

00551



UNIVERSIDAD NACIONAL **UN/M**  
AUTÓNOMA DE MÉXICO **POSGRADO** 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ANÁLISIS FUNCIONAL Y MOLECULAR DE  
LA REGULACIÓN SEXUAL DIMÓRFICA  
DEL COTRANSPORTADOR RENAL DE  
 $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$  SENSIBLE A TIAZIDAS

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :  
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

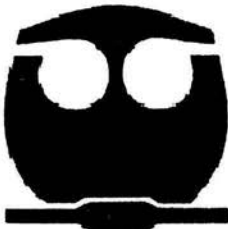
P R E S E N T A :

PAOLA ANA DE LOS HEROS RIOS

TUTOR: DR. GERARDO GAMBA AYALA

MÉXICO, D. F.

DICIEMBRE 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.

## **"Análisis funcional y molecular de la regulación sexual dimórfica del cotransportador renal de Na<sup>+</sup>:Cl<sup>-</sup> sensible a tiazidas"**

### **RECONOCIMIENTOS**

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Gerardo Gamba Ayala en el departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ).

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Gerardo Gamba Ayala	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dra. María Elena Ibarra Rubio	Facultad de Química, UNAM
Dr. Ignacio Camacho Arroyo	Facultad de Química, UNAM

Se reconoce la colaboración y asesoría de la Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval durante la realización del presente estudio.

Se reconoce la asesoría del M en C Mario Cárdenas León, departamento de Biología de la Reproducción del INCMNSZ y del Q. César Juárez departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral del INCMNSZ en el manejo de los animales y la recolección de los tejidos.

Se reconoce la asesoría técnica de la Q. Norma Vázquez en diversos experimentos.

El proyecto fue apoyado por el CONACYT (G34511M) y por la DGAPA-UNAM (IN208602-3).

Durante los estudios de maestría recibí una beca otorgada por el CONACYT con número de registro 167258 y por la DGEP-UNAM para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dr. José Pedraza Chaverri	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Norma Bobadilla Sandoval	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Secretario	Dra. Marta Menjivar Iraheta	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dr. Ignacio Camacho Arroyo	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes	Facultad de Química, UNAM

A mi Papá  
Por todo su apoyo

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia por siempre apoyarme en mis estudios.

A mis amigos y compañeros del laboratorio: Paty, Erika, Victoria, Claudia, Joyce, Jazmín, Anahí, Norma V. Pedro y Manuel.

A David por toda su paciencia, comprensión y amor.

A Susy, Azul, Paco y Marcelo por sacarme de la rutina!

A la Dra. Norma Bobadilla por concederme mucho de su tiempo, consejos y amistad.

Al Dr. Gerardo Gamba por su apoyo y amistad dentro y fuera del laboratorio.

Al Posgrado en Ciencias Bioquímicas por todas las facilidades otorgadas. Especialmente a Leticia García por toda, toda la ayuda y paciencia durante mi maestría.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	1
<b>INTRODUCCIÓN</b>	3
Cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ sensible a tiazidas (CST)	4
Agentes Diuréticos	8
Tiazidas o diuréticos tipo tiazida	8
Características funcionales del CST	9
Regulación del CST	12
Flujo y carga tubular de sodio	17
Inhibición del transporte	17
Efecto de las hormonas esteroideas	18
Hormonas peptídicas	19
Hormonas sexuales	21
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	25
<b>HIPÓTESIS</b>	26
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	27
<b>Objetivos Particulares</b>	27
<b>METODOLOGÍA</b>	28
Modelo experimental	28
Determinaciones bioquímicas	31
Electrolitos	31
Creatinina	31
Hormonas sexuales	32
Extracción de RNA total (RNAt) a partir de Corteza y Médula Renal	32
Amplificación a partir de RT-PCR semicuantitativa	33
Transcripción reversa (RT)	33
Ensayos de PCR-semi-cuantitativa	34
Análisis de Western Blot (WB) del CST	35
Extracción de proteínas totales	35
Extracción de proteínas de membrana	37
Análisis Estadístico	38
<b>RESULTADOS</b>	40
<b>Efecto del género y la gonadectomía en la respuesta a la BFTZ</b>	40
Efecto del género sobre la respuesta al tratamiento con BFTZ	40
Respuesta a los diuréticos Furosemida y Amilorida	43
Efecto de la gonadectomía sobre la respuesta renal a la BFTZ	44
Hormonas sexuales	44
Peso corporal	45
Depuración de creatinina	46
<b>PCR Semicuantitativa</b>	50
Determinación de la fase exponencial	50
<b>Expresión génica del CST</b>	52
<b>Análisis de Western Blot</b>	53
Expresión del CST en proteínas totales de Riñón	53

Expresión del CST en las Proteínas de Membrana de Corteza Renal	55
<b>DISCUSIÓN</b>	57
<b>CONCLUSIONES</b>	64
<b>PERSPECTIVAS</b>	65
<b>REFERENCIAS</b>	66
<b>APÉNDICES</b>	73
<b>Apéndice 1.</b> Extracción de RNA con guanidina y CsCl	73
Soluciones para extracción de RNA	74
<b>Apéndice 2.</b> Gel de agarosa al 1% formaldehído para RNA	75
<b>Apéndice 3.</b> Tratamiento con DNAsa	76
<b>Apéndice 4.</b> Análisis de RT-PCR	77
<b>Apéndice 5.</b> Análisis de Western Blot	78
<b>Apéndice 6.</b> Extracción de proteínas de Membrana	85
<b>Apéndice 7.</b> Western blot para $\beta$ actina	86

## ANÁLISIS FUNCIONAL Y MOLECULAR DE LA REGULACIÓN SEXUAL DIMÓRFICA DEL COTRANSPORTADOR RENAL DE Na<sup>+</sup>:Cl<sup>-</sup> SENSIBLE A TIAZIDAS

### RESUMEN

**Introducción.** Se ha propuesto que uno de los sistemas de transporte en el túbulo renal que podría estar bajo regulación dimórfica por hormonas sexuales es el cotransportador de Na<sup>+</sup>:Cl<sup>-</sup> sensible a tiazidas (CST). Dicha regulación es importante de estudiar ya que se han hecho las siguientes observaciones en relación con el CST: 1) la actividad del CST regula la reabsorción renal de calcio, 2) el tratamiento crónico con tiazidas aumenta la masa ósea y protege contra la osteoporosis y 3) los defectos hereditarios en el CST se asocian con cambios en la densidad mineral ósea. Así, la actividad del CST podría estar asociada con el desarrollo de osteoporosis, enfermedad particularmente prevalente en la post-menopausia, en parte por los cambios que sucedan en la actividad del CST durante la insuficiencia ovárica.

**Objetivos.** Estudiar las diferencias de respuesta a tiazidas y la expresión del RNAm y proteína del CST en ratas hembras y machos, así como el papel de las gónadas en determinar las diferencias encontradas.

**Material y Métodos.** Se estudiaron 4 grupos de 10 ratas Wistar cada uno. Dos de machos y dos de hembras de 250-350 gr. Después de adaptación a jaula metabólica durante 5 días, en todas las ratas se estudió la respuesta, durante dos horas, a la administración de una dosis única intraperitoneal del diurético tiazida bendroflumetiazida (BFTZ). Posteriormente, 10 ratas hembras y 10 machos fueron sometidos a gonadectomía. Cuatro semanas después los 4 grupos fueron expuestos de nuevo a la administración de BFTZ. De esta manera, comparamos la respuesta a la BFTZ entre hembras y machos, con o sin gonadectomía y antes vs después de ésta. Al término del estudio, las ratas fueron sacrificadas y se obtuvieron los riñones para extracción de RNA total u proteínas. Se determinó la expresión del RNAm de CST mediante RT-PCR semicuantitativa en presencia de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP, con iniciadores específicos para amplificar una banda de 204 pb. del CST y otra de 515 pb. del RNAm de la gliceraldehído 3-fosfatodeshidrogenasa (G3PD) como gen control y de la proteína de CST mediante análisis de Western Blot con anticuerpos policlonales dirigidos contra el dominio amino terminal del CST.  $\beta$ -actina fue utilizada como proteína control.

**Resultados.** En las ratas normales observamos diferencia significativa en la respuesta a BFTZ entre hembras y machos. La magnitud de respuesta en hembras fue mayor que en los machos. Como ejemplo, el incremento en la excreción urinaria de sodio en ratas hembras y macho fue de  $106 \pm 48$  vs  $51 \pm 26$   $\mu$ Eq/100 g/2 h, respectivamente ( $p < 0.01$ ). Cuatro semanas después de la gonadectomía los cuatro grupos fueron estudiados nuevamente. En esta ocasión observamos que la ooforectomía redujo significativamente la respuesta a BFTZ, mientras que la orquiectomía no tuvo ningún efecto, de manera tal que la magnitud de respuesta a BFTZ en ratas hembras ooforectomizadas, en machos



control y en machos orquiectomizados fue similar. El análisis de expresión del CST mostró que no existe diferencia en la expresión entre hembras y machos a nivel del RNAm; al nivel de proteína totales las hembras expresan cuatro veces más CST que los machos. Sin embargo, esta diferencia no cambió con la gonadectomía, ya que las ratas ooforectomizadas también mostraron expresión del CST cuatro veces mayor que en los machos normales u orquiectomizados. Al nivel de proteínas de membrana, las hembras expresan más CST que los machos control y gonadectomizados. Esta diferencia cambia con la gonadectomía ya que en las hembras los niveles de CST en la membrana, se reducen significativamente.

**Conclusiones.** Nuestros resultados muestran que existe diferencia en la respuesta a tiazidas entre hembras y machos, asociada a mayor expresión del CST en las hembras. Esto sugiere que la regulación dimórfica del CST por hormonas sexuales sucede a nivel post-traduccional. La mayor respuesta a tiazidas en hembras depende de la presencia de los ovarios, pero no así la mayor expresión del CST, lo que indica que la regulación dimórfica del CST ocurre a varios niveles que incluyen el fisiológico y el proteómico.

## **Introducción**

El riñón es un órgano cuya función principal es la excreción de sal y agua, lo que le permite mantener constantes la osmolaridad y la composición de los líquidos corporales a pesar de las variaciones en la ingesta de agua y solutos. Se ha observado que distintos aspectos de la fisiología y fisiopatología renal están influenciados por el género o por la acción de las hormonas sexuales (1). Por ejemplo las diferencias de género observadas en la respuesta antidiurética a vasopresina, las cuales se deben probablemente a la acción de estrógenos (2), los compuestos que actúan como diuréticos únicamente en los machos (3), y/o los efectos de terapia estrogénica en la excreción renal de sodio (4) cloro, calcio y amonio (5).

Diferentes trabajos en animales y en humanos indican una asociación entre el género masculino y una progresión más rápida de las enfermedades renales. La hemodinámica glomerular, la proliferación de células mesangiales y de la matriz extracelular, así como la síntesis y liberación de citocinas, agentes vasoactivos y factores de crecimiento, son factores involucrados en la progresión de enfermedades renales en donde las hormonas sexuales ejercen un efecto regulador (6). Este dimorfismo sexual es más pronunciado antes de la menopausia, enfatizando así, el importante papel de los estrógenos. Las hormonas femeninas, han demostrado ser vaso-protectoras y producen efectos benéficos en los niveles de colesterol séricos. Además, pueden ejercer potentes acciones antioxidantes, las cuales parecen contribuir a la protección en el género femenino con respecto a las enfermedades renales crónicas (7).

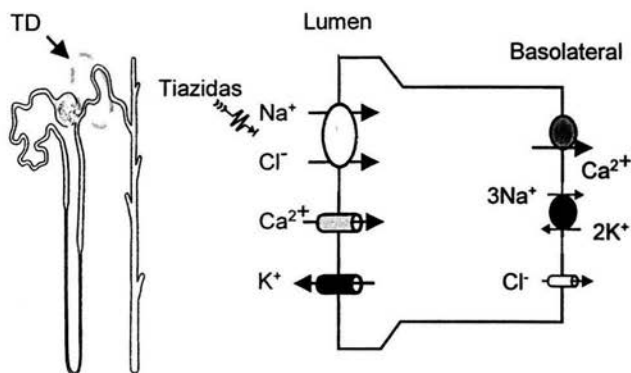
Lo anterior puede reflejar que además de las diferencias en la estructura y función renal determinadas genéticamente entre los sexos, los efectos directos de las hormonas sexuales mediados por receptores pueden jugar un papel importante en la determinación de la susceptibilidad diferencial al daño renal. Sin embargo, los mecanismos precisos del efecto del género en las enfermedades renales aún no se conocen (7).

Experimentalmente también se ha analizado el efecto del género y el de las hormonas sexuales en diferentes genes, proteínas y sistemas del riñón. A partir de lo anterior se han observado diferencias en la regulación génica al nivel transcripcional y postranscripcional, en presencia tanto de andrógenos como de estrógenos. Por ejemplo, la expresión del RNAm del gen del angiotensinógeno se induce cuando se administra  $17\beta$ -estradiol a ratas ovariectomizadas, sugiriendo una regulación estrogénica del sistema renina-angiotensina renal, la cual podría estar relacionada con ciertas formas de hipertensión mediada por estrógenos (8, 9).

### **Cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ sensible a tiazidas (CST)**

Uno de los sistemas de transporte específicos del riñón que se afecta claramente por el género es el cotransportador de  $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$  sensible a tiazidas o CST, el cual se expresa en la membrana apical del túbulo contorneado distal; sitio en la nefrona donde se reabsorbe una parte importante de la sal, que llega del asa de Henle y que constituye el principal sitio de acción de los diuréticos tipo tiazida, los cuales son de particular importancia terapéutica en el tratamiento de la hipertensión (10). Estos diuréticos antihipertensivos como la clortalidona, la hidroclorotiazida, la bendroflumetiazida y la

metolazona, actúan inhibiendo el transporte del CST, promoviendo así la excreción de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  (11). En el túbulo contorneado distal, el CST constituye la vía principal de reabsorción de  $\text{Na}$  y  $\text{Cl}$ , transportando  $\sim 5\%$  del  $\text{NaCl}$  filtrado del lumen del túbulo renal a la célula. A partir de la membrana apical, el CST (Fig. 1) transporta al ión  $\text{Cl}^-$  en contra de su gradiente y al ión  $\text{Na}^+$  hacia el interior de la célula con una estequiometría 1:1. El  $\text{Na}^+$  se intercambia en la cara basolateral por  $\text{K}^+$ , vía la  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPasa}$ . El  $\text{K}^+$  que entra por la cara basolateral es secretado hacia la luz tubular por canales conductivos. El  $\text{Cl}^-$



**Figura 1.** Fisiología del transporte de  $\text{Na}^+$  en el túbulo distal. El  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Cl}^-$  que ingresan a la célula a través del CST salen al intersticio renal a través de la  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPasa}$  y de canales de  $\text{Cl}^-$ , respectivamente

que ingresa a la célula acoplado al  $\text{Na}^+$ , sale por canales de  $\text{Cl}^-$  en la membrana basolateral, hacia el intersticio renal.

El CST pertenece a la familia de los cotransportadores electroneutros cloro-catiónicos (CCC) la cual incluye también otros dos receptores de diuréticos, los cotransportadores de  $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$  sensibles a bumetanida,  $\text{CSB1}$  y  $\text{CSB2}$  y el cotransportador de  $\text{K}^+:\text{Cl}^-$  o  $\text{KCC}$ , del cual hasta la fecha se han identificado 4 isoformas. Los genes que codifican estas proteínas transmembranales son altamente homólogos y poseen una topología membranal común (12). Los CCC llevan a cabo una

gran variedad de funciones, entre las que se encuentran la regulación del volumen celular, el movimiento vectorial de  $\text{Cl}^-$  y cationes a través de diversos epitelios y el control iónico del medio extra e intra-celular de las neuronas. La gran versatilidad de funciones de los CCC se refleja en los diversos tejidos donde se expresan y en su localización celular (13).

El CST se identificó molecularmente por primera vez, a partir de la vejiga urinaria del pez conocido como lenguado de invierno (*Pseudopleuronectes americanus*) mediante una estrategia de expresión funcional en ovocitos de *Xenopus laevis* (14). Es una proteína de membrana de 1023 aminoácidos (aa) en lenguado y 1002 en la rata, su estructura primaria predice por análisis de hidropatía, una topología básica de 3 dominios principales: una región

central hidrofóbica con 12  $\alpha$ -hélices, que probablemente corresponden a segmentos transmembrana con un asa hidrofílica extracelular glicosilada entre los segmentos transmembranales 7 y 8, un dominio amino terminal hidrofílico intracelular, relativamente corto de

130 a 270 aa y un dominio carboxilo terminal hidrofílico intracelular largo, de 450 residuos de aminoácidos en el que existen múltiples sitios para fosforilación vía proteína cinasa C y A (Fig.2). El peso molecular predicho para la proteína del CST es

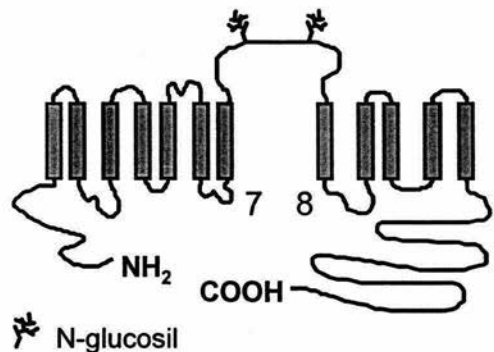


Figura 2. Estructura del cotransportador de  $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$  sensible a fiazidas

de ~110 kD. Sin embargo, en los análisis de western blot con anticuerpo anti CST se observa una banda de mayor peso molecular (44) lo cual sugiere que la proteína está glucosilada. La secuencia de aminoácidos del CSTr incluye 6 secuencias consenso para *N*-glucosilación, dos de las cuales se encuentran presentes en el asa extracelular en los residuos N404 y N424. La *N*-glucosilación es una modificación post-transcripcional en la cual una cadena de oligosacáridos se transfiere al péptido recién sintetizado y se une a residuos de asparagina de una secuencia consenso específica de la proteína [Asn-Xaa-Ser/Thr, Xaa ≠ Pro] (91). Diversos estudios indican que la *N*-glucosilación en las proteínas podría estar regulando su actividad biológica y su vida media, dirigiendo su plegamiento y/o regulando su expresión en la superficie celular (92). Sin embargo, el impacto funcional de la glucosilación del CST en el riñón aún no se ha demostrado. Hoover y colaboradores (93) mediante técnicas de mutagénesis dirigida y experimentos de de-glucosilación, demostraron que el CSTr se glucosila *in vivo* en los residuos N404 y N424 del asa extracelular y que estos sitios son esenciales para su expresión en la membrana, para llevar a cabo el cotransporte de NaCl y que están involucrados en la unión del ión cloro. En dicho estudio se demostró también que la glucosilación del CSTr está involucrada con la unión al diurético tipo tiazida. Los cambios en la afinidad a éste diurético; uno de los más utilizados en el tratamiento de la hipertensión, poseen claras implicaciones para el desarrollo de fármacos.

