



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

IDENTIFICACIÓN DE LA FAMILIA DE CANALES  
CATIONICOS HCN EN EL RIÑÓN

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA :  
Ricardo Saldaña Meyer

TUTORA  
Dra. Laura Escobar Pérez

2008





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.

## Hoja de Datos del Jurado

<p>1. Datos del alumno Saldaña Meyer Ricardo 56689971 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 404034317</p>
<p>2. Datos del tutor Dra. Leonila Irma Laura Escobar Pérez</p>
<p>3. Datos del Sinodal 1 Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade</p>
<p>4. Datos del Sinodal 2 Dra. Rocío Salceda Sacanelles</p>
<p>5. Datos del Sinodal 3 Dra. Marcia Hiriart Urdanivia</p>
<p>6. Datos del Sinodal 4 Dra. Norma Bobadilla Sandoval</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito Identificación de la Familia de Canales Catiónicos HCN en el Riñón 61 p 2008</p>

## ÍNDICE

PRÓLOGO.....	1
1. RESUMEN .....	2
2. INTRODUCCIÓN .....	4
2.1 MEMBRANA PLASMÁTICA .....	4
2.2 TRANSPORTE .....	5
2.3 CANALES IÓNICOS .....	7
2.4 CANALES ACTIVADOS POR VOLTAJE .....	9
2.5 CANALES DE POTASIO .....	11
2.6 CANALES CATIÓNICOS ACTIVADOS POR HIPERPOLARIZACIÓN Y MODULADOS POR NUCLEOTIDOS CICLICOS (HCN) .....	13
2.7 ANATOMIA Y FISILOGIA RENAL .....	19
2.8 FISILOGIA DEL IÓN SODIO .....	23
3. ANTECEDENTES.....	31
4. HIPÓTESIS .....	32
5. OBJETIVOS .....	32
6. METODOLOGÍA .....	33
6.1 WESTERN BLOT .....	33
6.2 INMUNOFLOURESENCIA .....	35
7. RESULTADOS .....	37
8. DISCUSIÓN .....	42
9. CONCLUSIONES .....	45
10. PERSPECTIVAS .....	46
11. REFERENCIAS .....	47
12. APENDICE .....	53
12.1 PROTOCOLOS EXPERIMENTALES .....	53
12.2 SOLUCIONES Y REACTIVOS .....	59

## PRÓLOGO

***Los canales iónicos son las máquinas moleculares que permiten a la células comunicarse con el mundo extracelular (Hille, 1992).***

La familia de canales catiónicos activados por hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos (HCN) han ganado una gran importancia en los campos de la neurobiología y la investigación cardiovascular. Se han realizado una cantidad de avances que han ayudado a conocer mejor sus propiedades farmacológicas y sus posibles aplicaciones en la medicina. Sin embargo, estudios recientes han reportado su presencia por primera vez en células  $\beta$ -pancreáticas y también en el riñón (El-Kholy, 2007; Bolivar, 2008), sugiriendo diferentes funciones para los canales HCN en tejidos no-excitables.

En esta tesis describiré el trabajo para ampliar la evidencia que se tiene de la presencia de la familia de canales HCN en el riñón de la rata. En la primera parte de esta tesis se introduce al lector sobre el transporte de solutos a través de las membranas celulares, las proteínas que están involucradas y los diferentes tipos de transporte que existen, detallando sobre las familias de canales iónicos que son más relevantes para este trabajo. En la segunda parte se describe de manera general la fisiología renal. Debido a que se tiene evidencia que los canales HCN generan una corriente entrante de  $\text{Na}^+$ , se hace especial énfasis en los mecanismos de reabsorción del  $\text{Na}^+$  en el riñón. En la última parte se muestran y se discuten los resultados obtenidos para poder proponer cual podría ser el papel de los canales HCN en un órgano como el riñón.

## 1. RESUMEN

Los canales catiónicos activados por hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos (HCN) participan en la generación y modulación de la actividad de marcapaso en el corazón y el cerebro (DiFrancesco, 1993). Los canales HCN tienen la misma topología y comparten una gran homología con las familias de canales de  $K^+$  sensibles al voltaje y activados por despolarización ( $K_v$ ). A pesar de que todos ellos comparten las mismas características fundamentales, los canales HCN difieren de los demás en dos puntos esenciales. Primero son más permeables al  $K^+$  que al  $Na^+$  (4/1) por lo que no son canales selectivos y segundo se activan a voltajes hiperpolarizantes. Esta familia de canales consta de cuatro miembros HCN1, HCN2, HCN3 y HCN4. Se conoce ampliamente la función de los canales HCN en el corazón y el cerebro.

Como antecedentes se tiene evidencia de la presencia de esta familia de canales en el riñón, en particular en el túbulo colector de la médula interna (TCMI): en un cultivo primario de TCMI se registró una corriente entrante denominada  $I_{vti}$ , que muestra una gran analogía con las corrientes  $I_f$  (corriente "funny") generadas por los canales HCN (Escobar, 2004). La corriente  $I_{vti}$  se activa a voltajes hiperpolarizantes (-60 mV), los canales no son selectivos (permean  $Na^+$  y  $K^+$ ) y la diferencia farmacológica más significativa es que la corriente no se bloquea con  $Cs^+$  (Bolívar, 2008), a diferencia de los canales HCN hasta ahora descritos.

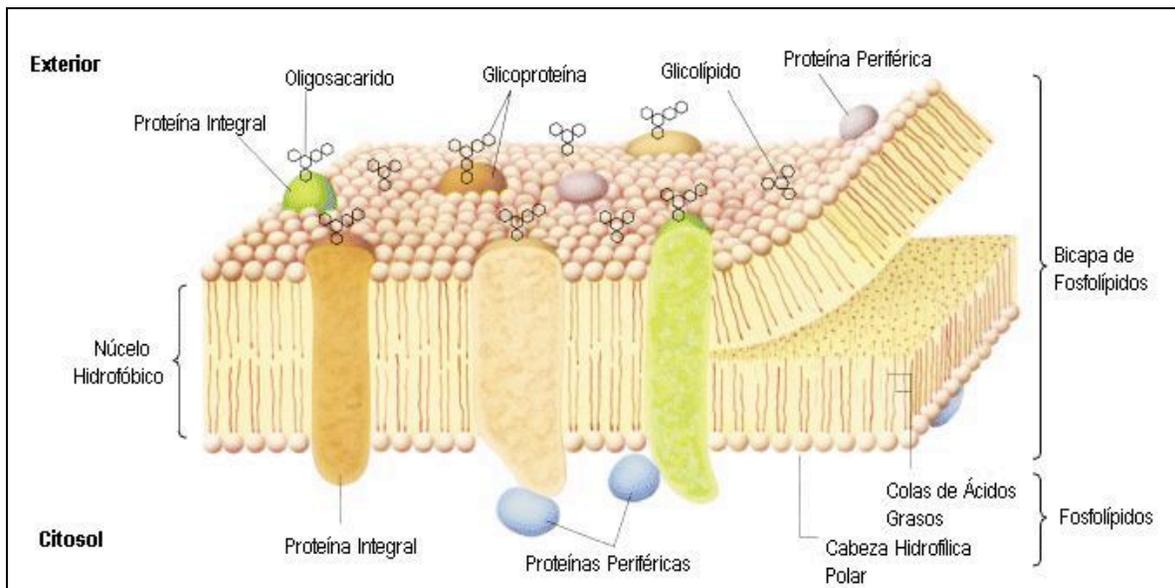
El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia y distribución de la familia de los canales HCN en el riñón de la rata. Se aplicaron técnicas inmunohistoquímicas y de microscopía confocal. Por la inmunofluorescencia indirecta se observó la presencia de todos los integrantes de la familia HCN. Sin embargo, sólo se pudo detectar la presencia del canal HCN3 por los ensayos de Western blot. Los canales HCN1 y HCN3 se observaron en las membranas apicales y los canales HCN2 y HCN4 en el citoplasma de las células de los túbulos en la corteza renal. El canal HCN4 fue el único que se localizó en la médula renal. Las propiedades biofísicas de estos canales sugieren que su papel fisiológico podría ser la reabsorción del  $Na^+$  y/o la regulación del volumen celular. Este trabajo contribuye a la confirmación de la presencia de una familia de canales iónicos que no se había reportado en los epitelios renales. Esto tendrá un gran impacto en el campo de la fisiología renal y ayudará a entender mejor los mecanismos de la homeostasis de  $Na^+$  y  $K^+$  en el riñón.

# PARTE I

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 MEMBRANA PLASMÁTICA

Las membranas biológicas definen los límites celulares y dividen a la célula en diferentes compartimentos. Las membranas están compuestas de lípidos y proteínas en combinaciones diferentes dependiendo de la especie, del tipo celular o del organelo del que se trate. Los lípidos son moléculas anfipáticas por lo que forman una doble capa de aproximadamente 5 nm de ancho, donde la cabeza hidrofílica esta viendo siempre hacia el exterior y las dos colas hidrofóbicas hacia el interior (fig. 1), permitiendo que la célula permanezca relativamente impermeable (Lodish, 2000).



**Figura 1. Arquitectura de la membrana plasmática (Lodish, 2000).** La bicapa de fosfolípidos es la estructura básica de las membranas celulares. Consiste en dos capas de fosfolípidos cuyas colas de ácidos grasos forman un interior hidrofóbico en el interior de la bicapa y las cabezas polares delimitan la superficie de ambos lados. Las proteínas integrales están embebidas en la membrana y las proteínas periféricas están asociadas con la membrana por medio de interacciones proteína-proteína. En la cara exterior glicoproteínas y glicolípidos.

El modelo del mosaico fluido de Singer y Nicholson describe características que son comunes para todas las membranas biológicas. Este modelo describe como:

- Las cadenas de ácidos grasos en el interior de la membrana forman una región hidrofóbica fluida.
- Las proteínas integrales flotan entre los lípidos, sostenidas por interacciones hidrofóbicas con sus aminoácidos no polares

- Tanto las proteínas como los lípidos son libres de moverse lateralmente en el plano de la membrana, pero el movimiento de cualquiera de una cara de la bicapa a la otra está restringido.
- Las proteínas se encuentran distribuidas de manera irregular a través de la membrana y las proteínas varían dependiendo de la membrana.
- Los grupos de carbohidratos unidos a algunas proteínas y lípidos están en a la cara extracelular de la membrana.

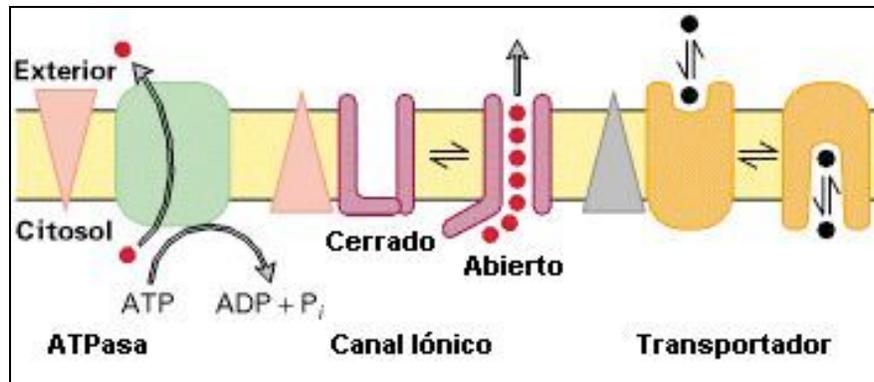
Existen dos tipos de proteínas en la membrana, las proteínas integrales y las proteínas periféricas. Las proteínas integrales están firmemente asociadas a la membrana con interacciones hidrofóbicas. Por otro lado, las proteínas periféricas están asociadas a la membrana a través de interacciones electrostáticas y también con puentes de hidrógeno con los dominios hidrofílicos de las proteínas integrales y con las cabezas polares de los lípidos de la membrana (Nelson, 2005)

## **2.2 TRANSPORTE**

Todas la células necesitan adquirir de su medio ambiente la materia prima para la biosíntesis y la producción de energía, y también liberar al medio los productos derivados de su metabolismo. Aunque unos cuantos compuestos no polares pueden disolverse en la capa lipídica y atravesar la membrana sin ayuda, para el paso de compuestos polares, cargados o de iones es esencialmente necesaria la presencia de una proteína de membrana, para el movimiento de un lado de la membrana a otro. (Nelson, 2005)

El transporte a través de la membrana se puede dividir en difusión simple, transporte activo y transporte pasivo. La difusión simple sucede cuando una molécula pequeña en solución se disuelve dentro de la bicapa de fosfolípidos, la atraviesa y luego se disuelve en la solución acuosa en el lado opuesto. En este proceso no hay proteínas involucradas y la tasa de difusión de la sustancia a través de la membrana es proporcional al gradiente de concentración y su hidrofobicidad.

Las proteínas de membrana que transportan moléculas a través de la membrana se pueden dividir en tres grandes grupos, las ATPasas, los canales iónicos y los transportadores (fig. 2).



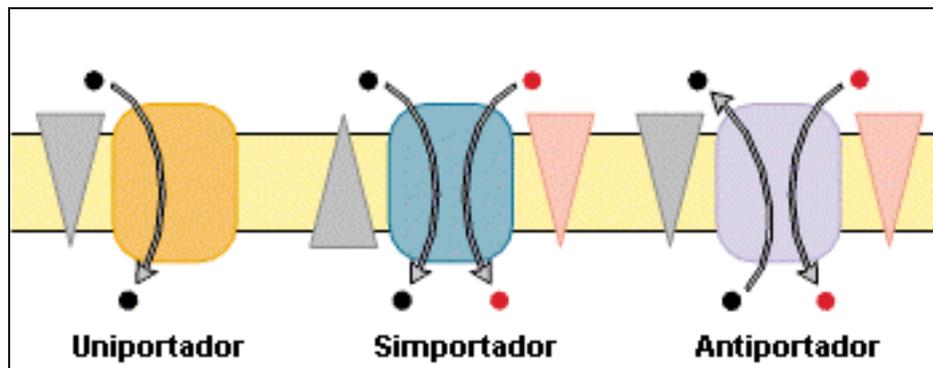
**Figura 2. Los tres tipos de proteínas involucradas en el transporte (Lodish, 2000).** Los gradientes se muestran con flechas apuntando hacia la menor concentración, potencial eléctrico o ambos. Las ATPasas utilizan la energía liberada de la hidrólisis del ATP para potenciar el movimiento de iones (círculos rojos) o moléculas pequeñas contra el gradiente electroquímico. Los canales iónicos catalizan el movimiento de iones o agua a favor del gradiente electroquímico. Los transportadores facilitan el movimiento de moléculas pequeñas o iones (círculos negros).

Las ATPasas también llamadas bombas utilizan la hidrólisis de ATP para el movimiento de iones y otros solutos en contra del gradiente de concentración. Éste tipo de movimiento se conoce como transporte activo, donde dos reacciones químicas una energéticamente desfavorable, a su vez esta asociada a otra reacción energéticamente favorable como puede ser la hidrólisis de ATP a ADP y Pi. La energía libre de Gibbs total, es decir la energía que puede utilizar el sistema, de estas dos reacciones asociadas permite que la proteína pueda transportar solutos en contra del gradiente de concentración o del potencial de membrana.

Los canales iónicos transportan agua o iones específicos a favor de su gradiente electroquímico, es decir son reacciones energéticamente favorables y a esto se le conoce como transporte pasivo. Estos canales forman una vía a través de la membrana por la que pueden pasar una gran cantidad de iones o moléculas de agua a una tasa muy rápida, puede llegar a ser de  $10^8$  moléculas por segundo.

Por último los transportadores, éstos a diferencia de los canales iónicos solo pueden mover una o unas cuantas moléculas a la vez. Después que el sustrato se une al transportador este último sufre un cambio conformacional al unirse a las moléculas del sustrato, de manera que solamente estas moléculas se pueden transportar al otro lado de la membrana. Como los transportadores requieren sufrir un cambio conformacional cada vez que mueven su sustrato de un lado de la membrana al otro, estos tienen una tasa de transporte más lenta que los canales iónicos, que es de alrededor  $10^2$  a  $10^4$  moléculas por segundo (Lodish, 2000).

Se conocen tres tipos de transportadores (fig. 3). Los uniportadores que transportan una molécula a la vez a favor del gradiente de concentración. Por otro lado, los cotransportadores (simportadores y antiportadores) catalizan el movimiento de un ion o de una molécula pequeña en contra del gradiente de concentración asociado al movimiento de una molécula o de un ion diferente a favor del gradiente de concentración, por esto se les conocen como “transportadores activos”. Al igual que las ATPasas, los simportadores y los antiportadores actúan como mediadores entre una reacción energéticamente desfavorable asociada a otra reacción energéticamente favorable, pero a diferencia de las ATPasas utilizan la energía del gradiente electroquímico (Lodish, 2000).



**Figura 3. Los tres tipos de transportadores (Lodish, 2000).** Existen tres tipos de transportadores. Los uniportadores que transportan un solo tipo de molécula a favor del gradiente de concentración. Las proteínas cotransportadoras (simportadores y antiportadores) catalizan el movimiento de una molécula en contra de su gradiente de concentración (círculos negros), potenciados por el movimiento de uno o más iones a favor de su gradiente electroquímico (círculos rojos). Los dos tipos de cotransportadores difieren en la dirección relativa en que la molécula transportada y el ion cotransportado se mueven.

## 2.3 CANALES IONICOS

### Historia

El concepto de canal iónico existió por muchos años antes de que fuera posible examinar sus propiedades como entidades individuales. Alan Hodgkin y Andrew Huxley en 1952 realizaron el estudio clásico sobre la naturaleza del impulso nervioso, describieron matemáticamente el flujo de los iones del  $\text{Na}^+$  y del  $\text{K}^+$  a través de la membrana del axón. Encontraron que el potencial de membrana y las corrientes iónicas están fuertemente relacionados. Parecía que los cambios en la permeabilidad iónica estaban asociados con el movimiento de algunas partículas cargadas eléctricamente a través de la membrana.

Hodgkin y Keynes en 1955 investigaron la permeabilidad del  $\text{K}^+$  en los axones y encontraron que los movimientos del  $\text{K}^+$  radioactivo a través de la membrana se podía explicar mejor si lo iones pasaban

a través de poros estrechos en un sola línea. Desde entonces se empezó a usar la palabra canal para describir este fenómeno.

La membrana plasmática actúa como una barrera para separar los contenidos celulares de los extracelulares, de esta manera las concentraciones iónicas dentro y fuera de la célula se pueden mantener a niveles diferentes. Debido a esto, existe una diferencia de potencial eléctrico entre el citoplasma y el medio externo. Los canales iónicos son componentes esenciales en la actividad de las células. Están presentes en las membranas de la célula y permiten el paso de iones particulares de un lado hacia el otro. Los factores involucrados para que los canales se abran o se cierren para controlar el movimiento iónico se conoce con el término de propiedades de compuerta. (Aidley, 1998).

### **Función**

Un canal iónico esta formado por una o más proteínas. Los canales contienen un poro central que se abre mediante un cambio conformacional y así permite que los iones fluyan a través del canal de un lado de la membrana hacia el otro. Este movimiento iónico crea una corriente eléctrica suficiente para su medición, por lo tanto es posible observar la actividad de un canal individualmente y también de una molécula o complejo molecular.

