



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

IDENTIFICACION INMUNOHISTOQUIMICA DE CANALES
CATIONICOS NO SELECTIVOS (HCNI) EN EL RIÑON
DE LA RATA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

EMILIO ESPINOZA SIMON



MEXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2005

m351971



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente Prof. José Pedraza Chaverri.
Vocal Prof. Oscar Armando Pérez Méndez.
Secretario Prof. Leonila Irma Laura Escobar Pérez.
1er. Suplente Prof. José Ignacio Páramo Ramírez.
2º. Suplente Prof. Miguel Ángel Peña Rico.

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM.

ASESOR:



Dra. Leonila Irma Laura Escobar Pérez.

SUSTENTANTE:



Espinoza Simón Emilio

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo reocpcional.

NOMBRE: Emilio Espinoza Simón

FECHA: 16-12-09

FIRMA: [Signature]

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Laura Escobar Pérez por su asesoría durante la realización de este proyecto.

Al QFB Rolando Carrisoza por su asesoría técnica.

Al jurado por sus correcciones y comentarios.

Este proyecto fue realizado con el financiamiento de los
proyectos

DGAPA IN233802-2
CONACYT 41365

DEDICATORIAS.

A DIOS POR REGALARME ESTA VIDA Y PERMITIRME
CONCRETAR UNO DE MIS SUEÑOS.

A MIS PADRES, POR SU GRAN AMOR, COMPRENSIÓN Y
APOYO, PORQUE USTEDES HAN SIDO EL MEJOR EJEMPLO DE
VIDA QUE HE TENIDO. UDS SON MI MÁXIMA INSPIRACIÓN
Y ESTA TESIS ES TAMBIEN UN LOGRO DE USTEDES.

A MI HERMANA MARY, POR TODOS LO MOMENTOS QUE
HEMOS PASADO JUNTOS, ESPERO QUE ESTA TESIS SEA UN
INCENTIVO PARA QUE SIGAS ADELANTE.

A SJT. GRACIAS POR TU APOYO.

A MARLENE, GRACIAS POR TODO, ERES UNA GRAN AMIGA.

A LA FAMILIA CORLEONE SU APOYO HA SIDO FUNDAMENTAL
PARA MI.

A MIS COMPAÑEROS DEL GRUPO 11 (SADAPI).

A LA UNAM PORQUE SE ES UNIVERSITARIO TODA LA VIDA.

A LA FACULTAD DE QUÍMICA, NUNCA OLVIDARE TODOS LAS
CONOCIMIENTOS QUE ADQUIRI EN SUS AULAS Y AFUERA DE
ELLAS

A MIS PROFESORES, PORQUE TODOS DE ALGUNA MANERA
CONTRIBUYERON A MI FORMACIÓN UNIVERSITARIA.

1. INDICE.

INDICE.....	1
1. RESUMEN.....	2
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1 membrana plasmática.....	3
2.2 transporte de sustancias a través de la membrana.....	4
2.3 canales iónicos.....	6
2.4 canales catiónicos HCN.....	8
2.5 anatomía y fisiología del sistema urinario.....	13
2.6 fisiología del ión sodio.....	23
3. ANTECEDENTES.....	27
4. OBJETIVOS.....	28
5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	29
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
7. CONCLUSIONES.....	46
8. PERSPECTIVAS.....	46
9. REFERENCIAS.....	47
10. APÉNDICE.....	50
10.1 Soluciones y reactivos utilizados.....	53

1. RESUMEN

Los canales iónicos son proteínas transmembranales que forman un poro acuoso a través de la membrana, tienen una amplia distribución en las células eucariontes e intervienen en una gran variedad de procesos. Los canales marcapaso ó canales HCN son canales catiónicos no selectivos, ya que permiten el paso de Na^+ y K^+ . Existen cuatro isoformas de canales HCN; HCN1, HCN2, HCN3 y HCN4, las cuales han sido encontradas en humano, rata, conejo y ratón. Estos canales desempeñan un papel fundamental en el inicio de la actividad rítmica de algunas neuronas, en la generación del latido cardiaco en el corazón y en la actividad de las células bastón en los ojos, sin embargo aun no se reporta su distribución y función en tejidos no excitables, como riñón.

Trabajos anteriores demostraron de manera indirecta la presencia de los canales HCN en el riñón de la rata. En cultivos primarios de túbulo colector de la médula interna del riñón de la rata se registró una corriente entrante "Ivti" que muestra una gran analogía con las corrientes If generadas por los canales HCN.

El objetivo de este trabajo es demostrar la presencia de la familia de canales catiónicos HCN en el riñón de la rata. La hipótesis planteada en este trabajo propone que al menos una isoforma de los canales HCN se encuentra en el riñón de la rata.

La fase experimental realizada en este proyecto para comprobar lo anterior, consistio en ensayos de inmunoperoxidasa indirecta en cortes histológicos de 10 μm de grosor de corteza y medula interna del riñón de ratas sanas.

Los resultados obtenidos mostraron por primera vez la presencia de las cuatro isoformas de la familia de canales HCN, tanto en medula interna como en corteza del riñón de la rata.

2. INTRODUCCIÓN.

2.1 MEMBRANA PLASMÁTICA.

La membrana plasmática es una estructura delgada, flexible y elástica cuyo grosor es de 7.5 a 10 nanómetros. Químicamente, la membrana está compuesta básicamente por lípidos y proteínas. Entre los lípidos que la componen, se encuentran los fosfolípidos y el colesterol, la proporción existente entre ambos determina la fluidez de la membrana. Las proteínas de membrana se clasifican de la manera siguiente: las proteínas integrales que atraviesan la membrana plasmática y las proteínas periféricas que sólo se encuentran en una cara de la membrana, como se muestra en la figura 1. (Guyton y col. 2001).

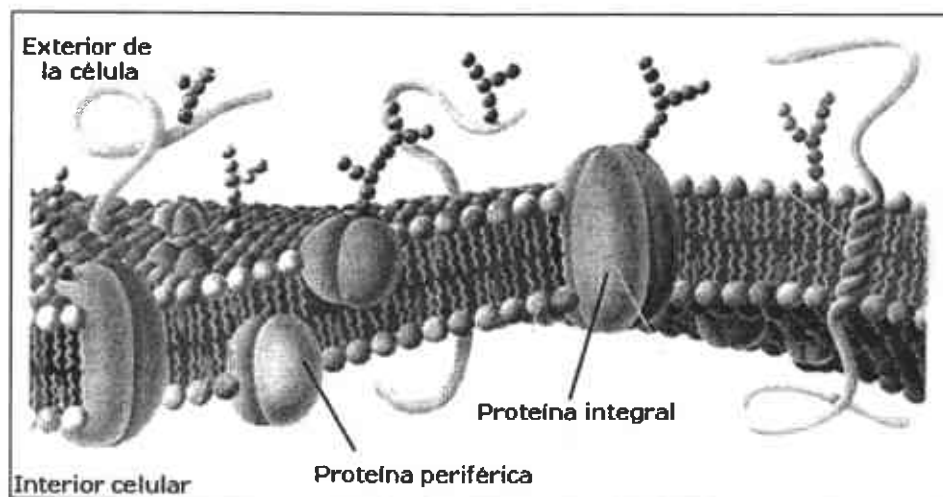


Figura 1. Membrana plasmática

La función principal de la membrana es aislar a la célula del medio circundante, lo que impide la entrada de sustancias indeseables del medio extracelular, además de permitir la entrada selectiva de nutrientes a la misma, mantener la composición iónica del medio, el pH óptimo y la presión osmótica adecuada, así como la salida de sustancias de desecho.

La célula tiene diversas concentraciones iónicas en comparación con el medio extracelular, lo que permite la generación de un gradiente electroquímico, el cual utiliza la célula en el transporte de iones y solutos.

2.2 TRANSPORTE DE SUSTANCIAS A TRAVÉS DE LA MEMBRANA.

Para que la célula tenga un funcionamiento óptimo, debe tener la capacidad de importar las sustancias necesarias. Existen diversas formas de transportar sustancias en la célula en función de las características fisicoquímicas de las mismas, como se ilustra en la figura 2.

Transporte pasivo. Esta consiste en el movimiento de las sustancias a través de la bicapa lipídica a favor de su gradiente de concentración y se clasifica en dos grupos. La difusión simple se caracteriza por el movimiento de las moléculas hidrófobas pequeñas, por ejemplo O_2 , CO_2 y N_2 . La difusión facilitada comprende proteínas transportadoras de dos tipos. Las proteínas de canal que forman un cilindro que atraviesa la membrana, a través del cual pasan los iones. Los transportadores en cambio, transportan pocas moléculas o iones a la vez. Después de que los iones se unen al transportador, este sufre un cambio conformacional de manera que solo los iones unidos al transportador se incorporan al interior de la célula. Entre las sustancias que son transportadas por este medio, podemos mencionar al sodio, potasio, cloruro, ión hidrónico etc.

Transporte activo.

El transporte se caracteriza por llevarse a cabo en contra de su gradiente de concentración y requiere de una fuente de energía electroquímica. En función de la fuente de energía el transporte se clasifica de la manera siguiente:

Transporte activo primario. La energía se obtiene de la hidrólisis del ATP por las ATPasas. Estas enzimas se encargan de mantener la concentración baja de calcio y sodio dentro de la célula animal en relación con el medio externo y mantienen el pH bajo en el interior de los lisosomas. Entre las sustancias transportadas por este medio encontramos al sodio, potasio, calcio y algunos otros iones (Guyton y col. 2001).

Transporte activo secundario. La energía requerida deriva de la diferencia de concentración iónica a ambos lados de la membrana, generada en primer lugar por el transporte activo primario. Como ejemplo podemos mencionar al cotransporte de sodio-glucosa.

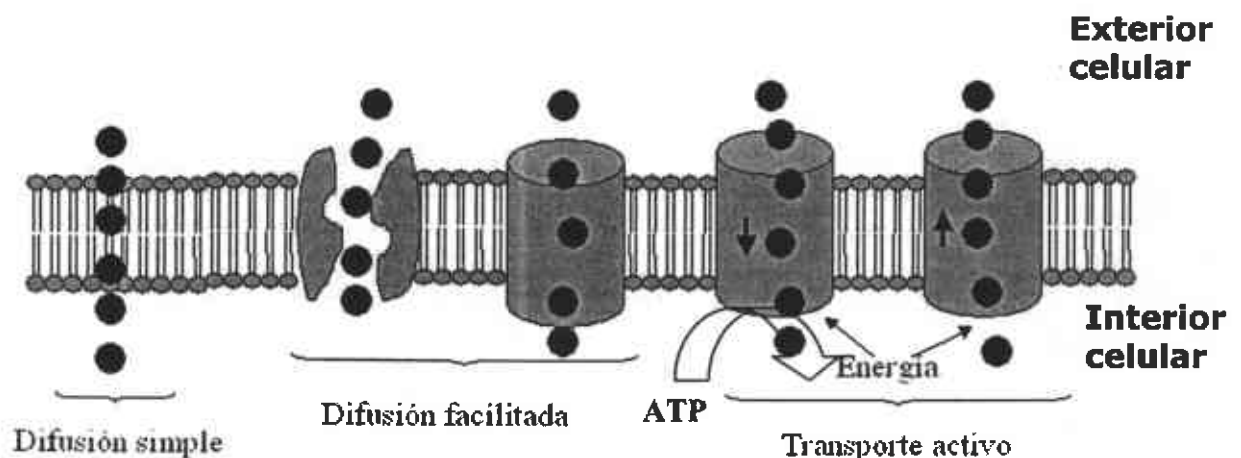


Figura 2. Tipos de transporte

2.3 CANALES IÓNICOS.

Los canales iónicos son proteínas transmembranales que forman un poro acuoso a través de la membrana, a través del cual permiten el paso selectivo de iones específicos cuando se abren. Los canales iónicos tienen una amplia distribución en las células eucariontes e intervienen en una gran variedad de procesos, entre los que podemos mencionar la generación del ritmo cardíaco, la regulación del volumen celular y la transmisión del impulso nervioso.

Los canales iónicos tienen tres características fundamentales:

- a) permiten el flujo elevado de iones (10^6 a 10^8 iones por segundo, en comparación a 10^3 iones por segundo que mueve una ATPasa). El flujo de iones que atraviesa cada canal produce una corriente eléctrica medible y produce cambios en el potencial de membrana.
- b) Los canales iónicos son capaces de discriminar a los iones que pasan a través de ellos, es decir, presentan selectividad iónica
- c) Las proteínas de canal asumen diversos estados conformacionales en respuesta a un estímulo. En general, existe un estado conductor o estado abierto y dos estados no conductores (inactivado y cerrado), en estos estados, la probabilidad de apertura del canal es mínima.

Los canales iónicos se clasifican de diversas formas:

- a) en función de su selectividad iónica

Canales catiónicos	Canales aniónicos
Canales de potasio Canales de sodio Canales de calcio Canales catiónicos no selectivos	Canales de cloro

b) en función de su mecanismo de apertura.

Activados por:

1. Cambios de voltaje (canales dependientes de voltaje Kv)
2. Interacción con un agonista (canales activados por ligando)
3. Mediadores intracelulares (Ca^{2+} , ATP, nucleótidos cíclicos, proteínas G)
4. Acción mecánica, estos canales suelen activarse por aumento o disminución del volumen celular.