En el humano el gen que codifica para el CST es el Slc12a3 que se localiza en el cromosoma 16 y está codificado por 26 exones que abarcan aproximadamente 55 kb de DNA genómico (15). Las mutaciones en este gen se han asociado directamente con

el síndrome de Gitelman. Este es una enfermedad autosómica y recesiva, descrita por primera vez en 1966 por Gitelman, Graham y Welt (16), que se caracteriza clínicamente por hipotensión arterial, hipocalcemia, hipomagnesemia, alcalosis metabólica e hipocalciuria y que se presenta usualmente en la segunda década de la vida (17; 18). En los últimos años se han descrito diversas mutaciones en el CST que originan esta enfermedad. Éstas incluyen, mutaciones sin sentido, mutaciones en los sitios de empalme alternativo, inserción de codones de paro, deleciones, cambios en el marco de lectura, entre otras. Este síndrome, presenta una variabilidad fenotípica considerable, por lo que no se ha podido establecer una correlación entre mutaciones específicas y un fenotipo en particular. Por otra parte, todas las mutaciones que se han reportado como causantes del síndrome de Gitelman, alteran un aminoácido conservado a lo largo de la evolución, generalmente cambiando la carga del residuo (19). Estos hallazgos clínico-moleculares han incrementado el entendimiento acerca de este padecimiento así como de la fisiología del túbulo distal. Simon y colaboradores (17) postularon que el síndrome de Gitelman se produce por un transporte defectuoso de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en los productos génicos mutados. Posteriormente, diversos estudios (20, 21) demostraron que muchas de las mutaciones puntuales encontradas en pacientes con síndrome de Gitelman afectan el procesamiento intracelular de la proteína, lo que le impide llegar adecuadamente a la membrana celular y funcionar apropiadamente. Por lo tanto, las manifestaciones de esta enfermedad se deben a la ausencia del CST en la membrana apical del túbulo distal.

## **Agentes Diuréticos**

Los diuréticos constituyen un grupo diverso de compuestos químicos, que comparten la habilidad de aumentar la excreción renal de sodio. Estos agentes son ampliamente utilizados en la clínica para el tratamiento de la hipertensión, edema pulmonar o cerebral y otros trastornos caracterizados por la acumulación de líquido en los compartimientos intersticiales o extracelulares.

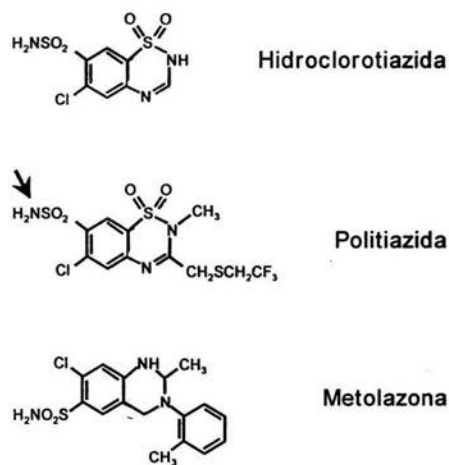
En general, los diuréticos pueden dividirse en 4 grupos: 1) diuréticos osmóticos e inhibidores de la anhidrasa carbónica como el manitol y la acetazolamida respectivamente, que actúan en el túbulo proximal; 2) diuréticos de asa como la furosemida que inhibe el transporte de sodio en el asa ascendente de Henle; 3) tiazidas y diuréticos tipo tiazidas que actúan en el túbulo distal; y 4) los diuréticos débiles amiloride y triamterena que actúan en el túbulo colector y se utilizan principalmente por su capacidad para retener potasio.

### *Tiazidas o diuréticos tipo tiazida*

Los diuréticos tipo tiazida, son análogos del 1,2,4-benzotiadiazina-1,1-dióxido y surgieron a partir de modificaciones químicas de las sulfonamidas, de las que se había observado producían diuresis y cloruresis. Muchos de los diuréticos tiazídicos conservan un grupo lateral sulfamil en el anillo bencénico, el cual les confiere cierta capacidad de inhibición de la anhidrasa carbónica (Fig. 3). El blanco principal de las tiazidas empleadas en la medicina, lo constituye el CST, sobre el que ejercen el efecto de alterar la tasa de transporte de NaCl inhibiéndolo (22). Es debido a lo anterior que el



uso de las tiazidas en la investigación de este transportador, constituye una de las herramientas más poderosas, tanto para su identificación en diferentes organismos o en expresiones heterólogas, como para el estudio de sus características funcionales (23, 24). Sin embargo, los sitios específicos de unión a los iones y al diurético en el CST, aún no se han identificado.



**Figura 3.** Estructura química de algunas tiazidas y diuréticos tipo tiazida. La flecha señala el grupo lateral sulfamil.

### Características funcionales del CST

Antes de la clonación del CST a partir de la vejiga urinaria del lenguado de invierno, ya se había demostrado la existencia de un transporte de NaCl sensible a tiazidas en el túbulo distal. Renfro (25;26) y Stokes y colaboradores (27) reportaron previamente la existencia de este cotransportador en el lenguado. El modelo de la reabsorción de sal en la vejiga urinaria de los peces teleósteos es el mismo para el túbulo distal y es por esto, que a partir del DNA complementario (DNAC) del CST de este pez, el cual se llamó CSTf, se generó una sonda de 1.3 kb con la cual se clonó el DNAC del CST de rata (CSTr) a partir de corteza renal (28) y posteriormente su expresión en ovocitos de *Xenopus*. A continuación, se realizó la identificación del CST de humano (CSTh) (17) y de ratón (CSTm) (29).

En 1975 Robert Kunau y colaboradores fueron los primeros en sugerir que las tiazidas ejercen su efecto diurético inhibiendo la reabsorción de sal en el túbulo distal (30). Posteriormente, Ellison y colaboradores en 1987 mediante estudios de micropunción (10), describieron la presencia del CST en el túbulo distal, como el responsable de la acción de los diuréticos tipo tiazida.

En experimentos de microperfusión *in vivo* en ratas Sprague-Dawley, Velázquez y colaboradores (31) demostraron que el transporte de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en el túbulo distal es interdependiente y ocurre en ausencia de  $\text{K}^+$ . El estudio cinético reveló una  $K_m$  de 9 mM para el  $\text{Na}^+$  y de 12 mM para el  $\text{Cl}^-$ . Estudios recientes han demostrado que la transfección de CSTfl y de CSTr en ovocitos de *Xenopus laevis* induce la aparición de un cotransportador de  $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$  con cinética similar a la reportada para los transportadores endógenos. Este transporte de  $\text{Na}^+$  no depende de la presencia de  $\text{K}^+$  extracelular y no es sensible a ouabaína, amiloride, acetazolamida o bumetanida (23, 24).

Beaumont y colaboradores (32) realizaron estudios de afinidad con [ $^3\text{H}$ ]metolazona; un diurético tipo tiazida marcado radiactivamente con tritio, en corteza renal de rata y demostraron que este compuesto se unía a un sitio de alta afinidad en las membranas plasmáticas con una  $K_m$  de 4.27 nM. Este sitio de alta afinidad, se encontraba presente únicamente en preparaciones de la corteza renal y no en aquellas de médula renal interna o externa. La unión de [ $^3\text{H}$ ]metolazona podía ser alterada únicamente con otras tiazidas, con un perfil de afinidad similar a su potencia como diuréticos clínicos y no con cualquier otro tipo de droga. Debido a estas propiedades de unión, se consideró que este sitio representaba al transportador de  $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$  sensible a

tiazidas. La localización autorradiográfica demostró que la unión de [<sup>3</sup>H]metolazona en la corteza renal se lleva a cabo específicamente en el túbulo distal (33). Dado que estas características correspondían a lo esperado para el receptor de tiazidas, desde entonces, varios grupos han utilizado la unión de [<sup>3</sup>H]metolazona a la corteza renal para el análisis de las características fisiológicas del CST en el riñón de mamíferos. Sin embargo, la heterogeneidad entre las especies y la falta de límites distinguibles entre el túbulo distal y el túbulo conector, han hecho que la localización precisa del CST se dificulte. Técnicas como la inmunofluorescencia y la hibridación *in situ* (34, 35), han sido de gran utilidad en este aspecto. De la misma manera, se han desarrollado ya anticuerpos contra el extremo amino del CST de rata.

En el túbulo distal, la inhibición de la función del CST a través de una tiazida, produce disminución en la reabsorción de Na<sup>+</sup> por efecto directo del diurético, pero también aumento en la reabsorción de Ca<sup>2+</sup>, por un efecto indirecto (36). No se conoce con precisión el mecanismo de esta acción indirecta, pero Friedman y colaboradores (37), han sugerido que las tiazidas bloquean la entrada de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> en la membrana apical, mientras que el Na<sup>+</sup> continúa saliendo en forma activa vía la Na<sup>+</sup>:K<sup>+</sup>-ATPasa en la membrana basolateral. La concentración intracelular de Cl<sup>-</sup> disminuye debido al eflujo continuo de éste a través de canales basolaterales de Cl<sup>-</sup>, lo cual resulta en la hiperpolarización de la célula tubular distal hacia el potencial de equilibrio del K<sup>+</sup> que tiene como consecuencia la apertura de canales catiónicos en la membrana apical, de los cuales los más abundantes son los de Ca<sup>2+</sup> (12). De esta forma, además del efecto natriurético, las tiazidas, producen aumento en la reabsorción de Ca<sup>2+</sup>, con la consecuente disminución en la excreción urinaria de Ca<sup>2+</sup>. Es debido a lo anterior que

se utilizan tiazidas en el tratamiento de la litiasis renal. Además, la disminución crónica en la excreción urinaria de  $\text{Ca}^{2+}$  en pacientes tratados con este tipo de drogas, podría explicar el aparente efecto benéfico de las tiazidas en la masa ósea (38, 39). El mecanismo por el cual las tiazidas estimulan la reabsorción distal de  $\text{Ca}^{2+}$  y la relación que existe entre la reabsorción tubular renal de  $\text{NaCl}$  y de  $\text{Ca}^{2+}$  aún no se conoce.

### **Regulación del CST**

Al contrario de otros miembros de la familia de los cotransportadores electroneutros, existe poca información directa, sobre la regulación del cotransporte de  $\text{NaCl}$  sensible a tiazidas (12). El CST controla el transporte electroneutro de  $\text{NaCl}$  hacia las células del túbulo distal y debido a que se encuentra restringido a esta región, la información que se obtiene de éste a partir de homogenados de riñón completo, refleja realmente los cambios en su abundancia en esta región. Los estudios sobre la regulación del CST al principio se vieron limitados debido a tres factores principales: la complejidad estructural del túbulo distal, la identificación específica del sitio de acción de las tiazidas y la falta de un marcador radiactivo para el CST (40).

Antes de que se desarrollaran anticuerpos específicos para el CST, su abundancia era cuantificada generalmente por la unión específica a la metolazona. En 1992 Fanestil (41) mediante el uso de la  $^3\text{H}$ -metolazona, estudió el número de transportadores bajo diversas condiciones fisiológicas y fisiopatológicas, en diversas especies como rata y conejo.

La nefrona distal es el sitio de la regulación fina de la excreción de los electrolitos renales. Anatómicamente su definición toma en cuenta exclusivamente

aquellas porciones tubulares que se originaron a partir del blastema metanéfrico, es decir, la porción gruesa del asa ascendente de Henle, el túbulo distal y el túbulo colector. Hasta la última parte del siglo XX, morfológicamente el túbulo distal se definía con base en las observaciones de la microscopía óptica. Sin embargo, la convención actual con base en estudios ultraestructurales, es subdividirlo en 3 segmentos: el túbulo contorneado distal, el túbulo conector y el inicio del túbulo colector (42). Actualmente gracias a las técnicas de la biología molecular, la definición puede basarse también en el tipo celular, así como en la distribución y co-expresión apical de diferentes proteínas de transporte.

A pesar de que estas proteínas y su secuencia básica en el túbulo distal, es la misma en todas las especies de mamífero estudiadas (rata, ratón, conejo y humano), en cada una, existen pequeñas diferencias en su topología, originadas probablemente como una respuesta evolutiva de acuerdo a las condiciones en las que viven. Estos cambios en los patrones de distribución podrían ser funcionalmente relevantes, y por ejemplo verse reflejado en la sensibilidad a las hormonas o en la excreción final de los solutos (43).

La transición fenotípica entre las células del asa de Henle y el túbulo contorneado distal es muy evidente y ocurre a una distancia variable después de la mácula densa. En contraste, en el riñón de rata y de humano el límite distal del túbulo distal es mucho menos abrupto, de tal manera que el túbulo conector se compone de una mezcla de células que expresan al CST, células que no lo hacen, células conectoras y células intercaladas, ambas negativas para el CST (44). La transición entre el túbulo contorneado distal y el túbulo conector es más distinguible en el conejo.

Para fines de este estudio, el túbulo distal, puede definirse como la porción de la nefrona distal localizada poco después de la mácula densa, seguida secuencialmente por el túbulo conector. Se encuentra conformado por un epitelio homogéneo con grandes células cuboidales altas, con extensos pliegues de la membrana plasmática basolateral, intercalados con abundantes mitocondrias de gran tamaño arregladas verticalmente. El núcleo y el complejo de Golgi se localizan en la parte superior de la célula. La superficie apical de la célula presenta algunas microproyecciones, pero no de longitud suficiente ni tan abundantes como para formar un borde en cepillo (40, 45).

Los cambios en la cantidad de proteína o el RNAm del CST, han sido observados bajo diferentes condiciones fisiopatológicas (46, 47, 48). En 1989 Beaumont y colaboradores (49) demostraron que la isquemia renal aguda en ratas, disminuye la densidad del CST en un 90%, medida con la unión de [<sup>3</sup>H]metolazona a membranas de corteza renal. Este efecto es revertido en un 40% con 10 minutos de reperfusión del riñón. Ellos también demostraron, que el bloqueo de la fosforilación oxidativa y la inhibición del transporte de electrones mitocondrial con rotenona, disminuyen la unión de [<sup>3</sup>H]metolazona a un valor menor al 20% del original. Esto sugiere que el CST presenta una regulación aguda y reversible, que es sensible a la concentración de oxígeno y que su afinidad por las tiazidas es dependiente de la producción intracelular de ATP. Posteriormente Edelstein y colaboradores (50) midieron la expresión del CST mediante análisis de western blot, en ratas con isquemia renal por 30 o 45 minutos seguidos de 15 minutos, 6 y 24 horas de reperfusión y demostraron que la abundancia de la proteína también se reduce en la corteza renal. Wang y colaboradores (51) analizaron los niveles del RNAm en este mismo modelo y mediante

análisis de Northern blot demostraron que la expresión del RNAm de CST disminuye después de 30 minutos de isquemia y 24 horas de reperusión.

Además de los estudios llevados a cabo en animales, la regulación de la función y la expresión del CST, también se ha llevado a cabo en sistemas de expresión funcional como en ovocitos de *Xenopus laevis* y en células renales Madin-Darby de perro (MDCK) (23, 24, 52, 53). Mediante el sistema de ovocitos de *Xenopus*, se encontró que la captación de  $\text{Na}^+$  llevada a cabo por el CSTfl no se veía afectada por la presencia de AMPc o de GMPc. Mientras que el ester de forbol PMA, el cual es un potente activador de la proteína cinasa C (PKC), disminuyó significativamente el transporte de  $\text{Na}^+$  en ovocitos inyectados con CSTfl (24) o CSTr (52). También mediante este sistema, de Jong en el 2003, demostró que cuando el CST se localiza en la membrana plasmática funcionalmente se encuentra formando homodímeros altamente glucosilados (53). La expresión del CSTh en las células MDCK, constituyó la generación de una línea celular de mamífero que expresaba establemente al CST de humano. En este estudio, además de confirmar el cotransporte de NaCl sensible a tiazidas, se analizó el papel de diversas rutas de señalización en la regulación de la localización del CST en la membrana y en su actividad. En estas células, el CST se localizó principalmente en el dominio apical y en su forma glicosilada, en donde llevó a cabo un transporte de  $\text{Na}^+$  sensible a tiazidas, el cual incrementó después de un tratamiento a corto plazo con forskolina. La forskolina promueve la producción de AMPc y es probable que este segundo mensajero a través de la PKA, debido al corto tiempo de respuesta, este involucrado en la activación de cotransportadores que ya están en la membrana o en el tráfico de las vesículas intracelulares que llevan el CSTh hacia la

membrana apical, más que en el incremento de la transcripción del gen. De todas las especies estudiadas, únicamente el CSTh contiene un sitio potencial de fosforilación por PKA (54). Lo anterior explica la falta de efecto del AMPc en la captación de Na<sup>+</sup> en ovocitos de *Xenopus laevis* con CSTfl. Hasta el momento, aún no es claro cuáles hormonas o factores actúan a través del AMPc para regular al CST en el túbulo distal del humano.

Hasta el momento, no se conocen exactamente las vías de fosforilación a través de las cuales sea regulada la función del CST. Sin embargo, en el 2003, Yang y Wilson (55, 56) demostraron que las proteínas cinasas WNK, regulan la actividad del CST. Sus estudios muestran que cuando el transportador se co-expresa en ovocitos de *Xenopus laevis* con la cinasa WNK4, la captación de Na<sup>+</sup> disminuye en más de un 85% cuando se compara con ovocitos inyectados únicamente con el CST. Lo que indica, que la WNK4 es un potente regulador de la actividad del CST. Esto aunado al hecho de que la WNK4 se expresa también a lo largo del túbulo distal, sugiere que esta cinasa podría estar participando en la regulación de la excreción de sal *in vivo*. Experimentos realizados con la proteína verde fluorescente en nuestro laboratorio, demostraron que el efecto de la WNK4 sobre el CST, está mediado en gran parte por una reducción en la llegada de este cotransportador a la membrana. La coexpresión del CST con WNK4 no interfiere con su procesamiento, es decir, que el mecanismo por el cual la WNK4 regula al CST, no es debido a que afecta su plegamiento, sino que interfiere en el tráfico de la proteína a la membrana (56). La especificidad de esta interacción se comprobó en células HEK 293T, en donde al expresar a la WNK4 y al extremo carboxilo del CST, se demostró que estas proteínas co-inmunoprecipitan, pudiendo



estar formando un complejo en este tipo celular. Estos resultados, muestran una probable vía de señalización de cinasas, que podría jugar un papel importante en el control del volumen del fluido extracelular (55).

#### *Flujo y carga tubular de sodio*

En el túbulo distal se reabsorbe el 5% del NaCl del filtrado glomerular y los primeros estudios sugirieron que tanto la carga tubular de sal, así como la tasa del flujo que llegan a éste, controlan directamente la reabsorción de sodio en este punto de la nefrona (57). La furosemida (58) y el aumento de Na<sup>+</sup> en la dieta (59) incrementan la carga de NaCl e inducen hipertrofia e hiperplasia del túbulo distal, con proliferación de la membrana basolateral, aumento en el volumen de las mitocondrias (57), así como en la actividad de la Na<sup>+</sup>:K<sup>+</sup>-ATPasa basolateral (60) y en el número de receptores para tiazida en la membrana apical (61), lo que incrementa la capacidad de reabsorción de Na<sup>+</sup> (59, 62).

#### *Inhibición del transporte*

Los diuréticos tipo tiazida, son los más utilizados en el tratamiento de la hipertensión. Estos inhiben la captación de NaCl hacia el túbulo distal, uniéndose al CST. La reducción prolongada de la entrada de sodio en las células, resulta en velocidades de transporte crónicamente disminuidas y estructuralmente en una disminución del epitelio, con una reducción en la maquinaria del transporte activo de sal (63). El tratamiento con tiazidas en el ratón, se asocia claramente con una disminución del epitelio del túbulo distal, mientras que el ratón knockout de CST muestra una marcada

hipotrofia del epitelio (64). Sin embargo, en la rata, el tratamiento con metolazona por 3 días o con hidroclorotiazida induce apoptosis masiva exclusivamente en la primera porción del túbulo distal (65). Los diferentes efectos de las tiazidas en el túbulo distal de ratas y ratones, enfatizan los diferentes tipos de respuesta en cada especie.