Los canales presentan una gran variación en las propiedades de compuerta. Algunos canales se abren por una combinación con moléculas dentro o fuera de la célula, como pueden ser los neurotransmisores o los mensajeros citoplásmicos. Otros canales se abren por cambios en el voltaje a través de la membrana, y otros por estímulos sensoriales de varios tipos. También los canales presentan selectividad para los iones a los que son permeables. Algunos permiten el paso de un solo ión, como el  $\text{Na}^+$  o el  $\text{K}^+$ , y algunos permiten el paso de más de un ión, como cationes monovalentes o cationes en general. (Aidley, 1998).

### **Tipos de Canales**

Existe una gran variedad de canales iónicos, los cuales son descritos comúnmente en términos de su selectividad iónica y sus propiedades de compuerta.

Se clasifican por su selectividad iónica como:

### Canales Catiónicos

- Canales de sodio
- Canales de potasio
- Canales de calcio
- Canales catiónicos no selectivos

### Canales Aniónicos

- Canales de cloro

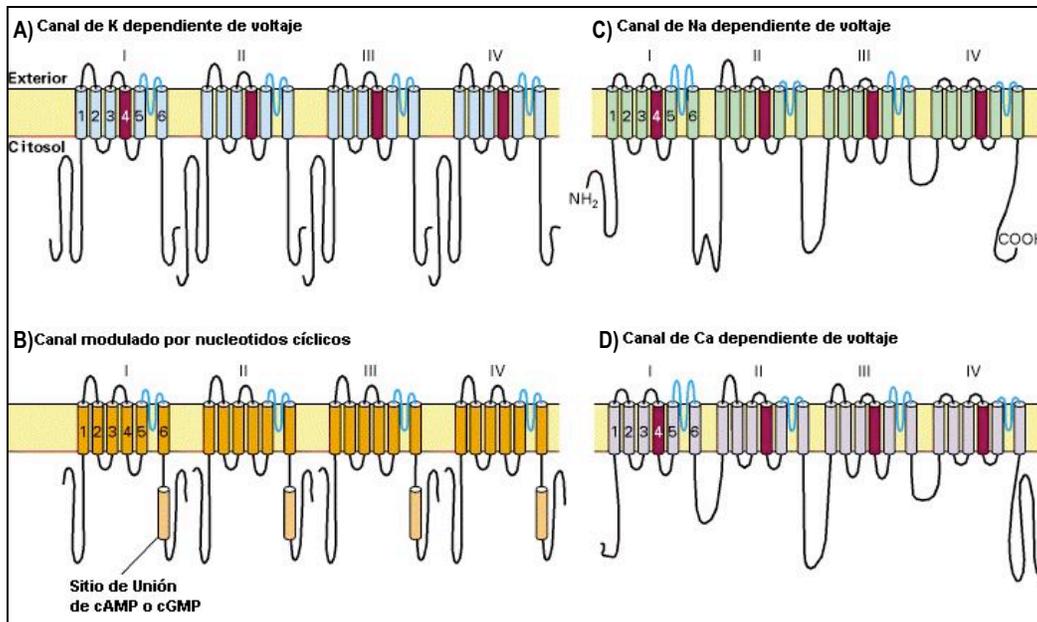
De acuerdo a la regulación de las propiedades de compuerta los canales pueden agruparse en (Aidley, 1998):

- A. Canales regulados por ligando (neurotransmisores como la acetilcolina, el glutamato, la glicina, el GABA, la serotonina, etc.).
- B. Canales sensibles al voltaje.
- C. Canales sensibles a la tensión (presión osmótica, curvatura de membrana).
- D. Canales de uniones celulares

## **2.4 CANALES IÓNICOS SENSIBLES AL VOLTAJE**

Los canales activados por voltaje son parte de una superfamilia de canales iónicos, que abarcan mas de 140 proteínas relacionadas formadoras de poros (Yu y Catteral, 2004). Los miembros de esta superfamilia tienen un papel determinante en el mantenimiento de la homeostasis en el riñón y muchos otros tipos celulares y además participan en las rutas de señalización de  $Ca^{2+}$  en las células excitables y no-excitables. Gracias a su importancia en muchos aspectos de la regulación celular y la transducción de señales, los canales iónicos activados por voltaje son el blanco molecular para una gran variedad de toxinas biológicas con aplicaciones médicas, en las que se incluyen toxinas que modifican las propiedades de compuerta y que alteran la cinética y la dependencia por el voltaje para su activación o inactivación (Catteral, 2006).

Los canales sensibles al voltaje que generan potenciales de acción han sido clonados casi en su totalidad y presentan una estructura muy similar.



**Figura 4. Los diferentes tipos de canales sensibles al voltaje (Lodish et al, 2000).** A) El canal de K<sup>+</sup> sensible al voltaje es un tetramero con cuatro subunidades idénticas cada contiene 656 amino ácidos y seis α-hélices transmembranales (indicadas por números arábigos). La hélice 4 (en café) actúa como el sensor de voltaje y los segmentos que unen a las hélices 5 y 6 delimitan al poro. B) Los canales modulados por nucleótidos cíclicos también tienen cuatro subunidades. Ninguna de sus α-hélices actúa como sensor de voltaje, por lo que estos canales no son sensibles al voltaje. Sin embargo, pueden unir AMPc o CMPC a un segmento citosólico que causa la apertura de estos canales. C, D) Los canales de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> sensibles al voltaje son proteínas monoméricas de 1800-2000 amino ácidos organizados en cuatro dominios transmembranales homólogos (indicados por números romanos)

Un canal de K<sup>+</sup> sensible al voltaje típico contiene cuatro copias de un polipéptido de aproximadamente 600 aminoácidos, cada uno con seis dominios transmembranales con una estructura de α-hélice. En contraste, los canales de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> están formados por un solo polipéptido de aproximadamente 2000 aminoácidos con cuatro dominios transmembranales homólogos, cada uno similar al canal de K<sup>+</sup> en estructura y secuencia (fig. 4). Estos dominios están conectados por fragmentos más pequeños no-homólogos (Lodish, 2000).

Los canales de K<sup>+</sup> sensibles al voltaje se abren cuando la membrana se despolariza, por lo que algún segmento de la proteína debe “sentir” el cambio de potencial. Las mediciones eléctricas que se han realizado sugieren que la apertura de cada canal de K<sup>+</sup> esta acompañada por un movimiento de cuatro a seis residuos de aminoácidos con cargas positivas de la proteína. Este movimiento se da de la superficie citosólica hacia la parte exoplásmica de la membrana, al mismo tiempo un número más grande de residuos cargados positivamente deben moverse una distancia corta a lo largo de la membrana. Este movimiento de cargas bajo la fuerza del campo magnético que generan, se piensa que son la causa del cambio conformacional en la proteína que resulta en la apertura del canal. Hay un sensor de voltaje en el dominio transmembranal 4 (S4) en los canales de K<sup>+</sup> pero también se

observan dominios S4 similares en canales de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles al voltaje. Con las mutantes “*shaker*” de *Drosophila melanogaster*, una cepa que presenta temblores debido a que tiene una mutación en el gen de un canal de  $\text{K}^+$  sensible al voltaje, se logró demostrar el papel del sensor de voltaje con estudios realizados en canales de  $\text{K}^+$  producidos por mutagénesis dirigida de uno o varios aminoácidos en el S4 (Catteral, 2006).

Las similitudes entre los canales de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles al voltaje sugieren que estas tres proteínas evolucionaron de un gen ancestral en común. Estas son algunas de estas similitudes (Lodish, 2000):

- Se abren cuando la membrana se despolariza.
- El sensor de voltaje S4 en los tres tipos de canales tienen una lisina o una arginina cargada positivamente cada 3 o 4 residuos.
- Los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  tienen una amplia homología a lo largo de su secuencia. Cada uno contiene cuatro dominios transmembranales con seis  $\alpha$ -hélices y un segmento H5 que constituye el filtro de selectividad del poro en cada dominio. La topología transmembranal de los canales de  $\text{K}^+$  que son mucho más pequeños, es similar a la de cada dominio de los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ .

Los canales de  $\text{K}^+$  se han encontrado en todas las levaduras y protozoarios que se han estudiado hasta el momento. Por otro lado, los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  están presentes en solo algunos de los protozoarios más complejos, como *Paramecium*, y solo los organismos multicelulares presentan canales de  $\text{Na}^+$ . Por lo tanto, los canales de  $\text{K}^+$  probablemente surgieron primero en la evolución. Mientras que los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  evolucionaron por eventos de duplicación de un gen que codificaba para un dominio ancestral de un canal de  $\text{K}^+$  (Lodish, 2000).

## 2.5 CANALES DE POTASIO

Los canales de  $\text{K}^+$  se encuentran de manera constante en los reinos animal y vegetal, así como en las levaduras y en las bacterias (Hille, 1992). Los canales selectivos a  $\text{K}^+$  forman la superfamilia más extendida en los organismos vivos. Se han identificado más de 200 genes que codifican para diferentes proteínas relacionadas con los canales de  $\text{K}^+$  (Shieh, 2000). Estos canales exhiben una heterogeneidad extraordinaria en todos estos organismos pero preservan sus características

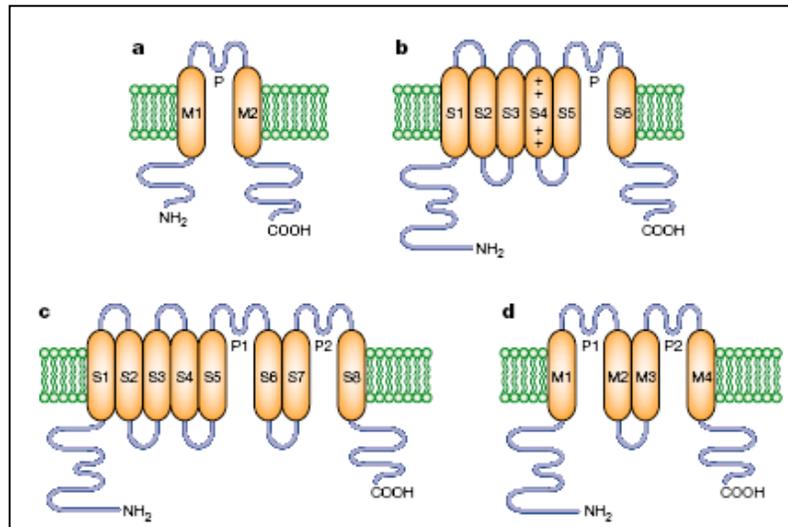
básicas. Se clasifican en canales sensibles al voltaje (Kv), dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ ) y rectificadores entrantes ( $\text{K}_{\text{ir}}$ ) (Coetzee, 1999). Además se pueden agrupar dependiendo del número de segmentos transmembranales de la subunidad alfa que forma el poro del canal (fig. 5; Shieh, 2002). Los canales de  $\text{K}^+$  participan en el control del flujo del  $\text{K}^+$ , la regulación del volumen celular, la liberación de hormonas y transmisores, el potencial de reposo y la excitabilidad de las neuronas y los músculos.

Estos canales pueden ser regulados por cambios en el

potencial de membrana, por el estado metabólico de la célula o por transmisores y hormonas (Hille, 1992). Este

tipo de regulación contribuye a la señalización entre las neuronas y los mecanismos de protección celular durante situaciones de estrés, como pueden ser la anoxia o la isquemia. Gracias a estas características, una gran variedad de agentes que aumentan o disminuyen la actividad de los canales de  $\text{K}^+$  han sido usados en la medicina como agentes contra la isquemia, anti-arritmicos, anti-angina y anti-hipertensivos.

La importancia de los canales de  $\text{K}^+$  se hace evidente al observar las consecuencias patológicas de las mutaciones en estos canales y en sus proteínas moduladoras. Se han podido asociar mutaciones en los genes de canales de  $\text{K}^+$  con muchas patologías neurológicas, como por ejemplo el síndrome de ataxia episódica (Browne, 1994; Adelman, 1995) y arritmias cardíacas (Curran, 1995; Sanguinetti, 1995). Las mutaciones en el gen del receptor a sulfonilureas, una subunidad  $\beta$  del canal de  $\text{K}^+$  sensible a ATP en el páncreas, es la causa del hiperinsulinismo neonatal que es la más común de la hipoglicemia persistente infantil (Inagaki, 1995; Thomas, 1995). Existen un sin número de ejemplos de patologías asociadas a estos canales. Sin embargo, lo importante es que estas anomalías fisiológicas causadas por mutaciones en varios genes de canales Kv ha facilitado la clonación de



**Figura 5. Las cuatro clases de canales de  $\text{K}^+$  (Shieh, 2002).** a) Los canales 2TM/P consisten de 2 hélices transmembranales (TM) con un asa P entre ellas. Ejemplos de este tipo son los canales rectificadores entrantes de  $\text{K}^+$  y canales bacterianos de  $\text{K}^+$  como el KcsA. b) Los canales 6TM/P son la clase predominante de los canales de  $\text{K}^+$  modulados por ligando y los sensibles a voltaje. c) Los canales 8TM/P son un híbrido de los canales 6TM/P y los 4TM/2P, fueron descritos por primera vez en levadura. d) Los canales 4TM/2P consisten en la repetición de dos canales 2TM/P.

varios de estos canales en *Drosophila* y de sus homólogos en otras especies (Jan & Jan, 1992, Gantenzky, 1995).

## **2.6 CANALES CATIÓNICOS ACTIVADOS POR HIPERPOLARIZACIÓN Y MODULADOS POR NUCLEÓTIDOS CÍCLICOS (HCN)**

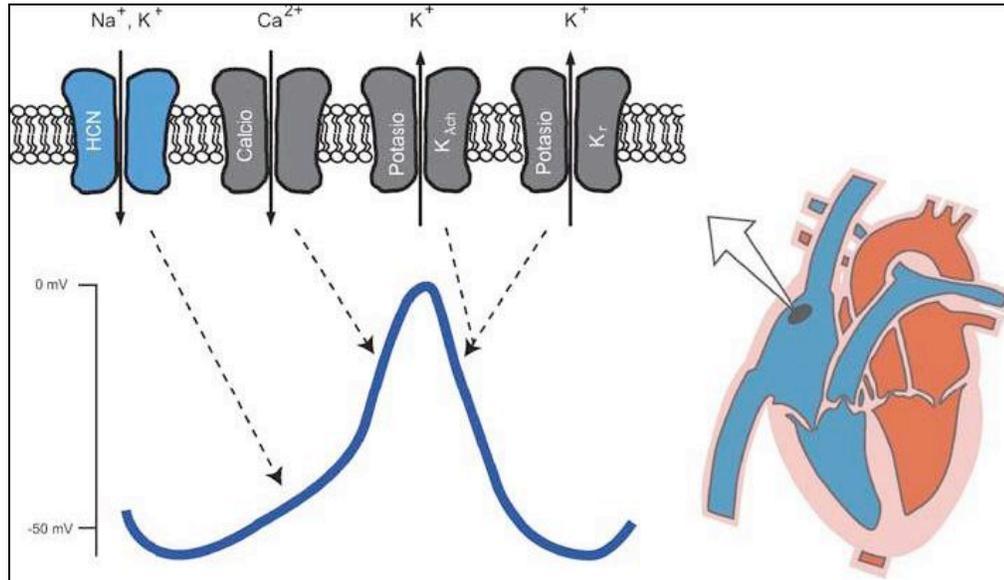
Los canales catiónicos activados por hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos (HCN) tienen la misma topología y comparten una gran homología con la familia de canales Kv. Sin embargo, los canales HCN difieren de los Kvs en dos puntos esenciales: (1) no son canales selectivos porque pueden permear  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  (con una proporción 1:4 vs. 1:100 de los canales de  $\text{K}^+$ ; DiFrancesco, 1981), a pesar de tener en el poro el mismo motivo GYG en el filtro de selectividad, que esta conservado en todos los canales de  $\text{K}^+$  y (2) se activan por hiperpolarización en vez de ser activados por despolarización, a pesar que también tienen un segmento S4 cargado positivamente característico de los Kvs (Ludwig, 1999). Además los canales HCN tienen un dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD) en el carboxilo terminal el cual modula la cinética de activación de los canales a voltajes más positivos (Zagotta, 1996).

La primera descripción de una corriente entrante activada por hiperpolarización en preparaciones de células del nódulo sinoauricular (Brown, 1979), fue la primera evidencia de un mecanismo capaz de generar actividad espontánea. La corriente "marcapaso" fue nombrada "funny" ( $I_f$ , por su nombre en inglés) por tener la propiedad atípica de ser una corriente entrante que se activa lentamente por hiperpolarización después de un potencial de acción cardiaco.

Desde entonces, los canales HCN han sido ampliamente investigados por sus propiedades de marcapaso en preparaciones cardiacas y no-cardiacas, por lo que también se le conoce como  $I_h$  (por heart en inglés; DiFrancesco, 2006). Debido a que los canales HCN son activados por hiperpolarización esto permite que el potencial de acción cardiaco se regenere. A pesar de que los canales HCN son más selectivos por el  $\text{K}^+$  que por el  $\text{Na}^+$ , en condiciones fisiológicas no se presentan altas concentraciones de  $\text{K}^+$  extracelular, por lo que los canales HCN se comportan como canales de  $\text{Na}^+$ ; el influjo de los iones  $\text{Na}^+$  a la célula genera una corriente entrante, cuando los canales HCN se abren. El rango de voltaje para su activación es muy variable y depende tanto de moduladores como de factores estructurales (Ludwig, 1998).

### Actividad de Marcapaso

Los canales HCN en el nódulo sinoauricular del corazón se activan por la hiperpolarización de la membrana después de un potencial de acción. Una vez activados, los canales producen una corriente entrante de  $\text{Na}^+$  y despolarizan a la célula hacia el umbral de activación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles al voltaje, que a su vez generan un nuevo potencial de acción. Una vez que se llega a la meseta, cerca del equilibrio electroquímico del ion  $\text{Ca}^{2+}$ , se cierran los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y la permeabilidad de la membrana al  $\text{K}^+$  aumenta rápidamente con la apertura de los canales de  $\text{K}^+$ , regresando así al voltaje de reposo (fig. 6). De esta manera se generan potenciales de acción de manera rítmica (Guyton, 2001).



**Figura 6. Esquema del potencial en el nódulo sinoauricular (Craven, 2006).** Se muestran el nódulo sinoauricular del corazón (ovalo negro) y los canales iónicos responsables de la actividad de marcapaso (arriba a la izquierda), cada canal contribuye a una fase del potencial de acción sinoauricular, cada fase se indica con líneas punteadas.

### Localización

Los canales HCN están ampliamente distribuidos en los tejidos excitables, la tabla 2 resume la distribución reportada hasta el momento de cada una de las isoformas:

	<u>Localización</u>
<u>HCN1</u>	Neuronas periféricas y centrales (hipocampo, cerebelo, neocorteza, ganglios de la raíz dorsal, células gustativas, fotorreceptores) nódulo sinoauricular y células $\beta$ -pancreáticas*.
<u>HCN2</u>	Neuronas periféricas y centrales, retina (células bipolares), células cardíacas y células $\beta$ -pancreáticas*.
<u>HCN3</u>	Cerebro, retina (células bipolares) y células $\beta$ -pancreáticas*.
<u>HCN4</u>	Tálamo, retina (células bipolares), bulbo olfativo, nódulo sinoauricular, células gustativas, testículos y células $\beta$ -pancreáticas*.