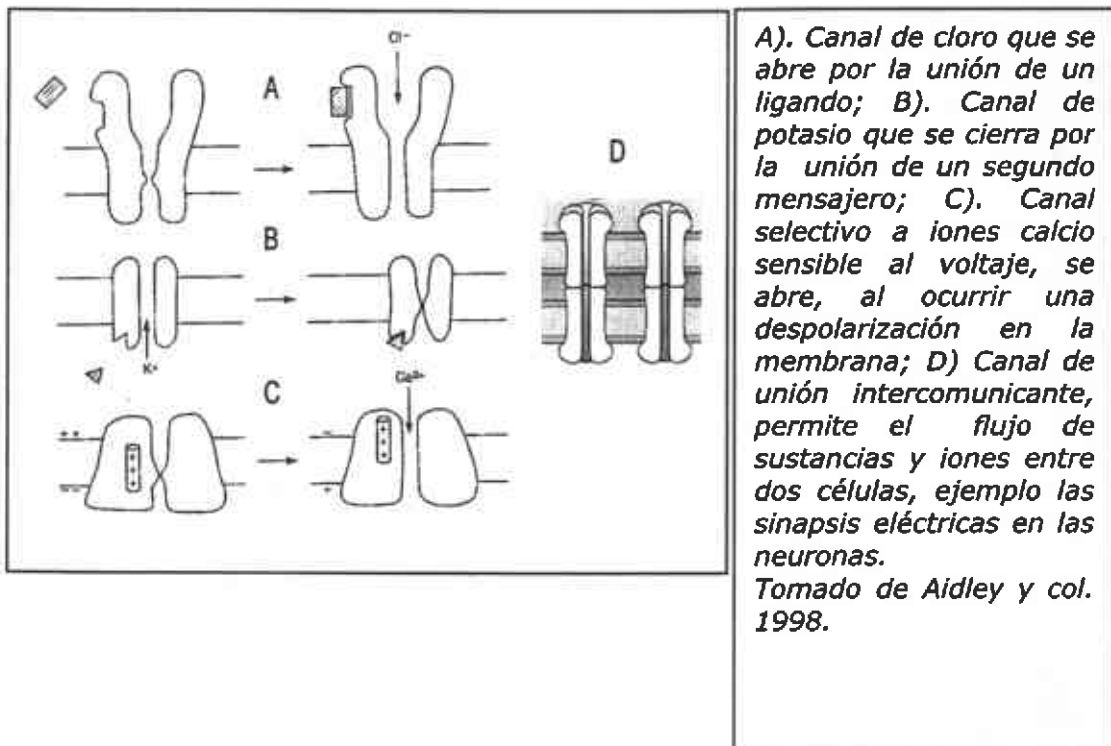


FIGURA 3. CLASIFICACION SEGÚN APERTURA DE CANALES

2.4 CANALES CATIONICOS HCN.

Los canales marcapaso ó canales activados por hiperpolarización y nucleótidos cíclicos (Hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide gated channels o HCN en inglés) son canales catiónicos no selectivos, ya que permiten el paso de Na^+ y K^+ .

Las corrientes generadas por estos canales fueron descubiertas en la década de los 70's en células del nodo sinoauricular de conejo (Brown y col. 1980). Estas corrientes fueron denominadas "funny" porque tenían características consideradas únicas para estos canales, como presentar activación bajo condiciones de hiperpolarización a diferencia de la mayoría de canales, que se activan por la despolarización de la membrana.

A pesar de su relevancia fisiológica, la identificación molecular de los HCN es relativamente reciente. Existen cuatro isoformas de canales HCN; HCN1, HCN2, HCN3 y HCN4, las cuales han sido encontradas en humano, rata, conejo y ratón.

Los HCN son primos de la familia de los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv) y de los canales CNG (modulados por nucleótidos cíclicos). Estructuralmente, los HCN tienen seis segmentos transmembranales (S1-S6), un segmento S4 cargado positivamente y un poro entre los segmentos S5 y S6 y un dominio de unión a nucleótidos cíclicos en la región carboxilo terminal del polipéptido, tal como se muestra en la figura 4 (Kaupp y col. 2001). Los cuatro genes de la familia HCN despliegan una gran homología en su secuencia de nucleótidos en los seis segmentos transmembranales y en la región de unión a nucleótidos cíclicos (80-90%) en contraste con los segmentos amino y carboxilo terminal. Como se muestra en la figura 5, la región del poro de los HCN está también muy conservada entre las diferentes familias, e inclusive, presenta el mismo motivo GYG de los canales de potasio, el cual funciona como filtro de selectividad.

Sin embargo, en contraste con los canales de potasio, el poro de los HCN presenta variaciones en los aminoácidos vecinos, lo cual probablemente confiere la propiedad de no selectividad a estos canales (Ludwing y col. 1999).

Los cuatro canales HCN se pueden expresar como homotetrámeros, sin embargo se han encontrado patrones de expresión de los HCN como heterotetrámeros, predominantemente HCN1/HCN2 (Brewster y col 2005).

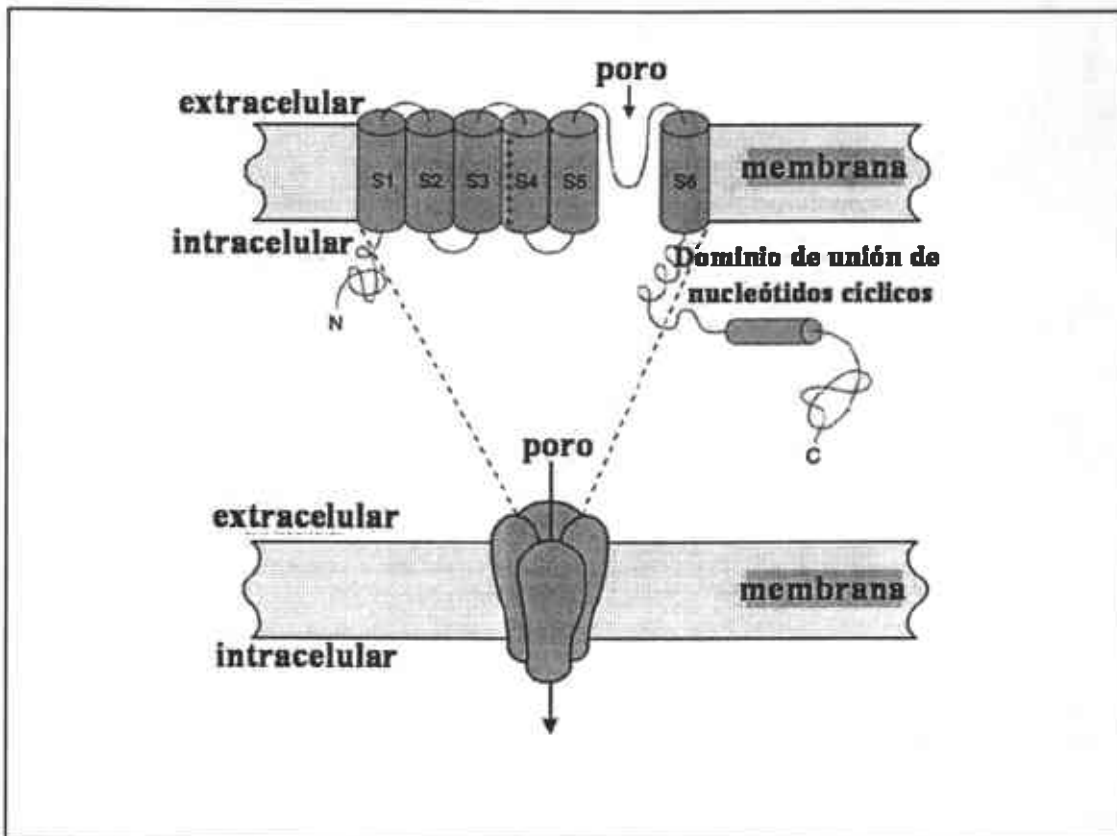


Figura 4. Topología de los canales HCN (Modificado de Kaupp y col. 2001)

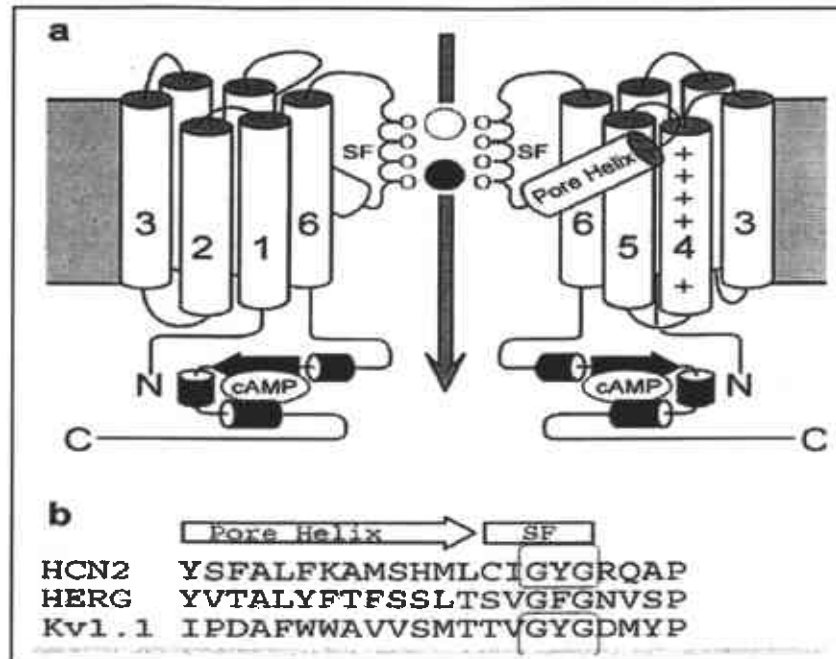


Figura 5. Comparación de la secuencia del filtro de selectividad en el poro del HCN y Kvs (1.1 y HERG o Kv 11.1) (Ludwing y col. 1999)

Características de los canales HCN:

- a) Estos canales desempeñan un papel fundamental en el inicio de la actividad rítmica de algunas neuronas, en la generación del latido cardiaco en el corazón y en la actividad de las células bastón en los ojos (Demontis y col. 2002).
- b) La actividad de estos canales depende del voltaje, pero a diferencia de la mayoría de los canales como los Kvs, los canales marcapaso se abren a voltajes hiperpolarizantes (- 65 a - 95 mV) (Kaupp y col, 2001).

- c) Los canales marcapaso transportan potasio y sodio. La permeabilidad relativa iónica P_{Na}/P_K de los canales marcapaso, depende de la concentración extracelular de potasio y varía entre 0.2 y 0.4, lo que nos indica que estos canales son más permeables al potasio, aunque transportan más sodio en condiciones fisiológicas (Hestrin y col. 1987).
- d) Concentraciones 1 mM de iones Cs^+ bloquean al canal HCN en un 80% (Zhong y col. 2004).
- e) La actividad de los canales se regula por el AMPc y el GMPc, esto tiene gran relevancia en la estimulación del latido cardiaco por activadores β -adrenérgicos que incrementan los niveles de AMPc el cual promueve la apertura del canal por interacción directa en el dominio de unión a nucleótidos cíclicos. (Kaupp y col. 2001).
- f) Existen fármacos que pueden regular la actividad del canal HCN, como la Ivabradina, un agente bradicardizante que tiene la capacidad de bloquear al canal, reduciendo así, el rango de despolarización diastólica y el Propofol, un agente anestésico que inhibe la activación de los canales HCN (DiFrancesco y col. 2005; Cacheaux y col. 2005).
- g) Algunos canales HCN son sensibles a la presión osmótica del medio. Recientes estudios en los que se coexpresó el canal HCN2 y la acuaporina 1 (AQP1) en ovocitos de *Xenopus laevis*, se observó que bajo condiciones de hipotonicidad se incrementó la actividad del canal. (Calloe y col. 2005).

Se han realizado diversos ensayos para determinar la distribución regional de los canales HCN en el organismo, mediante técnicas como northern blott, hibridación in situ, técnicas inmunohistoquímicas y PCR. Los resultados obtenidos hasta el momento se muestran en la tabla siguiente:

	<i>Ubicación</i>
HCN1	Neocorteza, hipocampo, cerebelo, células de Purkinje
HCN2	Bulbo olfatorio, corteza cerebral, hipocampo, tálamo, amígdala, cerebelo, tallo cerebral
HCN3	Todo el cerebro, principalmente en bulbo olfatorio
HCN4	Bulbo olfatorio, tálamo, nodo sinoauricular, células de Purkinje

Tabla 1. Distribución regional de la familia de canales HCN en la rata (Kaupp y col. 2001).

2.5 ANATOMIA Y FISIOLÓGÍA DEL SISTEMA URINARIO.

El sistema urinario consta de dos riñones, dos uréteres, la vejiga urinaria y la uretra, como se muestra en la figura 6. Entre las funciones principales del sistema urinario está la producción de orina, el equilibrio ácido - base del organismo, la eliminación de sustancias de desecho y el mantenimiento del volumen extracelular.

Los riñones son órganos pares en forma de frijol, situados en la región retroperitoneal de la cavidad abdominal, a cada lado de la columna vertebral y miden de 10 a 12 cm de largo, 5 a 6 cm de ancho y 3 a 4 cm de espesor. Cada riñón presenta una concavidad, en cuyo centro hay una hendidura llamada hilio, donde se encuentra tejido adiposo. El hilio se extiende hasta el seno renal, este contiene las arterias y venas renales y la pelvis renal.

La porción externa de cada riñón se denomina corteza, que a simple vista se observa más rojiza. La porción media del riñón se denomina médula renal, que esta constituida por unas subdivisiones en forma de cono denominadas pirámides renales; estas pirámides tienen la base dirigida hacia la corteza y una punta denominada papila renal. Cada pirámide esta separada de la siguiente por las columnas renales. La médula a su vez puede ser subdividida en médula interna y médula externa. A simple vista, la médula interna tiene un color más claro que la médula externa.