#### *Efecto de las hormonas esteroideas*

Los cambios en la carga de sal y la velocidad del flujo parecen ser factores suficientes para regular el transporte de sal en el túbulo distal. Sin embargo, diversos estudios sugieren la posible implicación de la aldosterona en el control de la abundancia del CST y/o en la reabsorción de sal. La hormona mineralocorticoidea aldosterona, regula la excreción urinaria de sodio, a través de incrementar la reabsorción renal de éste ión. Debido a que el CST controla la entrada de sodio en el túbulo distal, es probable que la aldosterona regule el transporte de sodio en esta región de la nefrona por medio del CST. Chen y colaboradores (66) demostraron que la adrenalectomía en la rata disminuye la densidad del CST y observaron un incremento en la unión a [<sup>3</sup>H]metolazona en homogenados de riñón después de aplicar aldosterona exógena. Velázquez y colaboradores (67) observaron que la baja actividad en el transporte electroneutro de sodio, medida *in vivo* en el túbulo distal de ratas adrenalectomizadas, puede ser recuperada a niveles normales e incluso incrementada con la administración de aldosterona y/o altas dosis de glucocorticoides. En 1998, Kim et al (68), realizaron un estudio en donde la restricción de NaCl en la dieta durante 10 días (con el fin de incrementar los niveles séricos de aldosterona), la infusión de aldosterona por 10 días, y/o la administración oral de un mineralocorticoide sintético durante 7 días, resultaron

en una sobre-expresión del CST comprobada mediante análisis de western blot (68). Los resultados anteriores, demuestran que la densidad y la reabsorción de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en el túbulo distal, se encuentra regulada por cambios en la concentración sérica de ésta hormona esteroide. El incremento en el transporte y la proteína del CST, después del tratamiento con furosemida o la restricción de sodio en la dieta, fue significativamente menor cuando los receptores de aldosterona fueron bloqueados con espironolactona (69, 70). Estos resultados son consistentes con la presencia de receptores para mineralocorticoides y la enzima  $11\beta$ -hidroxiesteroidea en el túbulo contorneado distal de rata, conejo y humano (48, 71), necesarios para que las hormonas esteroideas lleven a cabo su función.

#### *Hormonas peptídicas*

Se ha demostrado indirectamente la presencia de receptores para hormonas peptídicas como la calcitonina, la PTH y el péptido sintético isoproterenol, mediante el incremento en la actividad del AMPc después de la aplicación de estas hormonas a segmentos de túbulo distal microdisecados (72) Blakely y colaboradores, reportaron un aumento en la unión a [ $^3\text{H}$ ]metolazona en homogenados de riñón de ratas tratadas con calcitonina (73).

Independientemente de su efecto en la secreción adrenal de aldosterona, la angiotensina II, la enzima involucrada en el control de la presión sanguínea arterial y la homeostasis sistémica del sodio, también estimula la reabsorción de sodio en el túbulo distal (74). Se ha discutido que la hipertrofia del túbulo distal inducida por un aumento en la carga tubular de sal, podría ser debida en parte, a un efecto de la angiotensina II

(75) En experimentos recientes con ratones knockout del receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1) se demostró que, contrario a lo que sucede en los ratones silvestres, los knockout carecen de un aumento en la abundancia del CST en respuesta a una dieta baja en sodio. De tal manera que en el ratón, parte de la adaptación del túbulo distal a la baja ingesta de sodio, puede ser mediada por un aumento en los niveles de la angiotensina II.

Ecelbarger y colaboradores (76), analizaron el efecto de la hormona vasopresina en la expresión de diferentes transportadores de sodio en el riñón, en ratas diabéticas y normales, mediante la infusión de un análogo de la vasopresina a las primeras y mediante la elevación de los niveles endógenos de la hormona, restringiendo la ingesta de agua a las segundas. Por medio del análisis de western blot, comprobaron que la abundancia del CST incrementó con la infusión del agonista y no mediante la restricción de agua en las ratas normales. La vasopresina posee acciones anti-diuréticas y anti-natriuréticas en el riñón, sin embargo la presencia de sus receptores V2 en el túbulo distal, no se ha reportado, por lo que los autores sugieren que el efecto en el aumento de la expresión del CST, se podría deber a un ajuste en los niveles de aldosterona en las ratas diabéticas; hormona que se sabe aumenta la expresión del CST. Otra explicación es que la señalización en los 2 modelos no sea la misma, ya que el análogo se une únicamente a los receptores V2 y en las ratas normales, la vasopresina endógena puede actuar también a través de los receptores V1. Sin embargo no se descarta la posibilidad de que esta hormona pueda incrementar la abundancia del CST en el túbulo distal.

## Hormonas sexuales

Desde hace tiempo se conoce que los estrógenos pueden reducir la excreción renal de sodio (40), sin embargo, el estudio de la regulación de las hormonas sexuales y el género sobre la reabsorción de sodio y cloro en el túbulo distal, es poco extenso y comenzó hace poco tiempo.

En 1994 Chen y colaboradores (5) analizaron el efecto del género en la rata, sobre la expresión y la respuesta del CST mediante la unión con  $^3\text{H}$ -metolazona y la administración del diurético bendroflumetiazida (BFTZ). Utilizaron ratas Sprague-Dawley macho con o sin orquidectomía y hembras con o sin oforectomía y demostraron que la densidad del

cotransportador es mayor en ratas hembras que en los machos (Fig. 4). Sin embargo, su densidad disminuía significativamente en ratas ovariectomizadas mientras que en las ratas

orquidectomizadas,

incrementaba. En cuanto a la

respuesta a la BFTZ, en presencia de ésta, el volumen urinario y la excreción de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{NH}_4$  incrementó tanto en hembras como en machos, sin embargo, la excreción fue mayor en las hembras y disminuyó también la excreción del  $\text{Ca}^{2+}$ . Es decir que las hembras muestran una respuesta significativamente mayor a la administración de

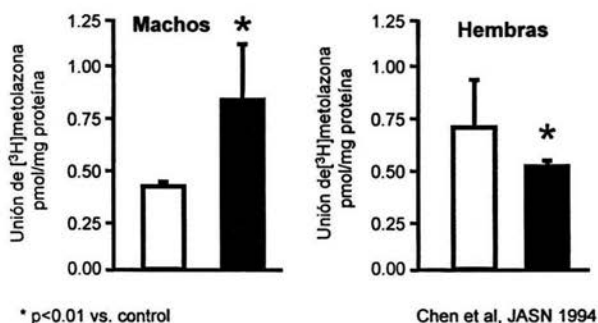


Figura 4. Efecto de la gonadectomía en la unión de  $^3\text{H}$ metolazona. La unión del diurético en el grupo control □ es mayor en las hembras que en los machos. Sin embargo, esta diferencia desaparece con la gonadectomía ■.

BFTZ. Sin embargo, esta diferencia desapareció con la ooforectomía. Con este estudio, Chen y colaboradores (5) demostraron una diferencia de género en la densidad del CST en el túbulo distal y en la respuesta a tiazidas, es decir una probable regulación tanto en la función como en la expresión, ya que el incremento en la densidad del transportador en las hembras correlacionó con una mayor excreción de sodio, cloro y amonio y con la disminución en la excreción urinaria de calcio después del tratamiento con BFTZ. A pesar de que este estudio brinda información importante sobre la respuesta a la BFTZ tanto en machos como en hembras, el análisis de densidad del CST mediante la unión con  $^3\text{H}$ -metolazona provee únicamente información sobre el número y no sobre la actividad del cotransportador.

En 1996 Verlander y colaboradores (40) determinaron el efecto de la ovariectomía y el reemplazo con estrógenos en la localización ultraestructural del CST. Mediante inmunocitoquímica y utilizando anticuerpos policlonales contra el extremo amino del CST, demostraron que éste se expresa en la membrana apical del túbulo distal y en las microproyecciones de ésta. En este sitio, el marcaje fue muy intenso en riñones de ratas control, mientras que en ratas ovariectomizadas la expresión del CST se redujo considerablemente así como en las microproyecciones. Sin embargo si estas ratas eran tratadas con  $17\beta$ -estradiol, el marcaje se restituía a niveles normales. De manera que el género femenino puede estar asociado con una mayor función y expresión del CST.

Con dicho estudio, Verlander et al (40) demostraron que los cambios en los niveles de estrógenos en la rata alteran tanto la complejidad de la membrana apical, así como la densidad del CST en el túbulo distal. Sin embargo, el análisis de distribución y

de cantidad de proteína únicamente se llevó a cabo en ratas hembras, por lo que no podemos saber si este comportamiento del CST, es exclusivo del género femenino o si también se presenta en los machos. Los mecanismos por los cuales la ovariectomía y la administración de  $17\beta$ -estradiol afectan al CST aún no se han determinado. A pesar de que se ha propuesto una acción directa de los estrógenos en las células del túbulo distal, así como en la transcripción del CST, aún no se ha reportado la presencia de receptores estrogénicos en esta región de la nefrona, ni el efecto de éstos en los niveles de expresión del RNAm del CST.

El efecto de la ovariectomía y los estrógenos en el balance de agua y sal en el túbulo distal podrían estar relacionados con las diferencias observadas en los estudios del CST. Clínicamente, esta información puede relacionarse al tratamiento con diuréticos tipo tiazida, particularmente en mujeres post-menopáusicas así como con los factores que contribuyen al balance de fluidos. Así mismo, la reducción en la expresión del CST después de la ovariectomía o la menopausia podría estar regulando en parte, el incremento en la incidencia de osteoporosis en mujeres durante la postmenopausia, así como el mantenimiento de la masa ósea antes de esta etapa.

## **Justificación**

- El balance de fluidos en el organismo y la respuesta al tratamiento con diuréticos tipo tiazida, puede estar relacionado con el efecto del género en el transporte de NaCl en el túbulo distal.
- La regulación del CST en el tejido renal mediado por estrógenos y su interacción con otras proteínas, podrían ser parte del mecanismo por el cual se presenta un efecto protector contra el daño renal, en las mujeres premenopáusicas.
- El estudio detallado de la interacción de los genes en el riñón, así como el efecto del género y las hormonas sexuales en su expresión y actividad, permitirá aproximarnos al entendimiento de la fisiología renal del humano.



## **Hipótesis**

Si la expresión del CST en el tejido renal de ratas hembra y macho está influenciada por el género, entonces la gonadectomía producirá un efecto sobre su función, a través de la regulación del RNAm y/o de los niveles de expresión de la proteína.

### **Objetivo General**

- Conocer el efecto del género y la gonadectomía en la función y expresión del cotransportador de  $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$  sensible a tiazidas en el riñón de rata.

### **Objetivos Particulares**

- Analizar la respuesta a la administración del diurético BFTZ en ratas hembra y macho.
- Estudiar el efecto de la gonadectomía en la respuesta a la BFTZ.
- Determinar y comparar el nivel de expresión del CST en ratas macho y hembra
- Determinar si la gonadectomía afecta el nivel de expresión del gen del CST.

## Metodología

### Modelo experimental

Se estudiaron ratas de la cepa Wistar, especie *Ratus norvegicus* del sexo masculino y femenino, de 250 a 300 g de peso, divididas en cuatro grupos de 10 ratas cada uno. Los grupos fueron los siguientes:

- 1) Machos control
- 2) Hembras control
- 3) Machos gonadectomizados
- 4) Hembras gonadectomizadas

Las ratas nacieron y se mantuvieron en todo momento en el bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, expuestas a períodos de luz/oscuridad de 12:12 horas, en condiciones constantes de temperatura y humedad relativa de 18°-19°C y 65%, respectivamente. Todas las ratas tuvieron libre acceso a agua y comida estándar para rata.

Con el fin de analizar la función del CST en la excreción urinaria de agua y electrolitos en ambos géneros, se analizó la respuesta a la administración aguda del diurético tipo tiazida bendroflumetiazida (BFTZ), el cual específicamente inhibe la actividad del CST.

Un día antes de la administración del diurético, las ratas permanecieron en jaulas metabólicas para recolectar la orina de 24 horas, a partir de la cual se midió el volumen urinario y la excreción urinaria de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Ca}^{2+}$ . Al término de este tiempo, los animales fueron inyectados con una dosis de 1 mg/kg de BFTZ por vía

intraperitoneal. La BFTZ fue diluida en dimetilsulfóxido (DMSO) al 20%. Durante las siguientes dos horas, se recolectó la orina nuevamente, a partir de la cual se determinó también, el volumen urinario y la excreción urinaria de electrolitos. La dosis y tiempo de respuesta máxima empleadas en los experimentos, se determinaron a partir de estudios previos de nuestro laboratorio llevados a cabo con ratas macho y BFTZ.

Dos o tres días después de la primera inyección de BFTZ, se llevó a cabo la gonadectomía (Gx) de los grupos 3 y 4. En el caso de las hembras, la cirugía se realizó por medio de ovariectomía bilateral y en el caso de los machos por orquidectomía total, previa anestesia con pentobarbital administrado intraperitonealmente (30 mg/kg). Después de la cirugía, se dejaron transcurrir tres semanas para que los niveles de las hormonas sexuales de las ratas gonadectomizadas se encontraran en un nivel por debajo de los de su grupo control. Una vez transcurrido este tiempo, los 4 grupos experimentales fueron expuestos de nuevo a la administración aguda de BFTZ con el fin de determinar las diferencias en la respuesta al diurético entre hembras y machos antes y después de la Gx.

Las ratas se sacrificaron al día siguiente de la segunda administración de BFTZ,. Un día antes, se pesaron y se colocaron en cajas metabólicas sin alimento para llevar a cabo una recolección de orina de 24 h. Se midió el volumen de orina y a partir de ésta, se determinaron los niveles de creatinina. Las ratas se anestesiaron en cámara de éter y se tomaron muestras de sangre mediante punción de la vena cava para determinar los niveles séricos de estradiol y testosterona. Posteriormente, ambos riñones fueron extraídos y se separaron en corteza y médula. Ambas regiones del riñón, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

Ya que en el presente estudio se analizó la función del CST en la excreción urinaria de agua y electrolitos en ambos géneros, fue necesario determinar si la respuesta a la BFTZ en las ratas hembra, no variaba entre los diferentes días del ciclo estral. Para poder determinarlo, se llevó a cabo un estudio piloto, en el cual analizamos el efecto del estado hormonal sobre la respuesta a la administración de la BFTZ. Para realizarlo, se emplearon dos grupos de 10 ratas cada uno. Un grupo fue estudiado en estro, el día del ciclo con menor nivel de estradiol circulante, y el otro grupo fue estudiado en proestro, el día del ciclo con mayor producción de estradiol. El día del ciclo fue determinado por medio de frotis vaginal. Con este fin se tomó una muestra de lavado vaginal mediante una pipeta con solución salina el cual es sujeto a análisis citológico en un microscopio óptico.

De acuerdo a Hafez (77) las diferencias en el tamaño, forma y cantidad de células son indicativas del día del ciclo estral. Como puede observarse en la figura 5, no se encontraron diferencias significativas en la respuesta de las ratas en fase de estro comparadas con las ratas en proestro, ni antes ni después del

tratamiento con BFTZ. Lo anterior indica que la magnitud de la respuesta al diurético no es influenciada por cambios cíclicos de las hormonas sexuales ováricas. Con base en este antecedente, en el presente estudio las ratas hembra no fueron cicladas.

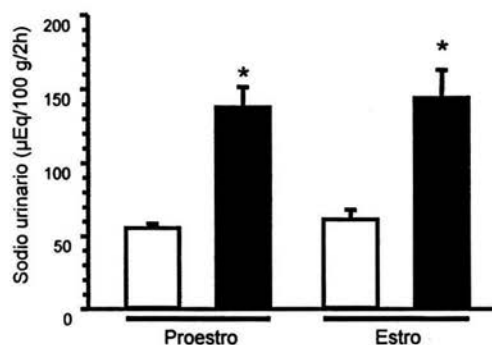


Figura 5. Efecto de la BFTZ sobre la excreción urinaria de  $\text{Na}^+$ . La concentración de  $\text{Na}^+$  en la orina se analizó antes  $\square$  y después  $\blacksquare$  de la administración de BFTZ en ratas hembras en proestro y estro. \* $p < 0.01$  vs. los valores antes de la BFTZ.

Con el fin de comprobar si las diferencias encontradas en las ratas hembra y macho después de la administración de BFTZ son específicas para este tipo de diurético y no el reflejo de algún factor involucrado con su llegada y función en el túbulo distal se analizó también la respuesta a los diuréticos furosemida y amilorida en ratas hembra y macho. Ambos diuréticos se administraron por inyección intraperitoneal en una dosis única de 5 mg/kg y 1 mg/kg, respectivamente. La furosemida inhibe la reabsorción apical de sodio en el asa ascendente de Henle, mientras que la amilorida lo lleva a cabo en el túbulo colector. De esta manera se analizó la reabsorción de sodio en la porción anterior y posterior al TD. El volumen urinario y la excreción urinaria de los principales electrolitos renales se cuantificaron 2 h antes y 2 h después de la administración del diurético, de la misma forma que se llevó a cabo con la BFTZ.

### Determinaciones bioquímicas

#### *Electrolitos*

El  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  urinarios se determinaron mediante el potencial de ión selectivo en un analizador de electrolitos NOVA 4 y el  $\text{Ca}^{2+}$  urinario mediante espectrometría de absorción atómica. Los electrolitos fueron determinados tanto en la orina de 24 horas como en la de dos horas después de la administración de BFTZ.

#### *Creatinina*

La creatinina se determinó tanto en suero como en orina mediante la técnica de reacción de punto final con ácido pícrico e hidróxido de sodio en un analizador de creatinina II de Beckman. Los resultados obtenidos fueron utilizados para calcular la depuración de creatinina según la fórmula  $U \cdot V/P$  en donde U es la concentración

urinaria, V el volumen urinario y P la concentración plasmática. La depuración de creatinina constituye un índice confiable de la filtración glomerular y se midió con el objetivo de analizar que la función renal en todas las ratas estudiadas fuera normal.

### *Hormonas sexuales*

Los niveles de las hormonas sexuales en los grupos de estudio, se evaluaron por medio del radio-inmunoensayo ( $^{125}\text{I}$ ) en fase sólida Coat-a-Count, diseñado para la determinación de testosterona y estradiol en muestras de suero heparinizado, sin necesidad de extracción. El procedimiento se basa en la utilización de tubos de polipropileno recubiertos con anticuerpos específicos para las hormonas antes mencionadas. La testosterona y el estradiol marcados con ( $^{125}\text{I}$ ) compiten con los de las muestras durante un tiempo determinado por los sitios de unión en los anticuerpos. A continuación el tubo se decanta para separar las hormonas sexuales unidas de las libres y se cuenta en un contador gama. La cantidad de cuentas está inversamente relacionada con la cantidad de hormona presente en la muestra. La cantidad presente en la muestra se determina a partir de una curva de calibración.

### Extracción de RNA total a partir de corteza y médula Renal

Con el fin de analizar y cuantificar la expresión del CST en los cuatro grupos experimentales al nivel molecular se extrajo el RNA total a partir de la médula y la corteza renal mediante la técnica de homogeneización en tiocianato de guanidina y ultracentrifugación en un gradiente de cloruro de cesio (Apéndice 1). Una vez aislado el RNA se determinó su concentración mediante espectrofotometría de luz ultravioleta a 260 nm con un espectrofotómetro Beckman DU640. Mientras que su calidad se

corroboró mediante electroforesis en gel de agarosa-formaldehído al 1%, (Apéndice 2), al observar las bandas correspondientes a las subunidades ribosomales 28s y 18s una vez teñido con bromuro de etidio y expuesto a luz ultravioleta.

#### Amplificación a partir de RT-PCR semicuantitativa

Para llevar a cabo las reacciones de RT-PCR, las muestras de RNA se trataron con DNAsa (InvitroGen) (Apéndice 3) para evitar cualquier riesgo de contaminación. Los productos de la reacción se separaron en un gel de agarosa-formaldehído al 1% para detectar su presencia y calidad mediante tinción en bromuro de etidio bajo una lámpara de luz ultravioleta. Su concentración después del tratamiento se determinó mediante espectrofotometría de luz ultravioleta a 260 nm con un espectrofotómetro Beckman DU640.

