



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



FACULTAD DE QUÍMICA

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**Caracterización del papel fisiológico de los canales catiónicos
activados por hiperpolarización y modulados por nucleótidos
cíclicos en el riñón de la rata**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A :
Biól. Ricardo Saldaña Meyer

TUTORA
Dra. Laura Escobar Pérez



2009



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.

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 gran importancia en los campos de la neurobiología y la investigación cardiovascular. Se han realizado una gran cantidad de avances que han ayudado a conocer mejor sus propiedades farmacológicas y sus posibles aplicaciones en la medicina. Sin embargo, cada vez aumentan la cantidad de reportes sobre su presencia en diferentes tejidos no-excitables. A la fecha se tiene evidencia de la presencia de la familia HCN en células pancreáticas β y α , en el hígado, en células HEK293 y en ovario, sin embargo, su función en estos tejidos todavía no es clara.

En esta tesis describiré el trabajo que realicé para ampliar la evidencia que se tiene sobre la presencia de la familia de canales HCN en el riñón de la rata. En la primera sección 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 sección se describe de manera general la fisiología renal. Debido a que se tiene evidencia que los canales HCN generan una corriente entrante de Na^+ y que a los resultados que se obtuvieron en este trabajo muestran una distribución diferencial de los canales en las células secretoras de protones, segmentos de la nefrona que están implicados en la absorción de Na^+ y en la regulación de la acidosis, se hace especial énfasis en los mecanismos de reabsorción del Na^+ en el riñón y en los mecanismos del equilibrio ácido-base. En la última sección se presentan y se discuten los resultados obtenidos en este proyecto de investigación que sugieren el posible papel de los canales HCN en los epitelios renales.

RESUMEN

Los canales catiónicos activados por la hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos (HCN) participan en la generación y regulación de la actividad de marcapaso en el corazón y el cerebro. Esta familia de canales consta de cuatro miembros HCN1-4 de los cuales se conoce ampliamente su función en los tejidos excitables. Recientemente se obtuvo evidencia de la presencia de esta familia de canales no-selectivos en el riñón, en particular en el túbulo colector de la médula interna. A la fecha se tienen reportes de la presencia de la familia HCN en el hígado, en células pancreáticas β y α , en células HEK293 y en el ovario. Sin embargo, la función de los canales HCN en los epitelios renales se desconoce.

El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia y distribución de la familia de los canales HCN en el riñón de la rata teniendo como propósito poder dilucidar su papel fisiológico en éste. Por medio de ensayos de inmunofluorescencia se demostró la presencia de todos los integrantes de la familia HCN, tanto en la corteza como en la médula renal. Los canales HCN1, HCN3 y HCN4 se localizan en las membranas apicales y los canales HCN2 en las membranas basolaterales. Se distribuyen por todo lo largo de la nefrona, los canales HCN1 y HCN3 en los túbulos proximales, los canales HCN4 en la porción ascendente del asa de Henle y los canales HCN2 en la nefrona distal, específicamente en las células intercaladas tipo A. Los canales HCN1 y HCN4 aumentaron sus niveles de proteína en las membranas plasmáticas de la corteza en condiciones crónicas de acidosis metabólica.