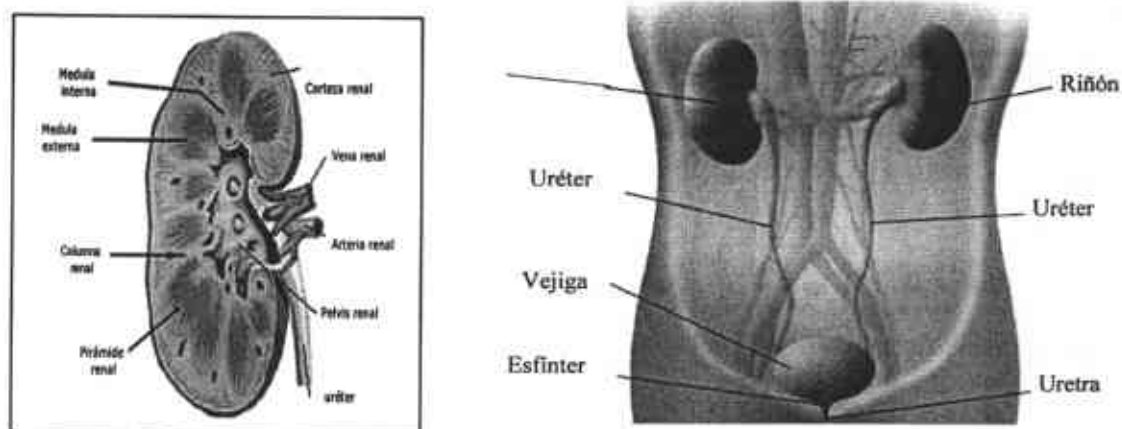


Figura 6. Imagen del sistema urinario, proyectando un riñón y sus partes.

La unidad funcional del riñón es la nefrona. Cada riñón humano contiene aproximadamente un millón de nefronas, que no pueden ser regeneradas. La nefrona consta de varios segmentos morfológicamente distintos: el corpúsculo renal, el túbulo contorneado proximal, el asa de Henle, el túbulo contorneado distal, el túbulo colector y conducto colector, tal como se muestra en la figura 10.

La corteza renal contiene los corpúsculos renales, los túbulos contorneados proximales y distales y una parte de los túbulos colectores. Las asas de Henle y la mayor parte de los conductos colectores se encuentran en la médula renal.

Existen básicamente dos tipos de nefronas, las corticales, cuyos glomérulos están situados en la parte externa de la corteza y sus asas de Henle tienen un breve recorrido dentro de la médula y las yuxtamedulares, cuyos glomérulos se encuentran en la parte inferior de la corteza y cuyas asas de Henle llegan a la parte más profunda de la médula interna.

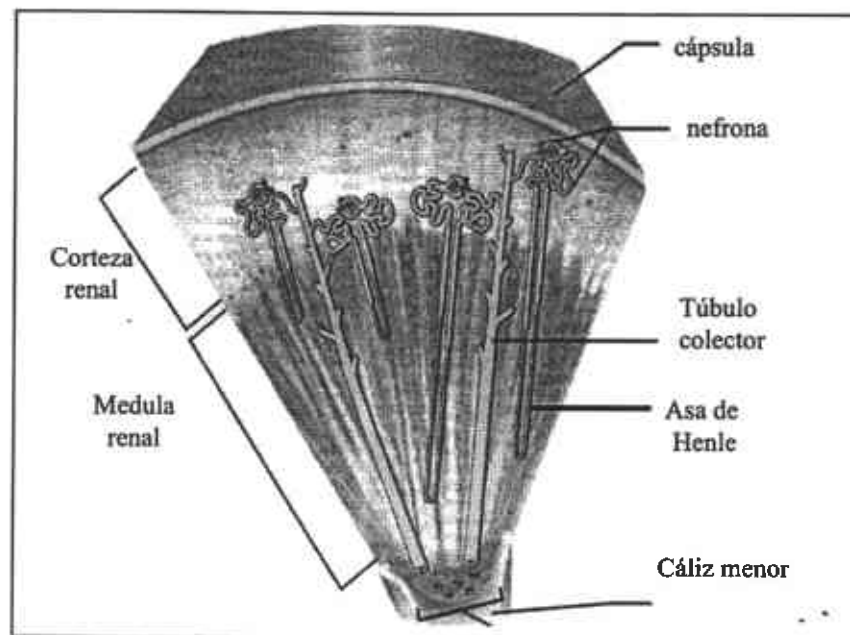


Figura 7. Nefronas yuxtamedulares y corticales

Glomérulo renal.

El glomérulo renal está constituido por una madeja de capilares derivados de la arteriola aferente, la cual se divide en cuatro a ocho asas capilares formando un penacho y por la cápsula de Bowman, una extensión de pared delgada del túbulo proximal que se invagina en forma de copa. La cápsula de Bowman es una capa de dos paredes formadas por el epitelio plano simple. El epitelio que recubre la pared externa de la cápsula se llama capa parietal y el epitelio que mira hacia el glomérulo se denomina la capa visceral. El espacio entre las dos capas se denomina espacio de Bowman o espacio capsular.

En el glomérulo se inicia la formación de orina, por medio de la filtración, la cual consiste en el movimiento del plasma desde el capilar glomerular hacia la cápsula de Bowman, el líquido resultante de este proceso es denominado ultrafiltrado glomerular. Este líquido contiene los mismos componentes del plasma, sólo que sin proteínas.

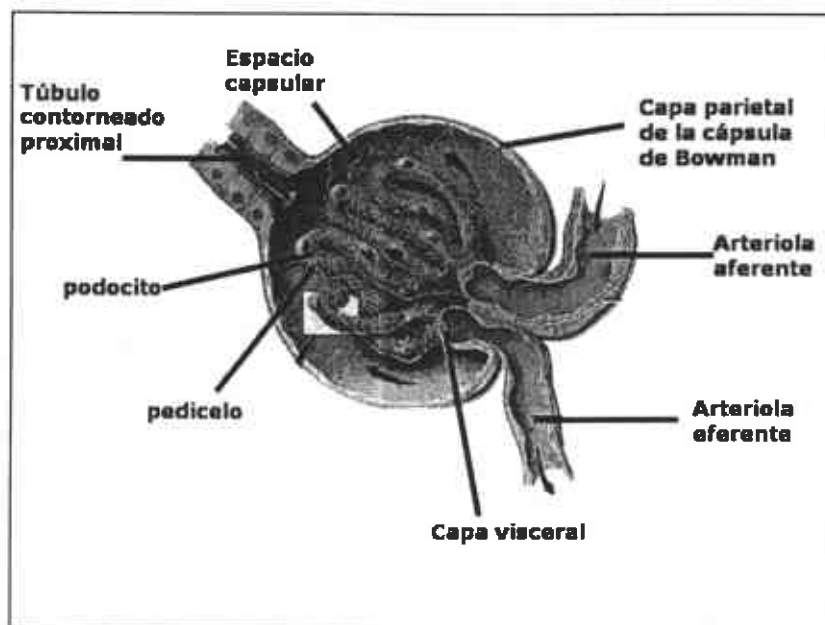


Figura 8. Imagen de la cápsula de Bowman

El glomérulo funciona como una barrera o filtro constituido por tres capas principales, como se ilustra en la figura 9:

- a) El endotelio capilar fenestrado tiene poros cuyo diámetro oscila entre 50 a 100 nm. La superficie de la célula endotelial esta cubierta por una capa polianiónica que tiene un espesor de 12 nm. Debido al tamaño relativamente grande de las fenestraciones, esta capa sólo funciona como filtro para células.

- b) La membrana basal es una malla homogénea compuesta principalmente por colágena tipo IV y una variedad de sustancias como proteoglicanos (que confieren una carga negativa a la membrana), glucoproteínas y mucopolisacáridos. Los proteoglicanos son en gran parte responsables de la barrera eléctrica que restringe la entrada de macromoléculas y moléculas aniónicas sencillas de radio aproximado entre 0.4 y 0.8 nm.

- c) Las células epiteliales de la cápsula o podocitos no forman una capa continua, sino que poseen largas prolongaciones en forma de pie llamadas pedicelos, que se ramifican libremente a lo largo del capilar glomerular y se entrelazan, dejando un espacio entre ellas de 20 a 30 nm. Estas células también están cubiertas por una capa polianiónica, lo que restringe aun más el paso de moléculas a través de ésta.

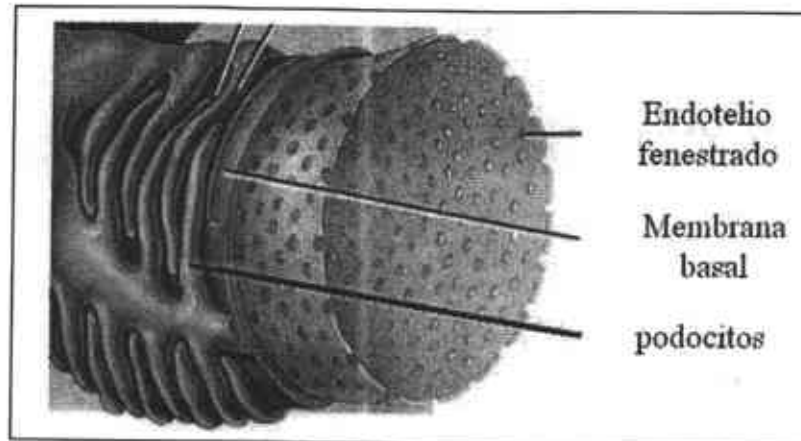


Figura 9. Principales barreras de filtración.

Otro componente esencial del glomérulo es el mesangio, este consiste de células mesangiales y una matriz mesangial. Las células mesangiales rodean los capilares glomerulares aportando rigidez estructural al glomérulo. Estas células tienen la capacidad de secretar la matriz mesangial, tienen actividad fagocitaria y de pinocitosis, además de secretar prostaglandinas. También tienen la capacidad de regular el flujo sanguíneo, debido a sus receptores para angiotensina II.

Túbulo proximal.

La cápsula continúa con una formación tubular que se denomina túbulo proximal por estar próximo al glomérulo. El túbulo proximal está compuesto por dos partes morfológicamente diferentes, la porción contorneada que está más cerca del glomérulo y la porción recta, que desemboca en el asa de Henle. Las células epiteliales del túbulo proximal tienen una gran actividad metabólica y una gran cantidad de mitocondrias para abastecer a estas células de energía suficiente para llevar a cabo sus procesos de transporte activo. Otra característica especial de estas células es que tienen numerosas microvellosidades, lo cual les da la apariencia de

borde de cepillo en el lado apical de la membrana (el lado que da al lumen), estas microvellosidades le confieren una gran capacidad de absorción. Estas microvellosidades también están dotadas de una gran cantidad de proteínas cotransportadoras de sodio y algunas moléculas orgánicas como glucosa o aminoácidos; también en esta zona encontramos moléculas cotransportadoras de protones.

En el túbulo proximal se han observado diversos tipos celulares los cuales han sido clasificados de la manera siguiente:

- a) Células S1 que se encuentran en el segmento inicial del túbulo proximal, son ricas en mitocondrias y es aquí donde se lleva a cabo la reabsorción del bicarbonato y la excreción de cloro, el cual se reabsorbemás adelante.
- b) Células S2, comienzan en la porción distal del segmento contorneado y se extienden hacia el interior del segmento recto. En estas células el borde de cepillo está menos desarrollado y hay una menor cantidad de mitocondrias. En estas células se lleva a cabo un movimiento pasivo de calcio.
- c) Células S3, en la parte distal del segmento recto. Estas células son cúbicas y prácticamente no hay borde de cepillo, además de tener una cantidad menor de mitocondrias en comparación con las células anteriormente mencionadas. En esta zona se puede reabsorber glucosa y calcio.

El túbulo contorneado proximal reabsorbe aproximadamente el 85% de agua, debido a la presencia de la acuaporina 1 (AQP1) y el 60% de la carga de sodio, así como otros iones como el calcio y fosfato, además de la glucosa del filtrado glomerular. En este sitio también se secreta creatinina, y metabolitos de algunos fármacos. También el túbulo proximal secreta ácidos y bases orgánicas como las sales biliares y catecolaminas

Asa de Henle.

El asa de Henle está formada por tres porciones distintas: la porción descendente delgada, la porción ascendente delgada y la porción ascendente gruesa. Las células de la rama descendente delgada y la rama ascendente delgada carecen del borde de cepillo, poseen pocas mitocondrias y tienen una actividad metabólica disminuida. La porción descendente del asa es altamente permeable al agua, debido a la presencia de la AQP 1. Su función principal es la de permitir la difusión simple de solutos a través de sus paredes, en esta zona se absorbe casi el 20% del agua y el 25% de la carga total de sodio. La porción gruesa del asa tiene células con gran actividad metabólica y una elevada capacidad de reabsorber sodio, cloruro y potasio, magnesio y bicarbonato, además de ser relativamente impermeables al agua.

La membrana apical de estas células posee un cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$, el cual impulsa la reabsorción de potasio al interior de la célula en contra de su gradiente de concentración. Estas células también poseen un transportador Na^+/H^+ , lo que impulsa la absorción de sodio y la secreción de protones.

Túbulo distal y túbulo colector.

La porción gruesa ascendente del asa de Henle desemboca en el túbulo distal. La parte inicial del túbulo distal forma parte del complejo yuxtglomerular el cual posee tres componentes esenciales:

- a) Mácula densa: al acercarse al glomérulo, la parte inicial del túbulo distal modifica su epitelio mostrando células que tienen como característica principal tener sus núcleos muy compactos que le dan un aspecto más denso, por lo que se llaman mácula densa.

- b) Las células yuxtaglomerulares de la pared de la arteriola aferente adyacente, tienen la capacidad de secretar renina para modificar el flujo sanguíneo.
- c) Las células mesangiales, de las cuales ya se habló con anterioridad.

La segunda parte del túbulo distal, así como el túbulo colector se caracterizan por poseer dos tipos de células, las células principales y las células intercaladas. Las células principales tienen la capacidad de reabsorber sodio y secretar potasio, esto depende de la actividad de la ATPasa de sodio potasio, la cual se encuentra en la membrana basolateral de estas células. Esta bomba mantiene el gradiente de sodio y potasio.

