anticuerpo primario. Se realizó un análisis de dot blot en el cual se probaron tres diluciones diferentes de anticuerpo primario: 1:100, 1:200 y 1:400, para encontrar la dilución óptima (la dilución recomendada para western blot por parte del proveedor es 1:200). Las diluciones fueron probadas con extractos crudos de la médula interna renal (20 μ L), los extractos crudos de cerebelo (20 μ L), el péptido control (2 μ L) y albúmina 0.5 mg/mL como control negativo (20 μ L). Los extractos se usaron sin diluir. La dilución óptima encontrada, corresponde con la recomendada por el proveedor (figura 20), aunque se observó reactividad positiva con una dilución 1:400, esta era muy tenue, por lo tanto la dilución 1:200 del anticuerpo primario fue considerada en el western blot.

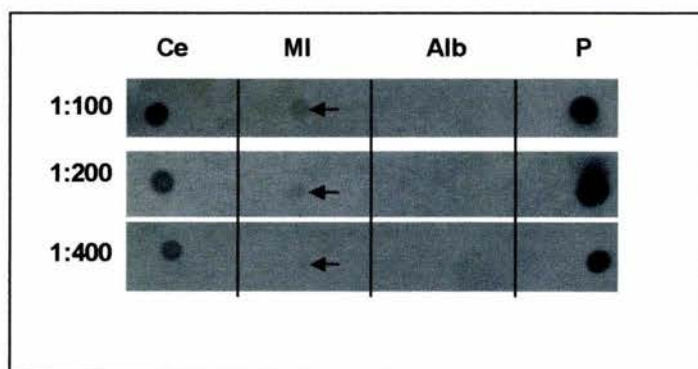


Figura 20: Estandarización de la dilución del anticuerpo. Ce: cerebelo; MI: médula interna; Alb: albúmina sérica bovina; P: péptido control. Aunque se observa reactividad con la dilución 1:400, esta es muy débil, por lo cual se eligió la dilución 1:200.

6.1.2 Cuantificación de las proteínas en los extractos crudos.

Las proteínas de los extractos crudos de las membranas fueron cuantificadas con un método colorimétrico (Bio-Rad Protein Assay), basado en la unión del colorante azul brillante de Coomassie G-250 con los residuos de aminoácidos aromáticos (arginina). Un cambio de color diferencial ocurre en respuesta a varias concentraciones de la proteína (Sedmack, 1977).

6.1.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.

Las proteínas cuantificadas, fueron diluidas en la solución de extracción, solubilizadas y desnaturalizadas en la solución desnaturalizante (Laemmli, 1970) y fueron separadas electroforéticamente en un gel de poliacrilamida-SDS al 10% junto con 5 μ L de estándares de peso molecular (Bio-Rad) para su separación. Las condiciones de la electroforesis fueron de 15 mA, gel de 0.75 mm de espesor y tiempo de la corrida 1.5 horas.

Dos carriles se cargaron con las proteínas y uno con los estándares de peso molecular. El gel se tiñó con azul de Coomassie para corroborar una buena separación electroforética (figura 21).

El detalle de la técnica se describe en el apéndice 10.1.4. de la página 49.



Figura 21. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida al 10%. 1) Estándares de peso molecular; 2) 20 μ g de proteína de Médula interna; 3) 50 μ g de proteína de Médula interna.

Después de corroborar una separación adecuada de las proteínas, una porción del gel fue utilizada para la electrotransferencia a un soporte sólido (western blot).

6.1.4. Inmunodetección

Finalizada la transferencia se procedió a la inmunodetección con los reactivos ECL; como control positivo se utilizó el extracto crudo de las membranas de cerebelo y como control negativo, el anticuerpo primario fue preincubado con el péptido control (1 hora). Se detectó una banda aproximadamente de 74 kDa, correspondiente al Kv1.3 (figura 22).

El detalle de la transferencia se describe en el apéndice 10.1.5 de la página 50.

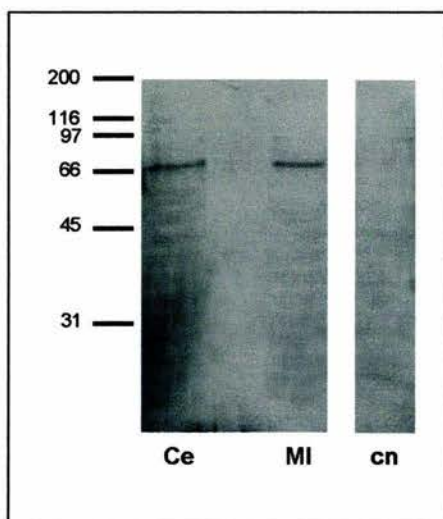


Figura 22. Western blot para Kv1.3. Se observa marca específica del anticuerpo para Kv1.3 en bandas que corresponden a un peso molecular de 74 kDa. Ce: cerebelo; MI: médula interna; cn: control negativo en cerebelo. El anticuerpo fue preincubado una hora con el péptido control.

6.1.5. La localización intracelular del canal Kv1.3 .

Por último, se realizó un protocolo de separación de las membranas mediante centrifugación para analizar la distribución del Kv1.3 en las membranas plasmática y microsomal. El resultado muestra que el Kv1.3 se encuentra mayoritariamente en las vesículas microsomales (figura 23).

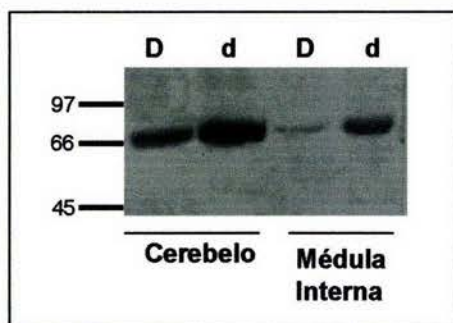


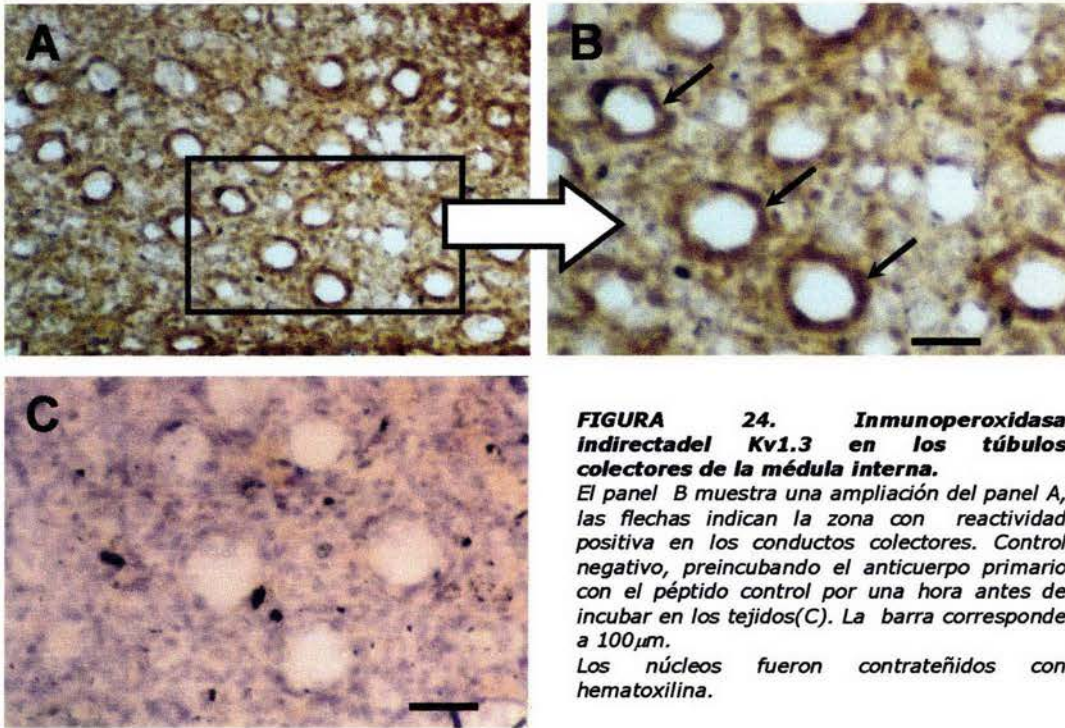
Figura 23. Western blot en fracciones de membranas. D) Extracto de membranas de alta densidad (enriquecido con membranas plasmáticas); d) Extracto de membranas de baja densidad (enriquecido con membranas microsomales). Se observa mayor cantidad de Kv1.3 en la fracción de membranas microsomales que en la fracción de membranas plasmáticas. En todos los carriles se cargaron 100 μ g de proteína.

Aunque los resultados muestran un mayor contenido de la subunidad α del canal Kv1.3 en las membranas microsomales, los ensayos realizados no proporcionan información de las células en las que se encuentra presente el canal, pues en la médula interna, se encuentran diferentes tipos celulares: las células que conforman los conductos colectores de la medula interna, las células que conforman el epitelio de las asas de Henle, las células que conforman los vasos sanguíneos y las células del intersticio renal. Para poder elucidar la distribución celular, se utilizaron diversas técnicas inmunohistoquímicas que revelaran la presencia del Kv1.3 en cortes histológicos de la médula interna.

6.2. Inmunohistoquímica.

6.2.1 Inmunoperoxidasa indirecta.

Las imágenes observadas al microscopio óptico de campo claro, muestran reactividad positiva para el Kv1.3 en los conductos colectores.



El mismo ensayo de la peroxidasa indirecta, para el Kv1.3 fue realizado en cortes histológicos de cerebelo, como control positivo.

La figura 25 muestra las diferentes capas que conforman el tejido cerebelar materia blanca (MB), capa granulosa (CG) y capa molecular (M), así como las células de Purkinje localizadas entre las capas granulosa y molecular, las cuales presentan de acuerdo con lo descrito por Chung y colaboradores reactividad positiva para el Kv1.3 .

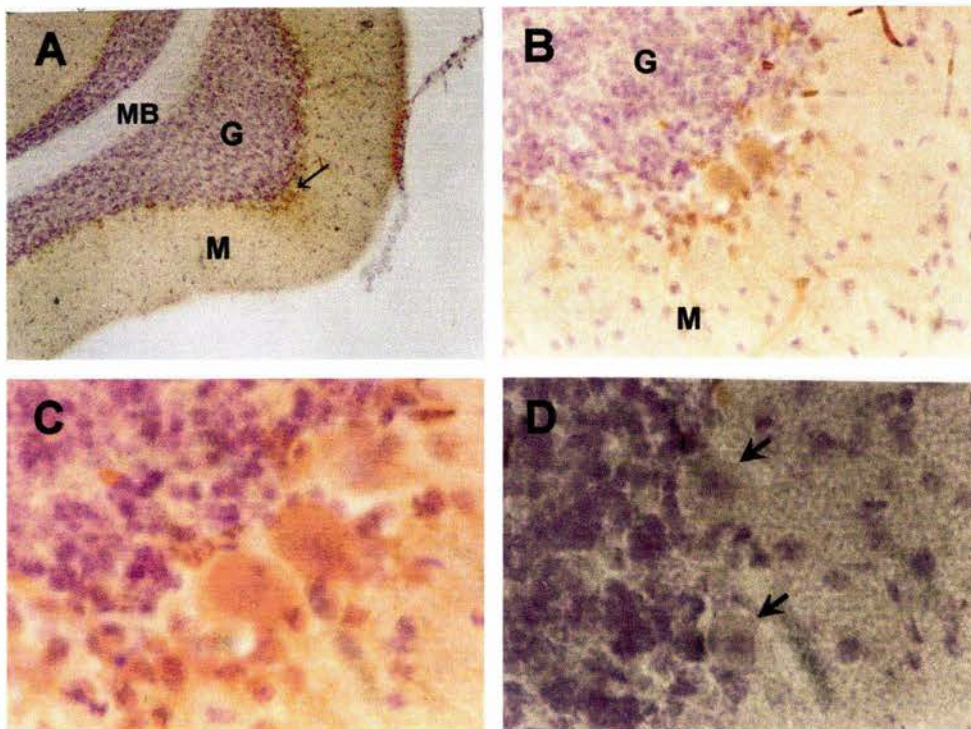


Figura 25. Inmunoperoxidasa indirecta para el Kv1.3 en el cerebelo. La materia blanca y la capa granulosa no muestran reactividad positiva para el Kv1.3; mientras que las células de Purkinje si muestran reactividad positiva (señaladas con flechas en A y D). A) 10X; B) 20X; C) 40X; D) 40X, control negativo, preincubando el anticuerpo primario una hora con el péptido control. Los núcleos fueron contrateñidos con hematoxilina.

Los ensayos de la inmunoperoxidasa indirecta lograron evidenciar la reactividad positiva para el Kv1.3 en los conductos colectores, pero no su distribución subcelular. De acuerdo con los resultados del western blot el Kv1.3 predomina en las membranas microsomales. La capacidad de resolución de la técnica con el microscopio óptico no permite observar a nivel subcelular. Por consiguiente, se utilizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta con la captura de las imágenes por un microscopio confocal para ayudar a resolver las limitaciones de la microscopia de campo claro.

6.2.2. Inmunofluorescencia indirecta.

La inmunofluorescencia indirecta permitió elucidar detalles más finos sobre la distribución celular y subcelular del Kv1.3 en los conductos colectores (figura 26).