Considerando las propiedades biofísicas de estos canales aunadas a los resultados obtenidos sobre su distribución en el riñón y su regulación en condiciones crónicas de acidosis metabólica nos llevan a sugerir que su papel fisiológico en los epitelios renales podría ser la reabsorción del Na^+ y/o también el transporte de amonio. Este trabajo muestra evidencias firmes de la presencia de la familia de canales no-selectivos HCN en los epitelios renales y aporta evidencia sobre su posible papel fisiológico. Este hallazgo tendrá un gran impacto en el campo de la fisiología renal y ayudarán a entender mejor los mecanismos de regulación en el riñón.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1.01 CANALES IÓNICOS	1
FUNCIÓN	1
TIPOS DE CANALES	2
1.02 CANALES IÓNICOS SENSIBLES AL VOLTAJE	3
1.03 CANALES DE POTASIO	5
1.04 CANALES CATIONICOS ACTIVADOS POR HIPERPOLARIZACIÓN Y MODULADOS POR NUCLEÓTIDOS CÍCLICOS (HCN)	6
ACTIVIDAD DE MARCAPASO	7
LOCALIZACIÓN	8
CLONACIÓN	9
CINÉTICA Y MODULACIÓN POR NUCLEÓTIDOS CÍCLICOS	9
TOPOLOGÍA	10
APLICACIONES MÉDICAS	11
II. ANATOMIA Y FISILOGIA RENAL	12
2.01 CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DEL RIÑÓN	12
ESTRUCTURA DE LA NEFRONA	12
2.02 TRANSPORTE DE Na⁺ EN EL RIÑÓN	16
REABSORCIÓN DE Na ⁺ EN LOS TÚBULOS DISTALES	17
SISTEMA RETROALIMENTARIO TÚBULO-GLOMERULAR	20
EQUILIBRIO GLOMERULOTUBULAR	20
ALDOSTERONA, NERVIOS SIMPÁTICOS Y LA HORMONA ANTIDIURÉTICA	21
2.03 HOMEOSTASIS ÁCIDO-BASE	22
PRODUCCIÓN METABÓLICA DE ÁCIDO-BASE	23
TRANSPORTE ÁCIDO-BASE	24
PRODUCCIÓN Y EXCRECIÓN DE AMONIO RENAL	29
III. ANTECEDENTES	30
IV. HIPÓTESIS	31
V. OBJETIVO GENERAL	31
5.01 OBJETIVO PARTICULARES	31
VI. RESULTADOS	32
6.01 HCN1	33
6.02 HCN2	38
6.03 HCN3	44
6.04 HCN4	49

6.05	DIETA ALTA EN K⁺ Y ACIDOSIS METABOLICA	53
<u>VII. DISCUSIÓN</u>		<u>55</u>
7.01	HCN1 Y HCN3 EN LOS TÚBULOS PROXIMALES	56
7.02	HCN2 EN LA NEFRONA DISTAL	58
7.03	HCN4 EN LA PORCIÓN ASCENDENTE DEL ASA DE HENLE	62
<u>VIII. CONCLUSIONES</u>		<u>64</u>
<u>IX. PERSPECTIVAS</u>		<u>65</u>
<u>X. MATERIALES Y MÉTODOS</u>		<u>66</u>
10.01	OBTENCIÓN DE TEJIDOS PARA WESTERN-BLOT	66
10.02	OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS CRUDOS DE MEMBRANAS	66
10.03	FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS CRUDOS	67
10.04	ELECTROFORESIS DE LAS PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA	67
10.05	TRANSFERENCIA DE LAS PROTEÍNAS A LA MEMBRANA DE NITROCELULOSA	68
10.06	INMUNODETECCIÓN	69
10.07	PERFUSIÓN, OBTENCIÓN Y FIJADO DE LOS TEJIDOS PARA INMUNOFLORESCENCIA	70
10.08	OBTENCIÓN DE CORTES	71
10.09	INMUNOFLORESCENCIA	71
10.10	MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA CONFOCAL	72
10.11	PROTOCOLO PARA DIETA ALTA EN K⁺	72
10.12	PROTOCOLO PARA INDUCIR ACIDOSIS METABÓLICA CRÓNICA	72
<u>XI. SOLUCIONES Y REACTIVOS</u>		<u>73</u>
<u>XII. REFERENCIAS</u>		<u>76</u>

Caracterización del papel fisiológico de los canales catiónicos activados por hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos en el riñón de la rata

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Laura Escobar Pérez en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Laura Escobar Pérez	Facultad de Medicina, UNAM
Dra. Norma Bobadilla Sandoval	IIB, UNAM
Dr. José Pedraza Chaverri	Facultad de Química, UNAM

Reconozco y agradezco la asesoría técnica y teórica que recibí de parte del Dr. Rolando Carrisoza a lo largo de la elaboración de este proyecto.

Durante mis estudios de Maestría fui apoyado por una beca otorgada por el CONACyT para realizar estudios de posgrado.