Tabla 2. Distribución regional de la familia de canales HCN en la rata (Hofmann, 2005;\* EIKoly, 2007).

### Clonación

A pesar de que la corriente  $I_f$  es de gran importancia y se genera frecuentemente en los tejidos excitables, los canales responsables de esta corriente no fueron clonados hasta tiempo después de su descripción original,. Aunque muchos laboratorios hicieron esfuerzos para encontrar las bases moleculares de estos canales, la clonación del primer miembro de los canales relacionados con la  $I_f$  se logró en 1997 por Santoro y sus colaboradores. La secuencia que se identificó mostró las características de un canal Kv con seis dominios transmembranales, una  $\alpha$ -hélice cargada en el S4 y un dominio de unión a los nucleótidos cíclicos (CNBD) en el carboxilo-terminal intracelular. Después de esta secuencia se identificaron otras isoformas (Gauss, 1998; Ludwig, 1998; Vaccari, 1999; Ishii, 1999; Seifert, 1999). Desde entonces, este grupo de canales se conoce como la familia de canales activados por hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos (HCN), con cuatro miembros (HCN1, HCN2, HCN3 y HCN4) y que pertenece a la superfamilia de los canales Kv (Jan, 1997) con los que comparten muchas propiedades.

### Cinética y modulación por nucleótidos cíclicos

En lo que respecta a la cinética de activación, los cuatro canales de la familia HCN tienen distintas características. El canal HCN1 es el primero en activarse a valores de -69.5 mV y el HCN4 es el que

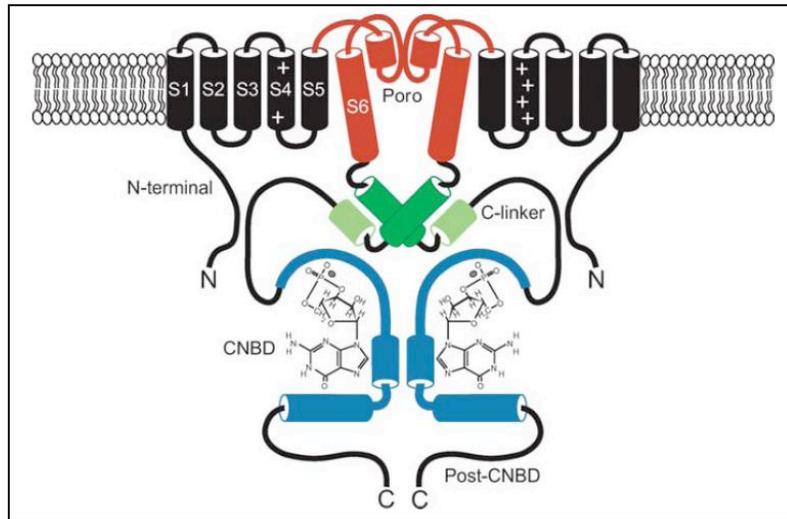
se activa a los voltajes más hiperpolarizantes de -100.5 mV. El HCN2 y el HCN3 tienen una activación intermedia de -95.5 mV y -77 mV, respectivamente.

Las características farmacológicas propias para la familia de los canales HCN son:

- El cesio bloquea rápida y reversiblemente a todos sus integrantes con una constante de inhibición ( $K_i$ ) de 1 a 2 mM. Esto quiere decir que, el sitio de unión al canal se encuentra en la cara extracelular permitiendo que se bloquee inmediatamente.
- ZD7288 un bloqueador relativamente específico de la corriente nativa  $I_f$ , los bloquea lenta e irreversiblemente, requiriendo entre 3 y 4 minutos para alcanzar una inhibición estable (Stieber, 2005). Esta última característica se debe a que el ZD7288 ejerce su efecto en la cara intracelular del canal, ya que el bloqueo ocurre en unos cuantos segundos en experimentos con un “sello invertido”, es decir cuando la orientación de las caras intracelular y extracelular de la membrana se invierten (Shin, 2001).
- Otra característica esencial de estos canales es que son modulados por AMPc. Los canales HCN1, HCN2 y HCN4 son modulados por AMPc lo que conduce a su activación hacia valores más positivos de voltaje. En presencia de AMPc, el tiempo de activación se acelera alrededor de 1.4, 2.2 y 4 veces, respectivamente. En el HCN1 el AMPc tiene el efecto más débil (Stieber, 2005).
- De manera muy interesante el canal HCN3 *in vitro* no se modula por nucleótidos cíclicos ya que experimentalmente no muestra cambios al estar en contacto con AMPc, ni con GMPc, a pesar de tener el dominio CNBD (Stieber, 2005).

### **Topología**

Los canales HCN pertenecen a una superfamilia de canales Kv y son proteínas tetraméricas cuyas subunidades se arreglan alrededor de un poro central. Cada subunidad tiene seis dominios transmembranales y un amino y carboxilo terminal intracelular (fig. 7). El cuarto dominio transmembranal (S4) contiene varios residuos de aminoácidos cargados positivamente, al igual que los Kv en los canales HCN el dominio S4 sirve como un sensor de voltaje. La región del poro comprende el quinto dominio transmembranal (S5), el filtro de selectividad del poro y el sexto dominio transmembranal (S6). En el carboxilo terminal se encuentra un dominio de unión del ligando llamado el CNBD (Craven, 2006).



**Figura 7. Esquema de la topología de los canales HCN (Craven, 2006)** Dos de las cuatro subunidades que forman el canal completo se muestran en la imagen. Los segmentos transmembranales (S1-S6) se muestran en negro, con excepción de la región del poro (S6 y el asa del poro) que se muestran en rojo. El sensor de voltaje S4 se muestra con cargas positivas. La región del C-terminal contiene un dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD por sus siglas en inglés) se muestra en azul, con un GMPc unido y el C-linker en verde, que conecta en CNBD con el poro.

Los canales HCN tienen una alta similitud de secuencias con los canales modulados por nucleótidos cíclicos (CNG), los canales Ether-a-go-go, y los canales de  $K^+$  de plantas. Estos últimos también contienen CNBDs, aunque los efectos de los nucleótidos cíclicos en los dos últimos es débil o no esta clara (Bruggemann, 1993; Cui, 2000; Hoshi, 1995).

### **Aplicaciones Médicas**

Una de las aplicaciones médicas para estos canales ha sido el uso de agentes reductores del ritmo cardiaco, como ivabradina que selectivamente inhibe la  $I_f$  (Bucchi et al, 2002; Bois et al, 1996). La ivabradina disminuye la tasa de actividad espontánea de las células del nódulo sinoauricular, debido a que induce una bradicardia controlada lo cual tiene como ventaja, no tener los efectos negativos de los bloqueadores  $\beta$ -adrenérgicos y los antagonistas de  $Ca^{2+}$ . Estos canales además podrían ser usados en sustitución de los marcapasos convencionales, para evitar que el paciente sufra una cirugía peligrosa e invasiva. Experimentos recientes han logrado darle propiedades de marcapaso a las células cardiacas de la aurícula izquierda mediante terapia génica, estos experimentos son un primer paso para desarrollar técnicas que podrán utilizarse en humanos en el futuro (Tse, 2006).

Recientemente se observó que al bloquear los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L con dihidropiridinas en neuronas dopaminérgicas adultas de la sustancia nigra, se reestablecen las funciones de marcapaso de los canales HCN que permiten la propagación del potencial eléctrico de estas neuronas. Estos experimentos han logrado prevenir la muerte de las neuronas dopaminérgicas en modelos de Parkinson *in vitro* e *in vivo* (Chan, 2007).

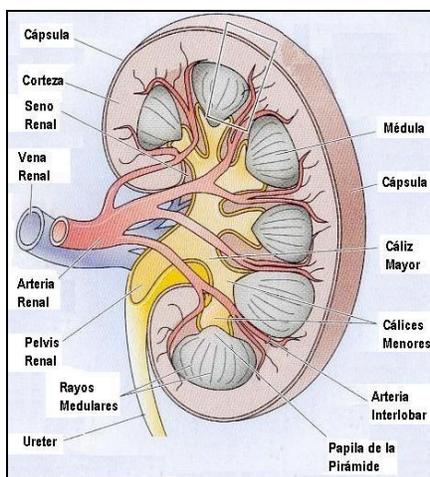
# PARTE II

## 2.7 ANATOMIA Y FISILOGIA RENAL

### Características macroscópicas del riñón

El riñón tiene como funciones principales la excreción de productos de desecho y sustancias exógenas, la regulación del balance de agua y electrolitos, el mantenimiento del equilibrio ácido-base, la regulación de la presión arterial y la producción de hormonas.

Los riñones son estructuras situadas en la cavidad retroperitoneal. La complejidad y el tamaño del riñón varía dependiendo del organismo. En un corte sagital el riñón revela dos regiones principales, la corteza es la región más externa y la médula la región más interna (fig. 8). La médula se divide en dos partes, médula externa e interna. La externa posee una banda exterior y una interior, el extremo más interno de la médula interna se llama papila y desemboca en los cálices, que son prolongaciones del uréter. La orina se drena en un uréter y llega a la vejiga para ser almacenada y eliminada posteriormente (Constanzo, 1998).



**Figura 8. Anatomía del riñón (modificada de Boron, 2003)** Se muestra el diagrama de un corte de riñón humano. Una cápsula fibrosa recubre cada riñón. Se pueden apreciar dos capas principales, la corteza (zona externa granular) y la médula (pirámides). La médula se subdivide en 8 a 18 pirámides renales, donde cada una termina en la pelvis renal. De la papila de cada pirámide la orina escapa hacia los cálices menores del seno

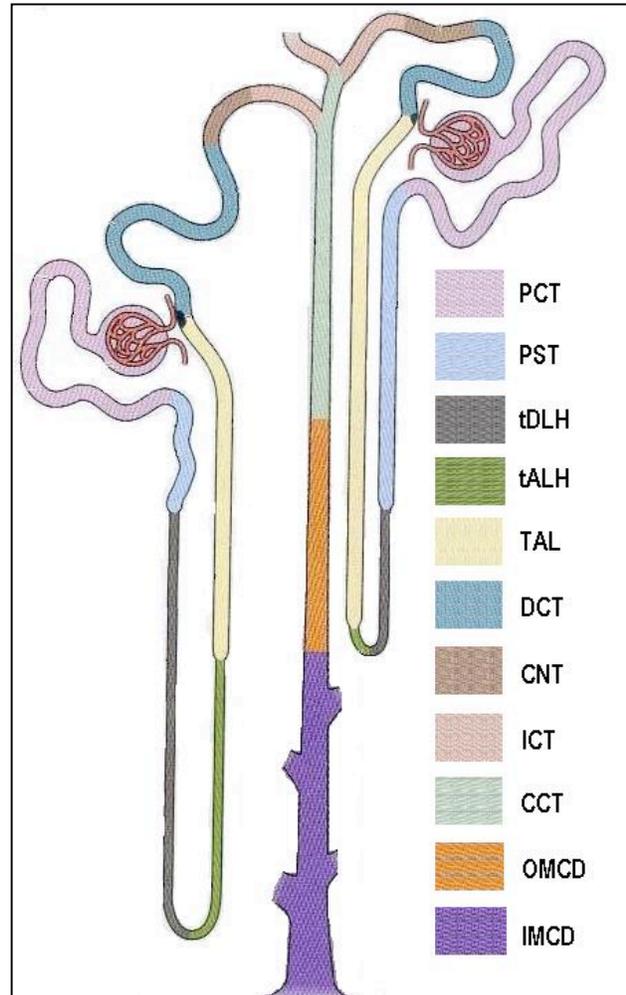
### Estructura de la nefrona

El riñón tiene como unidad funcional a la nefrona. El riñón contiene aproximadamente un millón de nefronas donde cada una se compone de un glomérulo y un túbulo renal. El glomérulo es una red de capilares glomerulares que surgen de una arteriola aferente. Los capilares glomerulares están rodeados por la cápsula de Bowman o también llamado espacio de Bowman, que se continúa con la primera porción de la nefrona. La sangre se filtra a través de los capilares glomerulares y el

ultrafiltrado se vierte en el espacio de Bowman; este es el primer paso de la formación de la orina. El resto de la nefrona es una estructura tubular revestida de células epiteliales, que cumplen las funciones de reabsorción y secreción (Constanzo, 1998).

La nefrona o túbulo renal está integrado por los segmentos siguientes, empezando en el espacio de Bowman, el túbulo contorneado proximal, el túbulo recto proximal, el asa de Henle (con una rama descendente delgada, una ascendente delgada y una ascendente gruesa), el túbulo contorneado distal y los conductos colectores. Cada segmento del túbulo renal es funcionalmente distinto y las células epiteliales que revisten cada segmento poseen una ultra estructura diferente (Boron, 2003).

Existen dos tipos de nefronas, las superficiales corticales y las yuxtamedulares (fig. 9). Las nefronas corticales superficiales tienen glomérulos en la corteza externa. Estas nefronas poseen asas de Henle relativamente cortas que solo descienden hasta la médula



**Figura 9. Neuronas yuxtamedulares y corticales. (modificada de Boron, 2003)** Se muestran los diferentes segmentos de las nefronas ilustrados con diferentes colores. Los túbulos proximales se dividen en túbulo contorneado proximal (PCT) y el túbulo recto proximal (PST). El asa de Henle se divide en la porción delgada descendente (tDLH), la porción delgada ascendente (tALH) y la porción gruesa ascendente (TAL). Le siguen los túbulos contorneados distales (DCT) y el túbulo conector (CNT). Finalmente los túbulos colectores se dividen en cuatro, el túbulo colector inicial (ICT), el túbulo colector cortical (CCT), el túbulo colector de la médula externa y el túbulo colector de la médula interna.

externa. Los glomérulos de las nefronas yuxtamedulares se encuentran cerca del borde corticomedular. Los glomérulos de estas nefronas son más largos comparados con las superficiales corticales y por lo mismo, muestran una mayor tasa de filtración glomerular. También se caracterizan por tener asas de Henle que descienden hasta la médula interna y las papilas, estas son indispensables para concentrar la orina.

Los túbulos proximales se dividen en túbulo contorneado proximal (PCT) y el túbulo recto proximal (PST). Sin embargo la ultraestructura de estos permite subdividirlos en los segmentos S1, S2 y S3. El segmento S1 empieza en el glomérulo e incluye la primera porción del PCT. El segmento S2 empieza en la segunda mitad del PCT y continúa hasta la primera mitad del PST. Por último el segmento S3 incluye la mitad más distal del PST que se extiende hacia la médula.

Tanto las membranas apicales como basolaterales de los túbulos proximales están extensamente amplificadas (Fig 9). Este aumento de la superficie apical se correlaciona con la función principal de este segmento de la nefrona que es, reabsorber la mayor parte del filtrado de nuevo a la circulación. Del segmento S1 al S3 la complejidad va declinando progresivamente, lo que está correlacionado con la disminución gradual de la tasa de reabsorción a lo largo del túbulo. Las células del túbulo proximal contienen lisosomas, vacuolas endocíticas y un retículo endoplásmico bien desarrollado, pero se caracterizan por tener un aparato de Golgi muy prominente, ya que es muy importante en la síntesis y el tráfico de muchos componentes de la membrana (Boron, 2003).

Las células de la porción delgada descendente y ascendente del asa de Henle, son mucho menos complejas que las del segmento S3 del túbulo proximal, tienen pocas mitocondrias y sus membranas están poco amplificadas. La porción ascendente del asa de Henle está muy poco desarrollada en las nefronas superficiales. Sin embargo, esta porción es una parte mayoritaria del asa de Henle en las nefronas juxtamedulares. Las células epiteliales de la porción ascendente del asa de Henle tienen un gran número de mitocondrias y su membrana basolateral está invaginada y es muy extensa. La maquinaria celular que presentan estas células está correlacionada con el papel tan importante que tienen para generar un medio hiperosmótico en el intersticio medular.

El túbulo contorneado distal (DCT) empieza en la mácula densa y termina en la transición del túbulo conector (CNT). Las células del DCT se parecen en estructura a las de la porción gruesa ascendente del asa de Henle. El túbulo conector consiste de dos tipos celulares, las células del túbulo conector y células intercaladas. Las células del túbulo conector son únicas ya que solo en ellas se produce y secreta kalikreina renal, una hormona local cuya función no está clara todavía.

En la tabla 3 se muestran los diferentes procesos de transporte de agua y los diferentes solutos involucrados a lo largo del componente tubular de la nefrona.

SEGMENTO TUBULAR	TIPO CELULAR	TRANSPORTE
Túbulo contorneado proximal (PCT)	S1 S2	Reabsorción: Cl <sup>-</sup> , K <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , H <sub>2</sub> O, fosfato, sulfato, glucosa, aminoácidos, mono y dicarboxilatos, urea, HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> . Secreción: H <sup>+</sup> y NH <sub>3</sub> y urato.
Túbulo recto proximal (PST)	S3	Reabsorción: Na <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> , glucosa, urato. Secreción: K <sup>+</sup> .
Porción delgada descendente del asa de Henle (tDLH)	Células tDLH	Reabsorción: Na <sup>+</sup> . Secreción: K <sup>+</sup> , urea y NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> .
Porción delgada ascendente del asa de Henle (tALH)	Células tALH	Reabsorción: Na <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> , Ca <sup>2+</sup> , K <sup>+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .
Porción gruesa ascendente del asa de Henle (TAL)	Células TAL	Reabsorción: Na <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> , Ca <sup>2+</sup> , H <sub>2</sub> O, fosfato, HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .
Túbulo contorneado distal (CDT)	CDT	Reabsorción: Na <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> .
Túbulo conector (TCN)	Células TCN Células Intercaladas	Reabsorción: Na <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> .
Túbulo colector inicial (ICC)	Células Principales	Secreción: K <sup>+</sup> .
	Células Intercaladas	Reabsorción: Na <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> . Secreción: K <sup>+</sup> .
Túbulo colector cortical (CCT)	Células Principales	Reabsorción: Na <sup>+</sup> . Secreción: K <sup>+</sup> .
	Células Intercaladas	Reabsorción: K <sup>+</sup> . Secreción: H <sup>+</sup> . Reabsorción: Na <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> .
Túbulo colector de la médula externa (OMCC)	Células principales	Reabsorción de Ca <sup>2+</sup> , HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> . Secreción: NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
Túbulo colector de la médula interna (IMCC)	Células IMCC	Reabsorción de K <sup>+</sup> , Urea, HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> . Secreción: H <sup>+</sup>

Tabla 3. Papel de los diferentes segmentos de la nefrona (Boron, 2003 y Guyton, 2001)

Los dos segmentos que le siguen al túbulo conector son el túbulo colector inicial (ICT) y el túbulo colector cortical (CCT). Estos segmentos están compuestos por células intercaladas y células principales, que exhiben diferencias morfológicas y funcionales muy específicas. Las células intercaladas forman alrededor de una tercera parte de los segmentos del túbulo colector. Distintas subpoblaciones de estas células secretan H<sup>+</sup> (células α-intercaladas) o HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (células β-intercaladas) y reabsorben K<sup>+</sup>. Las células principales forman cerca de dos tercios de los túbulos colectores inicial y cortical. Presentan invaginaciones en la membrana basolateral poco desarrolladas y tienen un menor número de mitocondrias que las células intercaladas. Las células

principales se pueden reconocer porque presentan un cilio central en la membrana apical y son las más abundantes y se encargan de la reabsorción de  $\text{Na}^+$  a través del canal epitelial de  $\text{Na}^+$  regulado por aldosterona.