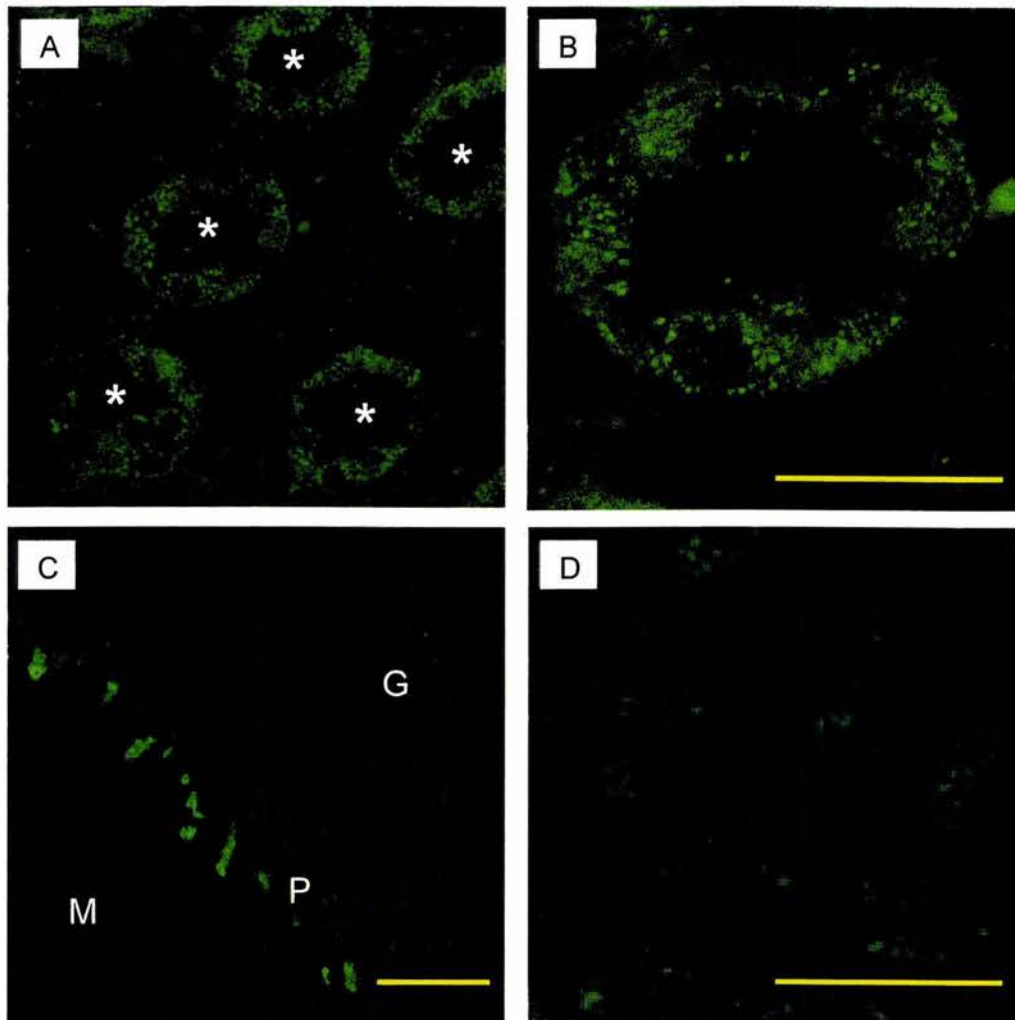


Figura 26. Inmunofluorescencia indirecta anti Kv1.3 .

A: Corte transversal de la médula interna del riñón de rata, los túbulos colectores se señalan con *. B: Ampliación de un túbulo colector de la imagen A. C: Corte sagital del cerebelo de rata, usado como control positivo con reactividad positiva en las células de purkinje (P), con escasa reactividad positiva en la región granulosa (G) y reactividad negativa en la región molecular (M) . D: Control negativo en médula interna. La barra corresponde a 100 μm. Las imágenes fueron capturadas con objetivo confocal 40X. En (B) Se observa reactividad positiva en el citoplasma de las células del conducto colector y no se puede apreciar la reactividad en la membrana plasmática. La distribución heterogénea de la reactividad positiva, sugiere una expresión del Kv1.3 en la membrana basolateral, pero que no es posible corroborarlo dado la alta reactividad citoplásmica que impide definir la membrana plasmática.

6.2.3. Inmunofluorescencia indirecta con doble marcaje.

Para elucidar la expresión y distribución del canal Kv1.3 en las células de los conductos colectores, fue necesario recurrir a la técnica de doble marcaje. Ya que la ATPasa Na^+/K^+ se expresa en la membrana basolateral de estas células (Muto, 2001), por lo cual se utilizó como marcador de esas membranas. Las imágenes obtenidas muestran la presencia del Kv1.3 en las membranas basolaterales (figura 27).

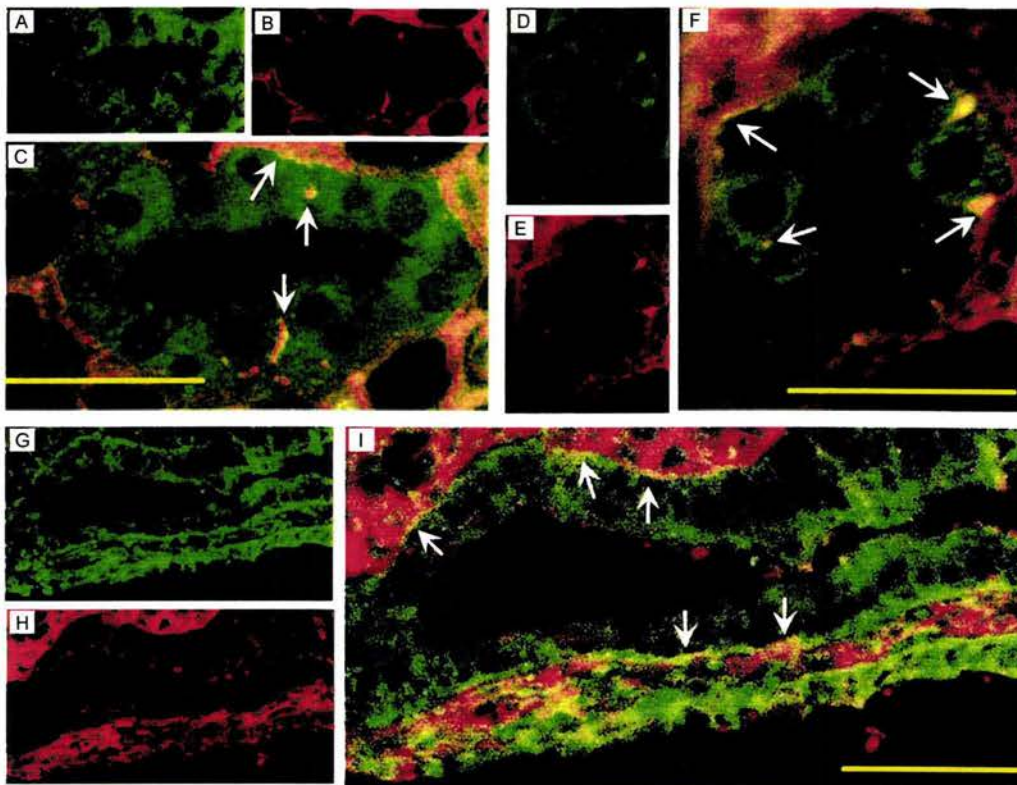


Figura 27. Localización del Kv1.3 y la ATPasa Na^+/K^+ en las células del CCM1. En cortes transversales (C y F) y corte sagital (I). Localización del Kv1.3 en las células epiteliales (A, D y G; verde) y localización de la ATPasa Na^+/K^+ en la membrana basolateral (B, E y H; rojo). La colocalización del Kv1.3 (verde) en las membranas basolaterales (rojas) se muestra de color amarillo (C, F, I) se señala con flechas. La barra amarilla corresponde a $100\mu\text{m}$.

Las imágenes obtenidas demuestran la presencia del Kv1.3 en las membranas basolaterales de las células epiteliales del conducto colector de la médula interna. Al ser este el primer dato reportado sobre la polaridad de un canal Kv en el epitelio renal, llama la atención el hecho de que la

inmunoreactividad positiva se localice predominantemente en el citoplasma de dichas células. Este dato se apoya en los resultados del Western blot, en los cuales la fracción enriquecida con membranas microsomales muestra una reactividad mucho mayor que la fracción con membranas plasmáticas. Por consiguiente estos resultados sugieren que los canales Kv1.3 se encuentran retenidos en vesículas microsomales (retículo endoplásmico y/o aparato de Golgi) antes de distribuirse en las membranas basolaterales de las células epiteliales. El hecho de que parte de los canales se encuentre en estas vesículas, sugiere que su expresión en la membrana puede estar modulada por sitios consenso de retención presentes en su estructura primaria (*Deutsch, 2002*), así como por factores fisiológicos y hormonales acoplados con el transporte de los electrolitos en el riñón, siendo la médula interna, la región donde se realizan los últimos ajustes del fluido urinario (*Giebisch, 1998*).

Algunos de estos datos fueron ya publicados (*Escobar y colaboradores, 2004*).

7. CONCLUSIONES

- Se identificaron los canales Kv1.3 en cortes histológicos de la médula renal, con una distribución heterogénea en las células epiteliales de los conductos colectores de la médula interna.
- Se logró detectar la presencia de la subunidad α del Kv1.3 en extractos de membranas de la médula interna del riñón de rata, el peso molecular de la subunidad aproximadamente de 74 kDa.
- Se encontró mayor predominancia del Kv1.3 en las membranas que provienen del retículo endoplásmico.
- Se logró establecer la polaridad basolateral del Kv1.3 en las células epiteliales del conducto colector de la médula interna.

8. PERSPECTIVAS.

El registro por patch clamp de las corrientes de potasio en las células del cultivo primario del conducto colector de la médula interna, indica que el Kv1.3 debe estar formando un heteromultímero con otra subunidad α de esta subfamilia de canales de potasio (Kv1 *Escobar y col., 2004*). El objetivo de nuestro grupo de trabajo en estudios posteriores será:

- Investigar la presencia de otros canales Kv1 en la médula interna del riñón de rata.
- Establecer la asociación multimérica del Kv1.3 con otros canales de la subfamilia shaker.
- Identificar en que compartimento(s) se encuentra el Kv1.3 distribuido (retículo endoplásmico, aparato de Golgi, cis, trans o retículo Golgi).
- Identificar los mecanismos fisiológicos que regulan la expresión del Kv1.3 en las membranas basolaterales del conducto colector de la médula interna (alto potasio, bajo potasio, hormonas: vasopresina y aldosterona).
- Identificar secuencias consenso de retención en la estructura primaria del Kv1.3.
- Investigar la expresión del Kv1.3 en los epitelios tubulares en la médula externa y la corteza renales.

9. REFERENCIAS.

- Aidley D. J., Stanfield P. R. "Ion channels molecules in action" first edition. Cambridge University Press, U K,1996. Reprint 1998, pags 3-8.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. "Molecular biology of the cell" third edition. Garland Publishing, Inc. USA, 1994, pags477-486 y 507-516.
- Boron W. F., Boulpaep E. L. "Medical physiology a cellular and molecular approach" first edition. Saunders, USA, 2003, pags 739-745 y 754-860.
- Choe S., "Potassium channel structures". *Nature reviews/Neuroscience* **3**: 115-121, 2002.
- Chung Y., Shin C., Kim M., Lee B., Cha C. "Immunohistochemical study on the distribution of six members of the Kv1 channel subunits in the rat cerebellum". *Brain Res* **895**: 173-177, 2001.
- Clark E., Fanguy J., Henry C. "High throughput multi-analyte screening for renal disease using capillary electrophoresis". *J Pharma Biomed Analysis* **25**: 795-801, 2001.
- Coetzee W. A., et al "Molecular Diversity of K⁺ channels". *Annals N Y Acad Sci* **868**: 233-285, 1999.
- Deutsch C. "Potassium cannel ontogeny". *Annu Rev Physiol* **64**: 19-46, 2002.
- Escobar L. I., Martinez J. C., Salas M., Castilla S. A., Carrisoza R., Tapia D., Vazquez M., Bargas J., Bolivar J. J, "A voltaje-gated K⁺ current in renal inner medullary collecting duct cells". *Am J Physiol Cell Physiol* **286**: C965-C974, 2004.
- Fergus D., Martens J., England S. "Kv channel subunits that contribute to voltage-gated K⁺ current in renal vascular smooth muscle" *Pflugers Arch* **445(6)**: 697-704, 2003.
- Geneser F. "Histología sobre bases moleculares" tercera edición. Editorial médica panamericana, Argentina, 2002, pags 42-45 y 555-578.
- Giebisch G., "Renal potassium transport: mechanisms and regulation". *Am. J. Physiol Renal Physiol* **274**: F817-F833, 1998.

- Grunnet M., Rasmussen H., Schmidt A., Klaerke D. "The voltage-gated potassium channel subunit, Kv1.3, is expressed in epithelia" *Biochim Biophys Acta* **1616**: 85-94, 2003.
- Guyton A., may J. E. "Tratado de fisiología médica" décima edición. Mc Graw-Hill Interamericana, México, 2001, pags 339-347.
- HGNC, Department of Biology, University Collage London, 2003. <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily/kcn.shtml>
- Hille B. "Ionic channels of excitable membranes" second edition. Sinauer associates Inc. USA, 1992, pags 1-6.
- Houssay A. B., Clingolany H. E. "Fisiología humana" primera edición. Editorial el Ateneo, Argentina, 2000, pags 445-448.
- Laemmli U.K. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature* **227**: 680-685, 1970.
- Lee J, Oh Y., Kim S. "Altered renal expression of aquaporin-2 water channels in rats with experimental two-kidney, one clip hypertension". *J Korean Med Sci* **16**: 462-466, 2001.
- Lee S., Maniak P., Ingbar D., O'Grady S. "Adult alveolar epithelial cells express multiple subtypes of voltage-gated K⁺ channels that are located in apical membrane". *Am J Physiol Cell Physiol* **284**: C1614-C1624, 2003.
- Lehninger A. L., Nelson D. L., Cox M. M. "Principios de bioquímica" primera reimpresión, Ediciones Omega, S. A. 1995, pags 30-32 y 268-295.
- Muth T. R., Caplan M. J. "Transport protein trafficking in polarized cells". *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**: 333-366, 2003.
- Muto S. "Potassium transport in the mammalian collecting duct". *Physiol Rev* **81**: 85-116, 2001.
- Ouadid-Ahidouch H., Van Coppenolle F., Le Bourhis X., Belhaj A., Prevarskaya N. "Potassium channels in rat prostate epithelial cells". *FEBS Lett.* **459**:15-21, 1999.
- Peinado M. A., Pedrosa J. A., Rodrigo J. "Avances en inmunocitoquímica y técnicas relacionadas" primera edición. Universidad de Jaén, España, 1996, pags 52-58.