Las células intercaladas, tienen la capacidad de secretar iones hidrónico y reabsorber iones bicarbonato y potasio, esto lo hacen gracias a una ATPasa que transporta al ión hidrónico hacia el lumen tubular. Este protón es producto de la reacción de la anhidrasa carbónica sobre el CO_2 y el H_2O para formar iones bicarbonato e iones hidrónico.

La permeabilidad del agua está controlada en esta zona por la concentración de la vasopresina u hormona antidiurética (ADH) la cual aumenta la expresión de la AQP2, la cual tiene la capacidad de reabsorber agua. Cuando existen niveles altos de esta hormona los túbulos son permeables al agua, pero sin ADH estos no permiten el paso de agua. Esta característica del túbulo colector permite controlar el grado de dilución de la orina.

Conducto colector médular.

Los túbulos colectores de varias nefronas se unen en un solo conducto colector; este conducto colector vierte la orina finalmente en la pelvis renal. El túbulo colector incluye una porción cortical, una porción médular externa y una porción médular interna, esta última termina en los conductos papilares.

La porción cortical del túbulo colector también contiene células principales y células intercaladas. El túbulo cortical médular externo que tiene la función básica de secretar protones y reabsorber potasio mediante una ATPasa protón potasio y el túbulo cortical de la médula interna.

Las células epiteliales de este conducto tienen forma cúbica, y muy pocas mitocondrias. Esta zona también regula la absorción de agua por medio de la hormona ADH. También se observa una elevada capacidad de secretar iones hidrónico, lo que contribuye al equilibrio ácido base de la orina.

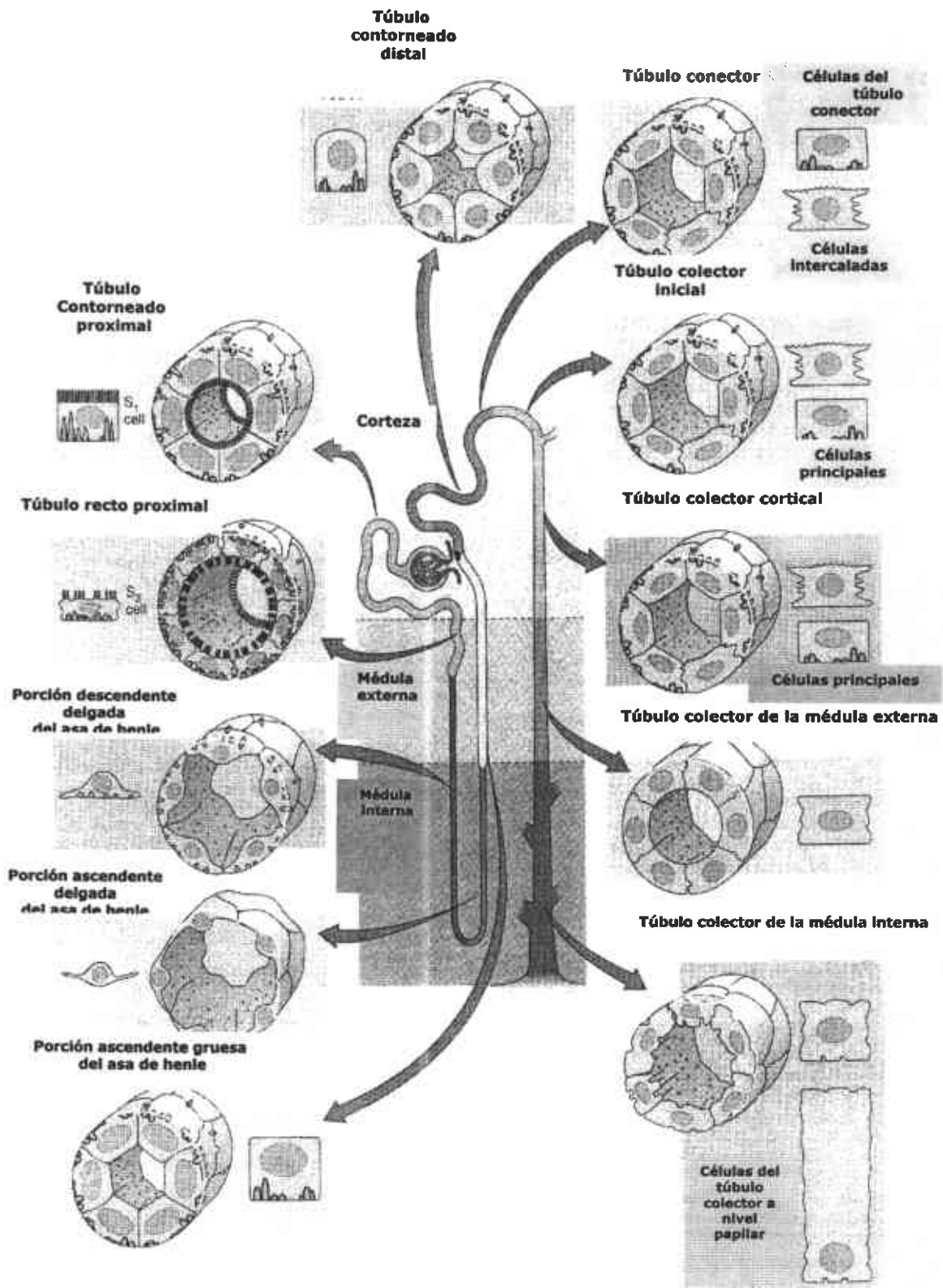


Figura 10. Diversos tipos de células a lo largo de la nefrona (Boron y col. 2003).

2.6 FISIOLÓGÍA DEL IÓN SODIO.

El sodio es un catión que predomina en el líquido extracelular. Su concentración en el líquido extracelular es de aproximadamente 142 mmol/L, mientras que su concentración en el líquido intracelular es de 10 mmol/L; es decir aproximadamente el 93% del sodio se encuentra en el líquido extracelular. Entre sus funciones principales están las siguientes:

- Conservar la distribución normal de agua así como la presión osmótica en el plasma.
- Preservación del equilibrio ácido / base en el riñón
- Excitación de nervios y músculos.

El consumo aproximado de sodio en la dieta es de 2300 a 4600 mg/día (Anderson, 1995.) este se absorbe activamente en el intestino delgado, pero son los riñones los que regulan el contenido de sodio.

La cantidad de sodio que se elimina con la orina depende de la cantidad ingerida, y puede ser desde menos de 100 mg a varios gramos. Como se muestra en la figura 11, aproximadamente el 60% de este sodio se reabsorbe en el túbulo contorneado proximal, el 25 % se absorbe en el asa de Henle, el 5 o 7 % en el túbulo contorneado distal y un 3-5% en el túbulo colector.

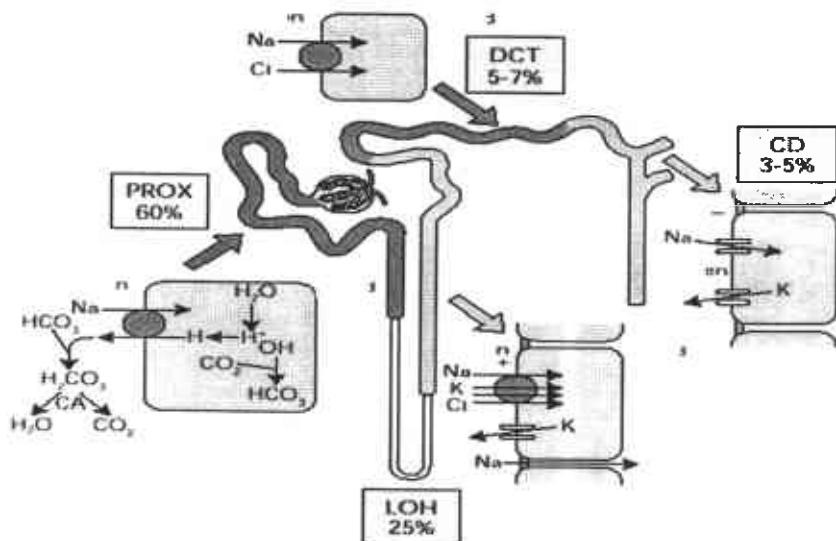


Figura 11. Porcentajes de absorción de sodio a lo largo de la nefrona y algunos mecanismos de su regulación (PROX: túbulo contorneado proximal, LOH: asa de Henle, DCT: túbulo contorneado distal, CD: túbulo colector). (Schrier y col, 1999)

Cuando una persona aumenta la cantidad de sodio ingerida se activan los mecanismos siguientes:

1. Activación de los receptores de baja presión. Las señales de estos receptores llegan al tronco encefálico e inhiben la actividad nerviosa simpática de los riñones, reduciendo así, la reabsorción tubular de sodio. Este mecanismo alcanza su máximo valor durante las primeras horas después de un aumento en la ingestión de sal o agua.
2. El organismo genera ligeros ascensos en la presión arterial provocados por la expansión de volumen y se incrementa la excreción de sodio (natriuresis por presión).
3. Se suprime la formación de angiotensina II reduciéndose la reabsorción tubular de sodio. También al reducir la formación de angiotensina se reduce la secreción de aldosterona, lo que provoca que disminuyamás la reabsorción de sodio.
4. Se estimula la formación del péptido natriuretico auricular (PNA), el cual es liberado en la aurícula por aumentos del volumen sanguíneo, este péptido inhibe la reabsorción de sodio a nivel de conducto colector. Eso lo hace inhibiendo a la angiotensina II, la cual estimula la reabsorción de sodio y agua (Castillo y col. 2003).

Cuando la concentración de sodio disminuye, el mecanismo funciona a la inversa.

La regulación del sodio en el túbulo contorneado distal, depende de la hormona aldosterona, un mineralocorticoide que es secretado en las glándulas suprarrenales. Si hay presencia de aldosterona, se aumenta la absorción del sodio, la excreción de potasio y de iones hidrógeno.

Existe otro factor hormonal que regula la secreción de sodio y es el péptido natriuretico auricular, una hormona secretada en el miocardio y ejerce sus funciones sobre el riñón, estimulando la excreción de sodio y agua.

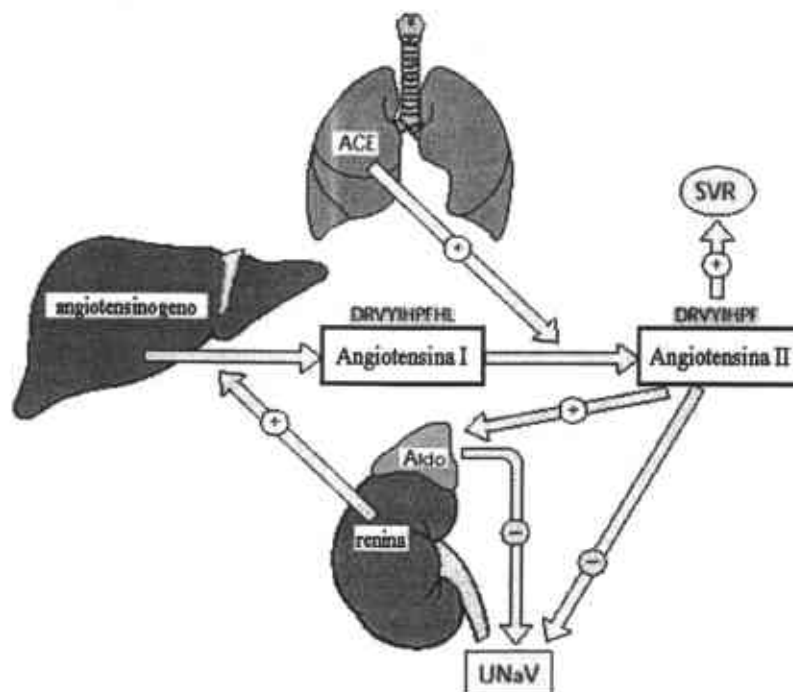


Figura 12. Sistema renina/angiotensina/aldosterona. El angiotensinógeno es un tetradecapeptido producido y secretado en el hígado. La renina es producida en el aparato yuxtaglomerular en el riñón. La renina escinde 4 aminoácidos del angiotensinógeno transformándolo en angiotensina 1, la enzima convertidora de angiotensina (ACE) corta 2 aminoácidos de la angiotensina 1, transformándola en angiotensina 2; ésta incrementa la resistencia vascular sistémica (SVR) y estimula la secreción de la aldosterona (Aldo) de las glándulas adrenales. En consecuencia, se incrementa la reabsorción de sodio en los túbulos renales y disminuyendo la secreción urinaria de sodio (UnaV). (Schrier y col, 1999)

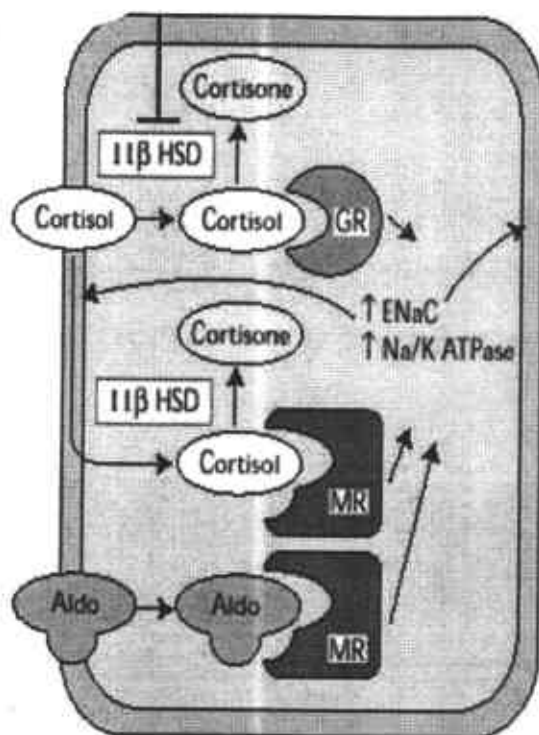


Figura 13. Mecanismo de la acción de la aldosterona en una célula distal de la nefrona. La aldosterona entra a la célula a través de la membrana plasmática debido a su alta liposolubilidad en membranas e interactúa con su receptor (MR), esto desencadena la formación de una nueva proteína que incrementa el número de canales de sodio (ENaC) y de ATPasas de sodio en la superficie de la célula. Se incrementa el transporte transepitelial de sodio. El cortisol también entra a la célula y puede interactuar tanto con su receptor (GR) como con MR, lo que estimula el transporte de sodio. La expresión de la enzima 11-β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (11-β-HSD) permite el metabolismo rápido del cortisol en cortisone (Schrier y col, 1999).