El conducto colector de la médula esta formado prácticamente por un solo tipo celular que aumenta en longitud conforme se acerca a la papila. El número de células intercaladas disminuye, empezando el ducto colector de la médula. Las células en este segmento de la nefrona continúan con el transporte de electrolitos y participan en el transporte de urea y agua que esta regulado hormonalmente. En el extremo terminal del conducto colector de la médula (conducto de Bellini) las células están extremadamente alargadas.

## 2.8 EL IÓN SODIO ( $\text{Na}^+$ ) EN LA FISIOLÓGIA RENAL

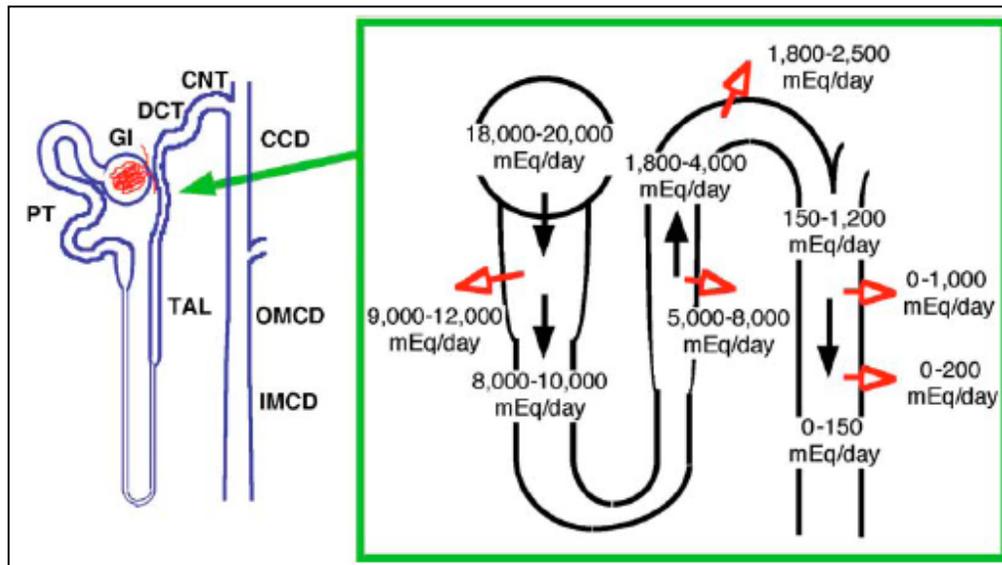
El  $\text{Na}^+$  es el principal catión del compartimiento del líquido extracelular (LEC) que consta de plasma y líquido intersticial. La cantidad de  $\text{Na}^+$  determina el volumen del LEC, lo que a su vez determina el volumen de sangre y la presión arterial. Por lo tanto, los mecanismos renales que participan en la reabsorción de  $\text{Na}^+$  tienen una importancia decisiva para conservar el volumen del LEC y el sanguíneo, así como la presión arterial. Los riñones trabajan regulando la cantidad de  $\text{Na}^+$  en la orina. El  $\text{Na}^+$  es el ion con mayor importancia por su contribución a la osmolalidad total del LEC. La excreción normal diaria de  $\text{Na}^+$  es solamente una muy pequeña fracción del  $\text{Na}^+$  total filtrado por los riñones. De todas las funciones del riñón, la reabsorción de  $\text{Na}^+$  es la más importante (Constanzo, 1998).

La reabsorción de  $\text{Na}^+$  se realiza tanto por vía de rutas transcelulares como de rutas paracelulares. En la ruta transcelular, la tasa de transporte depende de los gradientes electroquímicos, canales iónicos, y transportadores de la membrana apical y basolateral. Sin embargo, en la ruta paracelular fuerzas electroquímicas transepiteliales y propiedades de permeabilidad de las uniones comunicantes gobiernan el movimiento de los iones (Boron, 2003).

### **Homeostasis de $\text{Na}^+$**

Un riñón normal filtra en un día alrededor de 150 l de plasma, los cuales contienen 135-140 mEq/l de  $\text{Na}^+$  (alrededor de 18,000-20,000 mEq/día). Una dieta normal contiene cerca de 100 a 150 mEq de  $\text{Na}^+$ /día, por lo que el riñón debe reabsorber el 99.5% del  $\text{Na}^+$  que se filtra. Esta reabsorción de  $\text{Na}^+$

se lleva a cabo en los túbulos renales (fig. 10). Cerca del 50% al 60% se reabsorbe en los túbulos proximales y del 30% al 40% se reabsorbe en la porción gruesa ascendente del asa de Henle. Sin embargo, aunque en las partes más distales de la nefrona sólo se reabsorbe el 15% del  $\text{Na}^+$  filtrado, este último paso de reabsorción es el que regula predominantemente la homeostasis del  $\text{Na}^+$  (Meneton, 2004).



**Figura 10. Reabsorción de  $\text{Na}^+$  en los diferentes segmentos de la nefrona (Tanemoto, 2007)**

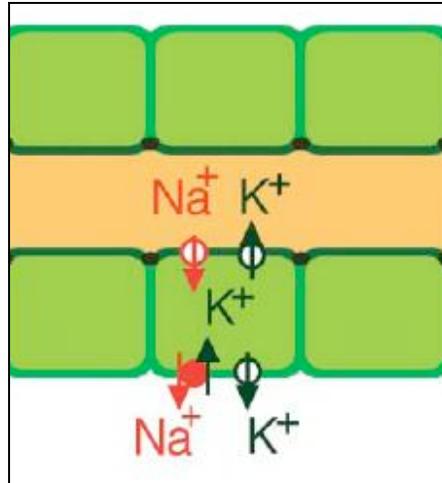
Alrededor de 18,000 – 20,000 mEq/day de  $\text{Na}^+$  se filtra en el glomerulo (GI), y más del 99%  $\text{Na}^+$  filtrado se reabsorbe en los túbulos renales. Cerca del 50% al 60% y el 30% al 40% del  $\text{Na}^+$  filtrado se reabsorbe en los túbulos proximales (PT) y en la porción gruesa del asa de Henle (TAL), respectivamente. Aunque los túbulos distales reabsorben solo cerca del 10% del  $\text{Na}^+$  filtrado, aquí se determina la cantidad neta de la excreción renal de  $\text{Na}^+$ .

*Abreviaciones:* Los túbulos contorneados distales (DCT), el túbulo conector (CNT), el ducto colector cortical (CCD), el ducto colector de la medula externa (OMCD) y el ducto colector de la medula interna (IMCD).

Los túbulos colectores han sido los segmentos de la nefrona donde se creyó ocurría el ajuste final de la homeostasis del  $\text{Na}^+$ , pero estudios recientes sugieren que el túbulo contorneado distal (DCT) y los túbulos conectores (CNT) son los segmentos donde se ajusta la reabsorción del  $\text{Na}^+$  (Meneton et al, 2004). Se ha observado que en las dietas altas en  $\text{Na}^+$  y las bajas en  $\text{K}^+$ , los ajustes suceden casi completamente en el DCT y el CNT.

### **Reabsorción del $\text{Na}^+$ en los Túbulos Distales**

El proceso de la reabsorción de  $\text{Na}^+$  en los túbulos distales es el resultado de un transporte coordinado de electrolitos a través de los epitelios (Lifton, 2001; Canessa, 1994). La  $\text{ATPase Na}^+/\text{K}^+$  en la membrana basolateral conduce de manera activa la salida del  $\text{Na}^+$  y las rutas apicales transportan pasivamente la entrada del  $\text{Na}^+$  como se puede ver en la figura 11.

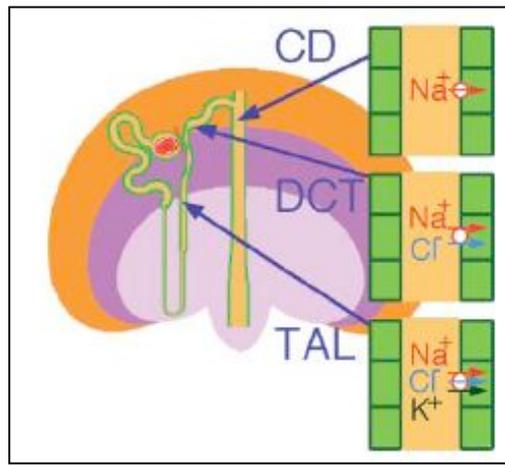


**Figura 11. Reabsorción de  $\text{Na}^+$  en los túbulos distales (Tanemoto, 2007).** En los túbulos renales el  $\text{Na}^+$  se reabsorbe a través de la vía transcelular desde el lumen (lado apical en amarillo) hacia el espacio intersticial (lado basolateral en blanco) mediante la conducción de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  y la entrada pasiva a través de transportadores de  $\text{Na}^+$ .

Diferentes moléculas juegan su papel en la salida apical de  $\text{Na}^+$  en cada segmento de los túbulos distales (fig. 12). En la porción gruesa ascendente del asa de Henle (TAL) se expresa el co-transportador  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$  (Gamba, 1994), en el túbulo contorneado distal (DCT) el co-transportador  $\text{Na}^+ - \text{Cl}^-$  (Gamba, 1993) y en los túbulos conectores (CNT) y en los ductos colectores (CD) se encuentra el canal epitelial de  $\text{Na}^+$  (ENac; Rossier, 1994; Canessa, 1994). En cualquiera de estos segmentos, así como la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  induce la entrada de  $\text{K}^+$  a cambio de la salida de  $\text{Na}^+$ , el mecanismo que excreta  $\text{K}^+$  es necesario para que la reabsorción del  $\text{Na}^+$  pueda continuar. Por lo tanto, la actividad de reciclaje de  $\text{K}^+$  en los túbulos distales regula el LEC por medio de la coordinación de la reabsorción del  $\text{Na}^+$ .

La reabsorción del  $\text{Na}^+$  en el túbulo contorneado distal ocurre casi exclusivamente mediante la ruta transcelular. La entrada apical del  $\text{Na}^+$  se lleva a cabo por un cotransportador  $\text{Na}/\text{Cl}$  (NCC) electroneuro, que es parte de la familia de cotransportador  $\text{Na}/\text{K}/\text{Cl}$  en la porción ascendente del asa de Henle. Sin embargo, el NCC es independiente de  $\text{K}^+$  y es sensible a diuréticos de tiazida, a diferencia del cotransportador  $\text{Na}/\text{K}/\text{Cl}$ . La reabsorción basolateral se lleva a cabo por la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ .

El reciclaje del  $K^+$  participa en la homeostasis del fluido y de los electrolitos al coordinar la excreción renal de  $Na^+$  y  $K^+$ . Los túbulos distales tienen dos rutas para el reciclaje de  $K^+$ , la apical y la basolateral. Los túbulos deben ser capaces de regular la homeostasis del  $K^+$  independientemente de la reabsorción del  $Na^+$  a través de la coordinación de las rutas apical y basolateral. La cantidad de  $Na^+$  que se reabsorbe depende de la actividad total de las rutas de reciclaje del  $K^+$ , es decir la suma de la actividad de la ruta apical y de la basolateral. La excreción del  $K^+$  esta bajo la dominancia de la ruta apical y la reabsorción del  $K^+$  esta bajo la de la ruta basolateral (Tanemoto, 2007).



**Figura 12. Diferentes proteínas involucradas en la salida apical de  $Na^+$  (Tanemoto, 2007).** Como la ATPasa  $Na^+/K^+$  provoca la entrada intracelular de  $K^+$  la ruta para la secreción de  $K^+$  es indispensable para la reabsorción del  $Na^+$ . Existe una ruta diferente de flujo apical del  $Na^+$  para cada segmento de la nefrona. En la porción ascendente del asa de Henle (TAL) es el co-transportador  $Na^+/K^+/2Cl^-$ ,  $Na^+$ , en los túbulos contorneados distales (DCT) es el co-transportador  $Na^+/Cl^-$  y en el ducto colector (CD) el canal de  $Na^+$

El cuerpo regula el transporte de  $Na^+$  usando cuatro mecanismos generales (Boron, 2003):

- La regulación de la filtración glomerular y el control a largo plazo del balance del  $Na^+$  y del volumen extracelular se lleva a cabo por el sistema retroalimentario túbulo-glomerular.
- Los cambios en la hemodinámica renal alteran la carga de  $Na^+$  que está presente en el riñón y modulan la tasa de reabsorción de  $NaCl$  en el túbulo proximal mediante un proceso llamado equilibrio glomerulotubular.
- La aldosterona, la división simpática del sistema nervioso autónomo y la hormona antidiurética son factores que aumentan el volumen efectivo de la circulación, y contribuyen a la reabsorción de  $Na^+$ .
- Los factores humorales natriuréticos pueden disminuir la reabsorción del  $Na^+$ .

### **Sistema Retroalimentario Túbulo-Glomerular**

El sistema retroalimentario túbulo-glomerular (SRTG) responde a variaciones en la composición del fluido tubular que son detectadas por la mácula densa. EL SRTG estabiliza la llegada de solutos y fluido a la nefrona distal. En condiciones normales , los cambios en la composición del fluido tubular son registrados por la mácula densa y las señales son transmitidas a la arteriola aferente para regular la carga filtrada. El incremento resultante en la carga filtrada aumenta el fluido tubular y la concentración de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{Cl}^-$  que llegan a las células de la mácula densa. Estas células no pueden detectar el aumento en fluido tubular, pero sí pueden registrar cambios en los iones de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{Cl}^-$ . La capacidad para registrar éstos cambios en concentración iónica se debe a la presencia en la membrana apical del cotransportador  $\text{Na}/\text{K}/\text{Cl}$ . Este cotransportador es responsable de que la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en la mácula densa aumente en forma paralela conforme se incrementa la concentración luminal de estos iones. (Drucker, 2005)

### **Equilibrio Glomerulotubular**

Cuando la carga de  $\text{Na}^+$  en la nefrona cambia porque los cambios en la hemodinámica alteran la tasa de filtración glomerular, los túbulos proximales responden reabsorbiendo una fracción constante del  $\text{Na}^+$  que está presente. Esta reabsorción de  $\text{Na}^+$  constante en el túbulo proximal, llamado equilibrio glomerulotubular, es independiente del control neurológico y humoral externo y por lo tanto sirve como una medida de seguridad para mantener el balance de  $\text{Na}^+$ .

Si hay una pérdida excesiva de  $\text{Na}^+$  (sudoración) el volumen del LEC, la presión de la perfusión causa que la tasa de filtración glomerular disminuya. En respuesta a esto, el túbulo proximal excreta una fracción constante de  $\text{Na}^+$  y agua, que corresponde a una cantidad absoluta menor. Por lo tanto, el equilibrio glomerulotubular ayuda a prevenir una mayor pérdida de  $\text{Na}^+$  y de agua. Sin embargo, si la retención del  $\text{Na}^+$  causa la expansión del LEC a su vez aumentando la tasa de filtración glomerular, el túbulo proximal empieza a excretar una fracción constante del  $\text{Na}^+$  filtrado, que corresponde a una cantidad absoluta más grande. Esta respuesta generalmente corrige la expansión del volumen. El equilibrio glomerulotubular a nivel de todo el riñón no es perfecto debido a que la reabsorción distal del  $\text{Na}^+$  esta controlada por mecanismos neurológicos y humorales (Boron, 2003).

### **Aldosterona, Nervios Simpáticos y la Hormona Antidiurética**

La aldosterona es el elemento final del eje renina-angiotensina-aldosterona que estimula la reabsorción de  $\text{Na}^+$  en los ductos colectores iniciales, corticales y de la médula. A pesar de que solo del 2% al 3% del  $\text{Na}^+$  filtrado está bajo control de la aldosterona, una pérdida de esta magnitud excede significativamente la ingesta diaria de  $\text{Na}^+$ . La aldosterona actúa en las células principales de los ductos colectores. Los mecanismos celulares de la acción de la aldosterona incluyen la activación de los canales de  $\text{Na}^+$  (ENaC) y de  $\text{K}^+$  apicales (ROMK), de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  basolateral y del metabolismo mitocondrial. El aumento fisiológico de la concentración de aldosterona aumenta el número de canales y la probabilidad de apertura. La activación de la entrada apical de  $\text{Na}^+$  y la salida basolateral asegura que los niveles de  $\text{Na}^+$  y el volumen celular se mantengan estables. Todos los cambios antes mencionados tardan unas cuantas horas que ocurra ya que dependen del aumento en la producción de proteínas inducida por aldosterona. La aldosterona se une a los receptores de mineralocorticoides en el citoplasma que luego se translocan hacia el núcleo y aumentan la transcripción de los canales.

Las terminaciones nerviosas simpáticas en el riñón secretan norepinefrina, que tiene tres efectos principales en la reabsorción del  $\text{Na}^+$  (Boron, 2003):

- Altos niveles de estimulación simpática reducen marcadamente el flujo sanguíneo renal y por lo tanto la tasa de filtración glomerular. Como consecuencia del equilibrio glomerulotubular proximal y la respuesta al flujo de la parte distal de la nefrona, la excreción de  $\text{Na}^+$  disminuye.
- La norepinefrina estimula a las células granulares para secretar renina, así activando el eje renina-angiotensina-aldosterona.
- Estímulos simpáticos activan los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos en las células de los túbulos renales aumentando la reabsorción de  $\text{Na}^+$ , independientemente de cualquier efecto en la hemodinámica y es el resultado de la activación del intercambiador apical  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  basolateral del túbulo proximal.

La hormona antidiurética (ADH) o arginina angiotensina (AVP) es secretada por la glándula pituitaria posterior, ésta se une a un receptor acoplado a una proteína G en la membrana basolateral de las células blanco causando un aumento en  $\text{AMPc}$ . El efecto general de la AVP es producir orina con

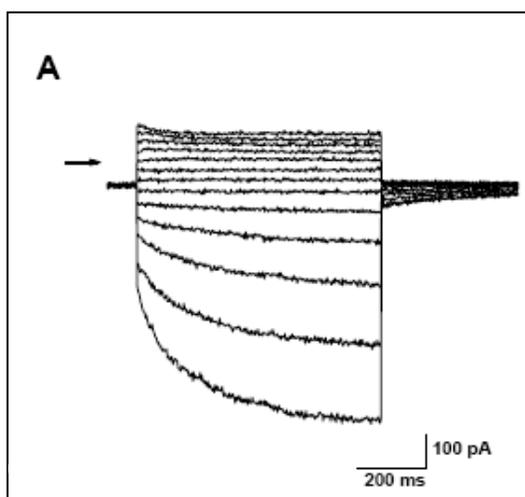
una alta osmolalidad y por lo tanto retener agua. Esto se logra al aumentar la permeabilidad de los túbulos y los ductos colectores, permitiendo que el agua salga del lumen tubular y entre al intersticio medular hipertónico. La AVP además estimula la reabsorción del  $\text{Na}^+$ , aumenta la generación del intersticio hipertónico al estimular al cotransportador apical  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$  y a los canales de  $\text{K}^+$  ROMK. En las células principales de los túbulos colectores iniciales y corticales la AVP, estimula el transporte de  $\text{Na}^+$  al aumentar el número de canales de  $\text{Na}^+$  abiertos en la membrana apical (Boron, 2003).