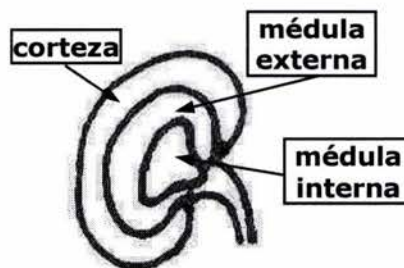
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. "Molecular cloning a laboratory manual" Book 3, second edition. Cold Spring Harbor laboratory press, USA, 1989, pags 18.47–18.65 .
- Sedmack J. J. and Grossberg, S. E., *Anal Biochem* **79**: 544, 1977.
- Schmidt K., Eulitz D., Veh R., Kettenman H., Kirchhoff F. "Heterogeneous expression of voltage-gated potassium channels of the *shaker* family (Kv1) in oligodendrocyte progenitors". *Brain Res* **843**: 145-160, 1999.
- Shieh C., Coghlan M., Sullivan J., Gopalakrishnan M. "Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities". *Pharmacol Rev* **52**: 557-593, 2000.
- Smith C. A., Wood E. J., "Biología Celular" primera reimpression. Addison Wesley Longman, México, 1998, pags 91–98.
- Stanton B. A., Giebisch G. "Renal potassium transport". En: Handbook of physiology, sec 8 Renal physiology. E.E. Windhager (editor), Oxford University Press. USA, 1992, pags 813-836.
- Warth R. "Potassium channels in epithelial transport". *Pflugers Arch Eur J Physiol* **446**: 505-513, 2003.
- Wray D. "The roles of intracellular regions in the activation of voltage-dependent potassium channels". <http://www.springerlink.com/media/4NC6RLYWLD9L4KMEJE/Contributions/X/F/Y/E/XFYERG3HUJ8XQ93B.html/fulltext.html>
- Yellen G. "The voltage-gated potassium channels and their relatives". *Nature* **419**: 35-42, 2002.

10. APENDICE

10.1. PROTOCOLOS EXPERIMENTALES.

10.1.1. Perfusión y obtención de tejidos para western blot.

1. Anestesiarse la rata con cloroformo.
2. Una vez que el animal se encuentra anestesiado profundamente, se procede a la apertura de la cavidad torácica, quedando al descubierto pulmones y corazón.
3. Se rasga el pericardio para liberar así el corazón.
4. Se sujeta el corazón con forceps y se perfora el ventrículo izquierdo con la cánula de perfusión, haciéndola penetrar el ventrículo hasta llegar al interior de la aorta.
5. A continuación se pinza la cánula con los forceps que sujetan al corazón para mantenerla fija durante toda la perfusión.
6. Con unas tijeras se rasga la aurícula derecha para que a través de ésta salga toda la sangre contenida en el torrente circulatorio, que es arrastrada por la solución de perfusión.
7. A través del corazón se perfunde PBS pH 7.4 durante cinco minutos. El PBS debe estar enfriado en hielo.
8. Al finalizar la perfusión se procede a la obtención de los órganos para su procesamiento (cerebelo y riñones). Contenerlos en PBS en un baño con hielo mientras se procesan.
9. El riñón entonces es seccionado para obtener la médula interna (MI) que es el tejido a estudiar.



10.1.2. Obtención de los extractos crudos de membranas.

1. Cortar finamente los tejidos hasta obtener secciones mínimas y proceder a homogenizar en un volumen mínimo de solución de extracción (4 mL). Utilizar homogenizadores de teflón.
2. Centrifugar el homogenizado a 1000 g durante 10 minutos. Contener el sobrenadante y resuspender el sedimento en 0.5 mL de solución de extracción.
3. Centrifugar el resuspendido a 1000 g durante 10 minutos y recuperar el sobrenadante; desechar el botón resultante.
4. Mezclar el sobrenadante obtenido en los dos últimos pasos (membranas celulares), al cual se le denominará **extracto crudo de membranas**.
5. Cuantificar las proteínas con el método colorimétrico de azul de Coomassie, siguiendo las instrucciones del producto (Bio-Rad Proteín Assay) sugeridas por el proveedor.
6. Almacenar a -20 °C por un día y a -70 °C periodos de tiempo mayores.

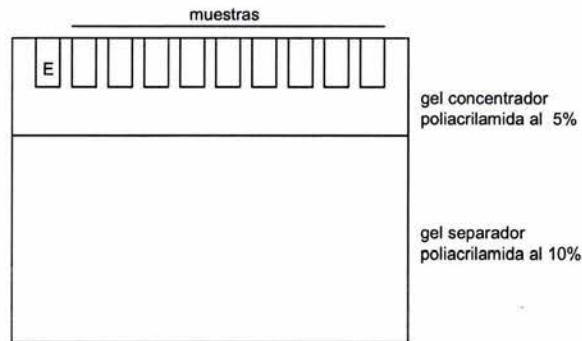
10.1.3. Fraccionamiento de los extractos crudos (Lee, 2001).

1. Centrifugar los extractos crudos de las membranas a 17 000 g durante 20 minutos a 4 °C.
2. Recuperar el sobrenadante resultante. El sedimento obtenido se resuspende en la solución de extracción (0.5mL) para tener una suspensión enriquecida con membranas de alta densidad (membranas plasmáticas); almacenar a -20° C si el almacenaje no será mayor de 24 horas y a -70° C si el almacenaje será por periodos de tiempo mayores de 24 horas.
3. Centrifugar el sobrenadante a 100, 000 g durante una hora. El botón resultante se resuspende en 200 mL de la solución de extracción para obtener una suspensión enriquecida con membranas de baja densidad (membranas microsomales). Almacenar en las mismas condiciones del paso previo.
4. Cuantificar las proteínas con el método de azul de Coomassie, siguiendo las instrucciones del producto (Bio-Rad Proteín Assay) sugeridas por el proveedor.

10.1.4. Electroforesis de las proteínas en geles de poliacrilamida-SDS.

Los geles de poliacrilamida están compuestos de acrilamida polimerizada por la acción de un agente de entrecruzamiento, el N,N'-metilenbisacrilamida. El rango efectivo de separación de los geles de SDS-poliacrilamida depende de la concentración de poliacrilamida usada para formar el gel y de la cantidad del agente de entrecruzamiento. La concentración de 10% resulta ser óptima para separar proteínas en rangos de masa molecular entre 31 y 97 kDa (*Sambrook, 1989*).

1. Preparar los geles de SDS-poliacrilamida: separador (10%) y concentrador (5%) en medio de dos placas de vidrio ensambladas como moldes como se muestra en seguida (*Laemmli, 1970*).



2. Colocar cantidades iguales de proteína de las diferentes muestras.
3. Mezclar una alícuota de proteínas con la mitad del volumen de la solución desnaturalizante de (*Laemmli, 1970*), en tubos eppendorf.
4. Incubar a 99 °C la mezcla durante 3 minutos para desnaturalizar.
5. Retirar y mantener en baño de hielo.
6. Centrifugar la muestra en una minicentrífuga por 20 segundos a 3000 rpm.
7. Los pozos se cargan con las muestras en los pozos del gel concentrador dentro de la solución de electroforesis. Destinar el primer carril para los estándares de peso molecular (5 μ L Bio-Rad) y los dos carriles siguientes para muestras que se teñirán con azul de Coomassie al igual que los estándares. Llenar los pozos sin muestra con solución desnaturalizante.

8. Correr la electroforesis a 30 mA durante una hora.
9. Remover el gel concentrador y marcar una esquina del gel separador.
10. Al término remover los tres primeros carriles (el primero contiene los estándares de masa molecular los otros dos contienen muestras de las proteínas) teñir con solución de azul de Coomasie (Simple Blue Safe Stain; Invitrogen) con agitación suave por una hora.
11. Lavar con agua destilada durante media hora con agitación suave.

10.1.5. Transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa.

1. Humedecer el gel separador que contiene las proteínas separadas por electroforesis en la solución de transferencia por diez minutos.
2. Cortar una membrana de nitrocelulosa con las dimensiones del gel separador y humedecerla con agua destilada; posteriormente mantenerla en la solución de transferencia por diez minutos.
3. Ensamblar el dispositivo de electrotransferencia con el gel separador y la membrana de nitrocelulosa, como está indicado en la figura 28.

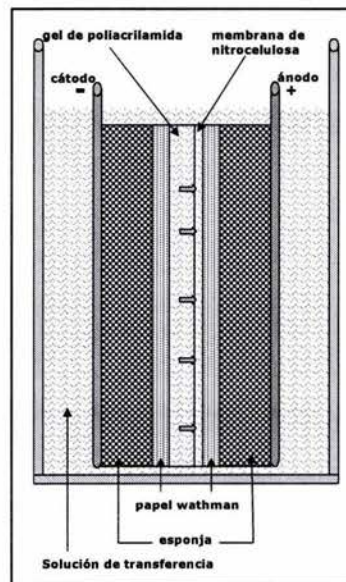


Figura 28. Ensamble y dirección de la electrotransferencia.

4. Transferir las proteínas separadas del gel a la membrana de nitrocelulosa a un voltaje de 8 -10 v/cm, y con una corriente de 100 mA por cinco horas.
5. Finalizado el tiempo de transferencia, remover el gel y la membrana del dispositivo de transferencia; marcar la orientación del gel en la membrana, y removerlo, lavar brevemente con solución amortiguadora de fosfatos salina y Tween 20 (PBS-T).

La membrana de nitrocelulosa con las proteínas transferidas a su matriz (blots) puede ser usada inmediatamente (inmunodetección) o se deja secar para almacenar (2 – 8 °C) y usarla posteriormente.

10.1.6. Inmunodetección.

1. Bloqueo de los sitios de unión inespecíficos de la membrana y proteínas transferidas por inmersión de la membrana con una solución de leche descremada al 5 % en PBS-T, por una hora a temperatura ambiente con agitación orbital constante.
2. Lavar la membrana con dos cambios de PBS-T.
3. Diluir el anticuerpo primario (IgG de conejo anti Kv1.3; Chemicon Inc.) en PBS-T (1:200) en un volumen final de 2mL.
4. Incubar la membrana en el volumen diluido de anticuerpo primario durante una hora a temperatura ambiente, en un incubador rotatorio.
5. Lavar brevemente la membrana con dos cambios de PBS-T y enseguida lavar la membrana en un volumen de 4 mL/cm² de PBS-T por 15 minutos a temperatura ambiente.
6. Continuar los lavados de la membrana (3 cambios x 5 minutos cada uno) con PBS-T a temperatura ambiente.
7. Diluir el anticuerpo secundario (IgG de cabra anti IgG de conejo, marcado con peroxidasa de rábano; Amersham Biosciences) en PBS-T (1:1000).
8. Incubar la membrana en 2 mL del anticuerpo secundario durante un hora a temperatura ambiente, en un incubador roscicero.
9. Repetir el protocolo de lavados de los pasos 5 y 6.

10. Mezclar volúmenes iguales de las soluciones de detección 1 (solución con peróxido de hidrógeno) y 2 (solución con fenol) a temperatura ambiente (Amersham Biosciences).
11. Drenar el exceso de PBS-T de la membrana a partir del último paso de lavado y depositarla sobre una hoja de acetato con el lado de las proteínas transferidas hacia arriba, cubrir la membrana con la solución de detección.
12. Incubar a temperatura ambiente durante un minuto.
13. Drenar el exceso de la solución de detección de la membrana y depositarla sobre una hoja de acetato nueva; cubrir ambos lados con acetatos, eliminar la formación de burbujas entre la membrana y los acetatos.
14. Depositar la membrana cubierta con acetato en un cassette para placas de rayos-X, con el lado de las proteínas hacia arriba.
15. Poner una hoja de placa autorradiográfica sobre la membrana. Cerrar el cassette y permitir la exposición un minuto.
16. Retirar la placa autorradiográfica del cassette, revelar y fijar.
17. Analizar la(s) banda(s) de revelado obtenidas en las placas autorradiográficas, de acuerdo con la orientación marcada en las membranas.
18. Comparar las longitudes de migración de los estándares de peso molecular con la migración de la(s) banda(s) revelada(s), para determinar el peso molecular aproximado de la proteína detectada por Western blot.

10.1.7. Dot blot.

El Dot blot es un método eficiente para determinar la dilución óptima del anticuerpo primario que se utiliza en la inmunodetección de las proteínas estudiadas por Western blot.

1. Cortar tres tiras de la membrana de nitrocelulosa.
2. Depositar un volumen de 10 μ L del extracto crudo de membranas de las muestras a estudiar (cerebelo y médula interna), 10 μ L de albúmina sérica bovina en PBS (0.5 mg/mL) como control negativo y 2 μ L del

péptido control sobre cada tira a distancias tales que la mancha absorbida de una muestra no se mezcle con la otra.

3. Secar y proceder con el protocolo de inmunodetección descrito en el apéndice 10.1.6, con una dilución de anticuerpo primario diferente para cada tira (1:100; 1:200; 1:400).
4. Determinar cual dilución es la más adecuada para la inmunodetección.

10.1.8. Obtención y fijado de los tejidos para la inmunohistoquímica.

1. Proceder con el protocolo de perfusión hasta el paso 6 (apendice10.1.1) y continuar con el siguiente paso.
2. A través del corazón se perfunden dos soluciones diferentes, primero la solución lavadora durante un minuto y durante los cinco minutos siguientes una solución fijadora; ambas soluciones deben estar enfriadas en hielo.
3. Al finalizar la perfusión de estas dos soluciones, se procede a la obtención de los tejidos para su procesamiento de posfijación.
4. Una vez obtenidos los diferentes tejidos (cerebelo y riñones) se sumergen en la solución fijadora (posfijación) y se mantienen en ésta durante cinco horas a 4°C.
5. Obtener la médula interna (MI) del riñón.
6. Sumergir los tejidos (cerebelo y MI) en una solución de crioprotección que contiene sacarosa al 30% y se mantenerlos en ésta toda la noche o hasta que la solución se incluya por completo en los tejidos, esto se observa ya que los tejidos flotan en la solución y a medida que la solución vaya incluyéndose, éstos descienden al fondo del frasco contenedor. Este proceso también se realiza a 4°C.

10.1.9. Obtención de los cortes.

1. La médula interna del riñón de rata y el cerebelo de rata se recubren con la resina "tissue teck" y se almacenan en el congelador del crióstato por dos horas mínimo, para que alcancen la temperatura de corte (-30 ° C).

2. Los cortes se realizan con un espesor de 40 μm y se recogen en cubre objetos previamente gelatinizados.
3. Los cortes obtenidos se dejan secar al aire libre por una hora y se almacenan a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento inmunohistoquímico.

10.1.10. Inmunoperoxidasa Indirecta.

1. Introducir por diez minutos los cortes en una solución amortiguadora (PBS 0.02 M pH 7.4) con ligera agitación para lavarlas.
2. Incubar 30 min con la solución de bloqueo de peroxidasa endógena.
3. Realizar dos lavados de 10 minutos cada uno con la solución amortiguadora de fosfatos salina (PBS).
4. Incubar con el anticuerpo primario en solución:
 - PBS 0.02M pH 7.4
 - Tritón x 100 0.3 %
 - Tween 20 0.05%
 - Albúmin sérica bovina 0.5 mg / mL
 - Suero bovino fetal 3 gotas / 10 mL
 - Anticuerpo primario (IgG de conejo anti Kv1.3) dilución 1:50 para MI y 1:70 para cerebelo. En un volumen final de 300 μL por cada pozo, durante 18 – 24 h a 4°C , agitación suave.
5. Realizar tres lavados de 10 minutos cada uno con PBS y Tween 20 al 0.1%.
6. Incubar con el anticuerpo secundario:
 - PBS 0.02M pH 7.4
 - Tween 20 0.05%
 - Triton x 100 0.3%
 - ASB 0.5 mg/mL
 - Anticuerpo secundario (IGg de cabra anti IGg de conejo, conjugada con peroxidasa de rábano) (dil 1:100). En un volumen final de 300 μL por cada pozo, durante 1 h a temperatura ambiente.
7. Realizar tres lavados de 10 minutos cada uno con PBS y Tween 20 al 0.1%.