#### *Transcripción reversa (RT)*

La transcripción reversa se llevó a cabo a partir de 2 µg de RNA total de corteza y/o médula. Antes de comenzar la reacción, el RNA se desnaturalizó a 65°C durante 10 minutos. La RT se realizó a 37°C durante 60 minutos en un volumen total de 20 µl, usando 200 U de transcriptasa reversa (MMLV Invitrogen), 100 pmol de hexámeros, 0.5 mM de cada nucleótido (dNTP) y 1x de amortiguador RT (Apéndice 4). Al término de la reacción las muestras se calentaron a 95°C por 5 minutos para inactivar la enzima y se diluyeron a un volumen final de 40 µl con agua grado biología molecular. Una décima parte de estas muestras se empleó para la amplificación del DNA complementario (DNAc) mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).



### *Ensayos de PCR-semi-cuantitativa*

Como en la mayoría de las reacciones enzimáticas la amplificación de cualquier gen por PCR exhibe dos fases: una fase exponencial, en donde la cantidad del producto se incrementa en forma geométrica con relación al número de ciclos y una fase de meseta en donde la cantidad del producto ya no se incrementa en forma geométrica y la reacción se satura. Entre más baja es la abundancia del RNAm, más grande es la fase exponencial y la fase de meseta se alcanza en un mayor número de ciclos (78).

Debido a lo anterior, para llevar a cabo la semi-cuantificación con PCR se determinaron primero las fases exponenciales y de meseta de la cinética de cada mensaje, con el fin de evitar resultados falsos negativos, ya que si las reacciones se realizan durante la fase de meseta, las diferencias pueden no ser detectadas.

Para realizar la determinación de ambas fases, las reacciones de PCR para cada gen, se llevaron a cabo en un volumen final de 200  $\mu$ l, las cuales se dividieron en 10 reacciones de 20  $\mu$ l en presencia de [ $\alpha^{32}$ P]-dCTP, para analizar la amplificación del producto cada cierto número de ciclos de la reacción. Al finalizar, 10  $\mu$ l de cada reacción se sometieron a electroforesis en geles de acrilamida al 1%. Posteriormente las bandas en el gel, correspondientes a los diferentes ciclos de amplificación llevados a cabo, fueron visualizadas con bromuro de etidio utilizando luz UV. Cada banda se cortó y se diluyó con líquido de centelleo, para determinar la radiactividad incorporada en cada reacción mediante un contador de centelleo  $\beta$ .

La curva de amplificación de cada gen se obtuvo graficando la incorporación de fósforo radiactivo en los productos de PCR en escala logarítmica contra el número de

ciclos correspondiente. De esta manera, se obtiene una gráfica sigmoidea en donde se observa una fase geométrica (fase exponencial) y una fase de saturación (fase de meseta). Con base en estas gráficas, se determinó el número de ciclos al que se sometió cada reacción tanto para la amplificación del CST como para el gen control.

Para la reacción de PCR-semicuantitativa se tomó el 10% de las muestras de RT y se llevó a un volumen final de 20  $\mu$ l con amortiguador PCR 1x, 0.1 mM de cada dNTP, 0.2  $\mu$ Ci de [ $\alpha$ <sup>32</sup>P]-dCTP, 10  $\mu$ M de los iniciadores específicos para cada gen, agua grado BM y 1x de Taq DNA polimerasa (InvitroGen) (Apéndice 4).

A partir del cDNA de corteza de riñón de los cuatro grupos experimentales, se realizó la amplificación en presencia de iniciadores específicos para el CST, así como para el gen de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PD), el cual fue empleado como gen control, debido a que su expresión en el riñón es constitutiva. A partir del cDNA de médula renal, se llevaron a cabo únicamente reacciones como controles negativos, ya que la expresión del CST se limita exclusivamente a la corteza.

Las secuencias, tamaño del producto que amplifican, así como el protocolo empleado para cada par de iniciadores se muestra en la tabla 1.

### Análisis de western blot (WB) del CST

#### *Extracción de proteínas totales*

El efecto del género y la gonadectomía en la expresión de la proteína del CST, se estudió mediante un análisis de WB. Para llevarlo a cabo, se homogeneizaron 0.5 g de la corteza renal de cada grupo experimental en un amortiguador de homogenado, adicionado con un cocktail de inhibidores de proteasas (Roche) (Apéndice 5). El lisado

resultante, se centrifugó a 4,000 rpm durante 10 min. a 4°C, al término de los cuales, se recuperó el sobrenadante y se centrifugó de nuevo a la misma velocidad durante 5 min. Se volvió a coleccionar el sobrenadante y a partir de éste, se determinó la concentración total de proteínas mediante el método de Lowry. Las muestras se guardaron a -80°C hasta su procesamiento. A continuación se separaron 75 µg/µl de cada muestra mediante electroforesis en un gel de acrilamida al 7.5% en condiciones desnaturalizantes, para después ser transferidas por el método semiseco a una membrana de PVDF (Amersham) durante 50 min. a 7 V y temperatura ambiente. La inmunodetección se realizó con el kit Immun-Star™ Chemiluminescent Protein detection Systems de BIO-RAD de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La membrana se bloqueó con un agente bloqueador al 0.4% en solución TBS durante una hora y después se incubó durante toda la noche a 4°C, con el anticuerpo primario anti-CST (proporcionado por el Dr. Mark Knepper, National Heart, Lung and Blood Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) en una dilución 1:1,500 en amortiguador del anticuerpo. Al siguiente día se realizó una serie de lavados de la membrana con solución TTBS (TBS + 0.1% Tween) y se incubó con el anticuerpo secundario Goat anti-Rabbit-AP (Bio-Rad) 1:2,000 en amortiguador del anticuerpo, durante una hora a temperatura ambiente. A continuación la membrana se volvió a lavar con TTBS y por último se le añadió el agente quimioluminiscente Immun-Star Substrate (Bio-Rad) para detectar la proteína de interés, exponiendo la membrana a una placa radiográfica. Las bandas en la placa correspondientes al CST (~150 kD), fueron analizadas densitométricamente con el programa Kodak ID 3.5.

### *Extracción de proteínas de membrana*

Con el fin de analizar la fracción de proteínas presentes en la membrana plasmática de las células de la corteza, se obtuvo un homogenado con el tejido de esta región de los cuatro grupos experimentales (Apéndice 6) y se centrifugó a 5,300 rpm durante 15 min. a 4° C en centrífuga refrigerada (Eppendorff). A continuación se recolectó el sobrenadante y nuevamente se centrifugó a 13,800 rpm durante 30 min. a 4°C. Se volvió a recolectar el sobrenadante y por último se centrifugó a 23,000 rpm en ultracentrífuga (Sorvall). Se desechó el sobrenadante y el botón obtenido, se resuspendió en amortiguador de homogenado ya que es en esta fracción donde se encuentran las proteínas de membrana. La concentración de las proteínas se determinó mediante el método de Lowry y las muestras se guardaron a -20°C hasta su procesamiento. Las proteínas de membrana se separaron mediante electroforesis y se transfirieron a membranas de PVDF para detectar la presencia del CST empleando las mismas condiciones que en el caso de las proteínas totales.

Tanto para las proteínas totales como para las de membrana, se empleó la proteína  $\beta$ -actina como proteína control. Ésta se detectó a partir de las mismas membranas en las que se llevó a cabo la detección del CST, pero con la parte de la membrana correspondiente a su peso molecular (45 kD). Para llevar a cabo este análisis de WB (Apéndice 8), la membrana se incubó durante toda la noche con el anticuerpo primario anti-actina (Santa Cruz Biotechnology) en una dilución 1:2,500 a 4°C. Al día siguiente se incubó con el anticuerpo secundario Donkey anti-goat IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology) 1:1500 en amortiguador del anticuerpo, para llevar a cabo su detección mediante el revelador quimioluminiscente ECL Western blotting

detection system (Amersham) y la auto-radiografía de la membrana. Las bandas en la placa correspondientes a la  $\beta$ -actina fueron analizadas densitométricamente con el programa Kodak ID 3.5.

**Tabla 1.** Protocolos de amplificación para CST y G3PD por RT-PCR semicuantitativa.

<b>Gen</b>	<b>cDNA Corteza renal</b>	<b>cDNA Médula renal</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Tamaño del fragmento</b>
CST	1) 94°C 4 min 2) 94°C 4 min 3) 57°C 1 min 4) 72°C 1 min 30 seg 5) 20 ciclos 6) 72°C 5 min 7) 4°C $\infty$	1) 94°C 4 min 2) 94°C 4 min 3) 57°C 1 min 4) 72°C 1 min 30 seg 5) 20 ciclos 6) 72°C 5 min 7) 4°C $\infty$	5' ACT CGT TCC TCA AGC AGG 3'  3' CCG ACT TGA CCT TGC CAT T 5'	332 pb
G3PD	1) 94°C 4 min 2) 94°C 4 min 3) 56°C 1 min 4) 72°C 1 min 30 seg 5) 17 ciclos 6) 72°C 10 min 7) 4°C $\infty$	1) 94°C 4 min 2) 94°C 4 min 3) 56°C 1 min 4) 72°C 1 min 30 seg 5) 17 ciclos 6) 72°C 10 min 7) 4°C $\infty$	5' GTA GCC ATA TTC ATT GTC ATA 3'  3' AAT GCA TCC TGC ACC ACC AA 5'	515 pb

### Análisis Estadístico

El análisis de la respuesta a la BFTZ se llevó a cabo en la siguiente forma: la excreción urinaria de 24 horas tanto de volumen como de electrolitos antes de la administración de la BFTZ, fue dividida entre 12 con el fin de obtener un valor promedio para un periodo de dos horas. Este valor posteriormente fue comparado con los

obtenidos en la recolección de orina obtenida dos horas después de la administración del diurético.

El análisis de expresión del RNAm del CST y su proteína se llevó a cabo mediante la determinación del cociente entre CST y G3PD y CST y actina, respectivamente.

El nivel de  $p < 0.05$  de dos colas fue tomado como significativo y los resultados se presentan como la media  $\pm$  el error estándar ( $\pm$  SE). La significancia estadística entre machos y hembras para los experimentos iniciales con BFTZ fue determinada mediante una prueba *t* de student no pareada, mientras que las diferencias entre los 4 grupos fueron analizadas con la prueba paramétrica de ANOVA de una sola vía con la corrección de Student-Neumann-Kuels.

## RESULTADOS

### Efecto del género y la gonadectomía en la respuesta a la BFTZ

#### Efecto del género sobre la respuesta al tratamiento con BFTZ

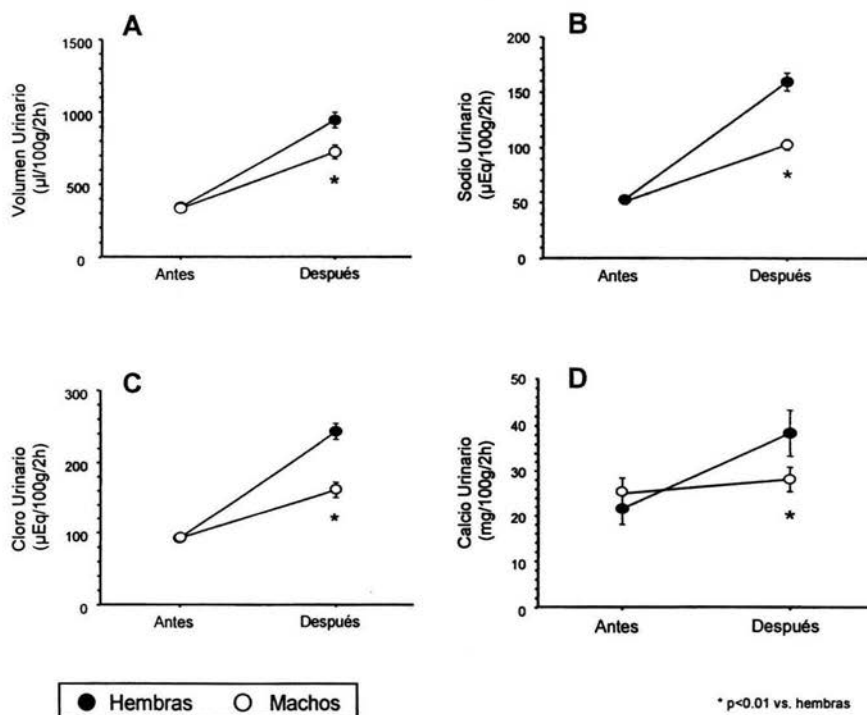
Con el fin de comprobar el efecto del género sobre la actividad del CST, se analizó la respuesta de las ratas hembra y macho a una dosis única del diurético BFTZ, cuantificando el volumen urinario y la excreción urinaria de sodio ( $\text{Na}^+$ ), cloro ( $\text{Cl}^-$ ) y calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). A lo largo del experimento la ingesta de sal fue la misma para todos los grupos (20 g/día de comida standard para rata). Mientras que el peso corporal entre hembras y machos al inicio del estudio fue semejante:  $245 \pm 10.7$  vs.  $265 \pm 8.9$  g,  $p = \text{NS}$ , respectivamente. En la tabla 1 se presentan los valores de los parámetros evaluados, obtenidos antes y después de la administración del diurético en los grupos estudiados. El valor pre-BFTZ se obtuvo dividiendo la excreción urinaria y de electrolitos de 24 h, entre 12, con el fin de obtener los valores promedio de un período de 2 h.

**Tabla 1.** Volumen urinario y excreción urinaria de electrolitos en ratas hembra y macho, 2 h antes y 2 h después de la administración intraperitoneal de BFTZ

	Hembras		Machos	
	Pre-BFTZ	Post-BFTZ (1 mg/kg)	Pre-BFTZ	Post-BFTZ (1 mg/kg)
Volumen ( $\mu\text{l}/100$ g/2h)	$342 \pm 24$	$943 \pm 53^*$	$331 \pm 21$	$723 \pm 48^*$
Sodio ( $\mu\text{Eq}/100$ g/2h)	$50.8 \pm 3.21$	$157 \pm 8.04^*$	$48.9 \pm 2.34$	$100 \pm 4.74^*$
Cloro ( $\mu\text{Eq}/100$ g/2h)	$92.3 \pm 5.77$	$243 \pm 11^*$	$92.2 \pm 5.37$	$160 \pm 10.6^*$
Calcio ( $\mu\text{g}/100$ g/2h)	$21,622 \pm 3572$	$38,235 \pm 4992^*$	$24,987 \pm 3432$	$28,138 \pm 2686^*$
Potasio ( $\mu\text{Eq}/100$ g/2h)	$73.5 \pm 5.12$	$128 \pm 6.55^*$	$95 \pm 8.03$	$96 \pm 6.44$

\*  $p < 0.05$  vs el valor de pre- BFTZ

La figura 5 muestra las gráficas obtenidas a partir de los datos de la tabla 1. Se presentan los valores basales del volumen urinario (5A) y de la excreción urinaria de los electrolitos  $\text{Na}^+$  (5B),  $\text{Cl}^-$  (5C) y  $\text{Ca}^{2+}$  (5D), obtenidos antes y después de la administración del diurético. Como puede observarse, el efecto de la administración de BFTZ, produjo un aumento sobre el volumen urinario y sobre la excreción de los electrolitos tanto en hembras como en machos. Sin embargo, a pesar de que los valores al inicio del estudio fueron similares en ambos géneros, la magnitud de la respuesta al tratamiento con BFTZ fue mayor en las hembras.



**Figura 5.** Efecto de la BFTZ en el volumen urinario (A) y la excreción urinaria de  $\text{Na}^+$  (B),  $\text{Cl}^-$  (C) y  $\text{Ca}^{2+}$  (D). Se presentan los valores antes y 2 h después de la administración de la tiazida, en ratas hembras (círculos negros) y ratas macho (círculos blancos). \*p < 0.01 vs. ratas hembra



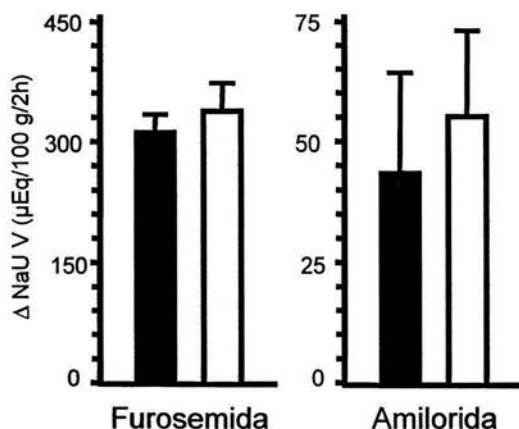
En la figura 5A se presenta el volumen urinario en  $\mu\text{l}/100\text{ g}/2\text{h}$ , donde puede observarse que en ambos grupos se presentó un efecto diurético significativo después de la BFTZ. Sin embargo, a pesar de que el volumen urinario fue similar al inicio, la diuresis fue mayor en las hembras que en los machos. En el caso de los electrolitos  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  (5B y C, respectivamente) su excreción urinaria, expresada en  $\mu\text{Eq}/100\text{ g}/2\text{h}$ , antes y después del diurético tuvo un comportamiento similar. Tanto en hembras como en machos, los valores iniciales de excreción fueron similares y el aumento en la excreción de ambos iones después del tratamiento fue significativo. Sin embargo, al comparar los valores finales de respuesta a la BFTZ, se observa que estos son significativamente mayores en las hembras que en los machos. La figura 5D muestra la excreción urinaria de  $\text{Ca}^{2+}$  en  $\mu\text{g}/100\text{ g}/2\text{h}$ , en donde se puede observar que a pesar de que los valores basales son nuevamente semejantes entre los grupos, únicamente en las hembras el tratamiento con BFTZ, produjo un incremento significativo en la excreción de éste ión.

A partir de nuestros resultados, podemos concluir que la administración del diurético BFTZ produjo un aumento en el volumen urinario y en la eliminación de los iones sodio y cloro en el riñón de ratas hembras y machos control, así como aumentó la excreción urinaria del ión calcio en las hembras. Sin embargo, la magnitud de esta respuesta fue significativamente mayor en las hembras que en los machos. Lo anterior podría sugerir dos cosas: que en el riñón de las ratas hembra la expresión del CST es mayor que en el de los machos ya que si la reabsorción de  $\text{NaCl}$  en el túbulo distal fuera la misma en ambos géneros, los valores de excreción después de la inyección de BFTZ serían similares, y/o que la

llegada del diurético a su sitio de acción en el riñón, es afectada por algún factor en los machos y la respuesta observada, no es específica de la función del CST.

### Respuesta a los diuréticos Furosemida y Amilorida

Como se menciona en el párrafo anterior, existen diferentes factores fisiológicos que pueden modificar tanto la eficiencia de llegada de los diuréticos así como su efecto. Estos factores incluyen la absorción peritoneal, la unión a la albúmina, la tasa de filtración glomerular y la tasa de secreción tubular. Con el fin de comprobar que la mayor magnitud de respuesta observada en las ratas hembras, después del tratamiento con BFTZ es específica para este diurético, se analizó la respuesta en ambos géneros a la administración de dos diuréticos distintos: uno, el diurético de asa furosemida y el otro, el inhibidor de la reabsorción de  $\text{Na}^+$  en el túbulo colector, amilorida. En la figura 6, se muestra el delta en la excreción urinaria de sodio en ratas hembras y machos, después de la inyección de una dosis única de cada diurético.