3. ANTECEDENTES.

Desde el descubrimiento de las corrientes catiónicas activadas por hiperpolarización, llamadas I_f o I_h hace 20 años, se han realizado una gran cantidad de investigaciones, para determinar la función fisiológica específica de estas corrientes en el corazón, cerebro y otros órganos como los ojos. Estas investigaciones también han conducido a la caracterización de los canales HCN, así como algunas características intrínsecas de estos, como su tetramerización, su distribución en algunos epitelios, y su bloqueo por algunas sustancias.

Recientemente se obtuvo evidencia de la presencia de esta familia de canales en las células del túbulo colector de la médula interna. Por medio de la técnica de Patch-Clamp en un cultivo primario del túbulo colector de la médula interna, se obtuvo una corriente "Ivti" que muestra una gran analogía con las corrientes I_f generadas por los canales HCN (Escobar y col. 2004).

Las corrientes entrantes dependientes de voltaje y tiempo se registraron en el 50% de las células estudiadas (datos no publicados). Esta corriente se activa a voltajes hiperpolarizantes (-60 mV) y es selectiva a sodio (Na^+) y potasio (K^+), y requiere más de 720 ms para terminar de activarse.

En nuestro laboratorio, se realizaron estudios de RT-PCR tanto en el riñón, como en el cerebro para identificar la presencia del mensajero para las isoformas 1 y 2 del HCN. Los resultados de este experimento demostraron la presencia a nivel de RNA mensajero de alguna de las isoformas del HCN, probablemente el HCN1.

Hasta ahora sólo se conoce la función de los canales HCN en los tejidos excitables, pero no existen reportes en la literatura de su presencia y función en tejidos no excitables, como riñón.

4. OBJETIVOS.

Objetivo general.

- Demostrar la presencia de la familia de canales catiónicos HCN en el riñón de la rata.

Objetivos particulares.

- Realizar técnicas inmunohistoquímicas aplicadas a la búsqueda de la familia de canales HCN en médula interna y corteza de riñón de rata.

5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

El proceso experimental mediante el cual se identificara la presencia de los canales HCN en células de riñón y cerebelo de rata consta de lo siguiente:

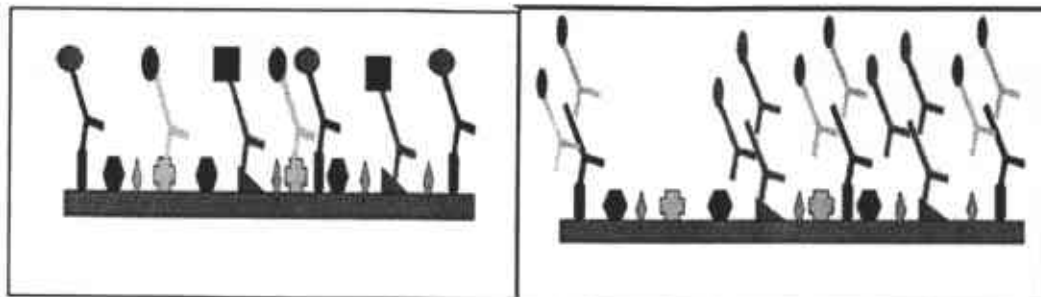
Inmunohistoquímica

Las técnicas inmunohistoquímicas han demostrado ser herramientas sumamente eficaces para la determinación de estructuras tisulares. Se fundamentan en el uso de anticuerpos marcados con alguna sustancia (ya sea una molécula fluorescente o alguna enzima que al reaccionar genere algún producto colorido) dirigidos contra epítopes específicos de la célula a marcar, formando así un complejo antígeno - anticuerpo (Peinado 1996).

Podemos clasificar a las técnicas inmunohistoquímicas básicamente en dos grupos:

- *Inmunohistoquímica directa*: Se basa en el marcaje de la estructura deseada con un anticuerpo que esta enlazado químicamente a la molécula fluorescente o a la enzima.
- *Inmunohistoquímica indirecta*: La estructura deseada se marca con un anticuerpo primario no marcado. Una vez que se ha llevado a cabo la reacción antígeno - anticuerpo, se elimina el anticuerpo primario que no reaccionó. Después, se hace reaccionar al complejo antígeno - anticuerpo con un anticuerpo secundario marcado dirigido contra el anticuerpo primario.

Las ventajas que ofrece la inmunohistoquímica indirecta consisten en una mayor sensibilidad, ya que cada anticuerpo primario puede reaccionar con varias moléculas del anticuerpo secundario, como se muestra en la figura 14.



Inmunohistoquímica directa

Inmunohistoquímica indirecta

Figura 14. Diversas técnicas inmunohistoquímicas.

Metodología.

La técnica inmunohistoquímica utilizada para la detección de los HCN en los diversos tejidos estudiados fue la de inmunoperoxidasa indirecta. Para la detección de los canales HCN se utilizaron anticuerpos primarios específicos para el canal (IgG de conejo anti HCN; Alomone labs) marcados con peroxidasa de rábano. La peroxidasa es una enzima que cataliza reacciones de oxidación en presencia de peróxido de hidrogeno. Como sustrato de la enzima se utilizó diaminobencidina, cuyo producto de oxidación forma un precipitado café marrón que tiñe al tejido en cuestión. Para observar la reactividad de los tejidos se utilizó un microscopio de campo claro.

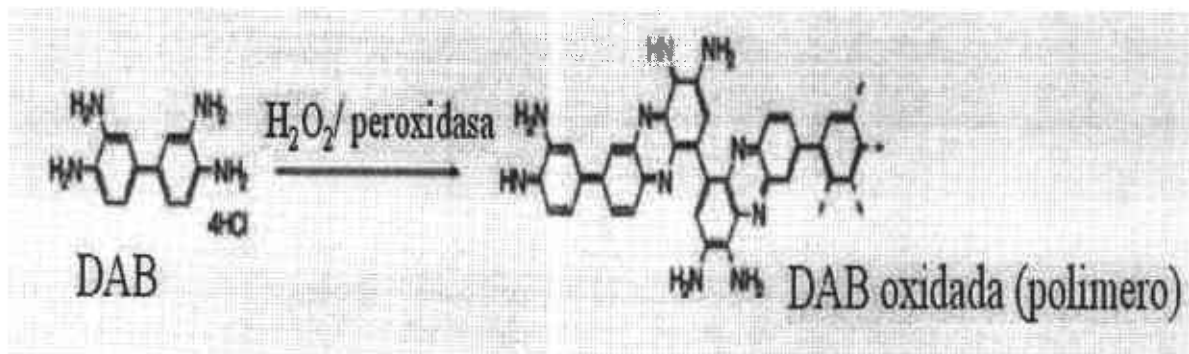
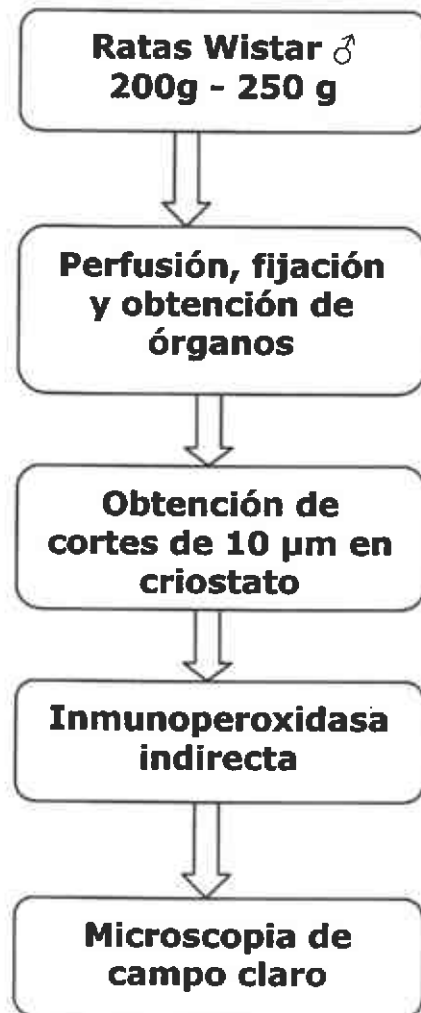


Figura 15. Reacción de la diaminobencidina.

Procedimiento

La metodología utilizada para estos ensayos se menciona de manera abreviada en el siguiente esquema, en el apéndice la técnica se describe con mayor detalle.



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Localización y distribución de la familia de canales catiónicos HCN en el cerebelo.

Para garantizar que la metodología y los reactivos utilizados durante los ensayos funcionan adecuadamente, es necesario realizar un control positivo. Reportes anteriores han demostrado que la familia de canales HCN se expresa de manera constitutiva en el cerebro, el corazón y la retina. (Notomi y col. 2004; Demontis y col. 2002; Ludwing y col. 1999). Notomi y colaboradores estudiaron la presencia y distribución de la familia de canales HCN en el cerebelo. Los resultados obtenidos son los siguientes:

Tabla 2. Distribución de la familia de canales HCN en el cerebelo de la rata.

Canal catiónico HCN	Distribución en el cerebelo.
HCN 1	Células de Purkinje, capa molecular
HCN 2	Capa molecular
HCN 3	Capa granular
HCN 4	Capa molecular

También se debe realizar un control negativo en el cerebelo con el objetivo de evitar obtener falsos positivos.

El control negativo se realizó con el protocolo de la inmunoperoxidasa indirecta (ver apéndice) omitiendo la incubación con el anticuerpo primario en cortes de cerebelo de 10 μm de grosor. El resultado obtenido durante este ensayo es el siguiente.

Control negativo

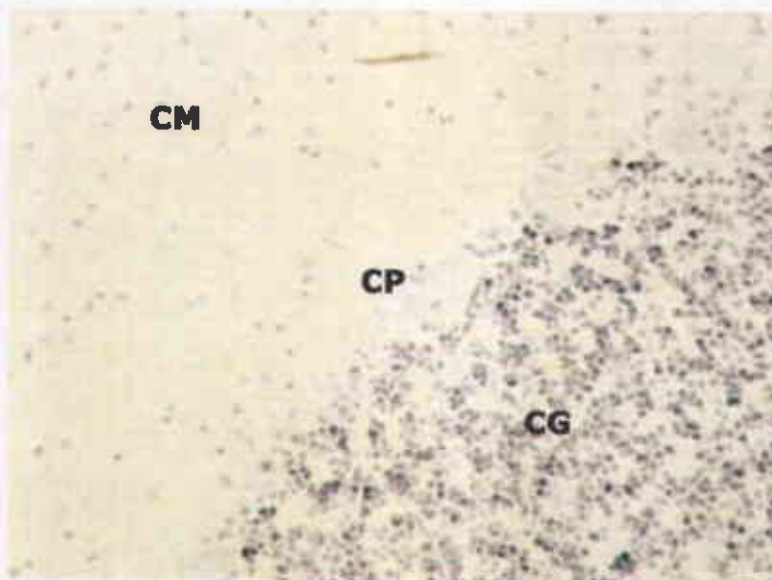


Figura 16. Control negativo realizado con la técnica de la inmunoperoxidasa indirecta en el cerebelo de la rata (CG: capa granular, CM: capa molecular, CP: células de Purkinje). La imagen fue obtenida con un aumento de 40 veces (40X).

En la figura 16 podemos observar que no hay reacción inespecífica con el anticuerpo secundario en las células de Purkinje o en las capas granular o molecular. Una vez que se determinó que el anticuerpo secundario no generó falsos positivos pudimos seguir con los ensayos.