8. Incubar con Diaminobencidina 0.03 % w/v y H₂O₂ 0.1% en PBS (1mL por pozo) durante 15 – 20 min.
9. Lavar con PBS por 10 minutos.
10. Contrateñir los núcleos con hematoxilina 5 minutos.
11. Deshidratar con alcoholes graduales y xilol (un minuto en cada solución de alcoholes 60%, 80%, 90%, Absoluto, Alcohol-Xilol, Xilol).
12. Montar las muestras con resina Permount.

10.1.11. Inmunofluorescencia Indirecta.

1. Lavar los cortes 10 minutos en PBS 0.02M.
2. Incubar con el anticuerpo primario en la solución:
 - PBS 0.02M pH 7.4
 - Tritón x 100 0.3 %
 - ASB 0.5 mg / mL
 - SBF 3 gotas / 10 mL
 - Anticuerpo primario (IgG de conejo anti Kv1.3) dilución 1:50 para los cortes de la médula interna y 1:70 para los cortes de cerebelo.
En un volumen final de 300 µL por cada pozo, durante 18 – 24 h a 4° C con agitación suave.
3. Lavar 10 min con tritón x-100 0.30% en PBS.
4. Lavar dos veces durante diez min cada una con PBS.
5. Incubar durante 1:45 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario en solución:
 - PBS 0.02M pH 7.4
 - Tritón 0.3%
 - ASB 0.5 mg / mL
 - SBF 3 gotas / 10 mL
 - Anticuerpo secundario (IgG de Cabra anti IgG de conejo, conjugada con fluoresceína) dilución 1:100. la incubación ocurre en oscuridad y a partir de este paso, los subsecuentes se deben desarrollar en la oscuridad.
6. Lavar 10 minutos con tritón x 100 0.03 % en PBS.
7. Lavar dos veces diez minutos cada una con PBS.
8. Montar los cortes en fresco (sin deshidratar) con fluoromount G.

10.1.12. Inmunofluorescencia indirecta Doble Marcaje.

Este procedimiento esta compuesto por el marcaje simple del Kv 1.3 con fluoresceina y el marcaje con rojo de texas de la ATPasa para sodio y potasio. De este modo se pretende marcar la membrana basolateral de las células de los conductos colectores de la médula interna, con el fin de identificar la presencia del Kv 1.3 en esta membrana.

El procedimiento es como se indica en el marcaje simple para el Kv 1.3 (apéndice 10.1.11) hasta el paso 7 y a partir de este punto, se repite el protocolo utilizando como anticuerpo primario IgG de ratón anti ATPasa para sodio y potasio a una dilución 1:1000. Como anticuerpo secundario se utiliza IgG de cabra anti IgG de ratón conjugada con rojo de texas, a una dilución de 1:1000. El protocolo se sigue hasta llegar al montaje.

10.1.13. Microscopia Óptica de campo claro.

Los tejidos procesados con la técnica de la Inmunoperoxidasa indirecta, se observan en el microscopio óptico en campo claro y las imágenes capturadas con una cámara fotográfica marca Nikon con el objetivo 40X.

10.1.14- Microscopia de Fluorescencia Confocal.

Los tejidos procesados con las técnicas de inmunofluorescencia, se observan en el microscopio invertido de epifluorescencia.

Las imágenes se capturan utilizando el sistema confocal Bio-Rad 1024 con un microscopio invertido Nikon TMD 300. Los fluoróforos FITC y rojo de Texas son excitados a 490 nm y 750 nm respectivamente, utilizando líneas laser de kriptón y argón. La emisión de los fluoróforos es detectada utilizando un filtro a 520 nm y 600 nm respectivamente.

Las imágenes capturadas corresponden a planos visualizados cada 1.5 μm de espesor en el tejido. Las imágenes obtenidas son procesadas con el programa CONFOCAL ASSISTANT versión 4.02.

10.2. SOLUCIONES Y REACTIVOS.

10.2.1. Solución amortiguadora de fosfatos salina 0.02 M (PBS).

Preparar una solución amortiguadora de fosfatos (PB) 0.2 M pH 7.4 previa para poder formular el PBS.

PB 0.2M	100 mL
NaCl	8.76 g
KCl	0.2 g
H ₂ O	cbp 1 L.

Filtrar con vacío y esterilizar en autoclave.

10.2.2. Solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M (PB).

Preparar las soluciones A y B como se indica a continuación:

- A). NaH₂PO₄·1H₂O 13.8 g en 500 mL.
B). Na₂HPO₄·7H₂O 26.81 g en 500 mL.

Mezclar:

B (mL)	A (mL)	pH deseado
61	39	7.0
81	19	7.4 *
87	13	7.6

Primero B y adicionar A con agitación continua, hasta alcanzar el pH deseado.

Filtrar y esterilizar en autoclave.

10.2.3. Solución PBS-T (PBS con tween 20 al 0.1%).

Diluir 1mL de Tween 20 en 999 mL de PBS.

10.2.4. Solución de extracción de proteínas.

Sacarosa	250 mM
EDTA	1 mM
PMSF	0.1 mM
Tris-HCl (pH 7.6)	10 mM

Adicionar 1mL de mezcla de inhibidores de proteasas (SIGMA) a 10 mL de solución de extracción.

10.2.5. Solución desnaturalizante (Laemmli).

Tris-HCl (pH6.8)	50 mM
Ditiotreitol (DTT)	100 mM
SDS	2%
Azul de bromofenol	0.1%
Glicerol	10%

Preparar sin el DTT, y almacenara temperatura ambiente, adicionar el DTT antes de usar.

10.2.6. Gel de SDS-poliacrilamida al 10%.

10.2.6.1. Gel separador (10%) 5 mL

	(mL)
H ₂ O	1.9
Mezcla de acrilamida 30% *	1.7
Tris 1.5 M (pH8.8)	1.3
SDS 10%	0.05
Persulfato de amonio 10%	0.05
TEMED **	0.002

10.2.6.2. Gel concentrador (5%) 3mL

	(mL)
H ₂ O	2.1
Mezcla de acrilamida 30% *	0.5
Tris 1.5 M (pH8.8)	0.38
SDS 10%	0.03
Persulfato de amonio 10%	0.03
TEMED **	0.003

*). Mezcla de acrilamida: 29g de acrilamida y 1g de N,N'-metilbisacrilamida, disolver en 40 mL de H₂O y llevar a 100 mL de aforo. Almacenar a 4 °C en frasco ámbar.

**). Mezclar todo excepto el TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina), adicionar este justo antes de verter al reacción en los platos de vidrio.

10.2.7. Solución de electroforesis (Bio-Rad).

Tris 25 mM
Glicina 250 mM (pH 8.3)
SDS 0.1 %

10.2.8. Solución de transferencia (pH 8.3)

Glicina 39 mM
Tris 48 mM
SDS 0.037%
Metanol 20%

10.2.9. Reactivo para cuantificar proteínas (Bio-Rad Protein assay).

Solución concentrada de azul de Coomassie (azul brillante G-250; Bio-Rad)
Filtrar antes de usar.

10.2.10. Reactivos ECL para análisis de Western blot (Amersham Biosciences).

Anticuerpo secundario: IgG de Cabra anti IgG de conejo, acoplada a peroxidasa de rábano.

Reactivo de bloqueo (Leche descremada) preparar al 5% en PBS-T.

Reactivos de detección (mezclar 1:1 antes de usar)

Almacenar 2 – 8 °C.

10.2.11. Solución de reveladora para placas radiográficas (Kodak).

Pesar 145 g y disolver en 1 L de agua.

Almacenar en frasco ámbar.

10.2.12. Solución fijadora para placas radiográficas (Kodak).

Mezclar con agitación rápida 500 mL de agua, 149 mL de solución A y 27.4 mL de solución B. Adicionar agua cbp 1L.

Almacenar en frasco ámbar.

10.2.13. Solución lavadora para perfusión.

PB 0.2M pH 7.4	50 mL
NaCl	8g
KCl	0.25 g
NaHCO ₃	0.5g
H ₂ O	cbp 1L

10.2.14. Solución fijadora para perfusión.

Paraformaldehído al 4% en PBS. Disolver el paraformaldehído en el volumen adecuado de PBS a 80 °C. Enfriar y filtrar. Usar el mismo día o almacenar hasta 24 horas a 4 °C en frasco ámbar.

10.2.15. Solución de bloqueo de peroxidasa endógena.

H₂O₂ al 3% en PBS.

10.2.16. Solución de Diaminobencidina (DAB).

Diaminobencidina al 0.03% en PBS.

Disolver y filtrar. Almacenar en congelación.

10.2.17. Hematoxilina de Mayer (Electron microscopy sciences: EMS).

Almacenar a 4 ° C. Filtrar antes de usar.

10.2.18. Batería para deshidratación gradual de tejidos.

Mezclas de etanol al 60%, 80 % y 90% en agua.

Metanol absoluto.

Metanol-Xilol al 50%.

Xilol.

10.2.19. Resina para montaje de cortes histológicos "Permunt"

(Electrón microscopy sciences).

10.2.20 Medio de montaje para fluorescencia "Fluoromunt G"

(Electrón microscopy sciences).

A voltage-gated K⁺ current in renal inner medullary collecting duct cells

Laura I. Escobar,¹ Julio C. Martínez-Téllez,¹ Monica Salas,¹ Salvador A. Castilla,¹ Rolando Carrisoza,¹ Dagoberto Tapia,² Mario Vázquez,¹ José Bargas,² and Juan J. Bolívar¹

¹Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, and ²Departamento de Biofísica, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City DF, 04510, Mexico

Submitted 25 February 2003; accepted in final form 9 December 2003

Escobar, Laura I., Julio C. Martínez-Téllez, Monica Salas, Salvador A. Castilla, Rolando Carrisoza, Dagoberto Tapia, Mario Vázquez, José Bargas, and Juan J. Bolívar. A voltage-gated K⁺ current in renal inner medullary collecting duct cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C965–C974, 2004. First published December 18, 2003; 10.1152/ajpcell.00074.2003.—We studied the K⁺-selective conductances in primary cultures of rat renal inner medullary collecting duct (IMCD) using perforated-patch and conventional whole cell techniques. Depolarizations above –20 mV induced a time-dependent outward K⁺ current (*I*_{vto}) similar to a delayed rectifier. *I*_{vto} showed a half-maximal activation around 5.6 mV with a slope factor of 6.8 mV. Its K⁺/Na⁺ selectivity ratio was 11.7. It was inhibited by tetraethylammonium, quinidine, 4-aminopyridine, and Ba²⁺ and was not Ca²⁺ dependent. The delayed rectifying characteristics of *I*_{vto} prompted us to screen the expression of Kv1 and Kv3 families by RT-PCR. Analysis of RNA isolated from cell cultures revealed the presence of three Kv α-subunits (Kv1.1, Kv1.3, and Kv1.6). Western blot analysis with Kv α-subunit antibodies for Kv1.1 and Kv1.3 showed labeling of ~70-kDa proteins from inner medulla plasmatic and microsome membranes. Immunocytochemical analysis of cell culture and kidney inner medulla showed that Kv1.3 is colocalized with the Na⁺-K⁺-ATPase at the basolateral membrane, although it is also in the cytoplasm. This is the first evidence of recording, protein expression, and localization of a voltage-gated Kv1 in the kidney IMCD cells.

kidney; Kv1.3; potassium channel; potassium transport; whole cell clamp; immunocytochemistry; confocal microscopy

K⁺ CHANNELS AT THE BASOLATERAL MEMBRANE of epithelial cells, by allowing recirculation of K⁺ across this membrane, participate as important elements in the mechanism of transepithelial Na⁺ transport; furthermore, when the apical membrane has no K⁺ channels or its K⁺ conductance is small, basolateral K⁺ channels may contribute to the maintenance of the driving force for Na⁺ transport across the apical membrane (26, 28, 31). Final regulation of urinary Na⁺ excretion occurs at the inner medullary collecting duct (IMCD) of the kidney. In vivo studies in the rat have indicated that the IMCD may reabsorb 2–3% of the filtered Na⁺ load and exhibit Na⁺ transport rates comparable to those of the proximal convoluted tubule (4, 11, 44). Despite the relevance of this transport activity, membrane fluxes through K⁺-permeable channels in the IMCD have not been sufficiently investigated. Moreover, according to histological and functional studies, the IMCD presents three clearly different portions (outer or IMCD1, middle or IMCD2, and inner or IMCD3; Refs. 32 and 33), and it is possible that cells in each of these portions have different membrane conductances.

Address for reprint requests and other correspondence: J. J. Bolívar, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, PO Box 70-250, México City DF, 04510, México (E-mail: jboliv@servidor.unam.mx).

Cation conductances of the IMCD membranes have been studied with microelectrodes and patch-clamp techniques. Microelectrode recordings in isolated and perfused IMCD have demonstrated the presence of a basolateral K⁺ and an apical amiloride-sensitive Na⁺ conductance (20, 41). Patch-clamp studies of the apical membrane have identified two nonselective cation channels: an amiloride-sensitive (in IMCD1) and an amiloride-insensitive cation channel (in IMCD2 and IMCD3), as well as an amiloride-sensitive Na⁺ channel (30, 35, 47). In a murine IMCD3 cell line, an amiloride-sensitive cation channel and two K⁺-selective channels have been observed in the apical membrane (36, 40). Cl[–] conductances have been registered by whole cell clamp studies of cells from IMCD in primary culture (19, 48). The first functional findings indicating evidence of Kv channel expression in the kidney were reported in a rabbit papillary epithelial cell line and in the medulla (45, 50).