**Figura 6.** Respuesta a la administración de furosemida y amilorida. Se presenta el delta en la excreción urinaria de  $\text{Na}^+$ , es decir el valor obtenido dos horas después del tratamiento, menos el valor obtenido dos horas antes de la administración de cada diurético, en las ratas hembras (barras negras) y machos (barras blancas) \* $p < 0.01$  vs. ratas hembras. N=6 ratas por barra.

Como puede observarse, la respuesta a estos agentes fue similar tanto en hembras como en machos. De manera que el incremento en la respuesta a la BFTZ en las hembras, es único y específico para este tipo de diurético y por lo tanto, un reflejo de la actividad del CST en el túbulo renal.

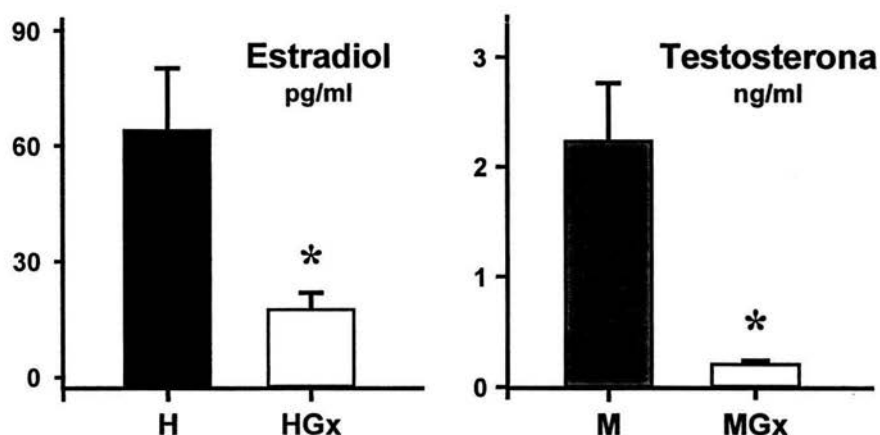
#### Efecto de la gonadectomía sobre la respuesta renal a la BFTZ

Ya que los resultados anteriores sugieren que efectivamente existe un efecto del género en la respuesta renal al tratamiento con BFTZ, decidimos analizar si este efecto es debido a la presencia de gónadas, es decir, si existe un efecto directo de éstas, sobre la expresión y/o actividad del CST. Para llevar a cabo lo anterior, se realizó la gonadectomía de un grupo de ratas hembras y un grupo de ratas machos, en los cuales se evaluó nuevamente la respuesta a la administración de BFTZ. Como grupos controles se emplearon ratas hembra y macho sin gonadectomía y de la misma edad.

#### *Hormonas sexuales*

La figura 7 nos muestra los niveles de las hormonas sexuales en los cuatro grupos experimentales al término del estudio. Las hormonas se midieron a partir de una muestra de sangre 21 días después de la gonadectomía. Como puede observarse, los niveles séricos de  $17\text{-}\beta$  estradiol en las hembras se redujeron significativamente en las ratas oforectomizadas, cuando se compararon con los de las hembras control. Lo mismo sucedió con los niveles séricos de testosterona, los cuales en las ratas macho orquidectomizadas disminuyeron significativamente al

compararlos con el grupo control. La reducción significativa en los niveles de ambas hormonas sexuales en los grupos experimentales nos demuestra que la gonadectomía, se llevó a cabo correctamente en estas ratas.

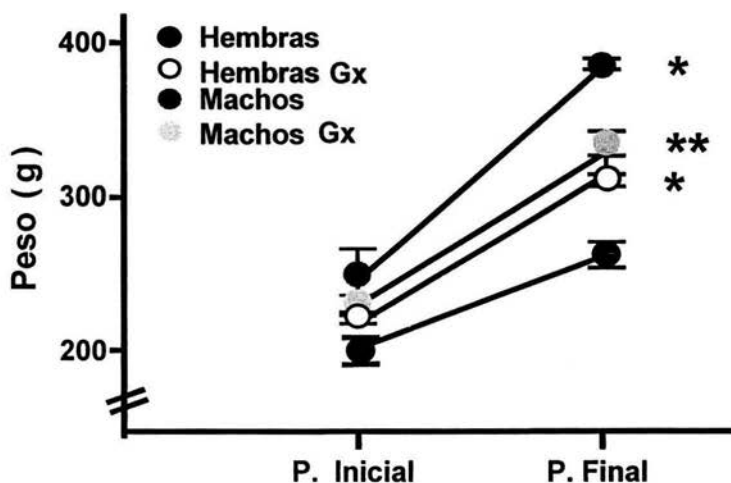


**Figura 7.** Niveles séricos de las hormonas sexuales. La cuantificación se llevó a cabo en ratas hembras control (H), hembras con gonadectomía (HGx), machos control (M) y machos con gonadectomía (MGx), 3 semanas después de la cirugía. \* $p < 0.05$  vs. el grupo control

### *Peso corporal*

La figura 8 muestra la ganancia de peso corporal en gramos de los cuatro grupos experimentales registrada al inicio y al término del estudio. Los pesos corporales de ambos grupos de hembras se mantuvieron siempre por debajo de los de los machos. Sin embargo, los 4 grupos mostraron ganancia de peso a lo largo del estudio. El grupo de hembras con gonadectomía, adquirió mayor peso que su grupo control. Siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Por el

contrario, en las ratas macho la ganancia de peso corporal fue significativamente menor para aquellos con orquidectomía que para los del grupo control.

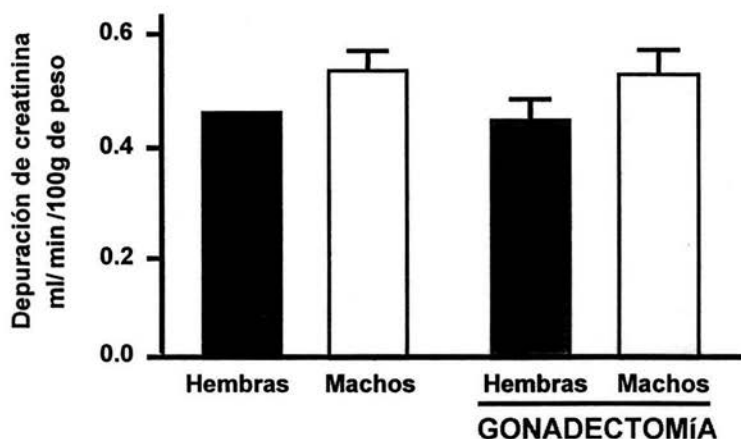


**Figura 8.** Cambio en el peso corporal. Diferencias de peso observadas a lo largo del estudio en los cuatro grupos experimentales. (Gx) gonadectomía. \* $p < 0.05$  vs. Hembras \*\*  $p < 0.05$  vs. Machos

#### *Depuración de creatinina*

A continuación se presenta el análisis de depuración de creatinina en las ratas hembra y macho con y sin gonadectomía, corregida por el peso corporal. La concentración de este producto de degradación en suero y en orina se midió con el fin de evaluar la función renal en las ratas y analizar el efecto de la gonadectomía sobre ésta. Como puede observarse en la figura 9 no se encontraron diferencias significativas entre los géneros, ni entre los grupos con y sin gonadectomía. Debido a que observamos diferencias significativas en el peso

de los animales, la depuración de creatinina fue corregida por el peso corporal. Por lo tanto los valores de este parámetro se presentan en ml/min/100 g de peso. Los resultados anteriores demuestran que la deficiencia de hormonas sexuales no modificó la función renal en los grupos experimentales. Por lo tanto, las diferencias observadas en la respuesta a la BFTZ, tampoco son debidas a una deficiencia en la función renal.



**Figura 9.** Depuración de creatinina. Los niveles de creatinina se determinaron a partir del suero sanguíneo, sin encontrar diferencias significativas en los grupos con y sin gonadectomía, ni entre éstos.

Una vez que comprobamos que no había producción de hormonas sexuales en los grupos gonadectomizados y que estos presentaban una función renal normal, se analizó el efecto del diurético BFTZ en el volumen de excreción urinaria y en la excreción de los principales electrolitos renales. En la tabla 2, se presentan los valores calculados a partir de una muestra de orina de cada grupo de ratas,

recolectada antes y 2 h después de la administración intraperitoneal de 1 mg/kg de BFTZ.

**Tabla 2.** Volumen de excreción urinaria y de electrolitos en ratas hembra y macho con y sin gonadectomía, antes y después del tratamiento con BFTZ.

	Hembras Ctrl		Hembras Gx	
	Pre-BFTZ	Post-BFTZ	Pre-BFTZ	Post-BFTZ
<b>Volumen (<math>\mu\text{l}/100\text{ g}/2\text{h}</math>)</b>	340 $\pm$ 191	888 $\pm$ 330	344 $\pm$ 153	579 $\pm$ 257*
<b>Sodio (<math>\mu\text{Eq}/100\text{ g}/2\text{h}</math>)</b>	37 $\pm$ 11.6	138 $\pm$ 33.8	41 $\pm$ 6.6	94 $\pm$ 33.1*
<b>Cloro (<math>\mu\text{Eq}/100\text{ g}/2\text{h}</math>)</b>	70 $\pm$ 19.4	197 $\pm$ 32.6	78 $\pm$ 16.5	137 $\pm$ 39.3*
<b>Calcio (<math>\mu\text{g}/100\text{ g}/2\text{h}</math>)</b>	28 $\pm$ 20	47 $\pm$ 27.5	12 $\pm$ 5.9	14 $\pm$ 5.4*
<b>Potasio (<math>\mu\text{Eq}/100\text{ g}/2\text{h}</math>)</b>	67 $\pm$ 22	97 $\pm$ 25.7	67 $\pm$ 20	59 $\pm$ 18.9*

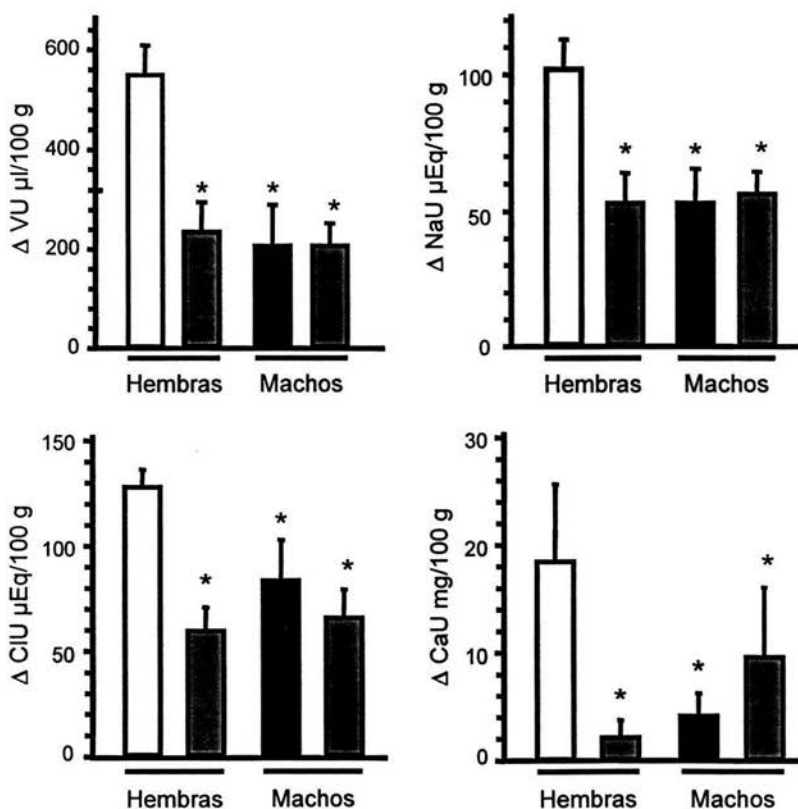
\*  $p < 0.05$  vs el valor de post- BFTZ en hembras ctrl.

	Machos Ctrl		Machos Gx	
	Pre-BFTZ	Post-BFTZ	Pre-BFTZ	Post-BFTZ
<b>Volumen (<math>\mu\text{l}/100\text{g}/2\text{h}</math>)</b>	199 $\pm$ 79.2	405 $\pm$ 286.2	197 $\pm$ 30.0	404 $\pm$ 142.9
<b>Sodio (<math>\mu\text{Eq}/100\text{ g}/2\text{h}</math>)</b>	30 $\pm$ 10.5	83 $\pm$ 39.0	35 $\pm$ 5.2	91 $\pm$ 26.9
<b>Cloro (<math>\mu\text{Eq}/100\text{ g}/2\text{h}</math>)</b>	52 $\pm$ 15.3	136 $\pm$ 61.5	58 $\pm$ 5.5	124 $\pm$ 39.0
<b>Calcio (<math>\mu\text{g}/100\text{ g}/2\text{h}</math>)</b>	7 $\pm$ 2.8	11 $\pm$ 5.1	14 $\pm$ 8.3	23 $\pm$ 23.3
<b>Potasio (<math>\mu\text{Eq}/100\text{ g}/2\text{h}</math>)</b>	51 $\pm$ 18.7	72 $\pm$ 35.0	53 $\pm$ 6.1	63 $\pm$ 23.3

$p = \text{NS}$

A continuación, en la figura 10 se muestran las gráficas obtenidas a partir del delta en la respuesta al diurético, es decir, el valor obtenido después de la inyección de BFTZ, menos el valor basal, en el volumen urinario (9A) y la excreción de los

electrolitos  $\text{Na}^+$  (9B),  $\text{Cl}^-$  (9C) y  $\text{Ca}^{2+}$  (9D). En estas gráficas, se presentan en barras blancas y negras, los grupos de hembras y machos controles, respectivamente y en las barras con rayas los grupos de hembras y machos gonadectomizados.



**Figura 10.** Delta del cambio en el volumen urinario (A) y la excreción de sodio (B), cloro (C) y calcio (D) en ratas hembras (barras blancas) y machos (barras negras) intactas y en ratas gonadectomizadas (barras con rayas) dos horas antes vs. dos horas después de la administración de BFTZ. \* $p < 0.01$  vs. ratas hembras control. N=6 ratas por barra.



De manera general, puede observarse que en esta serie de experimentos, la gonadectomía reduce la respuesta al tratamiento con BFTZ únicamente en las hembras, mientras que en los machos, la ausencia de gónadas no produce ningún efecto significativo en la respuesta al diurético. El delta obtenido en el volumen urinario y la excreción urinaria de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Ca}^{2+}$  en el grupo de las hembras ovariectomizadas fue significativamente menor que el que se obtuvo para las hembras control. Es decir que la ausencia de gónadas en las hembras disminuyó significativamente la magnitud de respuesta a la BFTZ. Por el contrario, los deltas observados para estos parámetros en los grupos de machos control y orquidectomizados, fueron similares. Es decir que la ausencia de gónadas en los machos, no produce ningún efecto en la respuesta a la BFTZ. Es interesante notar, que los deltas de respuesta en las hembras gonadectomizadas, alcanzan valores similares a los que se observan en los machos control y gonadectomizados. Los resultados anteriores indican que el efecto de la BFTZ en la diuresis y en el aumento de la excreción urinaria de los electrolitos en la rata, está directamente relacionado con el género, lo cual sugiere que la expresión y/o actividad del CST podría estar regulada por las hormonas sexuales femeninas.

### **PCR Semicuantitativa**

#### Determinación de la fase exponencial

Con el fin de analizar la expresión génica del CST en los 4 grupos de ratas, se llevó a cabo un análisis de PCR semicuantitativa a partir del DNAc de la corteza renal de cada rata. Para poder llevar a cabo esta técnica, es necesario determinar

la fase exponencial de la reacción de cada gen que se busca amplificar (78). La fase exponencial para los iniciadores del CST y el G3PD se determinó como se describió en la metodología. En la figura 11 se muestran las cinéticas de amplificación de cada gen en la corteza renal de rata, en las que se graficó en escala logarítmica las cuentas por minuto de la incorporación de fósforo radiactivo en los productos de PCR obtenidos a partir del gel, contra el número de ciclos de cada reacción. En el inserto de las gráficas, se observa una foto del gel con las bandas correspondientes a los ciclos de amplificación de cada cinética. Como se puede observar cada gráfica presenta una fase exponencial y una fase de saturación. Con base en estas cinéticas, el número de ciclos determinado para llevar a cabo la amplificación del CST y del G3PD a partir del cDNA de corteza renal fueron 20 y 17, respectivamente.

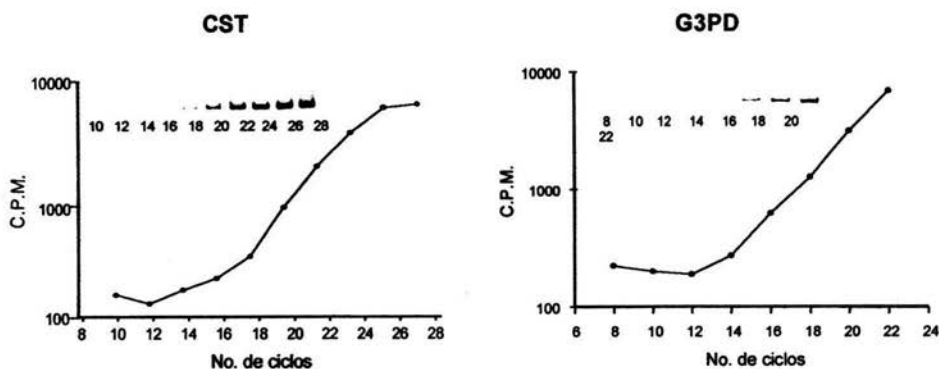
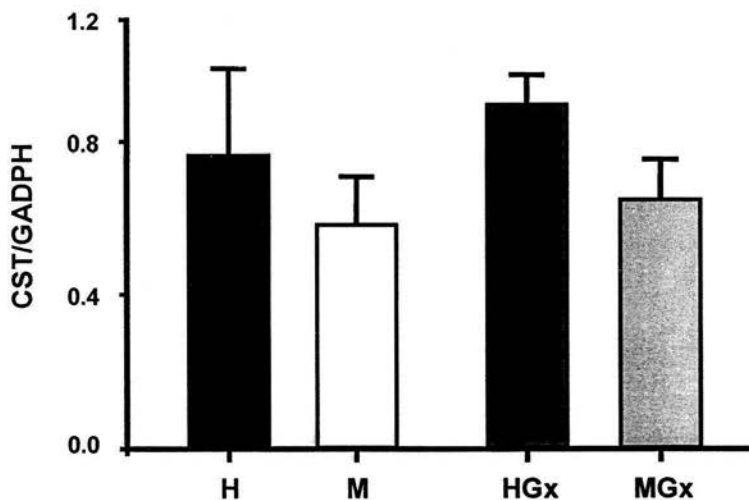


Figura 11. Cinéticas de amplificación en corteza renal. La determinación de la fase exponencial de cada gen se llevo a cabo mediante PCR semicuantitativa con un par de iniciadores específicos.

### Expresión génica del CST

Una vez que se determinó la fase exponencial para ambos mensajes (CST y G3PD), se analizaron los niveles de expresión del RNAm del CST en la corteza renal de los cuatro grupos experimentales mediante RT-PCR semicuantitativa (fig. 12). Los resultados en la gráfica se presentan como el promedio de la expresión del CST entre el promedio de la expresión del gen control (G3PD) y corresponden a los datos obtenidos a partir de las cuentas de la incorporación de [ $\alpha^{32}$ P]-dCTP en la reacción de PCR para cada gen y a partir de muestras individuales de rata por rata.



**Figura 12.** Efecto de la gonadectomía en los niveles de RNAm de CST en el riñón. CST se amplificó mediante PCR semi-cuantitativa a partir de cDNA de corteza renal, de ratas hembras (H) y machos (M) con y sin gonadectomía (HGx y MGx), respectivamente.