# PARTE II

### 3. ANTECEDENTES

Desde el descubrimiento de las corrientes catiónicas activadas por hiperpolarización (HCN), se han realizado una gran cantidad de investigaciones para determinar la función fisiológica de estas corrientes en el corazón y el cerebro. Las que han conducido a la caracterización biofísica de los canales HCN. Se conoce la distribución de los canales HCN en tejidos excitables como el corazón, el cerebro y en las células  $\beta$ -pancreáticas aunque todavía se desconoce su papel fisiológico en estas células (El-Kholy, 2007). Hasta el momento los canales HCN reportados presentan las mismas características biofísicas y farmacológicas. También se han encontrado dos homólogos de los canales HCN1 y HCN2 en el flagelo del espermatozoide del erizo de mar, donde le confieren un movimiento rítmico al flagelo (Gauss, 1998; Galindo, 2005).

Recientemente se obtuvo evidencia de la presencia de esta familia de canales en el riñón, en particular, en las células del túbulo colector de la médula interna (TCMI). Por medio de la técnica de patch-clamp en un cultivo primario de TCMI, se obtuvo una corriente entrante de  $\text{Na}^+$  que muestra una gran analogía con la corriente  $I_f$  generada por los canales HCN (Escobar, 2004). Esta corriente se activa a voltajes hiperpolarizantes (-60 mV) y no es selectiva ya que puede permear  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . La corriente se activa completamente en 720 ms, a diferencia de la corriente encontrada en el corazón y algunos tipos neuronales que requieren de alrededor de de 1 a 5 segundos para alcanzar un estado estable. Sin embargo, la diferencia que más llama la atención es que la corriente no se bloquea con  $\text{Cs}^+$ , a diferencia de las descritas en cerebro y corazón cuya  $K_i$  es de 1 - 2 mM (Robinson, 2003).



**Figura 13. Corrientes entrantes activadas por hiperpolarización en células de médula interna (Bolivar, 2008).** A) Registro de corrientes en una célula expresando una corriente " $I_{vti}$ ". La flecha indica corrientes de cero y las corrientes entrantes se encuentran debajo de ella. La corriente entrante se activa alrededor de -60 mV y tarda alrededor de 720 ms para activarse completamente a voltajes de entre -80 y -160 mV. Parecen activarse más rápido mientras la hiperpolarización es mayor.

Esta es la primera evidencia de una corriente homóloga a la  $I_f$  en el riñón o cualquier otro epitelio. Esto motivó a nuestro laboratorio a realizar estudios de RT-PCR tanto en el riñón, para identificar la presencia del RNA mensajero para las cuatro isoformas del HCN. Los resultados de esta serie de experimentos demostraron la presencia de todas las isoformas del HCN en el riñón, principalmente en la médula (datos no mostrados).

#### **4. HIPÓTESIS**

La familia de canales iónicos HCN se expresan en el riñón de la rata.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **Objetivo general**

Determinar la presencia de la familia de canales catiónicos activados por hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos (HCN) en el riñón de la rata.

##### **Objetivos particulares**

- Determinar la presencia de cada uno de los miembros de la familia de canales HCN (HCN1 al HCN4) en fracciones de membrana del riñón de rata al aplicar ensayos de Western blot.
- Determinar la distribución de los canales HCN en los túbulos renales usando inmunofluorescencia (microscopía confocal) en cortes de riñón de rata.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 WESTERN BLOT

#### 6.1.1 Fundamento.

El método de Western blot consiste en la transferencia de las proteínas, separadas por electroforesis, de un gel de poliacrilamida a un soporte sólido y la inmunodetección de estas, con reactivos específicos para una secuencia particular de aminoácidos presentes en su estructura. Los anticuerpos son los reactivos que se unen de manera específica a los epitopes antigénicos mostrados por la proteína blanco unida al soporte sólido. El Western blot no radioactivo utilizado es un método de emisión de luz (quimioluminiscencia), para la detección de antígenos, con anticuerpos conjugados con la peroxidasa del rábano. La peroxidasa del rábano cataliza la reacción de quimioluminiscencia del luminol (una diacilhidrazida cíclica) en presencia de peróxido de hidrogeno. El producto de la oxidación alcanza un estado energético excitado que al decaer emite luz. Ésta emisión de luz puede ser detectada con una placa autoradiográfica.

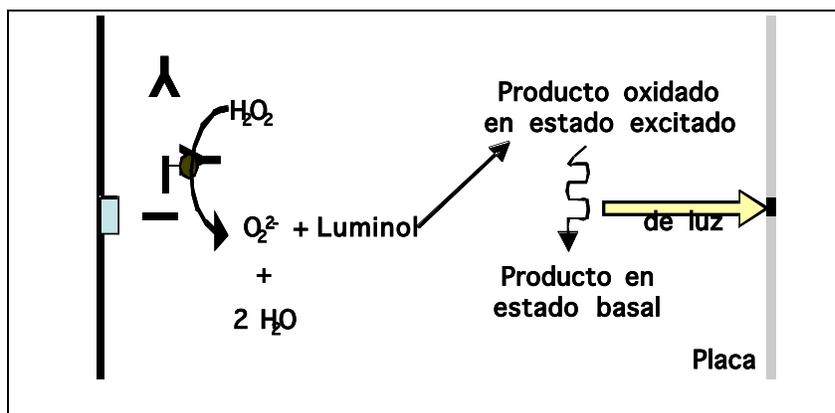


Fig 13. Principio del método ECL para Western blot.

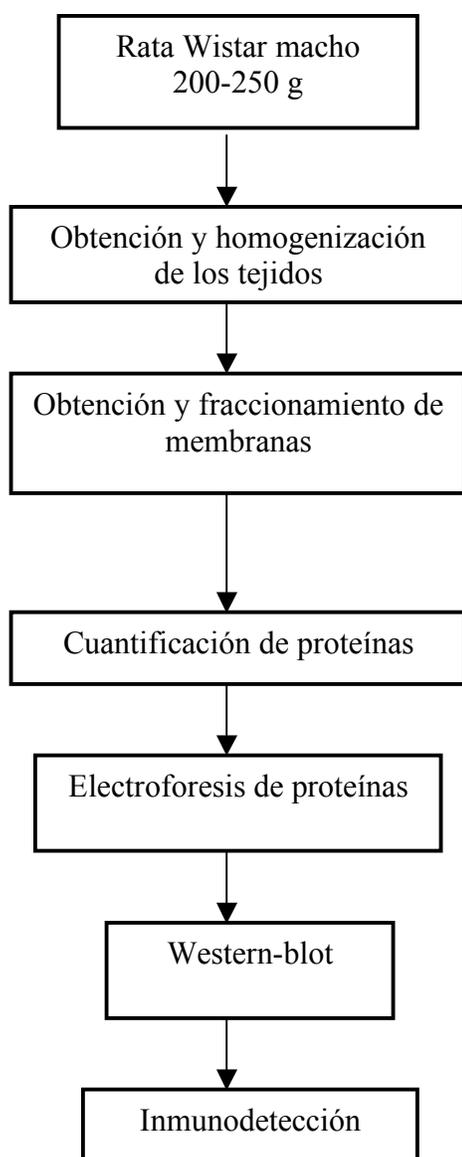
#### 6.1.2 Método

Se utilizaron las membranas totales del riñón de ratas Wistar adultas macho de 200 a 250 g (n=9). Como control positivo se utilizó el extracto de cerebro, el cual expresa la familia de canales HCN (Notomi, 2004) y como control negativo se incubó cada anticuerpo durante una hora con su respectivo péptido control.

Las proteínas contenidas en los extractos fueron solubilizadas y separadas con la técnica de electroforesis vertical en geles de poliacrilamida al 10%. Las proteínas separadas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa, en la cual se realizó la inmunodetección de las

proteínas que corresponde a cada una de las cuatro isoformas del canal HCN. Para esto se utilizaron los anticuerpos primarios para cada canal (IgG de conejo anti HCN1-4; Alomone), así como la técnica ECL Plus (enhanced chemiluminescence; Amershan Biosciences), que incluye el uso de anticuerpos secundarios (IgG de conejo) marcados con peroxidasa de rábano. La peroxidasa de rábano cataliza la reacción de oxidación de un sustrato (luminol) cuyo producto es luminiscente, en un medio alcalino que incrementa la emisión de luz.

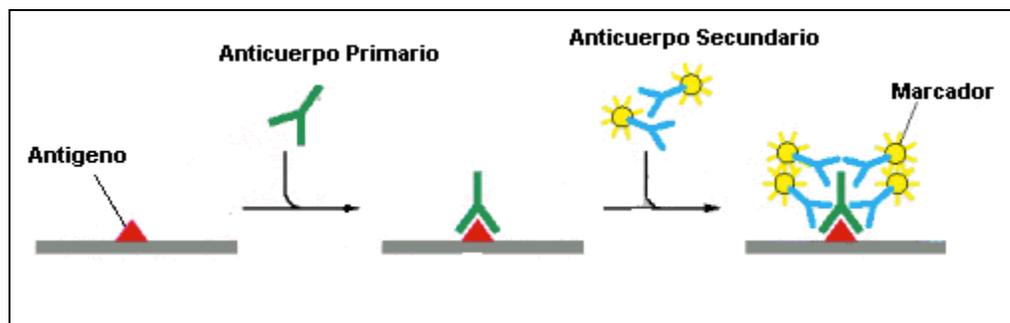
La metodología utilizada se menciona de manera abreviada en esta sección y se describe con todo detalle en el apéndice.



## 6.2 Inmunofluorescencia

### 6.2.1 Fundamento

Actualmente los métodos inmunohistoquímicos directos han sido reemplazados por los indirectos, en los cuales se hace reaccionar el preparado a analizar con un anticuerpo primario no marcado dirigido contra el componente que se desea mostrar. Cuando el anticuerpo primario reacciona se elimina el exceso, no fijado, y se hace reaccionar ahora con un anticuerpo secundario marcado (en este caso con fluoresceína), dirigido contra el anticuerpo primario. Este método es más sensible porque cada molécula del anticuerpo primario reacciona con varias moléculas del anticuerpo secundario marcado.

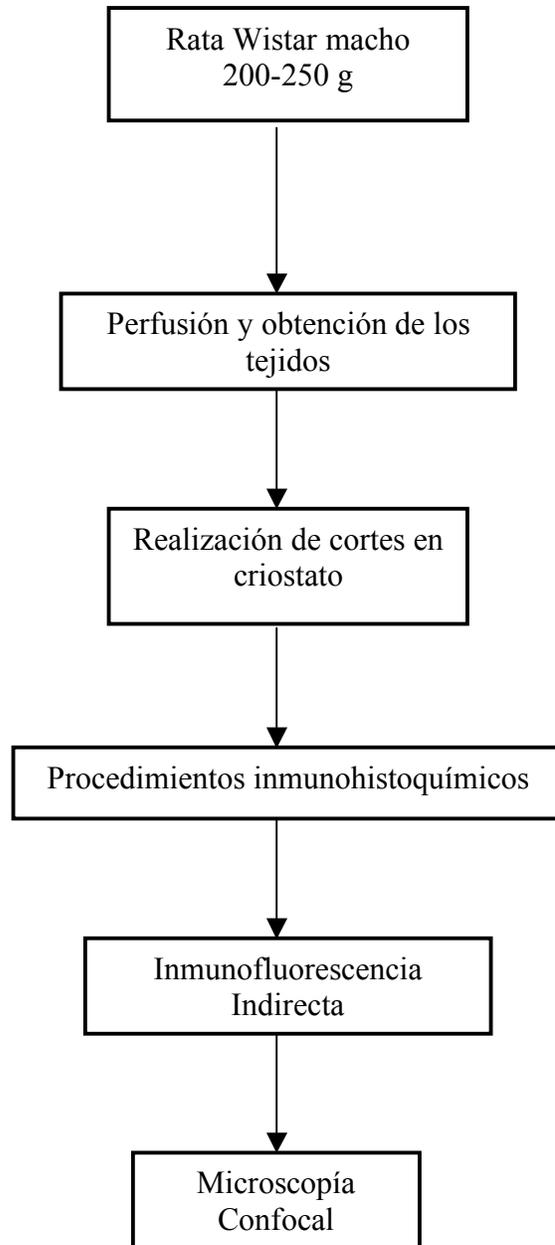


**Figura 14. Reconocimiento de anticuerpos (Alberts, 2002).** El anticuerpo primario (verde) reconoce un epítopo del antígeno (rojo) y se unen. Varias moléculas de anticuerpo secundario (azul) con un marcador acoplado (amarillo) se reconocen y se unen a una molécula de anticuerpo primario.

### 6.2.2 Método

Se utilizaron cortes histológicos de 10  $\mu\text{m}$  del riñón de rata Wistar para revelar la presencia de la familia de los canales HCN. Como control positivo se utilizaron cortes de cerebro, el cual expresa la familia de canales HCN (Notomi, 2004) y como control negativo se incubó durante una hora con su respectivo péptido control. En la inmunofluorescencia indirecta se utilizaron los mismos anticuerpos primarios que para Western-blot. Además como esta técnica requiere la utilización de anticuerpos marcados con moléculas capaces de fluorecer con la luz UV (fluoróforos), se usó un anticuerpo secundario marcado con fluoresceína (IgG de cabra anti conejo, ALEXA 488; Molecular Probes), a una dilución 1:1000, que marca a la proteína con una fluorescencia de color verde.

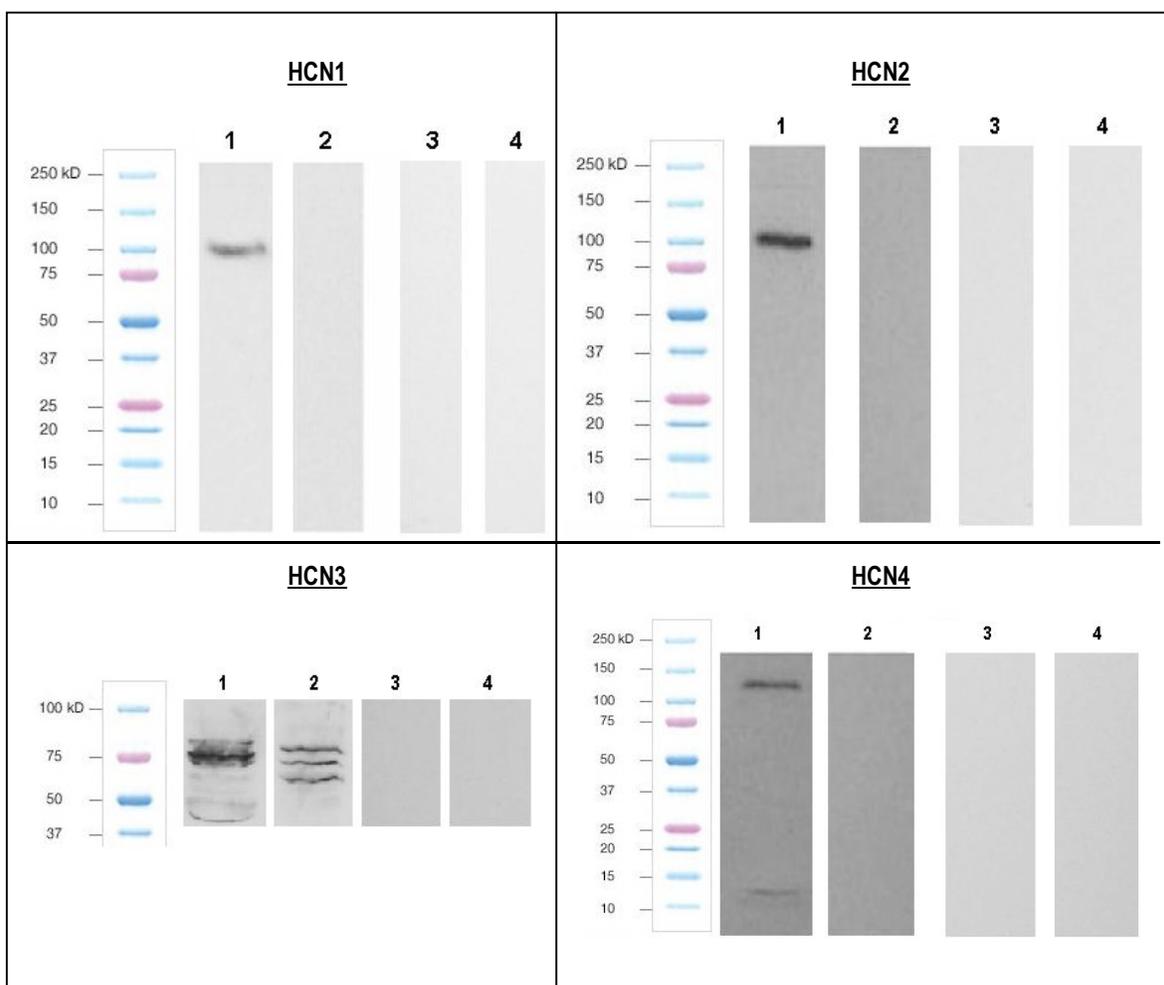
La metodología utilizada se menciona de manera en esta sección y se describe con todo detalle en el apéndice.



## 7. RESULTADOS

### 7.1 Western blot

En la estandarización de las condiciones para el Western blot se modificaron todos los parámetros del experimento para optimizar la detección de los canales HCN. Las variables que se probaron fueron: 1) concentraciones de proteína desde 50 hasta 200  $\mu\text{g}$ , 2) diferentes diluciones de los anticuerpos primarios y secundarios, entre 1:1000 y 1:5000, en ambos casos, y 3) los tiempos de exposición de las placas autorradiográficas se modificaron desde 5 s hasta 1 min, se probaron entre 3 y 4 tiempos diferentes dependiendo del experimento. Se pudo detectar el canal HCN3 en el riñón de rata (fig. 15).