In the present work we have examined the K⁺-selective conductances by the perforated-patch and conventional whole cell clamp in a primary culture of IMCD from rat. Our results demonstrate the presence of a time-dependent voltage-activated outward K⁺ current with a high voltage activation threshold in these cells. We detected mRNAs encoding three members of the Kv1 (*Shaker*) family: Kv1.1, Kv1.3, and Kv1.6 in cell cultures. Western blot showed Kv1.1 and Kv1.3 protein expression in plasmatic and microsome membranes from inner medulla. Immunocytochemistry analysis confirmed Kv1.3 distribution and localization in the cytoplasm and at the basolateral membrane of collecting duct cells. Kv1.x channel subunits have been reported to assemble into heterotetrameric channels with distinct biophysical and pharmacological properties when expressed in vitro (9). We suggest that in IMCD, the functional expression of an heteromultimer of Kv1.3/Kv1.x gives rise to this outward K⁺ current.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

Primary cultures of IMCD cells were obtained by using a modified hypotonic lysis method (30). Four male Wistar rats (175–225 g) were intraperitoneally injected with furosemide (Lasix; 1 mg/100 g; Hoechst, Mexico) 20 min before death. Animals were anesthetized with chloroform and killed by decapitation. The inner medulla of the kidneys was aseptically removed and sectioned in its outer and inner halves, which were handled in parallel. The tissue was finely minced and incubated, at 37°C, for 60 min as described (30). After this incubation, 1.75 volumes of distilled water were added, and the mixture was centrifuged at 500 g for 6 min. The pellet was suspended

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

as described (30) and centrifuged at 110 g for 2 min. This last procedure was repeated three times. The resulting pellet was suspended in DMEM (GIBCO, Grand Island, NY) supplemented as described (6) and seeded on glass coverslips contained in a 35-mm plastic petri dish (15 coverslips per dish) and kept incubated, at 37°C, in a humidified air-5% CO₂ atmosphere, with medium changed every other day. With this procedure two types of IMCD cell cultures were obtained: one from the IMCD outer half and one from its inner half (IMCD_o and IMCD_i cultures, respectively). Five to six days after plating, both cultures showed confluent cell monolayers in at least five of the coverslips. These monolayers remained stable for at least another week. Only confluent cells were studied.

To evaluate our cultures (42), some monolayers were incubated for 40 min in PBS (GIBCO) with 0.25 mg/ml peroxidase-labeled *Dolichos biflorus* lectin (Sigma, St. Louis, MO). Lectin binding was observed with diaminobenzidine plus hydrogen peroxide and estimated with an inverted microscope (Diaphot 300; Nikon) equipped with Hoffman modulation optics (Modulation Optics, Greenvale, NY).

RNA Purification and RT-PCR

Total RNAs from primary cultures of IMCD cells, kidney inner medulla, and brain from rats were extracted with CsCl (39). RNA (1 µg) from each sample was converted to cDNA, using the random primer p(dN)₆ (Roche Diagnostics) and reverse transcribed with SuperScript II RT (Life Technologies), according to the manufacturer's instructions. Contaminating DNA was removed by using DNase I (Pharmacia).

PCR Amplification and DNA Sequencing

cDNA products of the above-described samples were used directly as templates for PCR amplification with *Taq* DNA polymerase (Life Technologies). Only primers 5'-GAG THC TTC TTC GAC CG-3' (sense) and 5'-CAT GGT CAC CAC AGC CCA CCA GAA-3' (antisense; Life Technologies) (Table 1) were designed according to the conserved amino acid sequences at the amino terminus of a Kv1.x and Kv3.x and the pore regions of all Kv channels. The first PCR assays were performed with Kv1.x and Kv3.x primers; the 900-bp fragments obtained ($n = 4$) were cloned into the pCR 2.1-TOPO vector by using the TOPO TA cloning kit (Invitrogen). Clones were sequenced by using an ABI PRISM 310 Genetic analyzer. Three of the clones yielded a sequence corresponding to a Kv1.3. Therefore, specific primers for each of the Kv1 family members were designed (Table 1) to continue the PCR screening. cDNA fragments were purified from the agarose gel (Marligen-Biosciences) to further sequencing ($n = 6$).

Western Blot Analysis

Kidneys were removed immediately after perfusion with ice-cold saline phosphate solution (SPS). The inner medulla was dissected and homogenized in a solution containing 250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, protease cocktail inhibitor (Sigma-Aldrich), and 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6. Large tissue debris and nuclear fragments were removed by two low-speed spins (1,000 g, 10 min each). To separate the plasmatic (high-density fraction, HD) and microsomal (low-density fraction, LD) membrane-enriched fractions, the supernatant was centrifuged at 17,000 g for 20 min to yield a HD fraction pellet. The supernatant was centrifuged again at 100,000 g for 1 h to obtain a LD fraction pellet (25).

Protein concentration was measured by using the Coomassie brilliant blue G-250 assay kit (Bio-Rad). Samples containing 100 µg of protein were electrophoretically size separated with a 10% polyacrylamide gel and electroblotted to nitrocellulose membranes. Potassium channels Kv1.1 and Kv1.3 were detected with the use of the antibodies rabbit anti-Kv1.1 (1:100) and rabbit anti-Kv1.3 (1:200) (Chemicon International), ECL Western blotting detection reagents, and an analysis system (Amersham Biosciences). The same protocol was followed for cerebellum as a positive control.

Confocal Microscopy

Kidneys from normal male Wistar rats were fixed by retrograde perfusion via the aorta with 4% paraformaldehyde in SPS, pH 7.4 (37). The inner medulla was removed and fixed overnight. For preparation of sections, tissue was cryoprotected in 30% sucrose. The tissue was cut into 1- to 2-mm-thick slices and frozen in liquid nitrogen. Serial sections (10 µm thick) were cut in a cryostat. Sections were incubated 18–24 h at 4°C with a rabbit anti-Kv1.3 antibody (1:40), BSA (0.5 mg/ml), FBS (3 drops/10 ml), and 0.3% Triton in SPS. After three washes with SPS (10 min each), samples were incubated with FITC-conjugated secondary antibody (goat anti-rabbit IgG, 1:1,000; Vector Laboratories) for 1 h. For simultaneous labeling of different antigens (Kv1.3 and Na⁺-K⁺-ATPase), samples were incubated at the same conditions with mouse anti-Na⁺-K⁺-ATPase or H⁺-K⁺-ATPase antibody (1:200; Sigma). This labeling was visualized by using Texas red-conjugated goat antimouse secondary antibodies (1:1,000; Vector Laboratories). Positive controls for Kv1.3 were cerebellum slices, and negative controls were renal inner medullary slices, incubated without the anti-Kv1.3 or with anti-Kv1.3 preincubated with the antigen peptide. The samples were mounted with Vectashield (Vector Laboratories). The sections were assessed by using a Bio-Rad 1024 confocal system with a Nikon TMD 300 inverted micro-

Table 1. Specific primers used to amplify unique DNA fragments corresponding to regions of rat Kv1.x and Kv3.x by RT-PCR

Channel	Accession No.	Sequence	Sense
Kv1.1	P16388	5' GAA GAA GCT GAG TCG CAC TTC TCC AGT ATC 3'	Forward
		5' TTA AAC ATC GGT CAG GAG CTT GCT CTT 3'	Reverse
Kv1.2	AAA19867	5' GAT GAG CGA GAT TCC CAG TTC CCC AGC ATC 3'	Forward
		5' TCA GAC ATC AGT TAA CAT TTT GGT AAT 3'	Reverse
Kv1.3	See MATERIALS AND METHODS	5' GAG THC TTC TTC GAC CGC 3'	Forward
Kv3.x		5' CAT GGT CAC CAC AGC CCA CCA GAA 3'	Reverse
Kv1.4	P15385	5' GAA CCT ACC ACC CAT TTC CAA AGC ATT CCA 3'	Forward
		5' TCA CAC ATC AGT CTC CAC AGC CTT TGC 3'	Reverse
Kv1.5	Q61762	5' AAT CAG GGG TCG CAA CTC TCC AGT ATC CCG 3'	Forward
		5' TTA CAA ATC TGT TTC CCG GCT AGT GTC 3'	Reverse
Kv1.6	X176219	5' GTT GAC TCG CTC TTC CCT AGC ATC CCA GAT 3'	Forward
		5' CTC TTT TCC TAC GAG TGG CTC CAA ACT 3'	Reverse
Kv1.7	NM031886	5' GGT GTG GGC CAG CCG GCT ATG TCC CTG GCC 3'	Forward
		5' TCA CAC CTC AGT CAC CAT GTG TTT CCC 3'	Reverse
Kv1.10	XM227577	5' CCG AGT GCC CAA CAG AAC ATG TCC CTG GCC 3'	Forward
		5' TCA TTT CCT AGA CTT CTC TGT GGA ACA 3'	Reverse

Accession numbers refer to DNA sequences published in the GenBank of the National Center for Biotechnology.

scope. FITC and Texas red fluorophores were excited by using the 490- and 570-nm lines of the krypton-argon laser, and emission was detected by using a 520- and 600-nm long-pass filter, respectively.

Whole Cell Clamp Recordings

Membrane currents were studied mainly with the perforated-patch whole cell clamp technique (17, 38); only some experiments were performed with the conventional whole cell clamp technique (34). Coverslips containing confluent cell monolayers were placed on a superfusion chamber (0.3 ml) fixed to the stage of an inverted microscope provided with Hoffman modulation optics. Cells were maintained in a bath solution containing (in mM) 157 gluconic acid, 146 NaOH, 5 KOH, 2 Ca(OH)₂, 1 Mg(OH)₂, 10 HEPES, and 10 glucose, pH 7.4. Other bath solutions were used in some experiments: 1) a "Ca²⁺-free bath solution" containing 1 mM EGTA and no Ca(OH)₂, with a calculated free Ca²⁺ concentration of <10⁻⁸ M; 2) a "15 mM K⁺ bath solution" containing 136 mM NaOH and 15 mM KOH; and 3) a "45 mM K⁺ bath solution" containing 106 mM NaOH and 45 mM KOH. All experiments were performed at room temperature (20–25°C) and with 30 μM amiloride in the bath. Recording of membrane currents was performed through Ag-AgCl electrodes by using an Axopatch-1D amplifier with a CV-4 (500 MΩ) head stage (Axon Instruments, Foster City, CA). Micropipettes from Kimax-51 glass (Kimble, Vineland, NJ) were fabricated in a two-step vertical pipette puller (PB7; Narishige). The tips were fire-polished in a microforge (MF9, Narishige). Micropipettes were filled from the tip, up to a distance of 0.4–0.5 mm, with a pipette solution composed of (in mM) 156 gluconic acid, 141 KOH, 10 NaOH, 1.54 Ca(OH)₂, 1 Mg(OH)₂, 2.3 EGTA, and 10 HEPES, pH 7.4, with a calculated free Ca²⁺ concentration of 3 × 10⁻⁷ M. Pipette filling was completed, from the back, with a pipette solution with or without 200 μg/ml amphotericin B. In some experiments a "Ca²⁺-free pipette solution" was employed, containing 0.1 mM Ca(OH)₂ and 2 mM EGTA, with a calculated free Ca²⁺ concentration of <10⁻⁸ M. Once filled, micropipettes had a resistance of 2–3 MΩ. With the use of a hydraulic micromanipulator (WR-60; Narishige), pipettes were applied to the cells to contact the membrane, and a gentle suction was applied and maintained until a seal of at least 1 GΩ was obtained. Perforated-patch whole cell configuration was reached 4–8 min after the membrane contact as monitored when a voltage square pulse (20 mV, 5 ms) evoked a capacitive current transient shorter than 4 ms and a series resistance (R_s) smaller than 20 MΩ. In conventional whole cell recordings the membrane was ruptured with suction. Membrane potential was clamped at -50 mV. Membrane capacitance and R_s were compensated (80%) and then measured by using the Axopatch-1D compensation systems. The voltage-clamp protocols were generated, and the membrane currents were acquired by the Axopatch-1D under the control of pCLAMP software (version 6, Axon Instruments) running on a 486 personal computer (Gateway 200, N. Sioux City, SD) and using a Digidata 1200 analog-to-digital converter (Axon Instruments). Membrane currents were low-pass filtered at 2 kHz, digitized, and stored on the hard disk of the computer for subsequent analysis. A basic stimulation protocol was used in every cell: from a holding potential of -50 mV, a series of 720-ms voltage steps between -160 and 80 mV were applied in 20-mV increments and with 4-s intervals between the steps. Other protocols are described below. Membrane currents were analyzed by using the Clampfit module of pCLAMP, and curve fitting was performed by using SigmaPlot (Jandel Scientific, San Rafael, CA).

Current Kinetics Analysis

Time course of the capacitive current. Current was evoked by a voltage pulse from -50 to -60 mV, and its time course was fitted with a single exponential function of the form

$$I_{\infty} - I_t = I_0 \exp(-t/\tau) \quad (1)$$

where I_{∞} is the current measured at steady state. I_t is the current at time t , I_0 is the value of $(I_t - I_{\infty})$ extrapolated at $t = 0$, and τ is the time constant of the capacitive current decay.

Time course of the voltage-activated outward current. The time course of the voltage-activated outward current was adjusted to a Hodgkin-Huxley-type model with one activation gate and one inactivation gate (15, 16). Leak current was measured [from the recordings obtained in the presence of 10 mM tetraethylammonium (TEA) or 1 mM quinidine in the bath] and subtracted. Currents were evoked by the basic stimulation protocol. The time course of current activation was fitted to a single exponential function of the form

$$I_t = I_{\max}[1 - \exp(-t/\tau_a)] \quad (2)$$

where I_{\max} is the maximum value of the current and τ_a is the time constant of activation. If inactivation was observed, the current was fitted with a product of exponential functions of the form

$$I_t = I_{\max}[1 - \exp(-t/\tau_a)][\exp(-t/\tau_i)] \quad (3)$$

where τ_i is the time constant of inactivation.

Voltage dependence of the outward current activation. The voltage dependence of the outward current activation was studied with a voltage protocol departing from a holding potential of -50 mV to depolarizing voltage pulses, applied every 4 s for 300 ms, from -40 to 65 mV in 5-mV increments. Leak current was subtracted as before. The peak outward current (I) recorded after each voltage step (V) was transformed into conductance (g) according to the relation $I = g(V - V_{\text{rev}})$, where V_{rev} is the reversal potential of the current, which was assumed to be -50 mV (see RESULTS). Conductance values were fitted with the following (Boltzmann type) equation

$$g/g_{\max} = \{1 + \exp[(V_0 - V)/k]\}^{-1} \quad (4)$$

where g_{\max} is the maximum value reached by g , V_0 is the voltage at which g is half maximal, and k is a constant that gives the steepness of the voltage dependence.