Como puede observarse en la figura 12, en la expresión basal del RNAm del transportador de  $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ , no hubo diferencias significativas entre el grupo de las

hembras control cuando se comparan con el de los machos control. Por otra parte, el análisis de la expresión del CST 4 semanas después de la gonadectomía, demuestra que ésta no produce ningún efecto significativo en su expresión en las ratas de ambos géneros. El hecho de no observar diferencias significativas en la expresión entre los grupos control, difiere con lo que se ha reportado en otros estudios (5, 40), en donde la cantidad de CST es mayor en las ratas hembras que en los machos.. Así mismo, el efecto de la gonadectomía sobre la transcripción del CST en el caso de las hembras, difiere con los resultados obtenidos por Chen (5), en los que mediante la unión a metolazona radioactiva, demostró que la afinidad de ésta por el CST disminuía significativamente después de la gonadectomía. Sin embargo, es necesario tomar en cuenta que en los estudios antes mencionados lo que se cuantificó no fue la expresión del RNAm del CST, sino su expresión en la membrana y la unión a  $^3\text{H}$ -metolazona, Debido a lo anterior, el hecho de que la expresión del RNAm del transportador no cambie significativamente entre los grupos estudiados, sugiere que la diferencia en la respuesta a la BFTZ entre los géneros antes y después de la gonadectomía, no se debe a la regulación de la transcripción del gen, sino probablemente a un efecto sobre la traducción de la proteína.

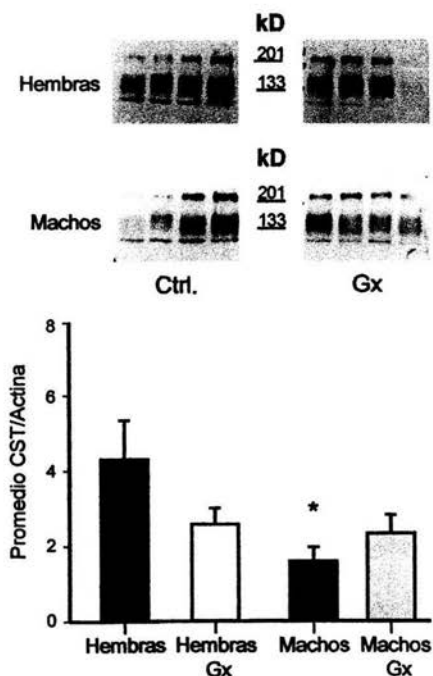
### **Análisis de western blot**

#### **Expresión del CST en proteínas totales de Riñón**

La figura 13 muestra el análisis de western blot que se llevó a cabo con muestras de un homogenado de proteínas totales de riñón, en donde se compara el nivel de

expresión del CST en los cuatro grupos experimentales. En la parte superior de la figura, la banda que corresponde al CST se localiza aproximadamente en un tamaño de 125 k Da y corresponde a la forma glicosilada y activa de la proteína. Mientras que la que se encuentra por debajo de ésta, representa su forma no glicosilada. Para llevar a cabo la cuantificación de la abundancia del CST, la banda que se tomo en cuenta fue la de 125k Da. El valor densitométrico de esta banda, fue corregido por el obtenido para la proteína  $\beta$ -actina a partir de la misma muestra. En la parte inferior de la figura 13 se presenta la gráfica del análisis densitométrico del western blot, en donde puede observarse que la expresión del CST en las proteínas totales del riñón de rata es significativamente mayor en las hembras control que en los machos control. Por otra parte a pesar de que en los grupos con gonadectomía la diferencia de expresión entre géneros se mantuvo, la abundancia de la proteína no se vio modificada en ausencia de gónadas y de hormonas sexuales cuando se comparan con el grupo control de su

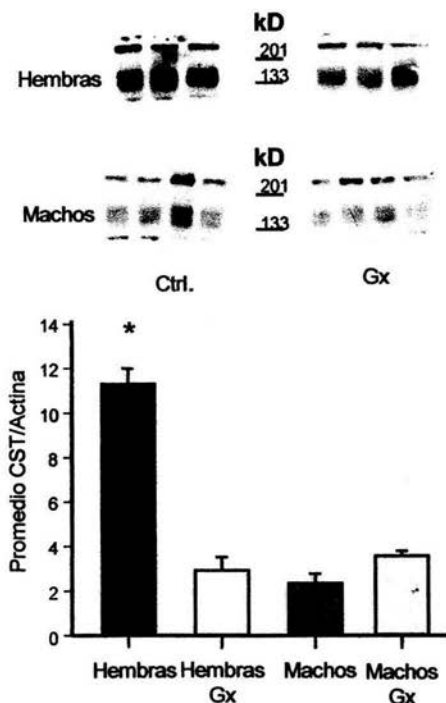
**Figura 13.** Efecto del género y la gonadectomía en la expresión del CST en el riñón de rata. El análisis de western blot se llevo a cabo a partir de un homogenado de proteínas totales de riñón de ratas hembras y machos con y sin gonadectomía (Gx). Cada carril se cargó con 75  $\mu$ g de proteína de una rata distinta \* $p < 0.05$  vs. hembras



mismo género.

### Expresión del CST en las proteínas de membrana de corteza renal

Con el fin de analizar de forma directa la expresión del CST en nuestros modelos experimentales, se llevó a cabo un análisis de western blot con proteínas de membrana de la corteza renal. En la figura 14 podemos observar el efecto del género en la expresión del CST, en donde nuevamente su abundancia es significativamente mayor en las ratas hembras control que en las ratas macho



control. Esta diferencia la encontramos también en el western blot de las proteínas totales. Por otra parte, como puede observarse tanto en el western blot como en la gráfica del análisis densitométrico, al nivel de las proteínas de membrana si encontramos un efecto de la gonadectomía en la

Figura 14. Expresión del CST en proteínas de membrana de ratas hembra y macho con y sin gonadectomía (Gx). En la parte superior se muestra el análisis de western blot a partir de 75 µg

de proteínas de membrana de corteza renal de diferentes ratas y en la parte inferior el análisis densitométrico de las bandas correspondientes al CST (~125 kD) \*p<0.01 vs. los otros grupos.

expresión del CST en el caso de las ratas hembras, en donde la cantidad de CST en la membrana, se reduce significativamente en ausencia de hormonas sexuales. La abundancia del transportador en el caso de los machos, se mantiene sin cambios significativos en el grupo gonadectomizado. Esta diferencia en la expresión del CST en las proteínas de membrana del riñón de las ratas hembras, nos muestra que efectivamente existe un efecto del género y la gonadectomía en la regulación de la expresión del CST en la membrana apical del túbulo distal. El hecho de que esta diferencia no se observara en el análisis de las proteínas totales de las hembras, nos habla de que probablemente esta regulación se presenta a nivel post-traducciona.

## Discusión

La expresión del CST en el túbulo contorneado distal en el riñón de los mamíferos, es esencial para la reabsorción de una fracción importante de NaCl en esta porción de la nefrona (66). Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que tanto la función como la expresión del CST en el riñón de la rata, están influenciados por el género y la gonadectomía. La respuesta a la administración del diurético BFTZ, que bloquea específicamente al CST, fue significativamente mayor en las hembras que en los machos. El tratamiento con furosemida y amilorida, demostró que esta respuesta es específica del CST y no está relacionada con la llegada de la tiazida a su sitio de acción. Desde que son administrados, estos diuréticos siguen básicamente la misma vía de llegada al riñón: absorción intraperitoneal, unión a la albúmina y transporte del intersticio renal a la luz del túbulo, a través de la secreción del túbulo proximal. Sin embargo, después del tratamiento con furosemida y amilorida, la inhibición del transporte de sodio en el asa de Henle y el túbulo colector, no se vio afectado por el género, como fue el caso para la tiazida. Estos resultados sugirieron que la mayor respuesta a la BFTZ en las ratas hembras, no tenía que ver con la llegada del diurético a su sitio de acción, si no que era el resultado de una mayor expresión y/o actividad del CST. En apoyo a los resultados anteriores, observamos que en las ratas gonadectomizadas, la respuesta al diurético en las hembras, se redujo significativamente alcanzando los niveles de volumen urinario y excreción de electrolitos observados en las ratas macho control. Es decir que la mayor respuesta a la BFTZ observada en las hembras control, desaparece en ausencia de las gónadas. Por otra parte, la orquiectomía en los machos, no produjo cambios aparentes en la



diuresis y excreción de iones producidos por el diurético. Por lo que podemos concluir que la ausencia de gónadas en la rata macho, no afecta la respuesta a la BFTZ y probablemente tampoco la abundancia del CST y/o su actividad.

El hecho de que la magnitud de respuesta a la BFTZ en las ratas gonadectomizadas, se redujera significativamente en nuestro análisis, no estuvo relacionado con la función renal. La depuración de creatinina analizada en los cuatro grupos fue similar (Fig. 9), lo que demuestra que los cambios observados, tanto en los grupos control como en los gonadectomizados, son producto de un efecto en la reabsorción tubular y no en la filtración glomerular. De esta manera, nuestros resultados fisiológicos indican claramente que las hembras responden con más intensidad a las tiazidas y que esta respuesta en la rata, se encuentra regulada por la presencia de los ovarios.

Con el fin de corroborar los resultados fisiológicos con la regulación del CST, evaluamos la expresión del gen al nivel del RNAm y de la proteína. En el análisis del RNAm de la corteza renal de los cuatro grupos experimentales (Fig. 12), no encontramos diferencias significativas en la expresión del CST, entre ninguno de los grupos. Es decir que a pesar de lo observado en la respuesta a la BFTZ, el nivel de expresión del RNAm del CST no es diferente entre ambos sexos, ni tampoco se afecta con la gonadectomía. Lo anterior nos sugiere que la respuesta a la tiazidas en las ratas hembras, no es debida a la regulación de las hormonas sexuales sobre el gen SLC12A3, pero si a un efecto de éstas al nivel postraduccional. La regulación del CST, se ha estudiado extensamente en sistemas de expresión heteróloga, sin embargo, existe relativamente poca información sobre su regulación en el riñón. Entre estos

estudios, se encuentran los de la regulación de su expresión a través de la hormona esteroídea aldosterona (79, 66), en los cuales se observó una sobre expresión del transportador en presencia del mineralocorticoide, efecto que se reprodujo con una dieta baja en sal y la administración de furosemida (70). Sin embargo, el aumento en la abundancia del CST no fue debido a un efecto directo de la aldosterona sobre el RNAm del CST en la corteza renal (80, 81). Estas evidencias sugieren, que al igual que en nuestro modelo, la regulación del CST por la hormona, no esta relacionada con la transcripción del gen. Tomando en cuenta los resultados anteriores, los cambios observados en la expresión de la proteína mediante los análisis de WB, fueron de gran importancia, ya que pudimos comprobar que las hormonas sexuales femeninas afectan la expresión y actividad del CST en la corteza renal, regulando su presencia en la membrana plasmática y no a través de incrementar la transcripción del gen o los niveles totales de la proteína. Cuando analizamos la expresión del CST en las proteínas totales (Fig 13), encontramos una ligera diferencia en la abundancia del transportador entre las hembras y los machos control, sin embargo, esta diferencia no fue significativa. Así mismo, observamos que la gonadectomía no produjo cambios aparentes en la expresión de la proteína. Sin embargo, cuando se analizó únicamente la fracción correspondiente a las proteínas de membrana de la corteza renal (Fig 14), encontramos una clara diferencia en la expresión del CST en las hembras, cuando se comparó con los machos y con las hembras gonadectomizadas. La expresión del CST en las membranas de las hembras control es mayor que en las de los machos control y esta expresión se redujo significativamente en las hembras con gonadectomía, mientras que en los machos orquiectomizados, la expresión no cambió. Estos

resultados, concuerdan con los datos fisiológicos de las figuras 5 y 10 en donde se analizó la respuesta a la administración de la BFTZ. Es decir, que la mayor respuesta al diurético observada en las ratas hembras, corresponde a una mayor expresión del CST en la membrana, mientras que la reducción en la respuesta después de la ovariectomía, esta relacionada con una disminución en la abundancia del cotransportador en la membrana, con niveles de expresión similares a los observados en las ratas macho.

Nuestros resultados tanto fisiológicos como moleculares, son similares a los obtenidos en los estudios de Chen (5) y Verlander (40). En el análisis de Chen sobre el efecto del género en la densidad y la respuesta del CST, se demuestra un dimorfismo sexual en la densidad del transportador cuantificada mediante unión a la (<sup>3</sup>H)metolazona y en la respuesta a la administración de BFTZ. Chen propone que la mayor densidad del transportador en los riñones de las ratas hembras, se refleja funcionalmente en el aumento en la excreción urinaria de Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, y NH<sub>4</sub>, después de la administración de la BFTZ. Así mismo, esta diferencia resulta minimizada después de la gonadectomía. Por otra parte en el estudio de Verlander, se determinó mediante inmunocitoquímica el efecto de la ovariectomía y el reemplazo estrogénico en la localización del CST. Este trabajo demostró que la ausencia de estrógenos disminuye la expresión del CST en la membrana apical del túbulo distal cuando se compara con las ratas control. Mientras que la administración de 17β-estradiol recuperó los niveles de expresión del CST en la membrana apical en ratas ovariectomizadas.

El presente estudio y los antecedentes de los trabajos de Chen y Verlander nos brindan evidencia suficiente para establecer que las diferencias en la respuesta a las

tiazidas entre hembras y machos, son debidas a una regulación post-traducciona del CST, en la cual las hormonas sexuales femeninas afectan la actividad de este cotransportador regulando su presencia en la membrana plasmática. Lo anterior sugiere un mecanismo por el cual, las hormonas sexuales podrían estar regulando el transporte de sodio en el túbulo distal.

Se conoce relativamente poco sobre la regulación del transporte de NaCl en el túbulo distal por las hormonas sexuales esteroideas. Aunque aparentemente los estrógenos ejercen un efecto directo en el CST, la presencia de receptores para estas hormonas en el túbulo distal, no se ha identificado todavía (71). Así mismo, el análisis del promotor del gen que codifica para el CST, reveló la ausencia de elementos reguladores por estrógenos (82, 83), lo cual podría explicar la falta de aumento en la transcripción del RNAm entre hembras y machos. Estas observaciones, nos sugieren que las acciones de los estrógenos en el túbulo distal, podrían estarse llevando a cabo a través de mecanismos no genómicos.

Recientemente, se llevo a cabo la identificación de una familia de receptores de membrana para progesterona (mPR) en diferentes especies de vertebrados, entre ellos, el humano, el ratón y el cerdo (84). Los mPRs se pueden clasificar en tres subtipos:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . Estos transcritos en el humano, se localizan en tejidos específicos que se identifican como blanco de acciones no genómicas de la progesterona en los mamíferos. Su estructura y las evidencias farmacológicas y biológicas, predicen que se trata de receptores acoplados a proteínas G. En particular, la isoforma  $\gamma$  es muy abundante en el riñón (85) y en tejidos regulados por la aldosterona (pulmón, colon y glándula adrenal). Estas observaciones sugieren que la progesterona, podría tener una

serie de efectos no genómicos en el riñón, entre los que se incluirían los relacionados con la regulación por mineralocorticoides, brindando una posible explicación de como los esteroides actúan sobre la superficie celular, causando respuestas intracelulares, no mediadas a través de mecanismos clásicos.

La ausencia de gónadas tanto en la rata hembra como en el macho, depleta los niveles séricos de las hormonas sexuales, tal y como se muestra en la figura 7. Sin embargo, existe producción de éstas en tejidos no reproductivos, como en la corteza suprarrenal. Esta producción es mínima e insignificante, si se compara con la producción de testosterona y estradiol en los testículos y en los ovarios, respectivamente (86). De manera que la respuesta a la BFTZ y la distribución del CST en la membrana, se pueden atribuir parcialmente a la ausencia o presencia de hormonas sexuales. Sin embargo, es necesario tomar en cuenta también, que los niveles de algunos de los esteroides sexuales producidos fuera de las gónadas, se afectan con la gonadectomía. Así mismo, se sabe también que los estrógenos incrementan los niveles circulantes de ciertas hormonas, como la renina (8), la angiotensina II (9, 87), los glucocorticoides (88, 89) y calcitonina (90), las cuales a través de sus receptores en el riñón podrían estar mediando el efecto de los estrógenos sobre el CST.

Los mecanismos por los cuales la ovariectomía y/o las hormonas sexuales, controlan la abundancia del CST aún necesitan determinarse y no se analizaron en este estudio. Será necesario llevar a cabo estudios posteriores con el fin de definir la hormona sexual y/o ovárica responsable de la regulación del CST entre los géneros.

Sin embargo, es evidente que existe una regulación fisiológica muy importante en el túbulo distal, en la cual el CST es blanco de diferentes objetivos.

El hecho de que los estrógenos sobre-regulen la expresión del CST en el túbulo distal, esta probablemente relacionado con la capacidad de reabsorción de NaCl, importante para el control de la presión sanguínea y el volumen del fluido extracelular, así como con los supuestos efectos benéficos de los estrógenos y la terapia de reemplazamiento estrógeno, en la prevención del desarrollo de hipertensión y el retraso en la progresión del daño renal en el género femenino. Así mismo, las ligeras variaciones en el CST y en los mecanismos de regulación que lo controlan, en la respuesta a la terapia con diuréticos, pueden afectar la homeostasis del calcio contribuyendo en diferentes desordenes metabólicos de este ión tales como la nefrolitiasis y la osteoporosis.

En resumen, en el presente estudio demostramos que al nivel fisiológico y molecular, la actividad y expresión del CST, esta regulada por el género. Probablemente este control, se presente al nivel postraducciona l y regulado por hormonas sexuales femeninas.

## **Conclusiones**

- La respuesta al tratamiento con BFTZ fue mayor en las ratas hembras que en los machos.
- La ovariectomía minimizó la diferencia en la respuesta al diurético, mientras que en los machos la gonadectomía no produjo cambios.
- No se encontraron diferencias en los niveles de RNAm del CST entre las ratas hembra y macho con y sin gonadectomía.
- La expresión del CST en la membrana plasmática de las células de la corteza renal, está regulada por el género y la ausencia de gónadas.

### **Perspectivas**

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo, los estudios a realizar posteriormente con el fin de complementar nuestras observaciones, incluyen:

1. Llevar a cabo un modelo de ratas hembras con y sin gonadectomía con reemplazo estrógeno en el grupo gonadectomizado y evaluar la expresión del CST mediante western blot de proteínas de membrana.
2. Tratar de identificar el mecanismo por el cual la expresión del CST se reduce en la membrana celular de las ratas hembras gonadectomizadas. Ya que en este proceso pueden estar involucrados diferentes mecanismos de regulación tales como el transporte intravesicular del CST, será necesario emplear técnicas experimentales diferentes a las utilizadas en el presente estudio para identificarlos.