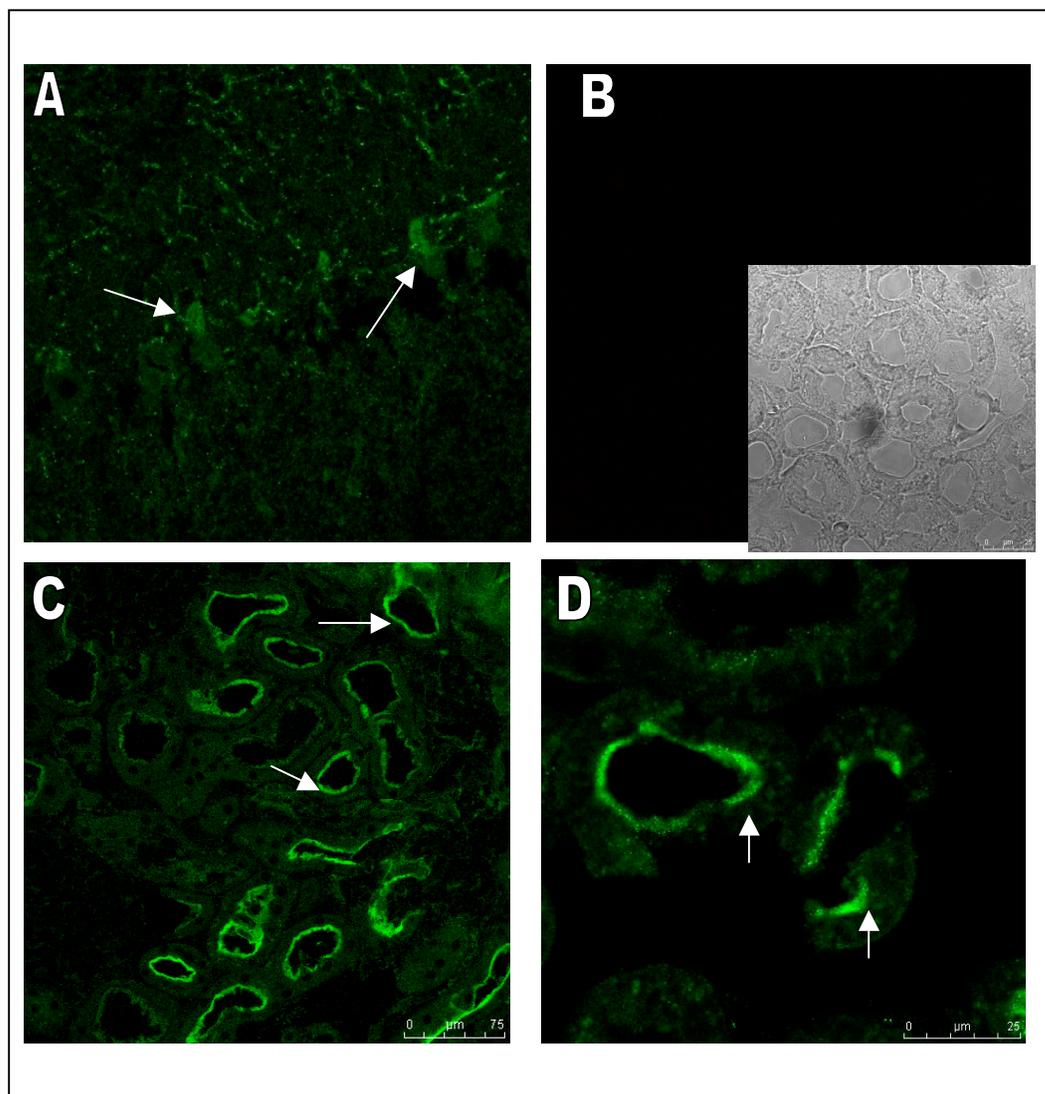


**Figura 15. Resultados de Western blot.** En todos los casos, en el carril 1 se muestran los análisis de Western blot en proteínas de membranas totales de cerebro de rata (100  $\mu\text{g}$  en cada carril) como control positivo y se utilizaron los anticuerpos comerciales de Alomone anti-HCN1, 2, 3 y 4, respectivamente, para identificar a la familia de canales iónicos HCN. En el carril 2 se utilizaron proteínas de membranas totales de riñón de rata (100  $\mu\text{g}$  en cada carril). En los carriles 3 y 4 se utilizaron proteínas de membranas totales de cerebro y riñón, respectivamente, los anticuerpos se incubaron previamente con sus respectivos antígenos control durante una hora.

## 7.2 Inmunofluorescencia

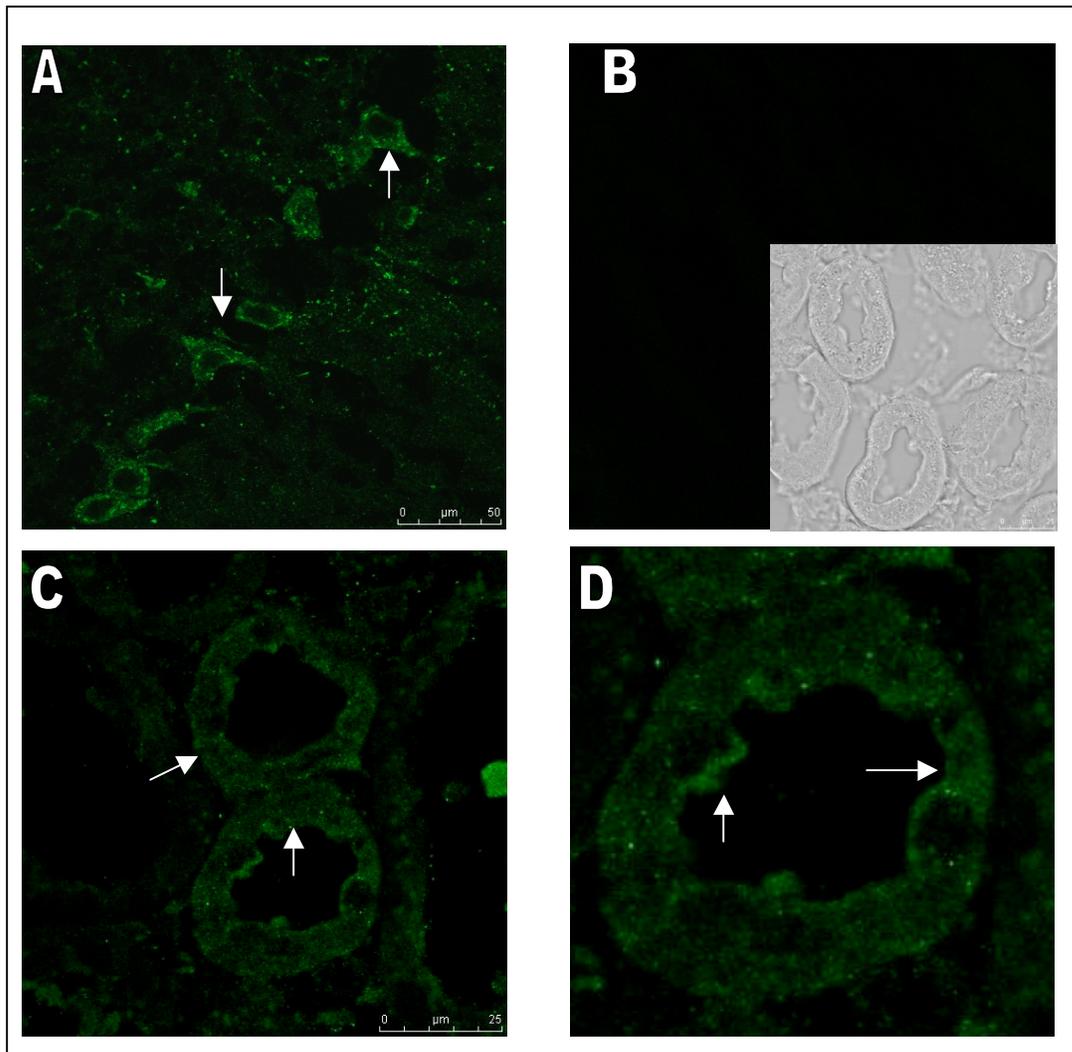
En los ensayos de inmunofluorescencia se pudo detectar la presencia de los cuatro integrantes de la familia de canales HCN. Los canales HCN1 y HN3 se observaron en las membranas apicales de la corteza renal. (fig. 16 y 18). Los canales HCN2 y HCN4 se observaron en el citoplasma celular de la corteza renal (fig. 17 y 19). El canal HCN4 fue el único que se pudo observar en la médula renal (fig. 19).

### HCN1



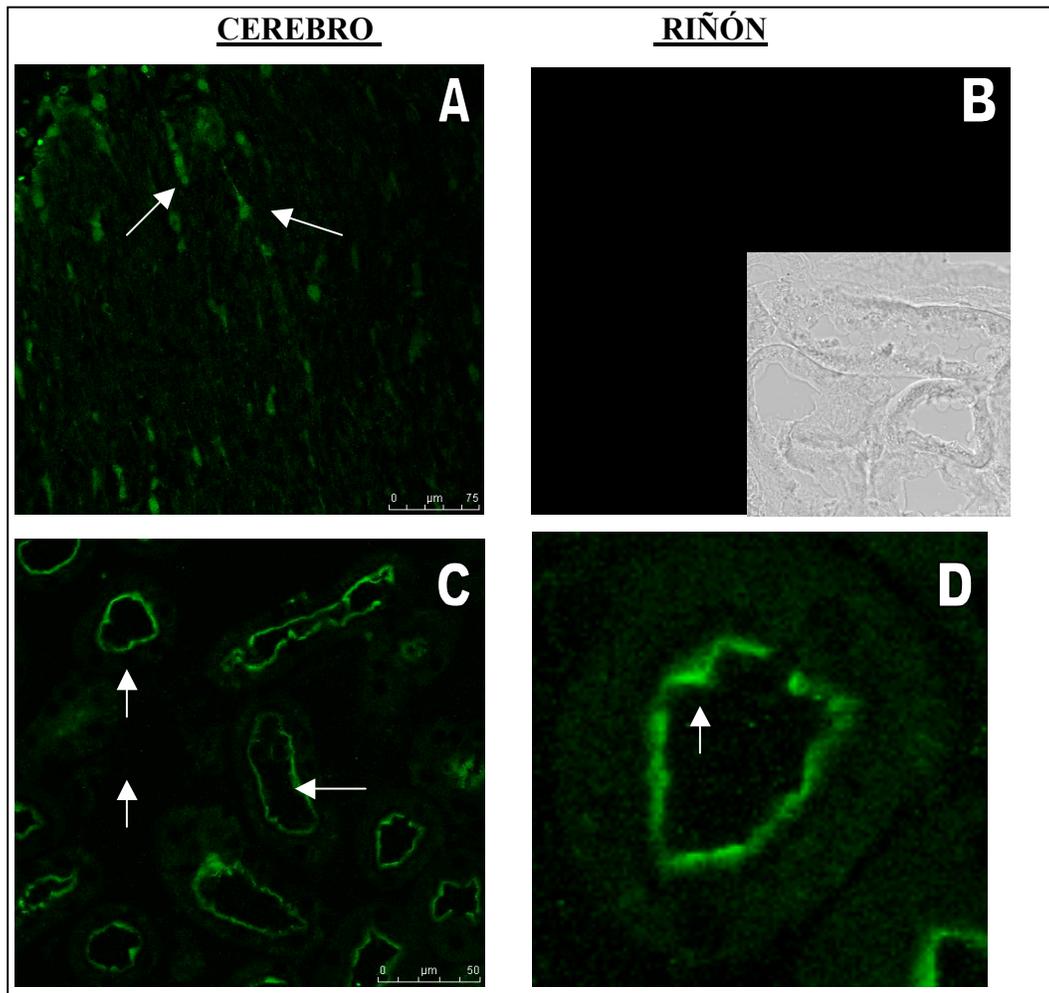
**Figura 16. Inmunofluorescencia anti HCN1.** Las imágenes fueron capturadas con un objetivo confocal de 40X. A) Corte transversal de cerebro (control positivo), la reactividad se observa predominantemente en el zona molecular del cerebelo. B) Control negativo e imagen de transferencia de luz en el que se observa un corte sagital de riñón de rata, con la incubación previa del anticuerpo HCN1 con su péptido control. C) Corte sagital de riñón de rata con reactividad positiva en la zona apical de los túbulos de la corteza renal. C) Un acercamiento de la imagen anterior mostrando dos túbulos con una clara reactividad positiva. Las flechas blancas indican las zonas con mayor reactividad.

## HCN2



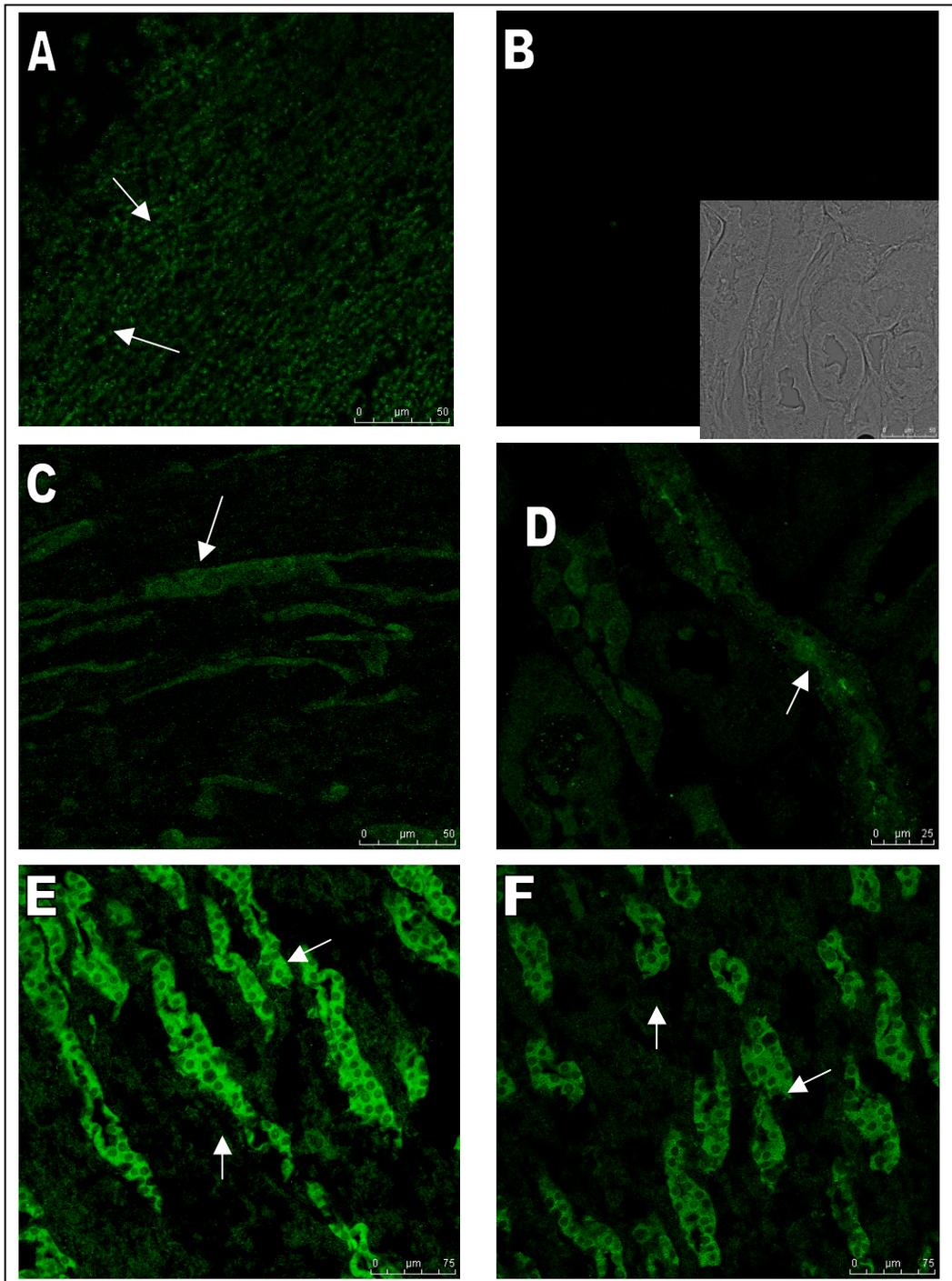
**Figura 17. Inmunofluorescencia anti HCN2.** Las imágenes fueron capturadas con un objetivo confocal de 40X. A) Corte transversal de cerebro (control positivo), la reactividad se observa predominantemente en las células de Purkinje del cerebelo. B) Control negativo e imagen de transferencia de luz en el que se observa un corte sagital de riñón de rata, con la incubación previa del anticuerpo HCN2 con su péptido control. C) Corte sagital de riñón de rata con reactividad positiva en el citoplasma de los túbulos de la corteza renal. D) Un acercamiento de la imagen anterior muestra un túbulo con una clara reactividad positiva. Las flechas blancas indican las zonas con mayor reactivada.

### HCN3



**Figura 18. Inmunofluorescencia anti-HCN3.** Las imágenes fueron capturadas con un objetivo confocal de 40X. A) Corte transversal de cerebro (control positivo), la reactividad se observa predominantemente en la corteza cerebral. B) Control negativo e imagen de transferencia de luz en el que se observa un corte sagital de riñón de rata, con la incubación previa del anticuerpo HCN3 con su péptido control. C) Corte sagital de riñón de rata con reactividad positiva en la zona apical de los túbulos de la corteza renal. D) Un acercamiento de la imagen anterior mostrando un túbulo con una clara reactividad positiva. Las flechas blancas indican las zonas con mayor reactivada.

## HCN4



**Figura 19. Inmunofluorescencia anti HCN4.** Las imágenes fueron capturadas con un objetivo confocal de 40X. A) Corte transversal de cerebro (control positivo), la reactividad se observa predominantemente en la corteza cerebral. B) Control negativo e imagen de transferencia de luz en el que se observa un corte sagital de riñón de rata, con la incubación previa del anticuerpo HCN4 con su péptido control. C) Corte sagital de riñón de rata con reactividad positiva en el citoplasma de los túbulos de la corteza renal. D) Un acercamiento de la imagen anterior mostrando dos túbulos con una clara reactividad positiva. E) Corte sagital de riñón de rata con reactividad positiva en la zona citoplásmica de los túbulos de la médula externa. F) Corte sagital de riñón de rata con reactividad positiva en la zona citoplásmica de los túbulos de la médula interna. Las flechas blancas indican las zonas con mayor reactividad positiva

## 8. DISCUSIÓN

Este es el primer trabajo que reporta la presencia y distribución de la familia de los canales HCN en el riñón de la rata. En los ensayos de Western blot con excepción del canal HCN3 (fig. 15C), los demás integrantes de la familia HCN no fueron detectados. Sin embargo, en los experimentos de inmunofluorescencia, al aplicar los mismos anticuerpos comerciales de Alomone, fue posible detectar la presencia de los cuatro canales HCN en cortes histológicos de riñón de rata (fig. 16,17,18 y 19).

Con los resultados obtenidos en este trabajo podemos concluir con certeza que todos los canales HCN están en el riñón. El canal HCN3 parece ser el más abundante en todo el riñón ya que fue el único que se pudo determinar por Western blot.

La discrepancia en los resultados entre las dos técnicas utilizadas sugiere que las condiciones de detección del Western blot para los canales HCN1, HCN2 y HCN4 no son lo suficientemente sensibles. Si se toma en cuenta que los anticuerpos detectaron en los ensayos de Western blot la presencia de la proteína en el tejido control (cerebro), entonces esto sugiere que la cantidad de los canales HCN endógenos en el riñón es pequeña en comparación con la que se expresa en el cerebro. Para poder detectar los canales restantes el kit de detección ECL Plus que se utilizó se debería cambiar por uno con una sensibilidad mayor, como podría ser el ECL Advance.

Por lo tanto, los resultados previos de RT-PCR donde se encontraron los transcritos para los cuatro integrantes de la familia HCN y los resultados positivos de inmunofluorescencia nos hacen concluir que si se encuentra toda la familia de canales HCN en el riñón de la rata.

En estudios del canal HCN3 en líneas celulares HEK293 se observó que este canal tiene sitios de N-glicosilación para facilitar que los canales migren hacia la membrana plasmática y se formen canales funcionales (Much, 2003). Esto concuerda con nuestros resultados de Western blot para el canal HCN3. Son necesarios ensayos con N-glicosidasa para poder concluir con certeza que las dos bandas con un cambio en su peso molecular de entre 10 y 20 kDa (fig. 15C), son realmente dos sitios de glicosilación diferentes.