Tail currents. In tail current experiments, the conventional whole cell clamp technique was employed. From a holding potential of -50 mV, the current was activated by a prepulse to 40 mV during 180 ms, and then voltage was returned to various test potentials ranging from -100 to -30 mV in 10-mV increments for 32 ms. When high-K⁺ concentration bath solutions were used, the test potentials ranged from -100 to 0 mV. Leak current was measured (from the recordings obtained with a similar protocol in which a prepulse to -35 mV was used) and subtracted. Tail currents were fitted with a single exponential of the form

$$I_t = I_0 \exp(-t/\tau) \quad (5)$$

where I_0 is the calculated value of I at $t = 0$ (when the voltage change occurs) and τ is the time constant of the current deactivation.

The tail currents measured in the first 2 ms were averaged and plotted against voltage. The reversal potential of the tail currents was measured at the point where the best curve that fitted the plotted current points crossed the voltage axis.

RESULTS

Cell Morphology

The monolayers observed in IMCD cultures (IMCD₀ and IMCD₁) were mainly formed by 20- to 40-μm-diameter cells showing an almost uniform appearance: flat and polygonal, with a large nucleus (Fig. 1). This morphology is similar to that previously described for cells from the IMCD in primary culture (30, 35). Smaller cells (10–20 μm) were present in some monolayers, with oval or rounded appearance. However, >85% of the cells in IMCD₀ cultures and >90% of the cells in IMCD₁ cultures exhibited positive binding for *D. biflorus* lectin (not shown). All

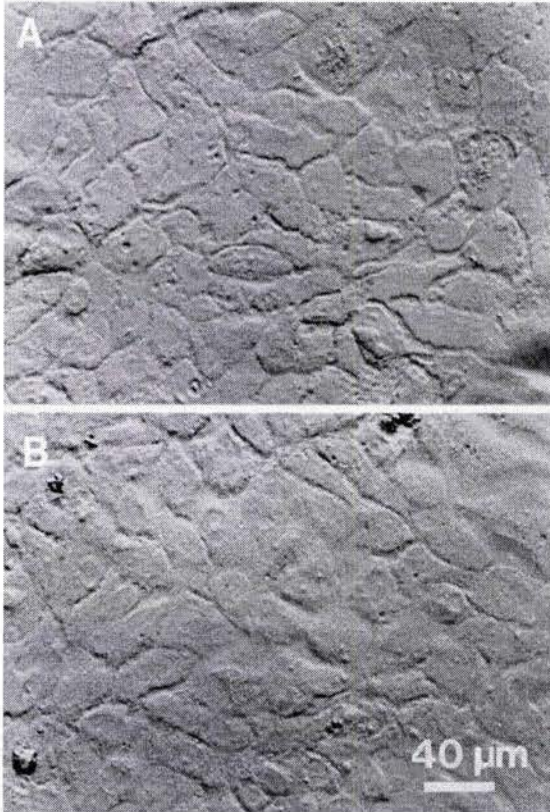


Fig. 1. Primary cultures of inner medullary collecting duct (IMCD) cells. Photomicrographs were taken with Hoffman modulation optics. Nine-day-old cells were cultured on glass coverslips. *A*: cells from the IMCD inner half (IMCD_i); *B*: cells from the IMCD outer half (IMCD_o). Both cultures show cells with uniform appearance.

these cells were flat and polygonal, indicating that these were IMCD cells in the IMCD_i cultures or principal and IMCD cells in the IMCD_o cultures (7, 42). Only these cells were used for the electrophysiological recordings. Therefore, electrophysiological recordings were performed in IMCD and principal cells. The monolayers exhibited blisters, providing evidence that cells were polarized and capable of transepithelial transport (29).

Capacitance and Resistance of Cells from IMCD_i and IMCD_o Cultures

According to the criterion established in MATERIALS AND METHODS, perforated-patch whole cell configuration was reached in 6.2 ± 0.4 min, the time at which R_s was 13.9 ± 0.3 M Ω (mean \pm SE; $n = 121$). R_s became smaller during the following minutes and reached a minimum value of 9.9 ± 0.4 M Ω . When studied ($n = 15$), the time course of the capacitive current was well described by Eq. 1. A good fit of the time course of the capacitive current with a single exponential function is indicative of the absence of electrical coupling between cells (6, 19), an indispensable condition for obtaining space clamp.

Membrane capacitance was 24.0 ± 0.9 and 24.8 ± 1.0 pF in IMCD_i ($n = 77$) and IMCD_o cells ($n = 44$), respectively, values identical to those previously reported (19). Cell input resistance, measured by means of the current change elicited by a voltage change from -60 to -40 mV, was 1.35 ± 0.17

and 1.07 ± 0.15 G Ω in IMCD_i ($n = 77$) and IMCD_o cells ($n = 44$), respectively. The difference is not statistically significant.

Membrane Currents in Cells

At the voltage range explored (from -160 to 80 mV), cells showed both inwardly and outwardly rectifying currents (Fig. 2). The present work focuses on voltage-dependent outward current.

A time- and voltage-dependent outward current (I_{Vto}) was observed in $\sim 27\%$ of the cells (IMCD_i: 29%, $n = 77$; IMCD_o: 25%, $n = 44$). Figure 2*A* shows that these currents activate at potentials between -20 and 0 mV, require ~ 100 ms to complete their activation at 0 mV, and activate more quickly with larger depolarizations. Figure 2*B* shows the mean current-voltage (I - V) relationship obtained in cells with I_{Vto} . The outward rectification is due to I_{Vto} . Considering the ionic conditions in our experiments (virtual absence of any potentially permeant anion) and the outward direction of I_{Vto} , it can be expected that this is a K⁺ current. Figure 2*B* also shows that

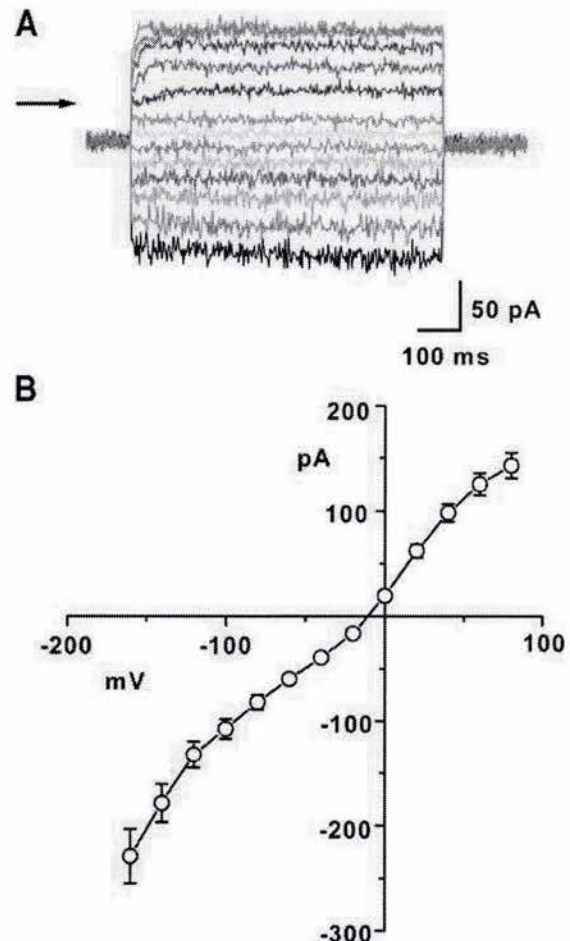


Fig. 2. Perforated-patch whole cell currents in IMCD cells exhibiting time- and voltage-dependent outward K⁺ current (I_{Vto}). *A*: superimposed traces of current evoked by the basic stimulation protocol (see MATERIALS AND METHODS) in a representative IMCD cell. Arrow indicates zero current level; outward currents are upward in this and all subsequent current traces. *B*: current-voltage (I - V) relationship from 30 cells (means \pm SE) shows both inward and outward rectification. The outward rectification is due to I_{Vto} . Maximal currents observed during the voltage pulses are plotted; where no maximum was identified, mean currents are plotted.

these cells exhibited an inward rectification and a leak component that reverses close to 0 mV, which are mainly due to an inward rectifying Cd²⁺-sensitive current (unpublished results).

Effect of Inhibitors on I_{v10}

To test whether I_{v10} is a K⁺ current, we explored its sensitivity to four K⁺ channel blockers. The effect of the inhibitors studied, expressed as the mean percentage block of the total outward currents recorded at membrane potentials between 0 and 80 mV, was TEA (10 mM), 82 ± 4% ($n = 7$); TEA (1 mM), 57 ± 2% ($n = 2$); quinidine (1 mM), 96 ± 1% ($n = 5$); Ba²⁺ (5 mM), 25 ± 4% ($n = 2$); and 4-aminopyridine (4-AP; 10 mM), 54 ± 10% ($n = 2$). TEA, quinidine, 4-AP, and Ba²⁺ inhibition of similar voltage-activated outward K⁺ currents has been observed in other classes of epithelial cells (6, 18, 21, 27, 45, 49). Therefore, the present experiments suggest that I_{v10} is a voltage-activated K⁺ current present in IMCD cells. Figure 3 illustrates the reversible effect of TEA on I_{v10} . TEA does not affect the Cd²⁺-sensitive cationic current, and its apparent inhibition is mainly due to its rundown (unpublished results).

Ca²⁺ Independence of I_{v10}

Time- and voltage-dependent outward K⁺ currents similar to I_{v10} may be Ca²⁺ dependent (6, 21). To test this possibility, we employed the conventional whole cell clamp technique with a Ca²⁺-free intracellular solution (pCa > 8; see MATERIALS AND METHODS). Extracellular Ca²⁺ removal did not reduce the I_{v10} current amplitude after 6 min (not shown), as should happen when the current is Ca²⁺ dependent (21). Also, the presence of 5 mM Cd²⁺ in the bath did not inhibit the current. These results suggest that I_{v10} is not a Ca²⁺-dependent current (1).

Time-Dependent Kinetics of I_{v10}

Current activation was followed by a slow inactivation. Figure 4A shows that the time course of current activation and inactivation can be well described by Eq. 2 or 3. Current activation shows voltage dependence, with τ_a becoming

smaller as depolarization increases (Fig. 4B). Inactivation was observed in 73% of the currents recorded at potentials between 20 and 80 mV. τ_i exhibited a weak voltage dependence, from 5.1 ± 1.1 s (at 20 mV) to 3.3 ± 0.8 s (at 80 mV; $n = 9$). I_{v10} activation and inactivation had τ_a and τ_i values comparable to those reported by other authors in delayed rectifier-type K⁺ outward currents observed in other classes of epithelial cells and fitted with similar equations (18, 21, 45, 49, 50). The similarities extend to the voltage dependence of τ_a and τ_i , which appears to be a common characteristic for this type of current when observed in epithelial cells. Therefore, these experiments suggest that I_{v10} is a K⁺ current of the delayed rectifier type. This current was the only one with delayed rectifier characteristics recorded in IMCD cultures.

Voltage Dependence of I_{v10} Activation

The voltage dependence of I_{v10} activation is well described by Eq. 4 (Fig. 4C). The mean values of the activation parameters were $V_o = 5.6 \pm 3.3$ mV and $k = 6.8 \pm 1.0$ mV ($n = 4$). The V_o value is similar to (18, 24) or 15–25 mV more positive than (45, 49) the V_o value reported for delayed rectifiers in other epithelial and nonepithelial cells. The value of k compares to those already reported (24, 46). The relative conductance tends to decline at potentials more positive than that at which g_{max} is reached (not shown). This phenomenon also has been observed in delayed rectifiers of other cells (12, 24).

K⁺/Na⁺ Selectivity of I_{v10}

To further characterize the ionic selectivity of I_{v10} , a tail current analysis of its reversal potential was performed. The conventional whole cell clamp technique was employed for these experiments. Figure 5A shows the tail currents recorded in a representative cell bathed in the control solution. The I - V relationship of these currents (Fig. 5B) exhibited a reversal potential of about -52 mV, which is much closer to E_K (-85 mV) than to E_{Na} (68 mV). The reversal potential of the tail currents depended on the external K⁺ concentration. Figure 5C

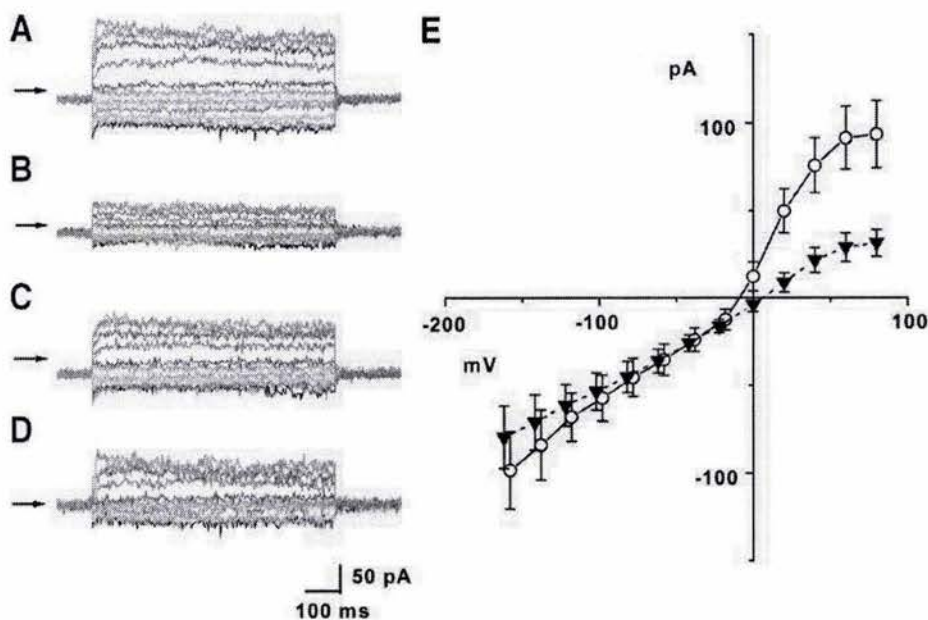
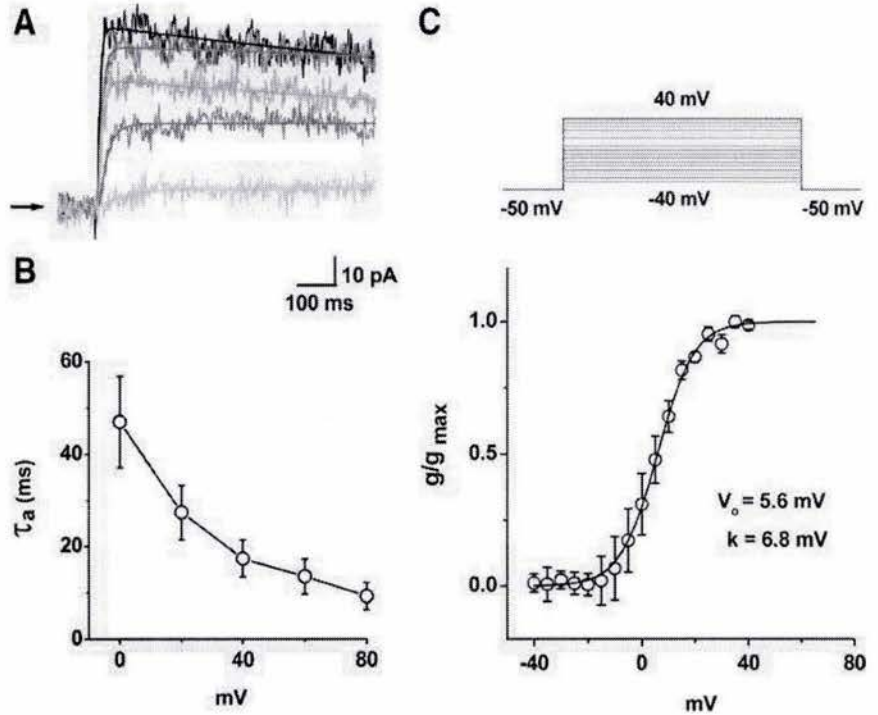


Fig. 3. Effects of tetraethylammonium (TEA; 10 mM) on I_{v10} . A–D: records obtained in a representative cell. A: control; B: TEA; C: after TEA removal; D: subtraction (A minus B) showing the TEA-sensitive currents. E: I - V relationship averaged from 7 cells before (○) and during (▼) TEA exposure. TEA severely blocked I_{v10} in all of these cells. Currents are plotted as described in Fig. 2.