## Referencias

1. Silbiger, S.R., Neugarten, J. (1995). The impact of gender on the progression of chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* **25**:515-533.
2. Wang, Y.X., Crofton, J. T., Miller, J., Sigman, C. J., Liu, H., Huber, J. M., Brooks, D. P. Share, L. (1996). Sex difference in urinary concentrating ability of rats with water deprivation. *Am J Physiol* **270**:R550-R555.
3. Gardier, R.W., Rohrer, B. (1968). Sex specific diuresis. *Proc Soc Exp Bio. Med* **127**:405-408.
4. Johnson, J. A., Davis, J. O, Hanson, R. C., Stubbs, D. H., Keitzer, W.F. (1977). Acute sodium retaining effects of estrogens in dogs. *Proc Soc Exp Biol Med.* **156**: 241-246.
5. Chen, Z., Vaughn, D. A., & Fanestil, D. D. (1994). Influence of gender on renal thiazide diuretic receptor density and response. *J. Am. Soc. Nephrol.* **5**:1112-1119.
6. Müller, V., Szabó, A., et al. (1998). Sex hormones and gender-related differences: Their influence on chronic renal allograft rejection. *Kidney International* **55**:2011-2020.
7. Sack, M.N., Rader, D.J., Cannon, R.O. (1994) Estrogen and inhibition of oxidation of low-density lipoproteins in postmenopausal women. *Lancet* **343**:269-270.
8. Gordon, M.S., Chin, W.W., Shupnik, M.A. (1992). Regulation of angiotensinogen gene expression by estrogen. *J. Hypertens* **10**:361-366.
9. Miller, J.A., Anacta, L.A., Catran, D.C. (1999). Impact of gender on the renal response to angiotensin II. *Kidney International* **55**:278-285.
10. Ellison D.H., Velasquez, H., Wright, F. S. (1987). Thiazide-sensitive sodium chloride cotransport in early distal tubule *Am J Physiol.* **253**:F546-F554.
11. de Jong, J.C., Willems, P.H., van den Heuvel, L.P., Knoers, N.V., Bindels, R.J. (2003). Functional Expression of the Human Thiazide-Sensitive NaCl Cotransporter in Madin-Darby Canine Kidney Cells. *J Am Soc Nephrol.* **14**:2428-2435.
12. Mount, D.B.; Hoover, R.S.; Hebert, S.C. (1997) The molecular physiology of electroneutral cation-chloride cotransport. *J. Membr. Biol.* **158**:177-186.
13. Delpire, E., Mount, D.B. (2002). Human and murine phenotypes associated with defects in cation-chloride cotransport. *Annu Rev Physiol* **64**:803-843.
14. Gamba, G., Saltzberg, S.N., Lombardi, M., Miyanoshita, A., Lytton, J., Hediger, M.A. (1993). Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the thiazide-sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter. *Proc Natl Acad Sci USA.* **90**:2749-2753.
15. Simon, D.B., Karet, F.E., Hamdan, J.M., Di Pietro, A., Sanjad, S.A., Lifton, R.P. (1996). Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nat Genet* **13**:183-188.

16. Gitelman, H.J., Graham, J.B., Welt, L.G. (1966). A new familial disorder characterized by hypokalemia and hypomagnesemia. *Trans Assoc Am Phys*; **79**:221-35.
17. Simon, D.B., Nelson-Williams, C., Bia, M.J., Ellison, D., Karet, F.E., Molina, A.M., Vaara, I., Iwata, F., Cushner, H.M., Koolen, M., Gainza, F.J., Gitelman, H.J., Lifton, R.P. (1996). Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Nat Genet* **12**:24-30.
18. Simon, D.B., Bindra, R.S., Mansfield, T.A., Nelson-Williams, C., Mendonca, E., Stone, R., Schurman, S., Nayir, A., Alpay, H., Bakkaloglu, A., Rodriguez-Soriano, J., Morales, J.M., Sanjad, S.A., Taylor, C.M., Pilz, D., Brem, A., Trachtman, H., Griswold, W., Richard, G.A., John, E., Lifton, R.P. (1997). Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III. *Nat Genet* **17**:171-178.
19. Simon, D.B., R.P., Lifton. (1998). Mutations in Na(K)Cl transporters in Gitelman's and Bartter's syndromes. *Curr. Op. in Cell Bio.* **10**:450-454.
20. Ellison, D.H. (2000). Divalent cation transport by the distal nephron: insights from Bartter's and Gitelman's syndromes. *Am J Physiol Renal Physiol.* **279**:F616- F625
21. Kunchaparty, S., Palcso, M., Berkman, J., Velazquez, H., Desir, G.V., Bernstein, P., Reilly, R.F., Ellison, D.H. (1999). Defective processing and expression of thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter as a cause of Gitelman's syndrome. *Am J Physiol*; **277**(4 Pt 2):F643-F649.
22. Seldin, D., G. Giebisch (Editors). Site and Mechanism of Diuretic Action. In: *Diuretic Agents*. USA: Academic Press, 1997, p.75-111.
23. Monroy, A., Plata, C., Hebert, S.C., Gamba, G., (2000). Characterization of the thiazide-sensitive Na(+)-Cl(-) cotransporter: a new model for ions and diuretics interaction. *Am J Physiol Renal Physiol.* **279**:F161-F169.
24. Vazquez, N., Monroy, A., Dorantes, E., Muñoz-Clares, R.A., Gamba, G. (2002). Functional differences between flounder and rat thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol.* Apr; **282**:F599-607.
25. Renfro, J.L. (1975). Water and ion transport by the urinary bladder of the teleost *Pseudopleuronectes americanus*. *Am.J.Physiol.* **228**:52-61.
26. Renfro, J.L. (1978). Interdependence of active Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> transport by the isolated urinary bladder of the teleost, *pseudopleuronectes americanus*. *J.Exp.Zool.* **199**:383-390.
27. Stokes, J.B., Lee, I., D'Amico, M. (1984) Sodium Chloride absorption by the urinary bladder of the winter flounder. A thiazide-sensitive, electrically neutral transport system. *J Clin invest.* **74**:7-16.
28. Gamba, G., Miyanoshta, A., Lombardi, M., Lytton, J., Lee, W.S., Hediger, M.A., Hebert, S.C. (1994) Molecular cloning, primary structure and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney. *J Biol Chem.* **269**:17713-17722.

29. Campean, V., Kricke, J., Ellison, D., Luft, F.C., Bachmann, S. (2001). Localization of thiazide-sensitive Na(+)-Cl(-) cotransport and associated gene products in mouse DCT. *Am J Physiol Renal Physiol.* **281**:F1028-F1035.
30. Kunau, R.T. Jr., Weller, D.R., Webb, H.L. (1975). Clarification of the site of action of chlorothiazide in the rat nephron. *J.Clin.invest.* **56**:410-407.
31. Velazquez, H., Good, D.W., Wright, F.S. (1984). Mutual dependence of sodium and chloride absorption by renal distal tubule. *Am.J.Physiol.* **247**:F904-F911.
32. Beaumont, K., Vaughn, D.A., Fanestil, D.D. (1988). Thiazide diuretic receptors in rat kidney: Identification with [<sup>3</sup>H]metolazone. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **85**:2311-2314.
33. Beaumont, K., Vaughn, D.A., Healy, D.P. (1989). Thiazide diuretic receptors: Autoradiographic localization in rat kidney with [<sup>3</sup>H]metolazone. *J.Pharmacol.Exp.Therap.* **250**: 414-419.
34. Bachmann, S., Velazquez, H., Obermuller, N., Reilly, R.F., Moser, D., Ellison, D.H. (1995). Expression of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter by rabbit distal convoluted tubule cells *J. Clin. Invest.* **96**:2510-2514
35. Obermuller, N., Bernstein, P., Velazquez, H., Reilly, R., Moser, D., Ellison, D.H., Bachmann, S. 1995. Expression of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter in rat and human kidney. *Am J Physiol.* **269**:F900-F91010.
36. Costanzo, L.S. (1985). Localization of diuretic action in microperfused rat distal tubules: Ca and Na transport. *Am.J.Physiol* **248**:F527-F535.
37. Friedman, P.A., Gesek, F.A. (1993). Mechanism of action of thiazide diuretics on sodium and calcium transport by distal convoluted tubules. In *Diuretics IV: Chemistry, Pharmacology and Clinical Applications*. Puschett J B and Greenberg A, eds. (New York: Elsevier Scientific Publications), pp. 319-327.
38. Feskanich, D., Willett, W.C., Stampfer, M.J., Colditz, G.A. (1997). A prospective study of thiazide use and fractures in women. *Osteoporos Int.* **7**:79-84.
39. Cauley, J.A., Cummings, S.R., Seeley, D.G., Black, D., Browner, W., Kuller, L.H., Nevitt, M.C. (1993). Effect of thiazide diuretic therapy on bone mass, fractures, and falls. *Ann.Intern.Med.* **118**:666-673.
40. Verlander, J.W., Tran, T.M., Zhang, L., Kaplan, M.R., Hebert, S.C. (1998). Estradiol enhances thiazide-sensitive NaCl cotransporter density in the apical plasma membrane of the distal convoluted tubule in ovariectomized rats. *J. Clin. Invest.* **101**:1661-1669.
41. Fanestil, D.D. (1992). Steroid regulation of thiazide-sensitive transport. *Sem.Nephrol.* **12**:18-23.
42. Boron, W.F., Boulpaep, E.L. (2003). Organization of the Urinary System. In: *Medical Physiology*. USA. Elsevier Science. p.737-755.

43. Johannes, L., Kaissling, B. (2003). Sodium and calcium transport pathways along the mammalian distal nephron: from rabbit to human. *Am J Physiol.* **284**:F628-F643.
44. Plotkin, M.D., Kaplan, M.R., Verlander, J.W., Lee, W.S., Brown, D., Poch, E., Gullans, S.R., Hebert, S.C. 1996. Localization of the thiazide sensitive Na-Cl cotransporter, rTSC1, in the rat kidney *Kidney Int.* **50**:174-183.
45. Ross, M.H., Romrell, L.J., Kaye, G.I. (1997) Aparato urinario. En: *Histología. Texto y Atlas Color.* Argentina. Editorial Médica Panamericana, S. A. p.553-596.
46. Gamba, G. (1999) Molecular biology of distal nephron sodium transport mechanisms. *Kidney Int* **56**:1606-1622.
47. Knepper, M.A., Brooks, H.L. (2001). Regulation of the sodium transporters NHE3, NKCC2 and NCC in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **10**:655-659.
48. Reilly, R.F., Ellison, D.H. (2000) Mammalian distal tubule: physiology, pathophysiology, and molecular anatomy. *Physiol Rev.* **80**:277-313.
49. Beaumont, K., Vaughn, D.A., Maciejewski, A.R., Fanestil, D.D. (1989). Reversible downregulation of thiazide diuretic receptors by acute renal ischemia. *Am J Physiol* **256**:F329-F334.
50. Edelstein, C.L., Shi, Y., Berkman, J., Ellison, D.H. (1998). Renal ischemia decreases thiazide-sensitive NaCl cotransporter expression. *J.Am.Soc.Nephrol.* **9**:34A.
51. Wang, Z., Raab, H., Haq, M., Shull, G.E., Soleimani, M. (1998). A possible molecular basis of natriuresis during ischemic-reperfusion injury in the kidney. *J.Am.Soc.Nephrol.* **9**:605-613.
52. Hoover, R.S., Monroy, A., Gamba, G., Hebert, S.C. (1999). Phosphorylation and regulation of the rat thiazide-sensitive sodium chloride cotransporter by protein kinase C (PKC) (Abstract). *J Am Soc Nephrol.* **10**:33A.
53. de Jong, J.C., Willems, P.H., Mooren, F.J., van den Heuvel, L.P., Knoers, N.V., Bindels, R.J. (2003). The structural unit of the thiazide-sensitive NaCl cotransporter is a homodimer. *J Biol Chem.* **278**:24302-24307.
54. Mastroianni, N., De Fusco, M., Zollo, M., Arrigo, G., Zuffardi, O., Bettinelli, A., Ballabio, A., Casari, G. (1996). Molecular cloning, expression pattern, and chromosomal localization of the human Na-Cl thiazide sensitive cotransporter (SLC12A3). *Genomics.* **35**:486-493.
55. Yang, C.L., Angell, J., Mitchell, R., Ellison, D.H. 2003. WNK kinases regulate thiazide-sensitive Na-Cl cotransport. *J. Clin. Invest.* **111**:1039-1045.
56. Wilson, F.H., Disse-Nicodeme, S., Choate, K.A., Ishikawa, K., Nelson-Williams, C., Desitter, I., Gunel, M., Milford, D.V., Lipkin, G.W., Achard, J.M., Feely, M.P., Dussol, B., Berland, Y., Unwin, R.J., Mayan, H., Simon, D.B., Farfel, Z., Jeunemaitre, X., Lifton, R.P. (2003). Molecular pathogenesis of inherited hypertension with hyperkalemia: The Na-Cl

- cotransporter is inhibited by wild-type but not mutant WNK4. *Proc Natl Acad Sci USA*. **100**:680-684.
57. Kaissling, B., Le Hir, M. (1982). Distal tubular segments of the rabbit kidney after adaptation to altered Na- and K-intake. I Structural changes. *Cell Tissue Res*. **224**:469-492.
  58. Scherzer, P., Wald, H., Popovtzer, M.M. (1987). Enhanced glomerular filtration and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase with furosemide administration. *Am.J.Physiol* **252**:F910-F915.
  59. Ellison, D.H., Velazquez, H., Wright, F.S. (1989). Adaptation of the distal convoluted tubule of the rat. Structural and functional effects of dietary salt intake and chronic diuretic infusion. *J.Clin.invest*. **83**:113-126.
  60. Le Hir, M., Kaissling, B., Dubach, U.C. (1982). Distal tubular segments of the rabbit kidney after adaptation to altered Na- and K-intake. II. Changes in Na-K-ATPase activity. *Cell Tissue Res*. **224**: 493-504.
  61. Chen, Z.F., Vaughn, D.A., Beaumont, K., Fanestil, D.D. (1990). Effects of diuretic treatment and of dietary sodium on renal binding of <sup>3</sup>H-metolazone. *J Am Soc Nephrol* **1**:91-98.
  62. Stanton, B.A. Kaissling, B. (1988). Adaptation of distal tubule and collecting duct to increased Na delivery. II Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transport. *Am J Physiol* **255**:F1269-F1275.
  63. Kriz, W., Kaissling, B. Structural organization of the distal nephron. (2000). In: *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*, edited by Seldin DW and Giebisch G. Philadelphia, PA: Lippincot, p. 587-654.
  64. Schultheis, P.J., Lorenz, J.N., Meneton, P., Niema, M.L., Riddle, T.M., Flagella, M., Duffy, J.J., Doetschman, T., Miller, M.L., Shull, G.E. (1998). Phenotype resembling Gitelman's syndrome in mice lacking the apical Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter of the distal convolute tubule. *J Biol Chem* **273**:29150-29155.
  65. Loffing, J., Loffing-Cueni, D., Hegyi, I., Kaplan, M.R., Hebert, S.C., Le Hir, M., Kaissling, B. (1996).Thiazide treatment of rats provokes apoptosis in distal tubule cells. *Kidney Int*. **50**:1180-1190.
  66. Chen, Z., Vaughn, D.A., Blakely, P., Fanestil, D.D. (1994). Adrenocortical steroids increase renal thiazide diuretic receptor density and response. *J Am Soc Nephrol* **5**: 1361-1368.
  67. Velazquez, H., Bartiss, A., Bernstein, P., Ellison, D.H. (1996). Adrenal steroids stimulate thiazide-sensitive NaCl transport by rat renal distal tubules. *Am J Physiol* **270**:F211-F219.
  68. Kim, G.H., Masilamani, S., Turner, R., Mitchell, C., Wade, J.B., Knepper, M.A. (1998). The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter is an aldosterone-induced protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. **95**:14552-14557.

69. Nielsen, S., DiGiovanni, S.R., Christensen, E.I., Knepper, M.A., Harris, H.W. (1993) Cellular and subcellular immunolocalization of vasopressin-regulated water channel in rat kidney. *Proc Natl Acad Sci USA*. **90**:11663–11667.
70. Abdallah, J.G., Schrier, R.W., Edelstein, C., Jennings, S.D., Wyse, B., Ellison, D.H. (2001) Loop diuretic infusion increases thiazide-sensitive Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter abundance: role of aldosterone. *J Am Soc Nephrol*. **12**:1335–1341.
71. Farman, N. (1992). Steroid receptors: distribution along the nephron. *Sem.Nephrol*. 12-17.
72. Morel, F. (1981) Sites of hormone action in the mammalian nephron. *Am J Physiol* **240**:F159–F164.
73. Blakely, P., Vaughn, D.A., Fanestil, D.D. (1997) Amylin, calcitonin gene-related peptide, and adrenomedullin: effects on thiazide receptor and calcium. *Am J Physiol* **272**:F410–F415.
74. Wang, T. Giebisch, G. (1996) Effects of angiotensin II on electrolyte transport in the early and late distal tubule in rat kidney. *Am J Physiol* **271**:F143–F149.
75. Beck, F.X., Ohno, A., Muller, E., Seppi, T., Pfaller, W. (1997) Inhibition of angiotensin-converting enzyme modulates structural and functional adaptation to loop diuretic-induced diuresis. *Kidney Int* **51**:36–43.
76. Ecelbarger, C.A., Kim, G., Wade, J.B., Knepper, M.A. (2001). Regulation of the abundance of renal sodium transporters and channels by vasopressin. *Exp Neurol*. **171**:227-234.
77. Hafez, E.S. (1970) Sexual Cycles. In reproduction and breeding techniques of laboratory animals. Ed. Lea & Febiger.
78. Bobadilla, N.A., Herrera, J.P., Merino, A., Gamba, G. (1997). Semi-quantitative PCR: a tool to study low abundance messages in the kidney. *Arch Med Res* **28**:55-60.
79. Masilamani, S., Kim, G.H., Mitchell, C., Wade, J.B., Knepper, M.A. (1999). Aldosterone-mediated regulation of ENaC  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  subunit proteins in rat kidney. *J Clin Invest* **104**:R19-R23.
80. Moreno, G., Merino, A., Mercado, A., Herrera, J.P., González-Salazar, J., Correa-Rotter, R., Hebert, S.C., Gamba, G. (1998) Electroneutral Na-coupled cotransporter expression in the kidney during variations of NaCl and water metabolism. *Hypertension* **31**:1002-1006.
81. Masilamani, S., Wang, X., Kim, G.H., Brooks, H., Nielsen, J., Nielsen, S., Nakamura, K., Stokes, J.B., Knepper, M.A. (2002). Time course of renal Na-K-ATPase, NHE3, NKCC2, NCC, and ENaC abundance changes with dietary NaCl restriction. *Am J Physiol* **283**:F648-F657.

82. MacKenzie, S., Vaitkevicius, H., Lockette, W. (2001). Sequencing and characterization of the human thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter (SLC12A3) gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun* **282**:991-1000.
83. Taniyama, Y., Sato, K., Sugawara, A., Uruno, A., Ikeda, Y., Kudo, M., Ito, S., Takeuchi, K. (2001). Renal tubule-specific transcription and chromosomal localization of rat thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter gene. *J Biol Chem* **276**:26260-26268.
84. Zhu, Y., Rice, C.D., Pang, Y., Pace, M., Thomas, P. (2003). Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:2231-2236.
85. Zhu, Y., Bond, J., Thomas, P. (2003). Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:2237-2242.
86. Pocock, G., Christopher, D., Richards. (1999) The Hormonal Regulation of the body. In: *Human Physiology. The Basis of Medicine*. Oxford University Press Inc., New York, USA. p.199-232.
87. Gallagher, P.E., Li, P., Lenhart, J.R., Chappell, M.C., Brosnihan, K.B. (1998). Estrogen Regulation of Angiotensin-Converting Enzyme mRNA. *Hypertens.* **33**:323-328.
88. Burgess, L.H., Handa, R.J. (1992). Chronic estrogen-induced alterations in adrenocorticotropin and corticosterone secretion, and glucocorticoid receptor-mediated functions in female rats. *Endocrinology* **131**:1261-1269.
89. Farman, N., Oblin, M.E., Lombes, M., Delahaye, F., Westphal, H.M., Bonvalet, J.P., Gasc, J.M. (1991). Immunolocalization of gluco- and mineralocorticoid receptors in rabbit kidney. *Am J Physiol.* **260**:C226-C233.
90. Blakely, P., Vaughn, D.A., Fanestil, D.D. (1996). Effects of calcium-modulating hormones on thiazide receptor density. *J. Am. Soc. Nephrol.* **7**:1052-1057.
91. Landolt-Marticorena, C., Reithmeier, R.A. (1994). Asparagine-linked oligosaccharides are localized to single extracytosolic segments in multi-span membrane glycoproteins. *Biochem J* **302**:253-260.
92. Nelson, D.L., Cox, M.M (2000). Carbohydrates and Glycobiology in: *Lehinger principles of biochemistry*. Worth Publishers, USA. p.293-320.
93. Hoover, R.S., Poch, E., Monroy, A., Vázquez, N., Nishio, T., Gamba, G., Hebert, S.C. (2003). N-glycosylation at two sites critically alters thiazide binding and activity of the rat thiazide-sensitive Na<sup>+</sup>:Cl<sup>-</sup> cotransporter. *J Am Soc Nephrol* **14**:271-282

## APÉNDICE 1 EXTRACCIÓN DE RNA CON GUANIDINA Y CsCl

### Día 1

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

### Día 2

8. Vaciar el sobrenadante con cuidado y cortar el tubo para obtener el botón.
9. Lavar el botón con 300  $\mu$ l de agua para eliminar basura.
10. Resuspender el precipitado con 600  $\mu$ l de agua (hacerlo con 300  $\mu$ l x 2). Mezclar bien con la pipeta, transferirlo a un tubo eppendorf etiquetado y luego agitar en vortex.
11. Dejar resuspendiendo mínimo 1 hora, agitando en vortex cada 15 min.
12. Tomar 20  $\mu$ l de RNA + 480  $\mu$ l de agua para espectrofotometría.
13. Separar los 600  $\mu$ l en dos tubos de 1.5 ml (300  $\mu$ l por tubo) y precipitarlos con 0.1 volúmenes (30  $\mu$ l) de acetato de sodio a pH 5.2 y con 3 volúmenes (990  $\mu$ l) de etanol al 100%.
14. Guardar a -20°C.