El control positivo se realizó con cada uno de los anticuerpos de la familia de canales HCN. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Control positivo

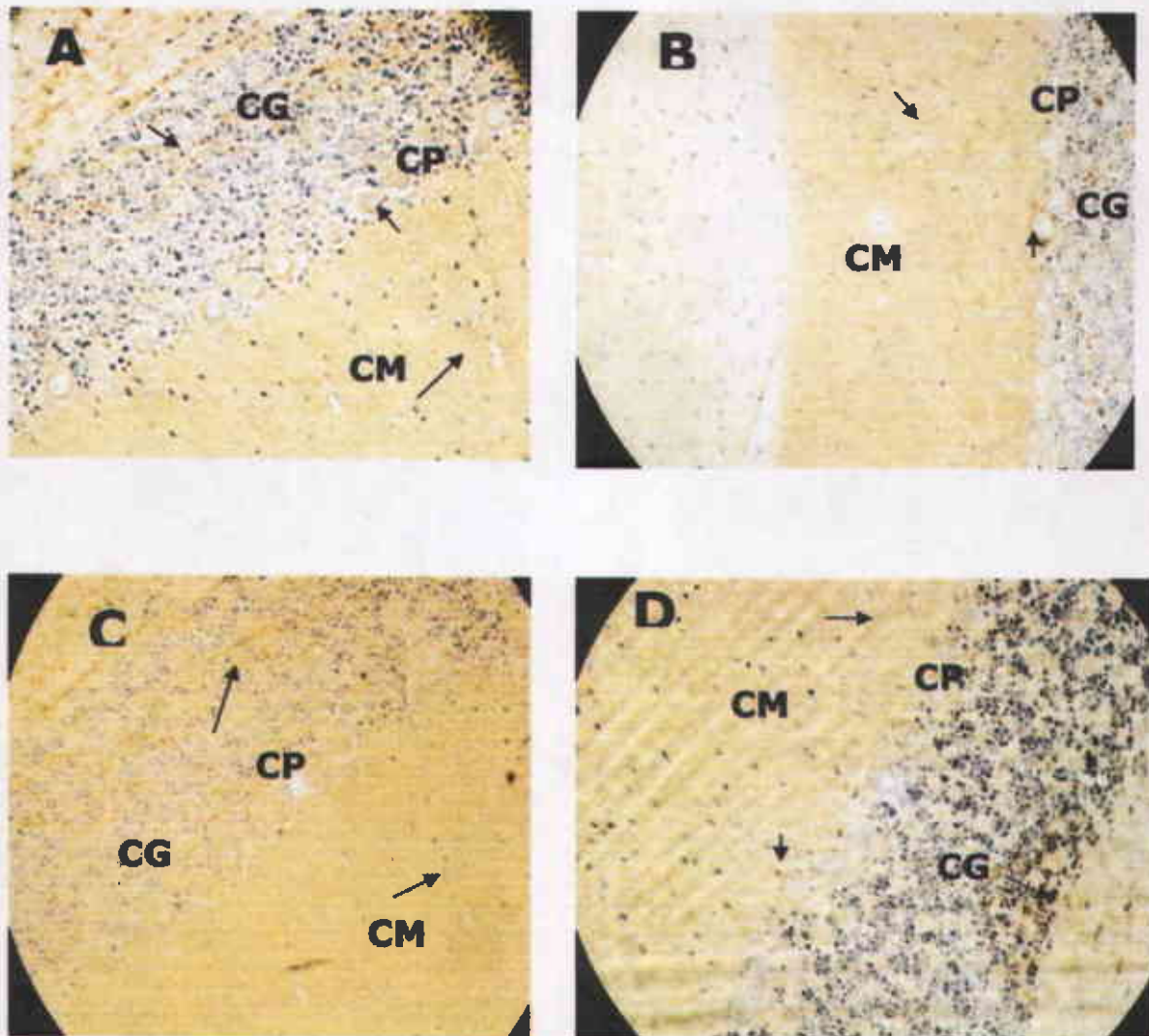


Figura 17. Inmunoperoxidasa indirecta para la familia de canales HCN en cortes histológicos de 10 μm de grosor del cerebelo de la rata. HCN1 (A), HCN2 (B), HCN3 (C), HCN4 (D). La reactividad positiva se indica con las flechas. Las imágenes fueron obtenidas con un aumento de 20X.

En la figura 17 podemos observar que están presentes los cuatro canales de la familia HCN en el cerebelo, los cuales se identificaron en los tres tipos celulares (las células de Purkinje, la capa granular y la capa molecular). Los canales HCN1, HCN2 y HCN4 son abundantes en la capa molecular. El HCN3 esta presente en mayor cantidad en la capa granular. En las células de Purkinje, predominan los canales HCN2 y el canal HCN4.

Si comparamos los resultados obtenidos por Notomi y col. 2004 con los obtenidos en el laboratorio, podemos notar que coinciden en los tipos celulares marcados por el anticuerpo. Sin embargo, nuestros anticuerpos marcan más células en el cerebelo en comparación con Notomi y colaboradores. Esto podría deberse a que los anticuerpos utilizados por Notomi fueron producidos en su laboratorio en cobayos. Los anticuerpos que usamos en este ensayo fueron comprados a la empresa Alomone (Israel) y se sintetizaron en conejos. Es un hecho conocido que la reactividad de los anticuerpos es diferente dependiendo de la especie animal donde se producen.

De los resultados obtenidos en los ensayos del control positivo, podemos concluir que la metodología y los anticuerpos utilizados para este trabajo son apropiados.

Identificación, localización y distribución de la familia de canales catiónicos HCN en la médula interna y la corteza del riñón de la rata.

Control negativo.

Se realizaron cortes de 10 μm de grosor de la médula interna y la corteza del riñón de la rata y se trabajó de la misma forma que con el control negativo en el cerebelo de la rata. Es importante verificar que la peroxidasa endógena se inhiba, debido a que podría reaccionar con la diaminobencidina y provocar un falso positivo.

Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Controles negativos.

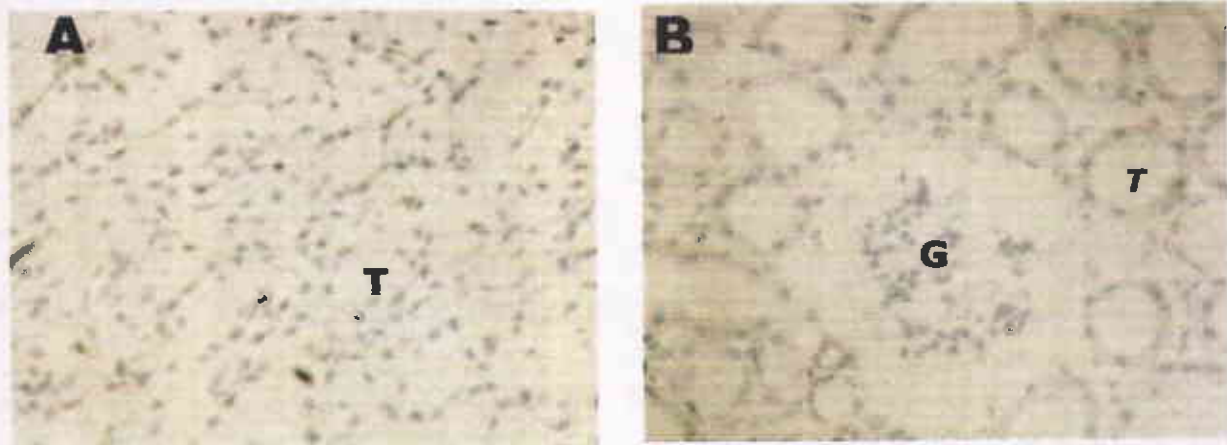


Figura 18. Control negativo de la inmunoperoxidasa Indirecta para la familia de canales HCN en cortes histológicos de la médula interna (A) y la corteza (B) del riñón de la rata (G:glomérulo, T:túbulo). Las imágenes fueron tomadas con un aumento de 40X.

Histológicamente podemos observar claramente en los tejidos estudiados los glomérulos y los túbulos de la nefrona en los cortes de la corteza renal. En estas imágenes no podemos diferenciar entre los túbulos proximales y los túbulos distales, ya que se ubican en la misma zona de la nefrona y tienen un grosor similar. En los cortes de la médula interna se pueden diferenciar con claridad los túbulos colectores de las asas de Henle, debido a que los primeros son más gruesos.

Una vez que se aprobaron los controles, tanto positivos como negativos y se ha comprobado la efectividad de la metodología y los anticuerpos, se iniciaron los ensayos de identificación y distribución de los canales HCN en la corteza y la médula interna del riñón de la rata. La metodología utilizada es la misma que la descrita para los controles y se menciona en el apéndice.

Los resultados obtenidos se muestran en las imágenes siguientes:

Médula Interna

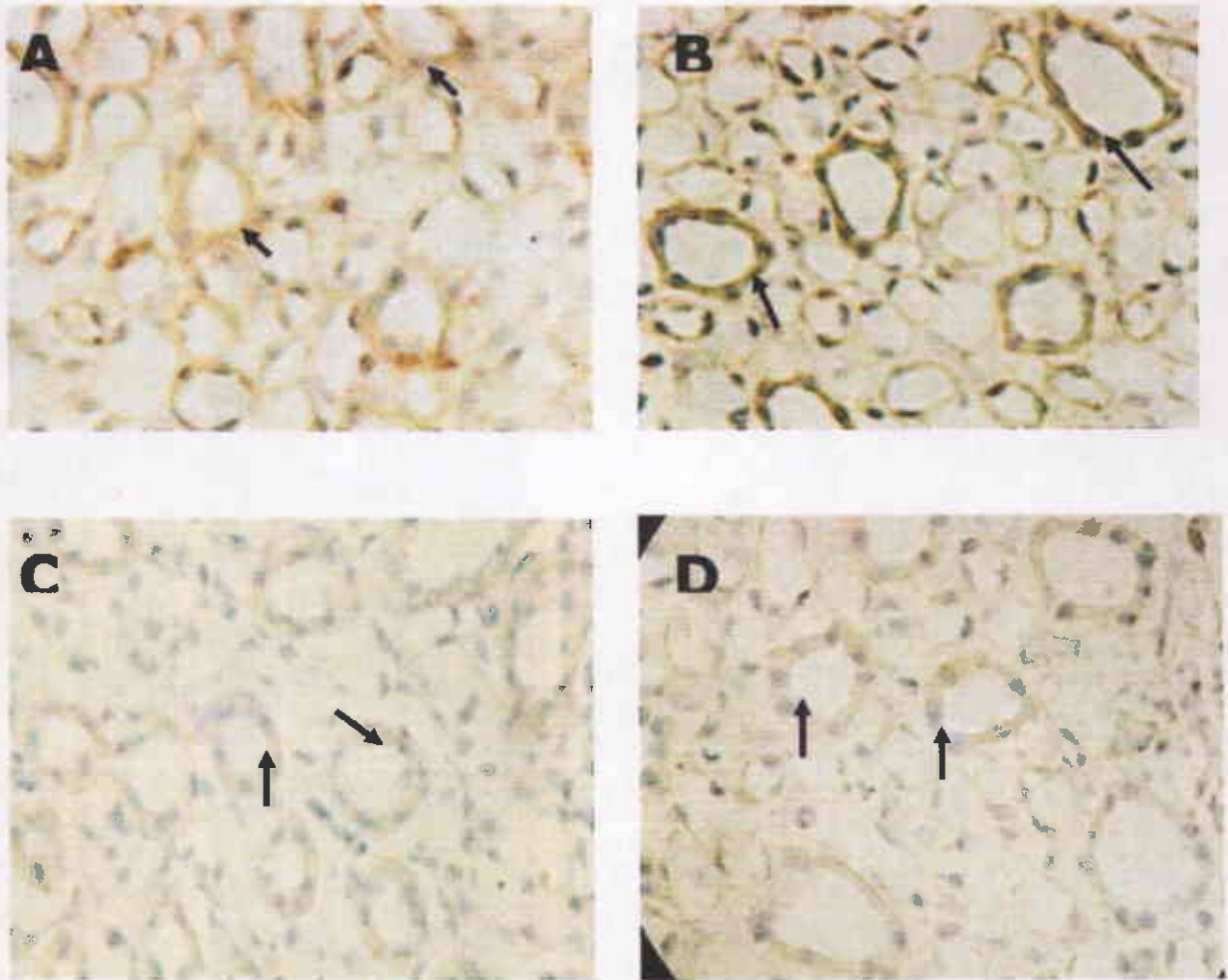


Figura 19. Inmunoperoxidasa indirecta para la familia de los canales HCN en cortes histológicos de la médula interna del riñón de la rata. HCN1 (A), HCN2 (B), HCN3 (C), HCN4 (D). La zonas tubulares de reactividad positiva se indican con las flechas (T:túbulo). Las imágenes fueron tomadas con un aumento de 40X.

Corteza renal

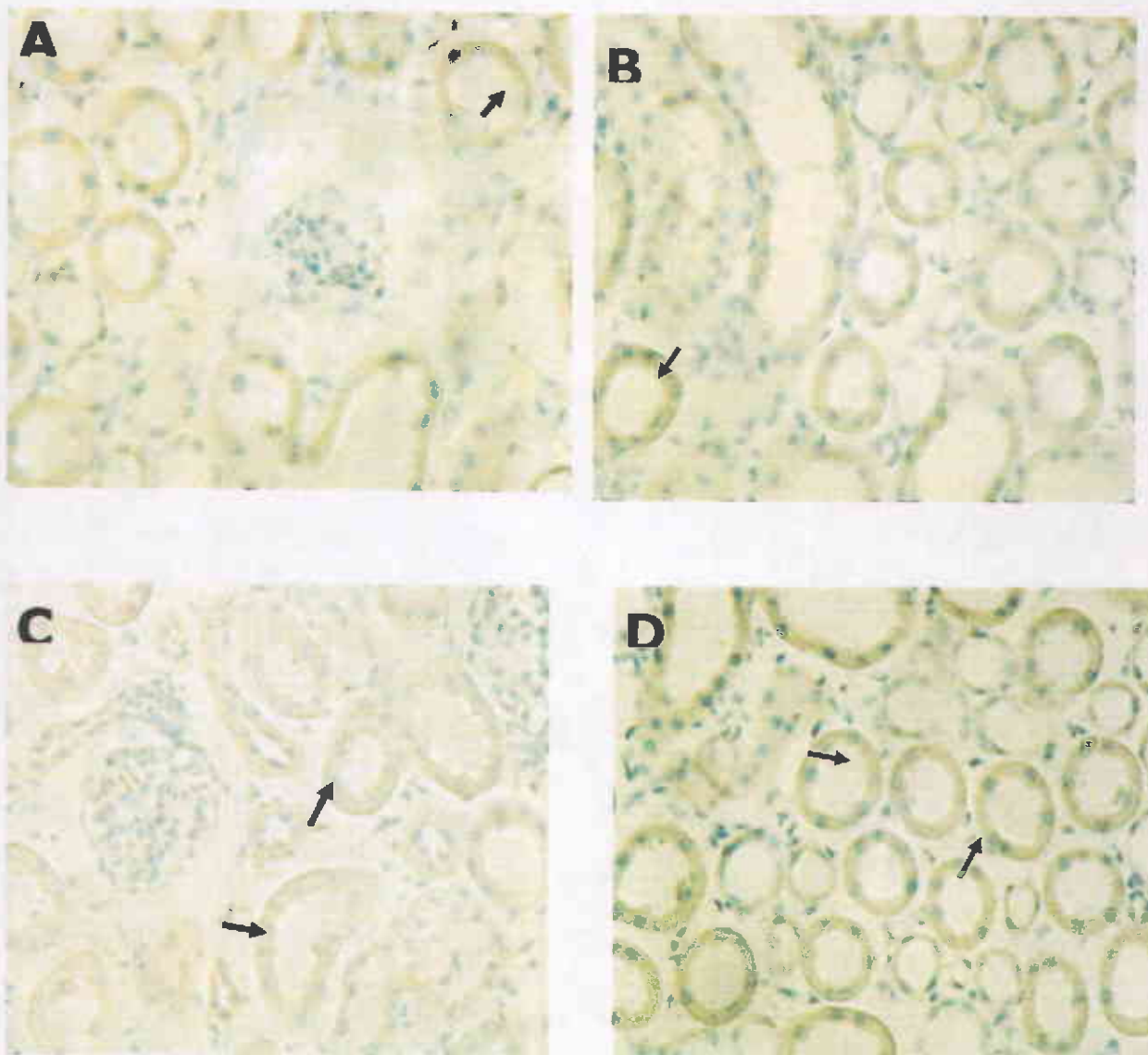


Figura 20. Inmunoperoxidasa indirecta para la familia de los canales HCN en cortes histológicos de la corteza del riñón de la rata. HCN1 (A), HCN2 (B), HCN3 (C), HCN4 (D). Las imágenes fueron tomadas con un aumento de 40X. Las regiones tubulares con reactividad positiva se indican con las flechas

Los resultados obtenidos en los ensayos anteriores demuestran por primera vez la presencia de la familia de canales HCN así como su abundancia relativa en la médula interna y la corteza del riñón de la rata.