Fig. 4. Kinetics characteristics of I_{vto} . *A* and *B*: time-dependent kinetics. *A*: noisy traces are TEA-sensitive currents in response to voltage steps of (from *bottom* to *top*) 0, 20, 40, 60, and 80 mV. Superimposed lines are best fits for the currents obtained with Eq. 2 or 3. *B*: means \pm SE ($n = 12$) of the activation time constant (τ_a) plotted against the membrane potential. *C*: voltage-dependent activation: complete voltage protocol (*top*) and mean value of relative conductance (g/g_{max} ; $n = 4$) plotted against membrane potential (*bottom*). Superimposed S-shaped curve corresponds to the best fit obtained with Eq. 4. V_o , voltage at which g is half maximal; k , constant giving steepness of the voltage dependence.



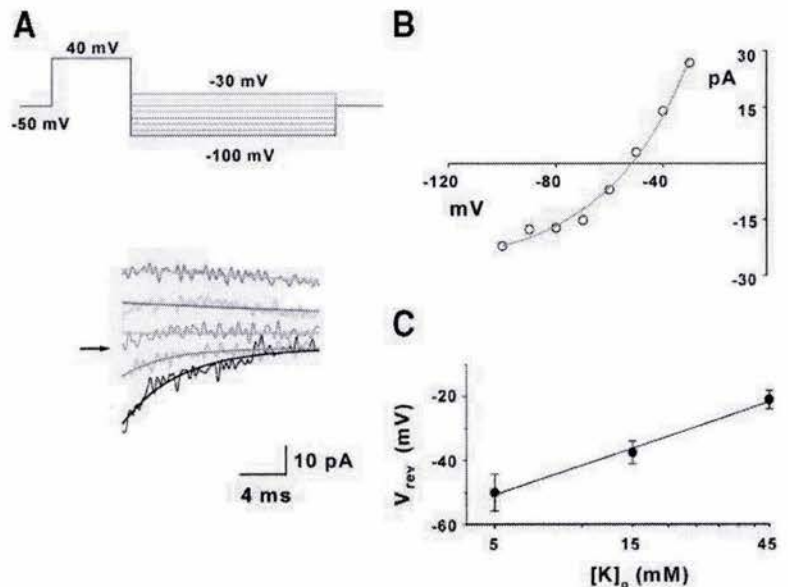
shows the mean reversal potentials measured in the presence of 5 ($n = 9$), 15 ($n = 2$), and 45 mM ($n = 3$) external K⁺. The straight line that joins the points is the best fit obtained with the minimum squares method; it has a slope of 30.4 that does not suggest a complete K⁺ selectivity. However, from this slope, the Goldman equation predicts that I_{vto} channels are 11.7 times more selective to K⁺ than to Na⁺. This value compares with that obtained for the delayed rectifier of the squid axon (5).

RT-PCR Analyses of Kv.x mRNA Expression in Rat IMCD Cells

Delayed rectifying K⁺ channels are found in the Kv1 and Kv3 voltage-gated channel families. Therefore, our first strat-

egy was to design primers to amplify a conserved region from the pore toward the amino-terminal end of both families. A single base band of roughly 900 bp was amplified with the IMCD cell culture and kidney inner medulla cDNA samples (Fig. 6). Sequence analysis of the 900-bp cDNA identified it as a Kv1.3 channel. Because the kinetic properties of the I_{vto} did not correspond to a Kv1.3 homomultimer (see above and Ref. 9), we carried out further RT-PCR reactions with specific primers for all of the Kv1.x family members (see Table 1). We observed amplification of the expected cDNA fragments for Kv1.1 and Kv1.6 (Fig. 6). GAPDH cDNA from IMCD cells and GAPDH and Kv1.x cDNAs from brain samples were always amplified as positive controls of the PCR reaction.

Fig. 5. Tail currents and reversal potential of I_{vto} . *A*: voltage protocol (*top*) and leak-subtracted tail currents recorded in an IMCD cell (*bottom*). Only currents in response to voltage steps of (from *bottom* to *top*) -100, -60, -50, -40, and -30 mV are shown. Superimposed lines are best fits for the currents obtained with Eq. 5. *B*: I - V relationship of tail currents shown in *A*. Mean currents recorded during the early 2 ms are plotted. *C*: reversal potentials (V_{rev}) of the tail currents (means \pm SE) are plotted against the external K⁺ concentration ($[K]_o$).



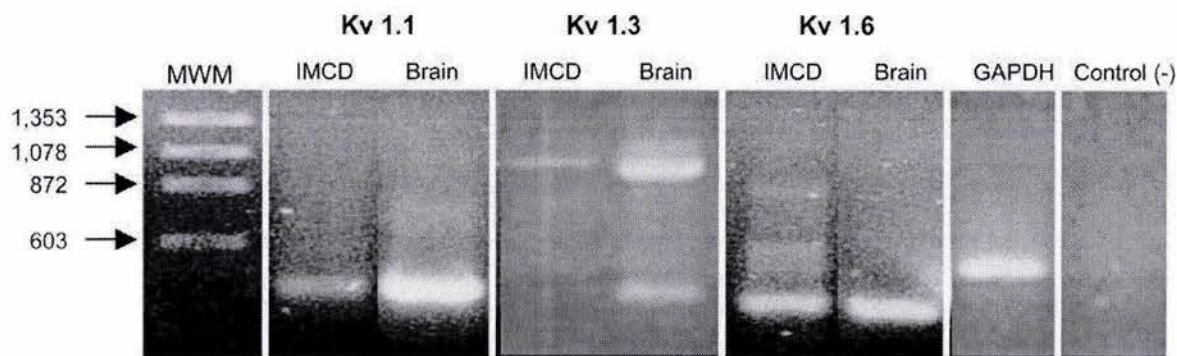


Fig. 6. RT-PCR amplification of rat Kv α -subunits with RNA isolated from IMCD cell cultures and brain. Molecular weight marker (MWM) was ϕ X174 RF DNA/*Hae*III (2.5 μ g). Kv1.1, ~441 bp (400 ng); Kv1.3, ~891 bp (300 ng); Kv1.6, ~387 bp (300 ng), GAPDH, ~459 bp (300 ng), positive control; (-), no cDNA, negative control.

Kv α -Subunit Protein Expression and Localization in Inner Medulla Cells

To determine whether Kv1.x α -subunits are expressed as protein, we performed Western blot experiments with commercially available antibodies directed against Kv1.1 and Kv1.3 in plasmatic membrane and microsomes fractions. A representative blot (Fig. 7) identifies proteins with masses of ~70 kDa that were specifically labeled with antibodies to these Kv α -subunits in both fractions.

Confocal microscopy images of the inner medullary slices and cultures (Fig. 8) were helpful in studying the Kv1.3 distribution. Fluorescence was observed mainly in the intracellular perinuclear zones. Colabeling of Kv1.3 and Na⁺-K⁺-ATPase proteins was observed, supporting the expression of Kv1.3 α -subunits at the basolateral membrane. Interestingly, this colabeling was also observed at the basolateral membrane of the papillary epithelial cells (Fig. 8F), in agreement with the hypothesis raised by others (50).

DISCUSSION

The present work demonstrates for the first time the current recordings of an outward K⁺ current in ~27% of confluent IMCD cells. IMCD cells cultured on glass (untreated) coverslips behave as a single electrical compartment, as inferred from the monoexponential decay of the capacitive current. This result resembles the one obtained with MDCK cells (cell line probably derived from the collecting duct) cultured under the same conditions (6). In contrast, when IMCD cells are cultured on collagen, they become electrically coupled. Therefore, under the latter conditions, the cells have to be decoupled in a Ca²⁺-free medium so that reliable whole cell clamp

measurements can be performed (19, 48). The procedure reported in this work offers an alternative way to perform whole cell clamp studies in IMCD uncoupled cells in primary cultures. On the other hand, the total membrane area of cultured IMCD cells, as inferred from whole cell capacitance, is the same with both procedures (19).

The cells of IMCD_i and IMCD_o cultures exhibited the same type of currents. IMCD_i cultures must be formed mainly by IMCD cells from the IMCD2 and IMCD3, whereas IMCD_o cultures must be enriched with principal cells from the IMCD1. Both cultures exhibited positive binding for *D. biflorus* lectin in at least 85% of the cells, indicating that they are formed mainly by these cellular types (7). It is known that cells from different IMCD segments show important functional differences (32, 33). However, with regard to the cationic conductances we observed, all cells behaved similarly. Therefore, functional differences between IMCD segments may involve other conductance types.

Our data suggest that a Kv1.3 channel protein is present at the basolateral membrane. In contrast, patch-clamp studies performed on the apical membrane of IMCD cells in primary cultures have only identified amiloride-sensitive Na⁺ channels (47) and two nonselective cation channels (one amiloride sensitive and the other amiloride insensitive; Refs. 30 and 35). Kv1.2 and Kv1.3 channels have been identified in the rabbit kidney medulla and in GRB-PAP1 cells (45, 50), although their activation occurs at voltages ~10 mV more negative. However, the values of the activation time constants and their voltage dependence are equivalent to those reported here.

Even when the RT-PCR and immunocytochemistry assays identified the presence of Kv1.3 channels in the IMCD cells,

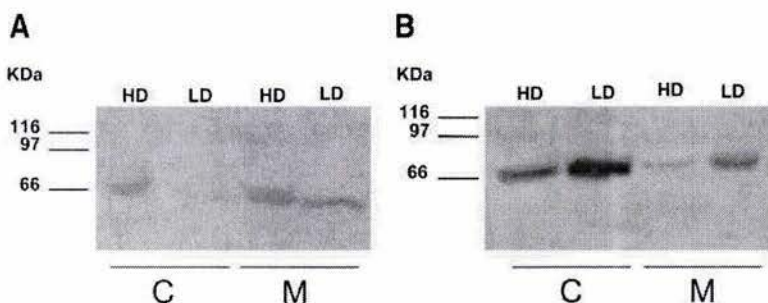


Fig. 7. Western blot showing specific antibody labeling to membrane proteins with molecular masses of ~66 kDa for Kv1.1 (A) and 74 kDa for Kv1.3 (B). C, cerebellum; M, inner medulla. HD (plasmatic membrane) and LD (microsomes), high- and low-density fractions, respectively.

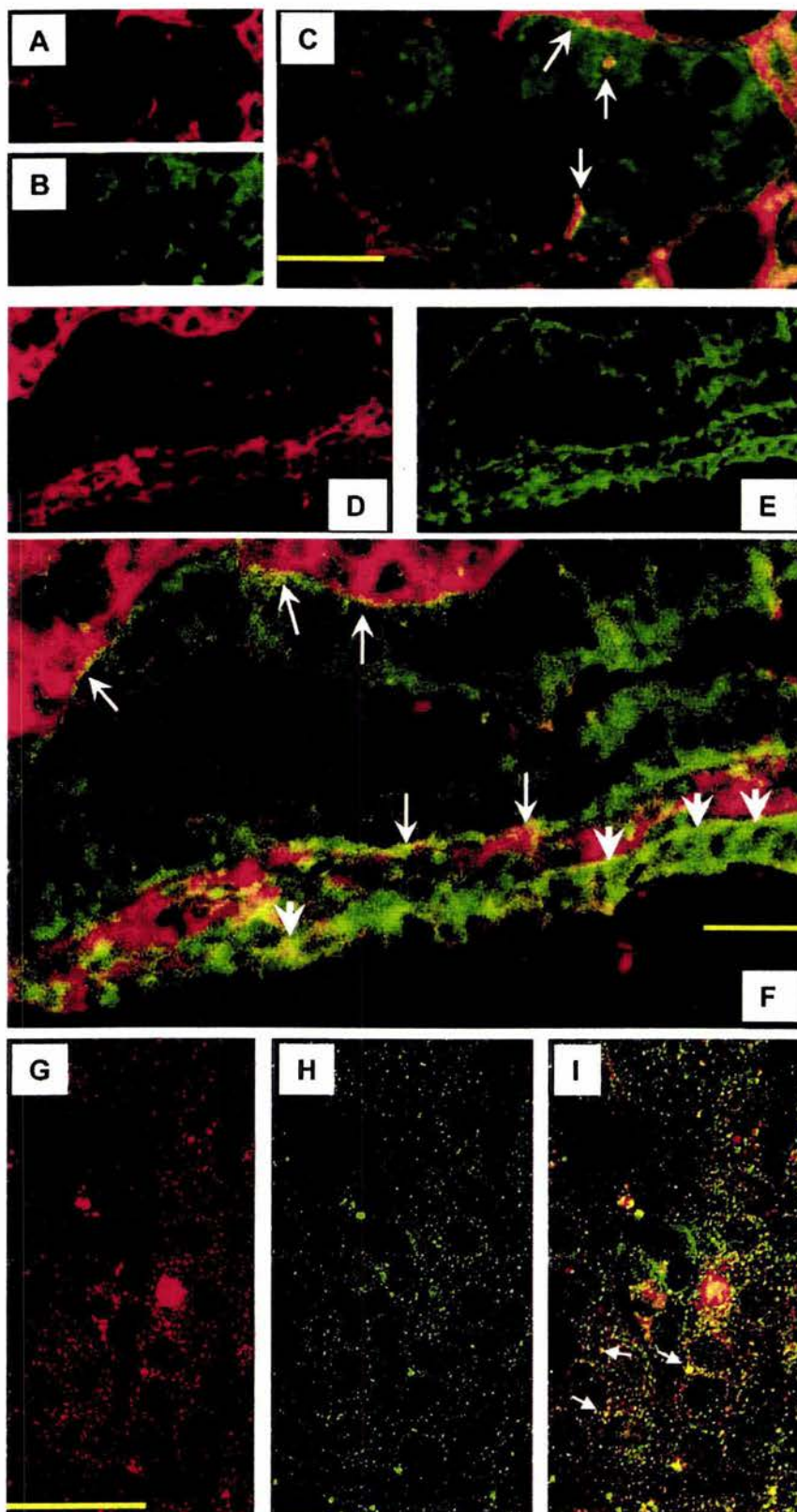


Fig. 8. Localization of Kv1.3 and Na⁺-K⁺-ATPase in IMCD: transverse sections (A–C), sagittal sections (D–F), and cultures (G–I). Localization of Na⁺-K⁺-ATPase at the basolateral membrane (A, D, and G; red) and localization of Kv1.3 (B, E, and H; green) are shown. Colocalization of Kv1.3 and Na⁺-K⁺-ATPase (C, F, and I; yellow) is shown and indicated by arrows. Kv1.3 and Na⁺-K⁺-ATPase colocalization was also observed in the papillar epithelium (arrowheads; F). Bars, 50 μm.