Este es la primera vez que se determina la presencia de los canales tipo HCN en un tejido no excitable en mamíferos. Su función en tejidos excitables con actividad rítmica en mamíferos está claramente caracterizado, además se conocen homólogos de los canales HCN en el flagelo del espermatozoide del erizo donde le confieren un movimiento rítmico al flagelo. Sin embargo, en un tejido epitelial aun se desconoce su función.

A pesar de tener la topología típica de un canal de  $K^+$ , los canales HCN en condiciones fisiológicas se comportan como canales de  $Na^+$ . Se tiene evidencia que la corriente homóloga a la  $I_f$  registrada en los cultivos primarios de la médula interna es una corriente de  $Na^+$  (Bolívar, 2008), lo que sugiere que el papel que tiene en los epitelios renales puede ser la reabsorción de este ión.

La reabsorción de  $Na^+$  se lleva a cabo a lo largo de todos los segmentos de la nefrona. Cerca del 50% al 60% se reabsorbe en los túbulos proximales, del 30% al 40% se reabsorbe en la porción gruesa ascendente del asa de Henle. En las partes más distales de la nefrona sólo se reabsorbe el 15% del  $Na^+$  filtrado, sin embargo este último paso de reabsorción es el que regula predominantemente la homeostasis del  $Na^+$ . El riñón debe reabsorber el 99.5% del  $Na^+$  que es filtrado de la sangre, junto con el  $Na^+$  además se reabsorbe agua para mantener los niveles del fluido extracelular. Las células sufren cambios osmóticos constantemente al cambiar las concentraciones de  $Na^+$  y agua, mecanismos que están además regulados por hormonas como la aldosterona y la vasopresina. Será importante hacer comarcajes de los canales HCN con proteínas cuya localización ya se conoce para definir su lugar en cada uno de los segmentos de la nefrona.

El canal epitelial de  $Na^+$  (ENac) es el único canal catiónico de  $Na^+$  que se conoce hasta el momento en el riñón. Este canal es el principal encargado de la reabsorción de  $Na^+$  en el segmento distal de la nefrona que es sensible a la aldosterona. Lo que se conoce hasta el momento sobre estos canales nos da una pauta para sugerir como funcionan y de que manera puedan estar regulados los canales HCN en el riñón. Se tiene evidencia que la aldosterona aumenta la reabsorción de  $Na^+$  induciendo la expresión de los canales ENac y también facilitando su tráfico hacia la membrana apical en la porción distal sensible a aldosterona de la nefrona (Loffing, 2000). De manera interesante, se publicó recientemente que la aldosterona aumenta la expresión y posiblemente también el tráfico de los canales HCN2 y HCN4 en el corazón de ratas neonatas (Muto, 2007).

Los mecanismos celulares de acción de la aldosterona incluyen la activación de los canales ENac y de  $K^+$  apicales (ROMK), de la bomba  $Na^+/K^+$  basolateral y del metabolismo mitocondrial. El aumento fisiológico de la concentración de aldosterona aumenta el número de canales y su probabilidad de apertura (Boron, 2003). El efecto de la aldosterona en canales tanto de  $K^+$  como de  $Na^+$ , nos lleva a sugerir que los canales HCN probablemente estén regulados por esta hormona. Particularmente, el tráfico de los canales HCN2 y HCN4, que observamos en el citoplasma celular en las imágenes de inmunofluorescencia.

Por otro lado, pensamos que los canales HCN en el riñón pudieran participar en la regulación del volumen celular. Existe un reporte en la literatura en que los canales HCN2 están involucrados en un mecanismo regulatorio del volumen celular (Calloe, 2005). Los canales HCN2 fueron co-expresados con aquaporina 1 en los ovocitos de *Xenopus laevis*. Se observó que la corriente que generan los canales HCN2 incrementaba cuando había un cambio en el volumen de la célula, ya fuera por condiciones hipoosmóticas o cuando se aumentaba el volumen celular después de inyectar 50 nl de una solución isoosmótica. Para comprobar que el cambio del volumen celular y no el cambio en el potencial iónico era la causa del aumento en la corriente, se expresó el canal sin la aquaporina 1 en condiciones hipoosmóticas y observaron que no había cambios en la corriente.

A pesar de que los registros de los canales recombinantes no siempre responden exactamente de la misma manera que en condiciones endógenas (presencia de moduladores), este reporte apoya la hipótesis de que el cambio en el volumen celular module a los canales HCN en el riñón. Además, si conocemos que la activación de la entrada apical de  $\text{Na}^+$  y su salida basolateral asegura que los niveles de  $\text{Na}^+$  y el volumen celular se mantengan estables, es lógico pensar que el transporte del  $\text{Na}^+$  y los cambios en el volumen celular puedan estar correlacionados con la función de los canales HCN.

En la literatura es difícil encontrar trabajos en donde se utilice la técnica de Western blot y de inmunofluorescencia para la identificación endógena de estos canales. Por lo general el registro electrofisiológico de los canales y la presencia de los transcritos se usan comúnmente para su identificación. Apenas a principios de este año se reportó la presencia de los HCN en el páncreas (El-Kholy, 2007), donde no presentan ensayos de Western blot ni de inmunohistoquímica a pesar de ser el primer reporte sobre la presencia de los canales HCN en este órgano. Esto refleja el poco conocimiento que tenemos sobre la regulación, el tráfico de estos canales y hace notar que todavía se requiere de mucho trabajo de investigación para conocer a fondo la modulación de la expresión funcional de estos canales y ahora, su papel fisiológico en los epitelios renales.

El ensamblaje de subunidades homólogas para formar complejos heterólogos es un mecanismo importante para generar diversidad en los canales iónicos. Se han realizado estudios donde se demuestra que la familia de canales HCN forman homodímeros para luego formar canales funcionales como homotetrámeros y heterotetrámeros. Con la excepción del heterotetrámero HCN2/HCN3 que sorprendentemente es la única combinación que no forma un canal funcional, lo

cual quiere decir que la heteromerización requiere de determinantes estructurales específicos que no se pueden lograr en todas las combinaciones posibles de los integrantes de la familia HCN (Much, 2003). La distribución que se pudo observar en nuestros resultados de los canales HCN1 y HCN3 (Fig. 16 y 18) podría sugerir que estos estén formando heterotetrámeros, sin embargo habrá que realizar ensayos de co-inmunoprecipitación para poder concluir que realmente se comportan de esta manera.

Este trabajo identifica la presencia de una familia de canales no selectivos que no se había reportado en los epitelios renales. Esto tendrá un gran impacto en el campo de la fisiología renal y ayudará a la mejor comprensión de los mecanismos de la homeostasis de  $\text{Na}^+$  en el riñón. En el futuro realizaremos estudios para determinar la localización de los canales HCN en los segmentos de la nefrona, así como el impacto de la dieta en  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  lo que nos ayudará a dilucidar con mayor certeza cual es la función de estos canales y la manera en que pueden estar regulados.

## 9. CONCLUSIONES

- Se identificó por primera vez la presencia de la familia de los canales catiónicos activados por hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos (HCN) en el riñón de la rata.

## 9. PERSPECTIVAS

- Caracterizar el papel fisiológico que tienen estos canales catiónicos en el riñón.
- Identificar en que segmentos de la nefrona se encuentran los canales (túbulos colectores, conectores, distales o proximales), con técnicas de doble comaraje.
- Utilizar la tecnología de DNA recombinante para clonar las nuevas isoformas encontradas.
- Realizar ensayos funcionales de los canales HCN del riñón en los ovocitos de *Xenopus laevis* para determinar sus propiedades biofísicas y farmacológicas.
- Determinar el impacto de la dieta alta y baja en Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> en la expresión de los canales HCN en el riñón de la rata.

## 10. REFERENCIAS

- **Aidley, D. J.**, Stanfield, P. R, "Ion Channels Molecules in Action" chap. 1. Introduction. 1st Ed. Cambridge University Press, UK. 1996. Reprint 1998.
- **Adelman, J. P.**, Bond, C.T., Pessia, M., Maylie, J. 1995. Episodic ataxia results from voltage-dependent potassium channels with altered functions. *Neuron* 15:1449–54
- **Alberts, B.**, Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2002. Molecular Biology of the Cell. Chap. 11. Membrane Transport of Small Molecules and the Electrical Properties of Membranes. 4th ed. New York and London: Garland Science
- **Bois P**, Bescond J, Renaudon B, Lenfant J. 1996. Mode of action of bradycardic agent, S 16257, on ionic currents of rabbit sinoatrial node cells. *Br. J. Pharmacol.* 118:1051–57
- **Bolivar, J.** Tapia, D., Arenas, G., Castanon-Arreola, M., Torres, H., Galárraga, E. 2008. A Hyperpolarization-Activated, Cyclic Nucleotide-Gated, (Ih -Like) Cationic Current and HCN Genes Expression In Renal Inner Medullary Collecting Duct Cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* [Epub ahead of print].
- **Boron, W. F.**, Boulpaep E. L. 2003. Medical Physiology a Cellular and Molecular Approach. chap. 32. The Urinary System by Giebisch, G. and Windhager, E. 1st. Edition. Saunders. USA. Pp. 737-827.
- **Brown, H.F.**, DiFrancesco, D., Noble, S.J., 1979. How does adrenaline accelerate the heart? *Nature* 280, 235–236.
- **Browne, D.L.**, Gancher, S.T., Nutt, J.G., Brunt, E.R.P., Smith, E.A., *et al.* 1994. Episodic ataxia/myokymia syndrome is associated with point mutations in the human potassium channel gene, KCNA1. *Nat. Genet.* 8:136–40
- **Bruggemann A**, Pardo LA, Stuhmer W, Pongs O. 1993. Ether-a-go-go encodes a voltage-gated channel permeable to K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> and modulated by cAMP. *Nature* 365:445–48
- **Bucchi, A.**, M. Baruscotti & D. DiFrancesco. 2002. Current-dependent block of rabbit sinoatrial node I<sub>f</sub> channels by ivabradine. *J. Gen. Physiol.* 120: 1-13.
- **Calloe, K.**, Elmedyby, P., Olesen, S.P., Jorgensen, N.K., Grunnet, M. 2005. Hypoosmotic cell swelling as a novel mechanism for modulation of cloned HCN2 channels. *Biophys J.* 89 (3): 2159-69.

- **Canessa CM**, Schild L, Buell G, Thorens B, Gautschi I, Horisberger JD, et al. Amiloride-sensitive epithelial Na<sup>+</sup> channel is made of three homologous subunits. *Nature* 1994; 367:463–7.
- **Catterall, W. A.**, Cestele, S., Yarov-Yarovoy, V., Yu, F. H., Konoki, K. Scheuer, T. 2006. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon* 49: 124–141
- **Chan, C.S.**, Guzman, J. N., Ilijic, E., Mercer, J. N., Rick, C., Tkatch, T., Meredith, G.E., Surmeier, D. J. 2007. 'Rejuvenation' protects neurons in mouse models of Parkinson's disease. *Nature*. Jun 28; 447 (7148): 1081-6.
- **Choe, S.** 2002. Potassium channel structures. *Nature reviews/Neuroscience* 3; 115-121.
- **Constanzo, L.** Fisiología. Cap. 6. Fisiología Renal. 1era Ed. McGraw Hill. USA. 1998. Pp. 228-288
- **Coetzee, W.**, Amarillo, Y., Chiuc, J., Chowb, A., Laub, D., McCormackb, T., Morenab, H., Nadalb, M., Ozaitab, A., Pountneyc, D., Saganichb, M., Vega-saenz, E., Rudy, B. 1999. Molecular Diversity of K<sup>+</sup> Channels. *Annals of the New York Academy of Sciences* 868:233-255.
- **Craven, K. B.**, Zagotta, W. N. 2006 CNG and HCN channels: two peas, one pod. *Annu Rev Physiol.* 68:375-401.
- **Cui J**, Melman Y, Palma E, Fishman GI, McDonald TV. 2000. Cyclic AMP regulates the HERG K<sup>+</sup> channel by dual pathways. *Curr. Biol.* 10:671–74
- **Curran, M. E.**, Splawski, I., Timote, K. W., Vincent, G. M., Green, E. D., Keating, M.T. 1995. A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* 80:795–803
- **DiFrancesco, D.** 1981 A study of the ionic nature of the pace-maker current in calf Purkinje fibres. *J. Physiol.* May ; 314: 377-93.
- **DiFrancesco, D.** 1993. Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annual Review of Physiology* 55, pp. 455–472.
- **DiFrancesco, D.** 1994. Some properties of the UL-FS 49 block of the hyperpolarization-activated (if) current in sinoatrial node myocytes. *Pflügers Arch.* 427: 64–70
- **DiFrancesco, D.** 2006. Serious workings of the funny current. *Prog Biophys Mol Biol.* 2006 Jan-Apr; 90(1-3): 13-25.

- **Drucker, R.** 2005. Fisiología Médica. Cap. 18. Filtración Glomerular. Bobadilla, N. 1era Ed. Ed. El Manual Moderno. Pp. 209-220.
- **Ei-Kholy W.**, MacDonald PE., Fox JM., Bhattacharjee A., Xue T., Gao X., Zhang Y., Stieber J., Li RA., Tsushima RG., Wheeler MB. 2007. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated channels in pancreatic  $\beta$ -cells. *Mol Endocrinol.* 21(3):753-64
- **Escobar, L.**, Martínez-Télez, JC., Salas, M., Castilla SA., Carrisoza, R., Tapia D, Vázquez, M., Bargas, J., Bolívar JJ. 2004. A voltage-gated K(+) current in renal inner medullary collecting duct cells. *Am. J. Physiol, Cell Physiol.* 286, C965-974.
- **Galindo, B.**, Neill, A. Vacquier, V. 2005. A new hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated channel from sea urchin sperm flagella. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 334: 96–101
- Gamba G, Saltzberg SN, Lombardi M, Miyanoshita A, Lytton J, Hediger MA, et al. 1993. Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the thiazide-sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter. *Proc Natl Acad Sci USA*;90:2749– 53.
- Gamba G, Miyanoshita A, Lombardi M, Lytton J, Lee WS, Hediger MA, et al. 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: 17 713–22.
- **Ganetzky, B.**, Warmke, J. W., Robertson, G., Pallanck, L. 1995. New potassium channel gene families in flies and mammals: from mutants to molecules. In *Ion Channels and Genetic Diseases*, ed. DC Dawson, RA Frizzell, pp. 29–39. New York: Rockefeller Univ. Press
- **Gauss, R.**, R. Seifert & B.U. Kaupp. 1998. Molecular identification of a hiperpolarization-activated channel in a sea urchin sperm. *Nature* 393: 583-587.
- **Goethals M**, Raes A, van Bogaert PP. 1993. Use-dependent block of the pacemaker current I(f) in rabbit sinoatrial node cells by zatebradine (UL-FS 49). On the mode of action of sinus node inhibitors. *Circulation* 88:2389–401
- **Hille B.** 1992. Ionic Channels of Excitable Membranes. Sunderland, MA: Sinauer. 2nd ed.
- **Hofmann, F.**, Biel, M., Kaupp, U. B. 2005. International Union of Pharmacology. LI. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Cyclic Nucleotide-Regulated Channels. *Pharmacol Rev.* 57:455–462.

- **Hoshi T.** 1995. Regulation of voltage dependence of the KAT1 channel by intracellular factors. *J. Gen. Physiol.* 105: 309–28.
- **Inagaki, N.,** Gonoï, T., Clement, J. P. IV, Namba, N., Inazawa, J., et al. 1995. Reconstruction of *IKATP*: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* 270:1166–70
- **Ishii, T. M.,** Takano, M., Xie, L.H., Noma, A., Ohmori, H. 1999. Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. *J. Biol. Chem.* Apr 30; 274 (18): 12835-9.
- **Jan L.Y.,** Jan, Y. N. 1997. Voltage-gated and inwardly rectifying potassium channels. *J Physiol.* 505 (Pt 2): 267-82.
- **Jan, L. Y.,** Jan, Y. N. 1992. Structural elements involved in specific KC channel functions. *Annu. Rev. Physiol.* 54:537–55
- **Lodish, H.,** Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Darnell, J. 2000. *Molecular Cell Biology.* Chap. 14. Membrane structure: The Plasma Membrane. 4th Ed. Pp. 595-666.
- **Loffing, J.,** Zecevic, M., Feraille, E., Kaissling, B., Asher, C., Rossier, B., Firestone, G., Pearce, D., Verrey, F. 2001. Aldosterone induces rapid apical translocation of ENaC in early portion of renal collecting system: possible role of SGK. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 280: F675–F682
- **Lifton RP,** Gharavi AG, Geller DS. Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell* 2001; 104:545–56.
- **Ludwig, A.,** Zong, X., Hofmann, F., Biel, M. 1999. Structure and function of cardiac pacemaker channels. *Cell Physiol. Biochem.* 9, pp. 179-186.
- **Ludwig, A.,** Zong, X., Jeglitsch, M. *et al.* 1998. A family of hiperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* 393: 587-591.
- **Meneton P,** Loffing J, Warnock DG. (2004) Sodium and potassium handling by the aldosterone-sensitive distal nephron: the pivotal role of the distal and connecting tubule. *Am J Physiol Renal Physiol*; 287: F593–601.
- **Mistriř, P.,** Mader, R., Michalakis, S., Weidinger, M., Pfeifer, A., Biel, M. 2005. The murine HCN3 gene encodes a hyperpolarization-activated cation channel with slow kinetics and unique response to cyclic nucleotides. *J. Biol. Chem.* 280, No. 29, pp. 27056–27061.

- **Much, B.**, Wahl-Schot, C., Zong, X., Schneider, A., Baumann, L., Moosmang, S., Ludwig, A., Biel, M. 2003. Role of subunit heteromerization and N-linked glycosylation in the formation of functional hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *J. Biol. Chem.* 278, No. 44. pp. 43781-6.
- **Muto, T.**, Ueda, N., Opthof, T., Ohkusa, T., Nagata, K., Suzuki, S., Tsuji, Y., Horiba, M., Lee, J.K., Honjo, H., Kamiya, K., Kodama, I., Yasui, K. 2007 Jul 20. Aldosterone modulates If current through gene expression in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*; [Epub ahead of print]
- **Natomi, T.**, Shigemoto, R. 2004. Immunohistochemical localization of Ih channel subunits, HCN1-4, in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 471, pp. 241-276.
- **Nelson, D.**, Cox, M. Lehninger Principles of Biochemistry. 2005. Pp. 369-380
- **Rossier, B.C.**, Canessa, C.M., Schild, L., Horisberger, J.D. 1994. Epithelial sodium channels. *Curr Opin Nephrol Hypertens*; 3:487–96.
- **Robinson, R.**, Siegelbaum, S. 2003. Hyperpolarization-Activated Cation Currents: From Molecules to Physiological Function. *Annu. Rev. Physiol.* 65: 453-80.
- **Sambrook, J.**, Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. Molecular cloning a laboratory manual. Book 3, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA. Pp. 18.47-18.65.
- **Sanguinetti, M. C.**, Jiang, C., Curran, M. E., Keating, M.T. 1995. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the *IKR* potassium channel. *Cell* 81:299–307
- **Santoro, B.**, S.G. Grant, D. Bartsch, et al. 1997. Interactive cloning with the SH3 domain of N-src identifies a new brain specific ion channel protein, with homology to eag and cyclic nucleotide-gated channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 14815-14820.
- **Santoro B.**, Tibbs, G.R. 1999. The HCN gene family: molecular basis of the hyperpolarization-activated pacemaker channels. *Ann N Y Acad Sci.* Apr 30; 868: 741-64.
- **Seifert R.**, Scholten A, Gauss R, Mincheva A, Lichter P, Kaupp UB. 1999. Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Aug 3; 96 (16): 9391-6.
- **Shieh, C.**, Coghlan, M., Sullivan, J., Gopalakrishnan, M. 2000. Potassium channels: molecular defects, diseases and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev* 52: 557-593.