En la figura 19 se observa que los cuatro miembros de la familia de los canales HCN están presentes en los túbulos colectores y las asas de Henle de la médula interna del riñón de la rata.

Las imágenes sugieren que el canal HCN1 y el canal HCN2 se encuentran en mayor abundancia, le sigue el canal HCN4 y por último el canal HCN3.

La figura 20 muestra la presencia de los cuatro miembros de la familia de los canales HCN en los túbulos de la corteza del riñón de la rata. En esta zona del riñón, es difícil discernir si los túbulos marcados son proximales o distales.

Los canales que muestran más abundancia en la corteza renal son el HCN2, el HCN4 y el HCN1; el HCN3 se expresa en menor cantidad. Los glomérulos no mostraron reactividad positiva para la familia de canales HCN.

Todos los canales HCN se observan en el citoplasma celular, tanto en la médula interna como en la corteza; sin embargo no excluye la posibilidad de que estos canales se expresen en las membranas celulares. Para determinar la presencia y la polaridad de estos canales en las membranas, se puede utilizar el anticuerpo dirigido contra la ATPasa Na^+/K^+ ya que esta proteína sólo se expresa en la membrana basolateral de los túbulos colectores. Por último, para determinar la proporción de los canales en las membranas plasmáticas y en las membranas microsomales, se puede realizar un western blot con las fracciones respectivas.

Para determinar la distribución de la familia de canales HCN en las diferentes regiones tubulares de la médula interna y la corteza renal se requiere de ensayos de inmunocolocalización con anticuerpos dirigidos contra algún marcador de la zona tubular específica. En la tabla 3 se muestran algunos marcadores específicos para los diferentes segmentos de la nefrona.

Tabla 3. Marcadores específicos de membrana plasmática a lo largo de la nefrona.

Segmento de la nefrona	Marcador específico	polaridad
Túbulo proximal	Receptor de angiotensina tipo II	Apical, basolateral y plasmática
Asa de Henle	Acuaporina 1 (AQP1)	Membrana apical y basolateral
Túbulo distal	Receptor de vasopresina tipo II (V2)	Membrana basolateral
Túbulo colector	Acuaporina 2 (AQP2)	Membrana apical

La mayoría de las investigaciones de la familia de canales HCN han estado enfocadas a definir su expresión, distribución y función en los tejidos excitables, por lo que resulta interesante descubrir que estos canales se expresan en tejidos epiteliales, como el riñón.

Con esto se generan nuevas perspectivas de investigación enfocadas a determinar la función que estos canales pueden tener en el riñón.

Para formular una hipótesis respecto a estos canales y su función fisiológica en el organismo revisaremos algunos trabajos previos.

Se observó que las ratas que son sometidas a dietas altas en sodio, tienen una menor expresión de RNA mensajero de canales CNG-3 (canales de sodio activados por nucleótidos cíclicos) en el riñón (Novaira y col. 2004). Esta investigación también demostró que la producción del transcrito del canal CNG3 aumenta con la administración de la aldosterona, principalmente en el túbulo colector lo que sugiere que este canal participa en la reabsorción del sodio.

El efecto de una dieta deficiente de sodio ha sido estudiada también en la expresión del transcrito de las subunidades alfa y gamma del canal EnaC (canal epitelial de sodio sensible a Amilorida) y del transportador Na^+/Cl^- (transportador sodio / cloro). Se observó un aumento en la expresión de los transcritos de la subunidad alfa del canal EnaC y del transportador Na^+/Cl^- (Masilamani y col, 2002).

La mayor parte del sodio filtrado en el glomérulo es reabsorbido a lo largo de la nefrona. En el túbulo proximal se reabsorbe aproximadamente el 60%, en el asa de Henle se reabsorbe un 25%, en el túbulo contorneado distal el 5 o 7 % y en el túbulo colector un 3-5%.

Basándonos en estos trabajos y en los resultados obtenidos en nuestro laboratorio, se propone que los canales HCN tienen un papel preponderante en la absorción de sodio. Para comprobar esta hipótesis es necesario realizar experimentos con ratas sometidas a dietas bajas y altas en sodio y comprobar si hay una diferencia en la expresión o en la distribución subcelular de los canales HCN a lo largo de la nefrona. También se deben realizar ensayos que nos permitan saber si la aldosterona ejerce algún efecto en la expresión o distribución subcelular de éstos.

Recientemente se demostró que los canales HCN2 se activan en condiciones de hipoosmolaridad. Este experimento consistió básicamente en realizar un registro de las corrientes de sodio por la técnica de voltage clamp en los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*, donde se coexpresaron el canal HCN2 con la acuaporina 1 (AQP1). La AQP1 permite la entrada de agua a la célula en condiciones hipoosmolares. Los resultados de este experimento mostraron que el hinchamiento celular aumenta la corriente entrante de los canales HCN2 en un 30%. Este trabajo también determinó que el aumento en la actividad del canal HCN2 es dependiente de la F actina del citoesqueleto (Calloe y col. 2005).

En contraparte a este reporte, el Dr. Bolívar de la Facultad de Medicina (UNAM) encontró que en condiciones de hipertonicidad, se incrementa una corriente entrante similar a las corrientes If de los canales HCN en las células de un cultivo primario del túbulo colector de la médula interna (comunicación personal).

Es probable que existan isoformas de los canales HCN en el riñón cuya farmacología y respuesta a la osmolaridad sea diferente a la de los canales HCN del corazón y del cerebro.

Mediante técnicas de voltage clamp en un cultivo primario de células de túbulo colector se puede determinar si la exposición de estas células a un medio hipoosmótico aumenta la corriente de los canales HCN.

El riñón es el órgano encargado de regular la osmolaridad del cuerpo. Las proteínas responsables de esta función son las acuaporinas, proteínas selectivas al paso de agua con una elevada permeabilidad (3×10^9 moléculas de agua por segundo) (Sánchez 2003). Estas proteínas se distribuyen ampliamente en el riñón como se muestra en la figura 22.

La reabsorción de agua está regulada por hormonas, entre las que podemos mencionar a la angiotensina II y a la vasopresina. La vasopresina controla la osmolaridad del organismo mediante la reabsorción de agua y sodio en los túbulos renales. Sus principales sitios de acción son el túbulo colector y el segmento grueso del asa de Henle (Tae-Hwan Kwon y col. 2004). Cuando el organismo necesita retener agua, estas hormonas estimulan la translocación de la acuaporina 2 del citoplasma a las membranas apicales de los túbulos colectores, lo que favorece la reabsorción de agua (Nielsen y col. 1995).

Estos antecedentes nos permiten proponer que los canales HCN funcionan como canales osmorreguladores en el riñón de la manera siguiente: el aumento de la cantidad de agua en la célula activaría a los canales HCN y con ello, la entrada de sodio. De esta manera se generaría un mecanismo sinérgico que permitiría la reabsorción de agua.

Para poder comprobar lo anterior, es necesario realizar diversos experimentos. Se deben realizar ensayos de coinmunolocalización de la familia de canales HCN en el riñón para determinar su coexpresión con las acuaporinas. También se debe realizar experimentos de inmunocolocalización de los canales de la familia HCN con receptores de angiotensina y vasopresina, para determinar si se coexpresan en la misma célula (véase figura 22). Esto nos daría pauta para investigar si las interacciones hormonales influyen en la expresión y/o función de los canales HCN en el riñón.

Un esquema aproximado que nos indica la localización de los canales HCN, las acuaporinas y los receptores a vasopresina y angiotensina se muestra a continuación:

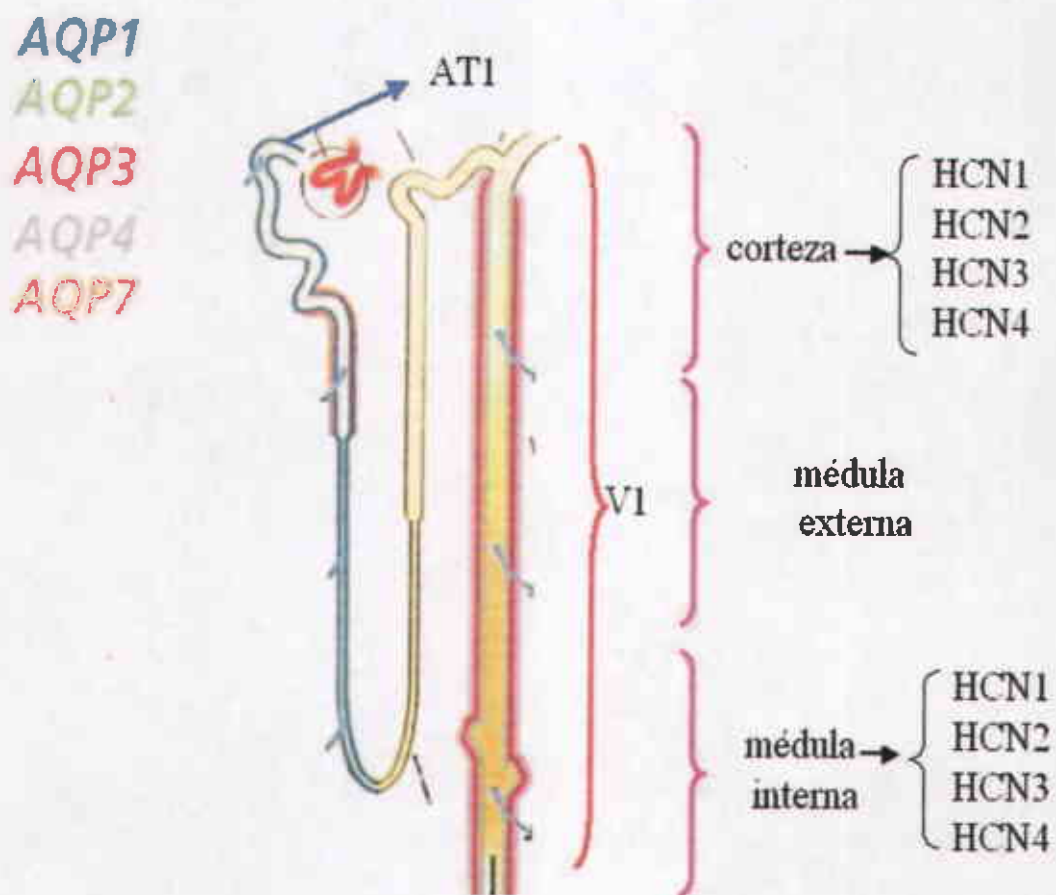


Figura 22. Distribución de las acuaporinas, el receptor de la vasopresina I (V1), el receptor de la angiotensina I (AT1) y los canales HCN en el riñón de la rata. (Modificado de Nielsen y col, 2002).

7. CONCLUSIONES.

- Se determinó por primera vez la presencia de las cuatro isoformas de la familia de los canales HCN en médula interna y corteza de riñón de rata mediante técnicas inmunohistoquímicas.

8. PERSPECTIVAS.

- Determinar la influencia de dietas bajas o altas en sodio en la expresión de las diversas isoformas de la familia de canales HCN en riñón de rata.
- Definir la distribución y polaridad de cada una de las isoformas de canales HCN en los diversos segmentos del riñón de rata.
- Obtener los patrones de heteromerización de los canales HCN en el riñón de rata.
- Señalar la influencia de factores hormonales (aldosterona) en la expresión de las isoformas de la familia de los canales HCN en el riñón de la rata.
- Determinar la coexpresión de canales HCN con acuaporinas en túbulo colector de riñón de rata y definir la función de estos canales como osmorreguladores.