the biophysical and pharmacological properties of the I_{v10} did not correspond to those reported for a Kv1.3 homomultimer. The voltage at which I_{v10} is half-maximally activated ($V_{1/2}$) was 5.6 mV, in contrast to the $V_{1/2}$ of about -30 mV of a Kv1.3 channel (13). The time constant of I_{v10} inactivation (5.1 s at 20 mV) was about five to more than seven times slower than that expected for a Kv1.3 (250–600 ms; Ref. 9). Also, the I_{v10} is about 10 times more sensitive to TEA and about 2 orders of magnitude less sensitive to 4-AP, compared with a Kv1.3 homomultimer (ID₅₀ of 10 mM TEA and 195 μ M 4-AP; Ref. 13). To compare cloned channels with native channels in IMCD cells, we have to consider that heteromultimer channels might be able to form in these cells with the resulting biophysical and pharmacological differences. The other two Kv channels (Kv1.1 and Kv1.6) identified in the cell culture also correspond to delayed rectifier channels. Although we observed expression of Kv1.1 and Kv1.3 proteins in the inner medulla, further immunoprecipitation experiments are needed to determine the Kv α -subunits that conform the heteromultimer that probably gives rise to I_{v10} .

The physiological role of Kv1.x channels in IMCD cells would depend on the membrane (apical or basolateral) where the channels are located and the membrane potential in physiological conditions. Colabeling of Kv1.3 and the Na⁺-K⁺-ATPase in our fluorescent assays suggests that Kv1.3 is expressed at the basolateral membranes of IMCD cells. However, there is no information about the membrane potential in IMCD in physiological conditions. Conflicting results are available from in vitro studies performed in extracellular K⁺ concentrations of 4–5 mM (not physiological for IMCD; Refs. 2 and 8). Meanwhile, mean basolateral membrane potentials of -82 and -51 mV have been reported (20, 41), and it was also observed that 60% of the cells exhibited a positive membrane potential (mean: 24 mV), whereas the remaining 40% exhibited a negative membrane potential (mean: -15 mV; Ref. 43). Because the transepithelial potential difference is very small, apical and basolateral membrane potentials must be approximately the same, at least in control conditions (20, 41). Because the IMCD is exposed to two different extracellular media (tubule and inner medullar interstitial fluids) that exhibit large variations in their ionic concentrations and osmolarity (2, 3, 8, 11, 14, 22, 23), it is possible that, depending on the physiological conditions, the IMCD membrane potential (apical and basolateral) undergoes large variations. Accordingly, there will be situations in which the basolateral membrane is sufficiently depolarized to activate these Kv1 channels. This activation, by inducing a K⁺ efflux, would oppose further depolarization. One can speculate that Kv1 channel activation may contribute to the maintenance of the driving force for Na⁺ reabsorption in conditions in which Na⁺ is reabsorbed at a high rate by the IMCD cells. Furthermore, because of the large variations in interstitial osmolarity, Kv1 channels might also play a role in volume regulation (10).

ACKNOWLEDGMENTS

We appreciate the assistance of Lidia Morales and Tomás Cruz for the artwork and Carolina Salvador and Ivonne Mora for technical support with the molecular biology assays. We thank Dr. R. G. Contreras (Centro de Investigación de Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional, Mexico) for helpful discussions on the confocal images and Dr. Carol Deutsch for critical reviewing of the manuscript.

GRANTS

This work was partially supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) Grants IN206393 and IN216396 (to J. J. Bolívar) and DGAPA UNAM Grant IN233802, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Grants 41365 (to L. I. Escobar).

REFERENCES

- Bargas J, Ayala GX, Vilchis C, Pineda JC, and Galarraga E. Ca²⁺-activated outward currents in neostriatal neurons. *Neuroscience* 88: 479–488, 1998.
- Beck F, Dörge A, Rick R, and Thureau K. Intra- and extracellular element concentrations of rat renal papilla in antidiuresis. *Kidney Int* 25: 397–403, 1984.
- Beck FA, Dörge A, Rick R, and Thureau K. Osmoregulation of renal papillary cells. *Pflügers Arch* 405, Suppl 1: S28–S32, 1985.
- Bengele HH, Lechene C, and Alexander EA. Sodium and chloride transport along the inner medullary collecting duct: effect of saline expansion. *Am J Physiol Renal Physiol* 238: F504–F508, 1980.
- Bezanilla F and Armstrong M. Negative conductance caused by entry of sodium and cesium ions into the potassium channels of squid axon. *J Gen Physiol* 60: 588–608, 1972.
- Bolívar JJ and Cerejido M. Voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ channel in cultured epithelial cells (MDCK). *J Membr Biol* 97: 43–51, 1987.
- Brown D, Roth J, and Orci L. Lectin-gold cytochemistry reveals intercalated cell heterogeneity along rat kidney collecting ducts. *Am J Physiol Cell Physiol* 248: C348–C356, 1985.
- Bulger RE, Beeuwkes R 3rd, and Saubermann AJ. Application of scanning electron microscopy to X-ray analysis of frozen-hydrated sections. III. Elemental content of cells in the rat renal papillary tip. *J Cell Biol* 88: 274–280, 1981.
- Coetzee WA, Amarillo YIMY, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal MS, Ozaita A, Pountney D, Saganich M, Vega-Saenz de Miera E, and Rudy B. Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann NY Acad Sci* 868: 233–285, 1999.
- Deutsch C and Chen LQ. Heterologous expression of specific K⁺ channels in T lymphocytes: functional consequences for volume regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10036–10040, 1993.
- Diezi J, Michoud P, Aceves J, and Giebisch G. Micropuncture study of electrolyte transport across papillary collecting duct of the rat. *Am J Physiol* 224: 623–634, 1973.
- Duchatelle P and Joffre M. Potassium and chloride conductances in rat Leydig cells: effects of gonadotrophins and cyclic adenosine monophosphate. *J Physiol* 428: 15–37, 1990.
- Grismer S, Nguyen AN, Aiyar J, Hanson DC, Mather RJ, Gutman GA, Karmilowicz MJ, Auperin DD, and Chandy KG. Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K⁺ channels, types Kv1.1, 12, 13, 15, and 31, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol Pharmacol* 45: 1227–1234, 1994.
- Hai MA and Thomas S. The time-course of changes in renal tissue composition during lysine vasopressin infusion in the rat. *Pflügers Arch* 310: 297–319, 1969.
- Hochermann SD and Bezanilla F. A patch-clamp study of delayed rectifier currents in skeletal muscle of control and *mdx* mice. *J Physiol* 493: 113–128, 1996.
- Hodgkin AL and Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 117: 500–544, 1952.
- Horn R and Korn SJ. Prevention of rundown in electrophysiological recording. *Methods Enzymol* 207: 149–155, 1992.
- Hughes BA and Steinberg RH. Voltage-dependent currents in isolated cells of the frog retinal pigment epithelium. *J Physiol* 428: 273–297, 1990.
- Husted RF, Volk KA, Sigmund RD, and Stokes JB. Anion secretion by the inner medullary collecting duct. Evidence for involvement of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Clin Invest* 95: 644–650, 1995.
- Imai M and Yoshitomi K. Electrophysiological study of inner medullary collecting duct of hamsters. *Pflügers Arch* 416: 180–188, 1990.
- Jacob TJC. Two outward K⁺ currents in bovine pigmented ciliary epithelial cells: $I_{K(Ca)}$ and $I_{K(V)}$. *Am J Physiol Cell Physiol* 261: C1055–C1062, 1991.

22. Jamison RL, Buerkert J, and Lacy FA. Micropuncture study of collecting tubule function in rats with hereditary diabetes insipidus. *J Clin Invest* 50: 2444–2452, 1971.
23. Jamison RL, Work J, and Schafer JA. New pathways for potassium transport in the kidney. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 242: F297–F312, 1982.
24. Johansson S, Sundgren AK, and Kahl U. Potential-dependent block of human delayed rectifier K⁺ channels by internal Na⁺. *Am J Physiol Cell Physiol* 270: C1131–C1144, 1996.
25. JongUn L, Wha OY, and Wan KS. Altered renal expression of aquaporin-2 water channels in rats with experimental two-kidney, one clip hypertension. *J Korean Med Sci* 16: 462–466, 2001.
26. Koefoed-Johnsen V and Ussing HH. The nature of the frog skin potential. *Acta Physiol Scand* 42: 298–308, 1958.
27. Kotera T and Brown PD. Evidence for two types of potassium current in rat choroid plexus epithelial cells. *Pflügers Arch* 427: 317–324, 1994.
28. Lang FG, Messner G, and Rehwald W. Electrophysiology of sodium-coupled transport in proximal renal tubules. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 250:F953–F962, 1986.
29. Leighton J, Brada Z, Estes LW, and Justh G. Secretory activity and oncogenicity of a cell line (MDCK) derived from canine kidney. *Science* 163: 472–473, 1969.
30. Light DB, McCann FV, Keller TM, and Stanton BA. Amiloride-sensitive cation channel in apical membrane of inner medullary collecting duct. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 255: F278–F286, 1988.
31. Macknight AD, DiBona DR, and Leaf A. Sodium transport across toad urinary bladder: a model “tight” epithelium. *Physiol Rev* 60: 615–715, 1980.
32. Madsen KM, Clapp WL, and Verlander JW. Structure and function of the inner medullary collecting duct. *Kidney Int* 34: 441–454, 1988.
33. Madsen KM and Tisher CC. Structural-functional relationships along the distal nephron. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 250: F1–F15, 1986.
34. Marty A and Neher E. Tight seal whole cell recording. In: *Single-Channel Recording*, edited by Sakmann B and Neher E. New York: Plenum, 1983, p. 107–122.
35. Nonaka T, Matsuzaki K, Kawahara K, Suzuki K, and Hoshino M. Monovalent cation selective channel in the apical membrane of rat inner medullary collecting duct cells in primary culture. *Biochim Biophys Acta* 1233: 163–174, 1995.
36. Ono S, Mougouris T, DuBose TD Jr, and Sansom SC. ATP and calcium modulation of nonselective cation channels in IMCD cells. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 267: F558–F565, 1994.
37. Peinado MA, Pedrosa J, and Rodrigo J. *Avances en Inmunocitoquímica y Técnicas relacionadas* (1st ed.). Jaén, Spain: Universidad de Jaén, 1996, p. 52–67.
38. Rae J, Cooper K, Gates P, and Watsky W. Low access resistance perforated patch recordings using amphotericin B. *J Neurosci Methods* 37: 15–26, 1991.
39. Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (2nd ed.). San Diego, CA: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, p. 7.19–7.22.
40. Sansom SC, Mougouris T, Ono S, and DuBose TD Jr. ATP-sensitive K⁺-selective channels of inner medullary collecting duct cells. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 267: F489–F496, 1994.
41. Stanton BA. Characterization of apical and basolateral membrane conductances of rat inner medullary collecting duct. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 256: F862–F868, 1989.
42. Stokes JB, Grupp C, and Kinne RKH. Purification of rat papillary collecting duct cells: functional and metabolic assessment. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 253: F251–F262, 1987.
43. Terreros DA, Tarr M, and Grantham JJ. Transmembrane electrical potential differences in cells of isolated renal tubules. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 241: F61–F68, 1981.
44. Ullrich KJ and Papavassiliou F. Sodium reabsorption in the papillary collecting duct of rats. Effect of adrenalectomy, low Na⁺ diet, acetazolamide, HCO⁻-free solutions and of amiloride. *Pflügers Arch* 379: 49–52, 1979.
45. Volk KA, Husted RF, Pruchno CJ, and Stokes JB. Functional and molecular evidence for Shaker-like K⁺ channels in rabbit renal papillary epithelial cell line. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 267: F671–F678, 1994.
46. Volk KA, Matsuda JJ, and Shibata EF. A voltage-dependent potassium current in rabbit coronary artery smooth muscle cells. *J Physiol* 439: 751–768, 1991.
47. Volk KA, Sigmund RD, Snyder PM, McDonald FJ, Welsh MJ, and Stokes JB. rENaC is the predominant Na⁺ channel in the apical membrane of the rat renal inner medullary collecting duct. *J Clin Invest* 96: 2748–2757, 1995.
48. Volk KA, Zhang C, Husted RF, and Stokes JB. Cl⁻ current in IMCD cells activated by hypotonicity: time course, ATP dependence, and inhibitors. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 271: F552–F559, 1996.
49. Wu D and Mori N. Outward K⁺ current in epithelial cells isolated from intermediate portion of endolymphatic sac of guinea pigs. *Am J Physiol Cell Physiol* 271: C1765–C1773, 1996.
50. Yao X, Chang AY, Boulpaep EL, Segal AS, and Desir C. Molecular cloning of a glibenclamide-sensitive, voltage-gated potassium channel expressed in rabbit kidney. *J Clin Invest* 97: 2525–2533, 1996.