### Día 3

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



## SOLUCIONES PARA EXTRACCIÓN DE RNA

### Isotiocianato de Guanidina (8 ml x muestra)

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

### Cloruro de Cesio (4 ml x muestra)

- 5.7 M CsCl: 3.83 g
- 25.0 mM acetato de sodio: 33.3  $\mu$ l de 3 M acetato de sodio, pH 5.2
- Llevar el volumen a 4 ml. con agua BM
- Esterilizar por filtración

## APÉNDICE 2 GEL DE AGAROSA AL 1% FORMALDEHIDO PARA RNA

### Gel

Por cada 30 ml de gel:

Pesar 0.3 gr de agarosa

Llevar a 30 ml con agua destilada

Mezclar la agarosa con el agua destilada en un matraz, disolver calentándolo en un horno de microondas dos tiempos de 30 seg (agitar entre los tiempos).

Añadir 3 ml de MOPS 10x

Esperar a que la temperatura baje a 50° C, y añadir 1.5 ml de formaldehído

Mezclar muy bien y vaciar en la caja.

Dejarlo polimerizar cuando menos 15 minutos.

### Amortiguador de Carga

Por cada muestra de RNA:

5 µl formamida

1 µl MOPS 10x

2 µl formaldehído

1 µl gel loading (Sigma)

0.16 bromuro de etidio (10 mg/ml)

Mezclar 8.1 µl de amortiguador de carga, con ~2 µg de RNA y si es necesario, completar 10 µl con agua destilada.

Calentar las muestras con el amortiguador a 65°C por 10 minutos.

Cargar las muestras en el gel sumergido en MOPS 1x.

Correr el gel a 70 V durante 1.5 h.

Para desteñir el gel se enjuaga en agua durante 10 minutos.

### MOPS 10x (1 litro)

41.86 g MOPS

6.8 g acetato de sodio

20 ml EDTA 0.5 M

pH 7.0 con NaOH 10 N

Esterilizar por filtración

### APÉNDICE 3 TRATAMIENTO CON DNAsa

- 1.- Calcular a partir de las muestras de RNA tot, lo necesario para tomar 100 µg, ponerlos en un tubo eppendorf y marcarlo.
- 2.- Agregar 0.1 veces el volumen de RNA del amortiguador de DNAsa.
- 3.- Agregar 5 µl de DNAsa (Invitrogen).
- 4.- Incubar la muestra a temperatura ambiente, durante 15 min.
- 5.- Detener la reacción, agregando 0.1 veces el volumen de RNA de EDTA y calentar a 65°C, 10 min.
- 6.- Tomar 2 µl de RNA + 498 µl de agua para espectrofotometría. Correr un gel de agarosa al 1% formaldehído para evaluar la calidad del RNA.

## APÉNDICE 4 ANÁLISIS DE RT-PCR

### Transcripción reversa

- Tomar 2.5 µg/µl de RNAtot y llevarlos a 11 µl con agua grado biología molecular (BM).
- Calentar el RNA +H<sub>2</sub>O (BM) a 65°C por 10 min.

<u>RT Mix (x muestra)</u>	<u>RT +</u>	<u>RT-</u>
Amortiguador RT    4 µl	11 µl RNA	11 µl RNA
ddNTPs*            1 µl	8 µl RT mix	8 µl RT mix
DTT** 0.1 M       2 µl	1 µl transcriptasa	1 µl agua BM
Hexámeros <u>1 µl</u>	reversa	
8 µl	_____	_____
	20 µl de volumen total	
	Incubar 1 h a 37°C	

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

\*\*DTT: ditiotreitól.

Al final de la reacción, se agregan 20 µl de agua BM a cada tubo.

### PCR semi-cuantitativa

<u>PCR Mix</u>	<u>PCR+</u>	<u>PCR-</u>
Agua BM            10.7 µl	14 µl PCR mix	14 µl PCR mix
Amortiguador PCR 2.0 µl	2 µl primers	2 µl primers
MgCl <sub>2</sub> 0.6 µl	4 µl RT+	4 µl RT-
dNTP's             0.3 µl	_____	_____
[a <sup>32</sup> P]-dCTP       0.2 µl		
Taq pol <u>0.2 µl</u>		
14 µl	20 µl vol. final	20 µl vol. final

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

## APÉNDICE 5 ANÁLISIS DE WESTERN BLOT

### 1) Homogenizado del tejido

- Se homogeniza 3 veces, 1 g del tejido con 4 ml del amortiguador de homogenizado con intervalos de 30 seg. entre éstas.

#### Amortiguador de Homogenado

Reactivo	Solución final	Para 500 ml	Para 50 ml
Sacarosa	250 mM	42.3 g	4.23 g
EDTA pH 8	5 mM	250 µl	25 µl
Tris-HCl pH 6.9	1 mM	2.5 ml	250 µl

#### Tris 5.0 mM 50 ml pH 6.9

Tris 6.055 g  
HCl 3.5 ml

- Diluir una pastilla de cocktail de inhibidores de proteasas Complete (Roche). Las tabletas Complete, inhiben una gran variedad de serin, cistein y metaloproteasas así como calpainas (ej. pronasa, termolisina, quimotripsina, tripsina, papaína)

1 tableta en 2 ml de agua destilada y agregar 400 µl por cada ml. de amortiguador.

- El amortiguador se guarda a 4°C.
- El homogenizado se centrifuga a 6,000 rpm durante 4 min a 4°C.
- Se separa el sobrenadante y se conserva ya que esta es la porción que contiene a las proteínas del tejido.

### 2) Determinación de la concentración de proteínas por el método de Lowry.

- Tomar 3 µl del homogenizado y agregarles 42 µl de solución salina.
- Para llevar a cabo la determinación, se emplean los reactivos Bio-Rad. D<sub>c</sub> Protein Assay
- Tomar 10 µl de la muestra o de la solución estándar y agregar 50 µl de la solución A y 400 µl de la solución B.
- También es necesario preparar un blanco, con 10 µl de solución salina y los reactivos A y B.

- Después de agregar los reactivos, esperar 15 a T.A.
- Leer las muestras a 750 nm. Primero se leen los estándares en una curva de calibración y después las muestras problema.
- Las lecturas obtenidas, deben de multiplicarse por el factor de dilución.

### 3) Separación de proteínas en gel de poliacrilamida

- La separación se lleva a cabo en las cajas para electroforesis de BioRad. Al vidrio pequeño se le hace una marca a 5 cm del borde para indicar hasta donde se colocará la mezcla del gel separador.
- Se montan los vidrios y con una pipeta, se agrega el gel de separación hasta la marca de los 5 cm.

<b>Gel de separación al 7.5%</b>		
No. de geles	1	2
Agua destilada	5.05 ml	10.1 ml
Acrilamida/ Bis Acrilamida (29:1)	2.25 ml	4.5 ml
Tris 1.5 M; pH 8.8	2.5 ml	5.0 ml
SDS 10%	100 µl	200 µl
APS 10%	100 µl	200 µl
TEMED	6 µl	12 µl

- En caso de que queden burbujas en la parte superior del gel, agregar lentamente agua con una pizeta. El agua no se mezcla con el gel y elimina las burbujas.
- Esperar mínimo 20 min a que el gel polimerize.
- Eliminar el agua que se agregó, insertando una sanita entre los vidrios.
- Agregar el gel de concentración con una pipeta e insertar el peine.

<b>Gel de concentración</b>		
No. de geles	1	2
Agua destilada	2.8 ml	5.6 ml
Acrilamida/ Bis Acrilamida (29:1)	600 $\mu$ l	1.2 ml
Tris 1.0 M; pH 6.8	500 $\mu$ l	1.0 ml
SDS 10%	40 $\mu$ l	80 $\mu$ l
APS 10%	40 $\mu$ l	80 $\mu$ l
TEMED	6 $\mu$ l	12 $\mu$ l

#### 4) Preparación de la muestra

- Las muestras se preparan de manera que todas tengan el mismo volumen.
- A partir de las lecturas de la concentración de proteínas, se calcula la cantidad de proteína que se va a cargar (de 20 a 200  $\mu$ g) y se lleva a 10  $\mu$ l con solución fisiológica.
- Agregar 10  $\mu$ l de amortiguador de carga a cada muestra.

<b>Amortiguador de Carga 2x</b>		
Volumen (ml)	50	25
SDS 6%	3 g	1.5 g
Glicerol 15%	6 ml	3 ml
Tris 150 mM	0.91 g	0.45 g
Azul de bromofenol 0.3% pH 7.6	0.15	0.075 g
$\beta$ - mercaptoetanol	1 ml	0.5 ml

- Las muestras se calientan 5 min a 94°C y se dejan a 37°C hasta que se carguen en el gel.
- El gel se corre a 50 V, en amortiguador de corrida 1X, hasta que las muestras pasen el gel de concentración y a 100 V en el gel de separación, el tiempo necesario de acuerdo al peso molecular de la proteína problema.

<b>Amortiguador de corrida 5x pH 8.3*</b>	
Volumen	1lt
Tris	15.1 g
Glicina	94 g
SDS 10%	50 ml
Agua destilada	Hasta 1 lt

\*Ajustar el pH a 8.3

### 5) Teñido y desteñido del gel

- Para observar la separación de las proteínas en el gel de poliacrilamida, éste se tiñe en una solución de azul de Coomasie por 30 min.
- Posteriormente el gel se desteñe en la solución de desteñido durante 30 min. recambiando esta solución 2 o tres veces, hasta eliminar el exceso de colorante.
- Los procesos de teñido y desteñido, se realizan en agitación.

<b>Azul de Coomasie</b>	
Volumen	100 ml
Metanol	45 ml
Agua destilada	45 ml
Acido acético	10 ml
Azul de coomasie 0.25%	0.25 g

<b>Solución de Desteñido</b>	
Volumen	1 lt
Metanol	450 ml
Agua destilada	450 ml
Acido acético	100 ml

- Para conservar el gel una vez desteñido, se puede secar: colocarlo sobre papel filtro, tapanlo con kleen pack y calentarlo 30 min con vacío en el speed vac a 70 °C.
- Una vez que se corroboró con el gel, que la cantidad de proteínas es la misma en todas las muestras, se puede proceder a la transferencia de proteínas.



## 6) Transferencia de proteínas

- Hacer el gel de separación de proteínas y correrlo.
- Después de la electroforesis, el gel de concentración se retira y se desecha, mientras que el de separación, sin teñir, se emplea para la transferencia de las proteínas a una membrana de difloruro de polivinilo (PVDF).
- Si se utiliza el "trans-blot" de Bio-Rad para la transferencia, se requiere: 2 papeles filtro gruesos y 1 membrana, cortados de acuerdo al tamaño del gel.
- Colocar el gel y los papeles filtro en amortiguador de transferencia 1x durante 20 min. Por otra parte, mojar la membrana con metanol por 15 seg, enjuagarla con agua destilada 5 min y después ponerla también 20 min. en el amortiguador de transferencia.
- El orden de la transferencia en el "trans-blot" es el siguiente: papel filtro/ membrana / gel / papel filtro. Es importante sacar las burbujas de aire entre cada capa, pasando por encima una pipeta Pasteur o una pipeta de plástico.
- El voltaje utilizado es de 7 V durante 50 min. El tiempo es proporcional al tamaño de la proteína; a mayor peso, mayor tiempo.

<b>Amortiguador de transferencia pH 8.3*</b>	
Volumen	1lt
Tris	5.8 g
Glicina	2.9 g
SDS	0.37 g
Metanol	200 ml
Agua destilada	Hasta 1 lt

\*Ajustar el pH a 8.3

- Una vez transcurrido el tiempo, se saca el gel y se tiñe y destiñe como se describió anteriormente, para verificar que toda las proteínas se hayan transferido. También puede secarse en el speed-vac.

- La membrana se coloca en una sanita hasta que este completamente seca. Si no se va a utilizar inmediatamente, y se guarda a 4°C entre papel filtro o entre el papel de la membrana. Si se va a utilizar inmediatamente, proceder con los siguientes pasos.

## **7) Identificación de la proteína**

### Bloqueado

- Preparar agente bloqueador al 0.4%: pesar 0.2 gr. de "blotting grade blocker" de Bio Rad y añadirlos a 50 ml de TBS
- El agente bloqueador se puede guardar a 4°C.
- Mojar la membrana con metanol por 15 seg hasta que se vea uniforme.
- Lavar con TBS 10 min, con agitación fuerte en un pequeño recipiente de plástico. Tirar el TBS y volver a lavar con las mismas condiciones.
- A continuación, tirar el TBS y agregar el agente bloqueador.
- La membrana se deja bloqueando durante 1 h a temperatura ambiente en un agitador orbital.

### Incubación

- Una vez transcurrido este tiempo, la membrana se transfiere a otro recipiente con el solución TBS-T y se lava por 10 min con agitación fuerte.
- Preparar el amortiguador del anticuerpo: agregar 0.2 gr. de "blotting grade blocker" de Bio Rad en 200 ml de TBS-T
- Preparar la solución del anticuerpo primario: disolver el anticuerpo en cierta concentración en el amortiguador del anticuerpo.
- Dejar incubando la membrana con el anticuerpo primario a 4°C durante toda la noche, con agitación, a una velocidad en que la membrana se bañe continuamente.

### Lavados

- Lavar la membrana con TBS-T de la siguiente forma:
  - I.- 3 lavados de 10 min, c/u con agitación fuerte. Cambiar la solución entre cada lavado.
- Incubar la membrana con el anticuerpo secundario durante 1 h. a temperatura ambiente en agitación orbital. El anticuerpo secundario se disuelve en amortiguador del anticuerpo en una concentración determinada.
  - II.- 4 lavados de 10 min. c/u con agitación muy fuerte. Cambiar la solución entre cada lavado.

<b>TBS 10x pH 7.6*</b>	
Volumen	1 L
Tris base	24.2 g
NaCl	80 g
HCl 1 M	38 ml
Agua destilada	Hasta 1 L

\* Revisar el pH.

<b>TBS-T 1x</b>	
Volumen	1L
TBS 10x	999 ml
Tween 20	1 ml

### Revelado

- Sacar la membrana de la solución y colocarla encima de Kleen-pack o de un vidrio.
- Añadir el agente quimioluminiscente Immun-Star Substrate (Bio-Rad), cubriendo la membrana. Dejarlo actuar por 5 min.
- Secar la membrana con sanitas y revelarla exponiéndola a una placa radiográfica

## APÉNDICE 6 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA

### Preparación de amortiguador de homogenado

EDTA 1 mM  
Hepes 10 mM  
TRIS 10 mM  
Sacarosa 0.25 M

Preparar un stock de EDTA 0.5 M (100 ml)

Pesar 18.61 g de EDTA+ 2 g de NaOH y aforar a 100 ml con agua destilada.

Para preparar el amortiguador de homogenado, tomar 0.5 ml de la solución de EDTA 0.5 M, pesar 0.5958 g de HEPES y 0.3029 de TRIS. Agregar 125ml de agua destilada y ajustar el pH a 7.2 con NaOH 2 N y agregar 21.39 g de sacarosa, agitar y aforar a 250 ml con agua destilada.

Alicuotar en tubos de 50 ml y congelar a -20°C

Para usar el amortiguador por cada 40 ml de este adicionar 1 pastilla de cocktail de inhibidores de proteasas Complete (Roche)

Pesar el tejido que estará previamente congelado y adicionar amortiguador de homogenado (9 ml /gr de tejido)

Homogenizar el tejido y centrifugar a 5,300 rpm en la centrifuga refrigerada eppendorff por 15 minutos, colectar el sobrenadante y centrifugarlo a 13,800rpm durante 30 minutos

Nota es importante guardar cada uno de los botones

El sobrenadante obtenido colectarlo y centrifugarlo a 23,000 rpm durante 45 min. En la ultra centrifuga en los tubos adecuados.

El botón obtenido resuspenderlo en amortiguador de homogenado en una relación 1:3 con el botón. Aquí es donde se encuentran las proteínas de membrana.

Determinar la concentración como se indica en el paso número 2 del apéndice 5 y congelar el resto para su posterior uso.

De aquí en adelante, seguir los pasos del apéndice 5, a partir del paso no. 3

## APÉNDICE 7 WESTERN BLOT PARA $\beta$ ACTINA

Se realiza igual que el apéndice 5, hasta el paso número 6, posteriormente la identificación de la  $\beta$  actina se lleva a cabo de la siguiente manera:

### **Amortiguador de Lavado WB 10X TBS**

Tris Base                    24.2 g  
NaCl                        80.0 g  
HCl 1 M                    38.0 ml ó 12 ml del concentrado

Aforar a 1 L ajustar el pH a 7.6

Para el TBS-t

Agregar 100 ml del 10X más 0.9 ml de tween (Sigma) y aforar a 1 litro con agua destilada.

### **Solución de Bloqueo.**

Pesar 0.2 g de agente bloqueador BIO-RAD en 50 ml de amortiguador de lavado 1X.

### **Solución de Anticuerpos**

Pesar 0.1 g de agente bloqueador BIO-RAD en 50 ml de amortiguador de lavado 1X.

Sumergir la membrana 10" en metanol

Lavar con agua destilada 5 minutos

Sumergir la membrana 10" en metanol

Lavar con agua destilada 5 minutos

Agregar la solución de bloqueo a la membrana y dejar durante 1 hora con agitación fuerte.

Lavar con TBS-t dos veces 1 minuto agitación

Lavar con TBS-t dos veces cada 5 minutos agitación

Incubar anticuerpo primario 1:2,500 a 4°C toda la noche con agitación

Lavar con TBS-t dos veces 1 minuto

Lavar con TBS-t tres veces cada 10 minutos

Incubar anticuerpo secundario 1:5000 1 hora a temperatura ambiente con agitación

Lavar con TBS-t dos veces 1 minuto

Lavar con TBS-t cuatro veces cada 10 minutos

Secar ligeramente y revelar

Preparar 1 ml soln A +25  $\mu$ l soln B del revelador quimioluminiscente ECL Western blotting detection system (Amersham)