9. REFERENCIAS.

- Aidley D. J., Stanfield P. R. 1998. "Ion channels molecules in action" first edition. Cambridge University Press.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. 1994. "Molecular biology of the cell" third edition. Garland Publishing. USA .
- Anderson SC, Cockayne S. 1995. Química Clínica. Interamericana-McGraw-Hill,.
- Boron W. F., Boulpaep E. L. 2003. "Medical physiology a cellular and molecular approach" first edition. Saunders, USA.
- Brewster AL, Bernard JA, Gall CM, Baram TZ. Formation of heteromeric hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels in the hippocampus is regulated by developmental seizures. 2005. *Neurobiol Dis.* 19: 200-207.
- Brown HF, DiFrancesco D. 1980. Voltage-clamp investigations of membrane currents underlying pace-maker activity in rabbit sino-atrial node. *J Physiol.* 308:331-51
- Cacheaux L, Topf N, Gareth R. 2005. Impairment of HCN channel function by the intravenous general anesthetic propofol *J Pharmacol Exp Ther.* .91801. (IN PRESS).
- Calloe K, Elmedyb P, Olesen SP, Jorgensen NK, Grunnet M. 2005. Hypoosmotic Cell Swelling as a Novel Mechanism for Modulation of Cloned HCN2 Channels. *J Biophysic* 89: 2159-2169.
- Castillo-Chaves Gabriela, CAI, Daniel y Solis Blanco Agustín. 2003. Implicaciones de los péptidos natriuréticos cardíacos en la insuficiencia cardíaca. *Rev costarric Cardiol.* 5: 39-50.
- Clapham DE. Not so funny anymore: pacing channels are cloned. 1998. *Neuron.* 21:5-7.
- Demontis G.C, Moroni A, Gravante B, Altomare C, Longoni B, Cervetto L, DiFrancesco D. Functional characterisation and subcellular localisation of HCN1 channels in rabbit retinal rod photoreceptors 2002. *J. Physiol.* 542: 89-97.

- DiFrancesco D. Cardiac pacemaker If current and its inhibition by heart rate-reducing agents. 2005. *Curr Med Res Opin.* 21: 1115-1122.
- Escobar LI, Martinez-Tellez JC, Salas M, Castilla SA, Carrizosa R, Tapia D, Vazquez M, Bargas J, Bolivar JJ. A voltage-gated K(+) current in renal inner medullary collecting duct cells. 2004. *Am J Physiol Cell Physiol.* 286:C965-74.
- Fain GL, Quandt FN, Bastian BL. Contribution of a caesium-sensitive conductance increase to the rod photoresponse 1978. *Nature.* 30:466-469.
- Guyton A., May J. E. 2001. "Tratado de fisiología médica" décima edición. Mc Graw-Hill Interamericana, México: 339-347.
- Hestrin S. The properties and function of inward rectification in rod photoreceptors of the tiger salamander. 1987. *J. Physiol.*390:319-33.
- Ishii TM. Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. 1999. *J. Biol. Chem.* 274:12835-39.
- Kaupp U, "Molecular diversity of pacemaker ion channels". 2001. *Annu Rev Physiol* 63:235-257.
- Kwon TH, Nielsen J, Knepper MA, Frokiaer J, Nielsen S. Angiotensin II AT1 receptor blockade decreases vasopressin-induced water reabsorption and AQP2 levels in NaCl-restricted rats. 2005. *Am J Physiol Renal Physiol* 288: F673-F684.
- Ludwing A, A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. 1998. *Nature* 393:587-91.
- Ludwing A, Zong X, Stieber J, Hullin R, Hofmann F, Biel M. Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. 1999. *EMBO J.* 18:23-29.
- Ludwing A, Zong X, Hofmann F, Biel M. Structure and function of cardiac pacemaker channels. 1999. *Cell Physiol Biochem.* 9: 179-186.
- Masilamani S, Wang X. Time course of renal Na-K-ATPase, NHE3, NKCC2, NCC, and ENaC abundance changes with dietary NaCl restriction. 2002. *Am J Physiol Renal Physiol.* 283:F648-57.

- Nielsen S, Chou CL, Marples D, Christensen EI, Kishore BK, and Knepper MA. Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. 1995. *Proc Natl Acad Sci.* 92: 1013-1017.
- Nielsen Soren, Jørgen Frøkiær, David Marples, Tae-Hwan Kwon, Peter Agre, and Mark a. Knepper Aquaporins in the Kidney: From Molecules to Medicine 2002. *Physiol Rev.* 82:205-244.
- Notomi T, Shigemoto R. Immunohistochemical localization of Ih channel subunits, HCN 1-4, in the rat brain. 2004. *J. comparative Neurology* 471: 241-276.
- Novaira HJ, Botelho BF, Goldenberg RC, Guggino SE, Morales MM. Modulation of renal CNG-A3 sodium channel in rats subjected to low- and high-sodium diets. 2004. *Biochim Biophys Acta.* 11:101-10.
- Peinado M. A., Pedrosa J. A., Rodrigo J. "Avances en inmunocitoquímica y técnicas relacionadas". 1996. primera edición. Universidad de Jaén, España.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. "Molecular cloning a laboratory manual" 1989. Book 3, second edition. Cold Spring Harbor laboratory press, USA.
- Sanchez JC. 2003. Acuaporina: proteínas mediadoras del transporte de agua. *Colomb Med.* 34: 1-8.
- Santoro B. Identification of a gene encoding a hyperpolarization activated pacemaker channel of brain. 1998. *Cell* 93:717-729.
- Schrier R. 1999. *Atlas of disease of the kidney. Curr. Med.*
- Zhong N, Beamunt V, Zucker S. Calcium Influx Through HCN Channels Does Not Contribute to cAMP-Enhanced Transmission. 2004. *J Neurophysiol.* 92: 644-647.

10. APÉNDICE

Protocolo de obtención y preparación de tejidos para inmunohistoquímica.

1. Se anestesia a la rata con cloroformo.
2. Sujetar a la rata en una tabla de disección.
3. Cortar piel, músculo y esternón para tener acceso inmediato al corazón.
4. Rasgar el pericardio.
5. Perforar el ventrículo izquierdo con una cánula de perfusión y se atraviesa el mismo hasta el interior de la aorta.
6. Se pinza la cánula al miocardio.
7. Se perfunde inmediatamente solución de PBS pH 7.4 helado
8. Se rasga la aurícula derecha para que por ahí salga la sangre y el líquido de perfusión.
9. El proceso de bombear PBS pH 7.4 helado a través de la rata se prolonga por un tiempo de 5 minutos
10. Se perfunde una solución fijadora de paraformaldehído al 4 % en PBS durante 5 minutos aproximadamente
11. Se obtienen los órganos (riñón y cerebelo)
12. Estos órganos son sumergidos en solución fijadora durante 6 horas a 4°C.
13. Se sumergen estos tejidos en una solución crioprotectora de sacarosa al 30% y se almacenan a 4°C hasta que la solución crioprotectora se haya incluido en los órganos, esto se puede observar de la siguiente manera: cuando el tejido está listo descenderá hasta el fondo del recipiente.

Obtención de cortes histológicos.

1. Se realizan los cortes necesarios en el riñón a fin de obtener la médula interna, externa o corteza, según sea el caso.

2. Los tejidos (médula y cerebelo) se recubren con medio para congelamiento de tejidos, que es una resina que solidifica a bajas temperaturas utilizada para poder crear un entorno sólido alrededor del tejido.
3. Se almacena en el criostato por dos horas hasta que se genera una temperatura de -25°C .
4. Los cortes se obtienen de $10\ \mu\text{m}$ de espesor y se colocan sobre portaobjetos previamente gelatinizados.
5. Se deja que los portaobjetos con los cortes sequen a temperatura ambiente por un periodo de 15 minutos.
6. En caso de no ocuparse inmediatamente los cortes, se pueden almacenar a -70°C .

Procedimiento inmunohistoquímico (inmunoperoxidasa indirecta)

1. Sumergir los tejidos previamente obtenidos en solución amortiguadora de PBS $0.02\ \text{M}$ pH 7.4 durante 10 minutos con agitación suave.
2. Bloquear la peroxidasa endógena mediante una incubación de 20 minutos con solución de bloqueo de peroxidasa endógena.
3. Lavar el tejido 3 veces con solución PBS durante 10 minutos cada una.
4. Aislar la zona del tejido en el portaobjeto mediante el uso de un aislante hidrófobo (edge - pen) con el propósito de utilizar la menor cantidad de solución de anticuerpo.

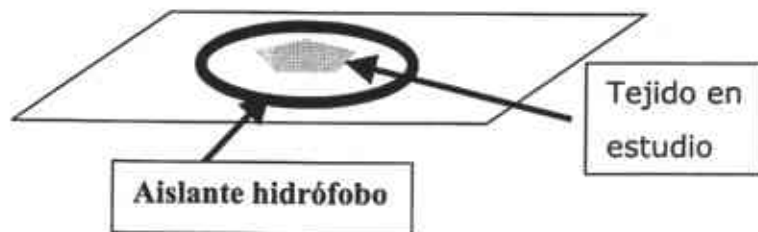


Figura 22. Portaobjeto listo para incubación.

5. Adicionar la cantidad suficiente de solución de anticuerpo primario a fin de cubrir el tejido (10 – 15 μ l).
6. Incubar durante 24 horas a 4°C con agitación suave.
7. Realizar 3 lavados con PBS – Tween 20 al 0.1 % con agitación suave a temperatura ambiente.
8. Incubar con la solución de anticuerpo secundario.
9. Esta incubación ser realiza durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave.
10. Lavar 3 veces con PBS – Tween 20 al 0.1 %.
11. Incubar en una solución de diaminobencidina al 0.03% w/v y H₂O₂ al 0.1% en PBS 0.02 M pH 7.4 durante 20 minutos.
12. Lavar 1 vez con PBS – Tween 20 al 0.1%.
13. Teñir los núcleos con Hematoxilina.
14. Deshidratar al tejido en un tren de deshidratación graduada de alcoholes (PBS – Etanol al 30% - Etanol al 60% - Etanol al 70% - Etanol al 80% - Etanol al 90% - Etanol 100% - Xilol Etanol (50-50) – Xilol (1 minuto en cada solución).
15. Montar las muestras en Permount.

10.1 Soluciones y reactivos utilizados

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 0.02 M.

Se prepara previamente una solución tampón de fosfatos (TF) 0.2 M pH 7.4 de la siguiente manera.

Preparar una solución ácida (A) pesando 27.6 g de NaH_2PO_4 monohidratada en 1 litro de agua desionizada.

Preparar una solución básica (B) pesando 71.7 g de Na_2HPO_4 dodecahidratado en 1 litro de agua desionizada.

Para obtener la solución tampón de fosfatos 0.2 M pH 7.4 (PBS) se mezclan 19 partes de la solución ácida más 81 partes de la solución básica.

Una vez preparado el TF, se procede a la preparación del PBS de la siguiente manera:

Disolver 800 mL de agua destilada, 8.76 g de NaCl, 200 mg de KCl y mezclar con 50 mL de TF., y una vez que la disolución sea correcta, ajustar el pH a 7.4, después aforar a 1 L con agua desionizada.

Por último, se debe filtrar la solución al vacío con un filtro de 0.2 μm

Solución para la fijación de tejidos (Paraformaldehído al 4% en PBS.)

Pesar 4g de paraformaldehído por cada 100 ml de solución fijadora a utilizar.

Calentar PBS 0.02 M pH 7.4 hasta 80°C

Adicionar el paraformaldehído cuidadosamente.

Agitar vigorosamente con agitador magnético.

La solución debe quedar translúcida, en caso de que no suceda así, adicionar unas gotas de NaOH.

Dejar enfriar a temperatura ambiente

Almacenar a 4°C

Nota: no almacenar más de 24 horas.

Solución crioprotectora de tejidos.

Pesar 30 g de sacarosa y disolver en 100 mL de (PBS 0.02 M pH 7.4 + paraformaldehído al 4%)

Solución para bloqueo de peroxidasa endógena (H₂O₂ al 3% en PBS).

Adicionar H₂O₂ al 3% v/v en PBS 0.02M.

Solución de PBS – Tween 20 al 0.1%

Mezclar 1 mL de Tween 20 por cada 999 mL de PBS 0.02 M pH 7.4

Solución para gelatinización de portaobjetos.

Pesar 5 g de gretina y 0.5 g de sulfato de potasio y cromo (potasio crómico) y disolver en 1 litro de agua desionizada a 60°C. Una vez que la solución esta homogénea, se colocan los portaobjetos en esta por un periodo de 15 segundos y se dejan secar a temperatura ambiente.

Solución de anticuerpo primario

- a) Triton X 100 al 0.3% v/v
- b) Tween 20 al 0.05% v/v
- c) Albúmina serica bovina 0.5 mg/ml
- d) Suero de cabra 3 gotas / 10 ml
- e) PBS 0.02 M pH 7.4 cbp 10 ml

Anticuerpo primario (IgG policlonal de conejo anti HCN de rata) Alomone labs. en una dilución 1: 50.

Solución de anticuerpo secundario

- a) Triton X 100 al 0.3% v/v
- b) Tween 20 al 0.05% v/v
- c) Albúmina serica bovina 0.5 mg/ml
- d) Suero de cabra 3 gotas / 10 ml
- e) PBS 0.02 M pH 7.4 cbp 10 ml
- f) Anticuerpo secundario (IgG de burro anti IgG de conejo)
Amersham Biosciences en una dilución 1: 100.

Solución de hematoxilina de Mayer. Electrón microscopy sciences: EMS

Esta solución se almacena a 4°C y se filtra antes de usarse.

Medio para congelamiento de tejidos Leica Microsystems.

Aislante hidrófobo Edge Pen Zymed labs.

Trenes de deshidratación.

Soluciones Etanol / H₂O al 30% v/v, 60% v/v, 70% v/v, 80% v/v, 90% v/v, Etanol absoluto, Xilol Etanol 50/50, y xilol.

Medio de montaje (permount) Electrón Microscopy Sciences.