- **Shin, K. S.**, Rothberg, B. S., Yellen, G. 2001. Blocker state dependence and trapping in hyperpolarization-activated cation channels: evidence for an intracellular activation gate. *J. Gen. Physiol.* 117:91–101
- **Stieber, J.**, Stöckl, G., Herrmann, S., Hassfurth, B., Hofmann, F. 2005. Functional expression of the human HCN3 channel. *J. Biol. Chem.* 280, No. 41, pp. 34635–34643
- **Tanemoto, M.** 2007. Regulatory mechanism of “K<sup>+</sup>-recycling” for Na<sup>+</sup>-reabsorption in renal Tubules. *Clin. Exp. Nephrol.* 11:1–6
- **Thomas, P. M.**, Cote, G. J., Wohlk, N., Haddad, B., Mathew, P. M., et al. 1995. Mutations in the sulfonylurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Science* 268:426–29
- **Tse, Hung-Fat MD**; Tian Xue, PhD; Chu-Pak Lau, MD; Chung-Wah Siu, MBBS; Kai Wang, BS; Qing-Yong Zhang, MD; Gordon F. Tomaselli, MD; Fadi G. Akar, PhD; Ronald A. Li, PhD. 2006. Bioartificial Sinus Node Constructed via In Vivo Gene Transfer of an Engineered Pacemaker HCN Channel Reduces the Dependence on Electronic Pacemaker in a Sick-Sinus Syndrome Model Circulation. 114; 1000-1011
- **Vaccari, T.**, A. Moroni, M. Rocchi, et al. 1999. The human gene coding for HCN2, a pacemaker channel of the Heart. *Biochem. Biophys. Acta* 1446: 419-425.
- **Wang, H.**, Allen, M. L., Grigg, J. J., Noebels, J. L., Tempel, B. L. 1995. Hypomyelination alters KC channel expression in mouse mutants shiverer and Trembler. *Neuron* 15:1337–47
- **Yu, F.H.**, Catterall, W.A., 2004. The VGL-kanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Sci STKE* (253) re15
- **Zagotta, W.N.** 1996. Molecular mechanisms of cyclic nucleotide-gated channels. *J. Bioenerg. Biomembr.* 28:269–278.

## 11. APENDICE

### 11.1 PROTOCOLOS EXPERIMENTALES

#### 11.1.1 Obtención de tejidos para Western-blot

1. Anestesiarse la rata con cloroformo
2. Una vez que el animal se encuentra anestesiado profundamente, se procede a sacrificarlo por medio de la dislocación de las vértebras cervicales.
3. Se hace una incisión en el abdomen para dejar expuestos los órganos internos.
4. Se rasga la cápsula del riñón y se hace un corte en la vena y la arteria renal para así liberar al riñón.
5. Se repite el paso número cuatro para liberar el riñón restante.
6. Una vez obtenidos los riñones, se procede a hacer un corte en la primera cervical para dejar expuesta la parte posterior del cráneo.
7. Se corta la periferia del cráneo para poder liberar el cerebro.
8. Los tejidos se deben congelar inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$ , para su uso posterior.

#### 11.1.2 Obtención de los extractos crudos de membranas.

1. Cortar finamente los tejidos hasta obtener secciones mínimas y proceder a homogenizar en un volumen mínimo de solución de extracción (4ml)  
Utilizar homogenizadores de vidrio.
2. Centrifugar el homogenizado a 1000g durante 10 minutos. Contener el sobrenadante y resuspender el sedimento en 0.5 ml de solución de extracción.
3. Centrifugar el resuspendido a 1000g durante 10 minutos y recuperar el sobrenadante; desechar el botón resultante.
4. Mezclar el sobrenadante obtenido en los dos últimos pasos, al cual se le dominará extracto crudo de membranas.
5. Cuantificar las proteínas con el método de Lowry
6. Almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$  por un día y a  $-70^{\circ}\text{C}$  por periodos de tiempo mayores.

### **11.1.3 Fraccionamiento de los extractos crudos**

1. Centrifugar los extractos crudos de las membranas a 17 000g durante 20 minutos a 4° C.
2. Recuperar el sobrenadante resultante. El sedimento obtenido se resuspende en la solución de extracción (0.5 ml) para obtener una suspensión enriquecida con membranas de alta densidad (membranas plasmáticas); almacenar a –20° C si no es por mas de 24 horas y a –70° C si el almacenaje será por periodos más largos.
3. Centrifugar el sobrenadante a 1000, 000g durante una hora. El botón resultante se resuspende en 200 ml de la solución de extracción para obtener una suspensión enriquecida con membranas de baja densidad (membranas microsomales). Almacenar en las mismas condiciones del paso previo.
4. Cuantificar las proteínas con el método de Lowry.

### **11.1.4 Electroforesis de las proteínas en geles de poliacrilamida.**

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

1. Preparar los geles de poliacrilamida: separador (10%) y concentrador (5%) en medio de dos placas de vidrio ensambladas como moldes.
2. Colocar cantidades iguales de proteína de las diferentes muestras.
3. Mezclar una alícuota de proteínas con el mismo volumen de la solución desnaturalizante de Laemmli, en tubos ependorff.
4. Incubar a 70° C la mezcla durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas.
5. Retirar y mantener en baño de hielo.
6. Centrifugar la muestra en una minicentrifuga por 20 segundos a 3000 rpm.

7. Los pozos se cargan con las muestras en el gel concentrador dentro de la solución de electroforesis. Destinar el primer carril para los estándares de peso molecular (5 $\mu$ l Bio-Rad). Llenar los pozos sin muestra con solución desnaturalizante.
8. Correr la electroforesis a 30 mA por gel durante una hora y quince minutos.
9. Remover el gel concentrador y marcar una esquina del gel separador.

#### 11.1.5. Transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa

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

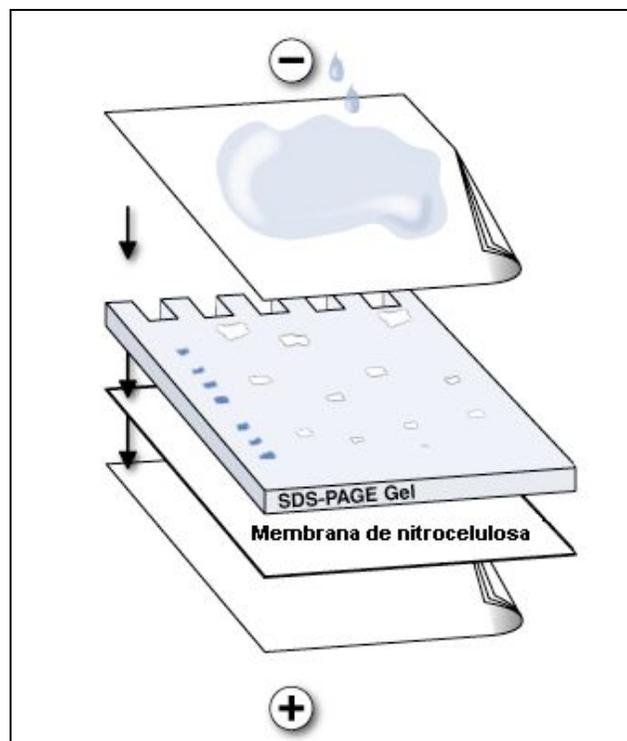


Figura 20. Esquema del dispositivo de electrotransferencia

4. Transferir las proteínas separadas del gel a la membrana de nitrocelulosa con el voltaje fijo a 20 V por cuarenta minutos.
5. Finalizado el tiempo de transferencia, remover el gel y la membrana del dispositivo de transferencia; marcar la orientación del gel en la membrana y removerlo, lavar brevemente con solución amortiguadora salina Tris y Tween 20 (TBS-T).  
La membrana de nitrocelulosa con las proteínas transferidas a su matriz (blot) puede ser usada inmediatamente (inmunodetección) o se deja secar para almacenar (2 -8 °C) y usarla posteriormente.

#### **11.1.6 Inmunodetección**

1. Bloquear los sitios de unión inespecíficos de la membrana y proteínas transferidas por inmersión de la membrana en una solución de leche descremada al 5% y TBS, durante toda la noche a 4° C en agitación orbital constante.
2. Lavar la membrana con dos cambios de TBS-T.
3. Diluir el anticuerpo primario (IgG de conejo anti HCN1, HCN2, HCN3 o HCN4 según el caso; Alomone) en TBS-T (1:300) en un volumen final de 1.5 ml.
4. Incubar la membrana en el volumen diluido de anticuerpo primario durante toda la noche a 4° C, en un incubador rotatorio.
5. Lavar brevemente la membrana con dos cambios de TBS-T y enseguida lavar la membrana en un volumen de 4ml/cm<sup>2</sup> de TBS-T (dos cambios por cinco minutos cada uno)
6. Continuar con los lavados de la membrana (tres cambios por diez minutos cada uno) con TBS a temperatura ambiente.
7. Diluir el anticuerpo secundario (IgG de cabra anti IgG de conejo, marcado con peroxidasa de rábano; Amersham Biosciences) en PBS-T (1:5000) en un volumen final de 2.5 ml.
8. Incubar la membrana en el volumen diluido del anticuerpo secundario durante una hora a temperatura ambiente, en un incubador rotatorio.
9. Repetir el protocolo de lavados en los pasos 5 y 6.
10. Dejar a temperatura ambiente el kit de quimioluminiscencia ECL Plus para que se establezca y luego mezclar 2 ml de solución A en 50 microlitros de solución B.

11. Retirar el exceso de TBS-T de la membrana a partir del último paso de lavado y depositarla sobre una hoja de acetato con el lado de las proteínas transferidas hacia arriba, cubrir la membrana con la solución de detección.
12. Incubar a temperatura ambiente por cinco minutos.
13. Retirar el exceso de la solución de detección de la membrana y depositarla sobre una hoja de acetato nueva; cubrir ambos lados con acetatos, evitar la formación de burbujas entre la membrana y los acetatos.
14. Depositar la membrana cubierta por el acetato en un cassette para placas de rayos-X, con el lado de las proteínas hacia arriba.
15. Poner una hoja de placa autoradiográfica sobre la membrana. Cerrar el cassette y permitir la exposición por el tiempo necesario. ( de 10 segundos a 5 minutos dependiendo de la intensidad de la emisión).
16. Retirar la placa autoradiográfica del cassette, revelar y fijar.
17. Analizar las bandas de revelado obtenidas en las placas autoradiográficas, de acuerdo con la orientación marcada en las membranas.
18. Comparar las longitudes de migración de los estándares de peso molecular con la migración de las bandas reveladas, para determinar el peso molecular de la proteína detectada por Western-blot.

## **Inmunohistoquímica**

### **11.1.7 Perfusión, obtención y fijado de los tejidos**

1. Anestesiarse a la rata con cloroformo.
2. Una vez que el animal se encuentre anestesiado profundamente, se procede a la apertura de la cavidad torácica, quedando al descubierto pulmones y corazón.
3. Se rasga el pericardio para liberar así el corazón.
4. Se sujeta el corazón con fórceps y se perfora el ventrículo izquierdo con la cánula de perfusión, haciéndola penetrar el ventrículo hasta llegar al interior de la aorta.
5. A continuación se pinza la cánula con los fórceps que sujetan al corazón para mantenerla fija durante toda la perfusión.

6. Con unas tijeras se rasga la aurícula derecha para que a través de esta salga toda la sangre contenida en el torrente circulatorio, que es arrastrada por la solución de perfusión.
7. A través del corazón se perfunde una solución lavadora durante un minuto y después una solución fijadora durante cinco minutos, ambas soluciones deben estar previamente enfriadas en hielo.
8. Al finalizar la perfusión se procede a la obtención de los tejidos para su procesamiento postfijación.
9. Una vez obtenidos los diferentes tejidos (riñones y cerebro) se sumergen en solución fijadora y se mantiene en esta durante cinco horas a 4° C.
10. Se obtienen un corte del riñón que incluya la médula interna la médula externa y la corteza.
11. Después se sumergen los tejidos (cerebro y riñón) en una solución de crioprotección que contiene sacarosa al 30% y se mantienen en ésta toda la noche o hasta que la solución se incluya por completo en los tejidos, esto se observa ya que los tejido flotan en la solución y a mitad que la solución vaya incluyéndose, estos descienden al fondo del frasco contenedor. Este proceso se realiza a 4° C.

#### **10.1.8 Obtención de cortes**

1. Los tejidos se recubren con resina "tissue teck" y se almacenan en el congelador del criostato por dos horas mínimo, para que alcancen la temperatura de corte (-27° C).
2. Los cortes se realizan con un espesor de 10 µm y se recogen en un cubreobjetos previamente gelatinizado.
3. Los cortes se dejan secar al aire libre por una hora y se almacenan a -70° C hasta su procesamiento inmunohistoquímico.

#### **11.1.9 Inmunofluorescencia Indirecta**

1. Descongelar los cortes 10 minutos a temperatura ambiente.
2. Lavarlos 5 minutos con solución lavadora en dos ocasiones.
3. Incubarlos 30 minutos en Buffer de Citratos 10 mM pH (8-9) a 80°C y dejar enfriarlos a temperatura ambiente en el buffer de citratos.
4. Lavarlos 10 minutos con solución lavadora dos veces

5. Permeabilizar con solución de lavado con Tritón X100 al 0.3% por diez minutos a temperatura ambiente en agitación suave
6. Incubar con solución de bloqueo durante 45 minutos a temperatura ambiente en agitación suave
7. Incubar con el anticuerpo primario (IgG de conejo anti HCN1-4, dilución 1:100) en solución para anticuerpos y dejarlos de 18 a 24 horas en cámara húmeda.
8. Lavar 5 minutos en PBS-T 0.1% y luego 3 veces por 10 minutos
9. Incubar con el anticuerpo secundario (IgG de cabra anti IgG de conejo, conjugada con fluoresceína, dilución 1:500) por una hora a temperatura ambiente
10. Lavar 5 minutos con PBS-T y tres veces por 10 minutos.
11. Montar los cortes en fresco (sin deshidratar) con medio para fluorescencia VECTASHIELD (Vector)

### 11.1.10 Microscopía de Fluorescencia Confocal

Los tejidos procesados con las técnicas de inmunofluorescencia, se observan en el microscopio invertido de epifluorescencia. Las imágenes se capturan utilizando el sistema confocal. El fluoróforo utilizado (Alexa 488) se excita a 488nm, utilizando una línea de argón y la emisión es detectada utilizando un filtro a 520 nm.

## 11.2 SOLUCIONES Y REACTIVOS

### 11.2.1 Solución de extracción de proteínas

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

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

### 11.2.2 Solución amortiguadora salina Tris (TBS) pH 7.6

Trizma Base	4.844g	12.11g
NaCl	16 g	40 g
H2O cbp	2000 ml	5000 m
Ajustar el pH con HCl 1N (puede almacenarse a 4° C por un mes)		

### 11.2.3 Solución TBS-T (TBS con Tween 20 al 0.1%)

Diluir 1 ml de Tween 20 en 999ml de TBS.

### 11.2.4 Solución de electroforesis (BioRad)

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

### 11.2.5 Gel de SDS-poliacrilamida

#### 11.2.5.1 Gel separador (10%) 5ml

Para dos geles separadores se preparan 10 ml con las siguientes concentraciones:

4 ml	H <sub>2</sub> O desionizada y filtrada
3.3 ml	mix de acrilamida 30%*
2.5 ml	Tris pH 8.8 1.5 M
0.1 ml	SDS 10%
0.1 ml	Persulfato de Amonio 10% p/v (mezclar levemente)
0.004 ml (4 $\mu$ l)	TEMED (mezclar y verter inmediatamente)

*Nota: Para vidrios de 0.75 mm verter 3ml x gel*

*Para vidrios de 1.00 mm verter 4ml x gel*

Una vez en las placas verter aproximadamente 200  $\mu$ l de N-butanol para linearizar el gel y esperar 15 min a que polimerice y enjuagar con agua.

\*Mezcla de acrilamida: 29g de acrilamida y 1g de N,N'-metilbisacrilamida, disolver 40 ml de H<sub>2</sub>O y llevar a 100 ml de aforo. Almacenar a 4° C en un frasco ámbar.

#### 11.2.5.2 Gel concentrador (5%)

Para dos geles concentradores preparar 5 ml en las siguientes concentraciones:

3.4 ml	H <sub>2</sub> O desionizada y filtrada
0.83 ml	mix de acrilamida 30%
0.63 ml	Tris pH 6.8 1 M

0.05 ml	SDS 10%
0.05 ml	Persulfato de Amonio 10% p/v (mezclar levemente)
0.005 ml (5 $\mu$ l)	TEMED (mezclar y verter inmediatamente)

#### **11.2.6 Solución de transferencia (pH 8.3)**

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

#### **11.2.7 Reactivo para cuantificar proteínas**

Soluciones A y B (Bio-Rad). Método de Lowry.

#### **11.2.8 Reactivos ECL Plus para análisis de Western-blot (Amershan Biosciences)**

Anticuerpo secundario, acoplado a peroxidasa de rábano

Reactivo de Bloqueo (leche descremada, BioRad) Preparar al 10% con TBS-T

Reactivos de detección (mezclar A y B en proporción 1:40 antes de usar)

#### **11.2.9 Solución reveladora para placas radiográficas (Kodak)**

Pesar 145 g y disolver en 1 L de agua a 70° C.

Almacenar en frasco Ámbar.

#### **11.2.10 Solución fijadora para placas radiográficas (Kodak)**

Mezclar con agitación rápida 500 ml de agua, 149 ml de solución A y 27.4 ml de solución B.

Adicionar cbp 1L.

Almacenar en frasco Ámbar.

#### **11.2.11 Solución desnaturalizante (Laemmli)**

Tris-HCl (pH 6.8)	50mM
Mecarptoetanol	5%
SDS	2%
Azul de bromofenol	0.1%

Glicerol 10%

Preparar sin el mecarptoetanol y almacenar a temperatura ambiente, adicionar el mecarptoetanol antes de usar.

#### **11.2.12 Solución de lavado (PBS)**

PB 0.2M pH 7.4	100ml
NaCl	8.76g
KCl	0.2g
H <sub>2</sub> O	cbp 1000ml

#### **11.2.13 Solución fijadora**

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

#### **11.2.14 Solución Bloqueadora**

Solución de lavado con Tritón X100 al 0.1%

Suero de caballo al 5%

Suero bovino fetal al 5%

#### **11.2.15 Solución para anticuerpos**

A la solución bloqueadora se le agrega albúmina 1mg/ml