El jurado designado por el Posgrado de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas para evaluar esta Tesis de Maestría estuvo constituido por:

Dr. Luis A. Vaca Domínguez	IFC, UNAM
Dr. Gerardo Gamba Ayala	IIB, UNAM
Dr. José de Jesús García Valdés	Facultad de Química, UNAM
Dra. Norma Bobadilla Sandoval	IIB, UNAM
Dr. José Pedraza Chaverri	Facultad de Química, UNAM

I. INTRODUCCIÓN

1.01 CANALES IONICOS

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 Na^+ y del 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 K^+ en los axones y encontraron que el movimiento del K^+ radioactivo a través de la membrana se podía explicar mejor si los 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 está formado por una o más proteínas. Los canales contienen un poro central que se abre mediante un cambio conformacional y así permiten que los iones fluyan a través de éste 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 variedad 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 segundos mensajeros en el citoplasma. Otros canales se abren por cambios en el voltaje a través de la membrana y otros por estímulos sensoriales. También los canales presentan selectividad para los iones a los que son permeables. Algunos permiten el paso de un solo ión, como el Na⁺ o el 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 cloruro

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

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

1.02 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 de 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.

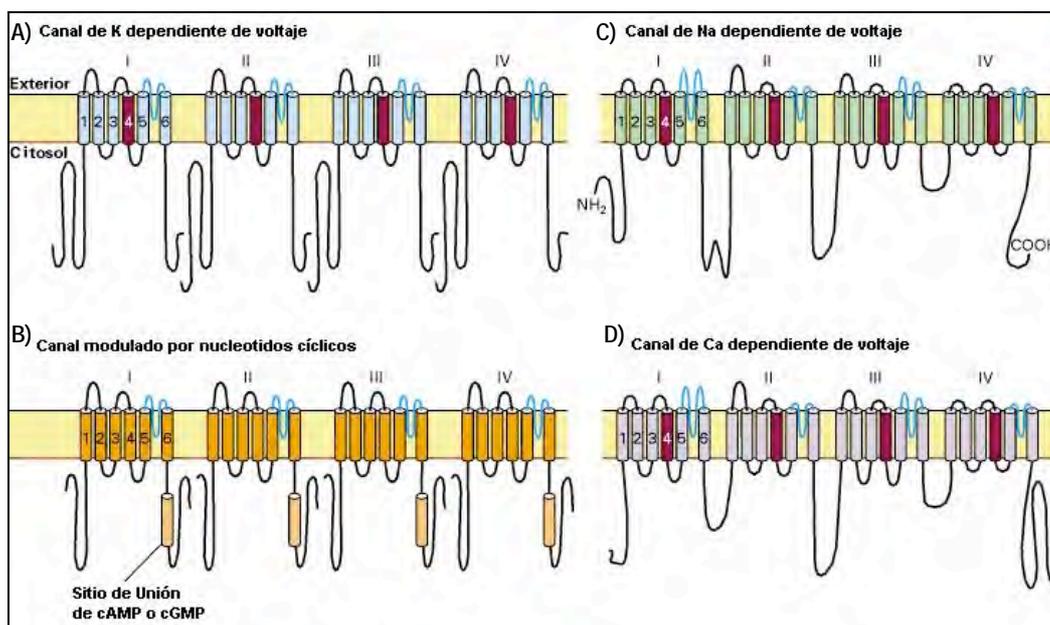


Figura 1. Los diferentes tipos de canales sensibles al voltaje (Lodish et al, 2000). A) El canal de K^+ sensible al voltaje es un tetrámero con cuatro subunidades idénticas cada una contiene 656 amino ácidos y seis α -hélices transmembranales (indicadas por números arábigos). La hélice 4 (en café) actúa 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^+ y Ca^{2+} 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^+ sensible al voltaje (Kv) 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^+ y Ca^{2+} están formados por un solo polipéptido de aproximadamente 2,000 aminoácidos con cuatro dominios transmembranales homólogos, cada uno similar a un canal de Kv en estructura y secuencia (fig. 1). Los dominios están conectados por asas más pequeñas no-homólogas (Lodish, 2000).

Los canales de Kv 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^+ 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. Se piensa que este movimiento de cargas, bajo la fuerza del campo magnético que generan, 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^+ pero también se observan dominios S4 similares en canales de Na^+ y de 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 K^+ sensible al voltaje, se logró demostrar el papel del sensor de voltaje con estudios realizados en canales de K^+ con mutagénesis dirigida de uno o varios aminoácidos en el S4 (Catteral, 2006).

Las similitudes entre los canales de K^+ , Na^+ y 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 con carga positiva cada 3 ó 4 residuos.
- Los canales de Na^+ y Ca^{2+} tienen una amplia homología a lo largo de su secuencia. Cada uno contiene cuatro dominios transmembranales con seis

α -hélices y un segmento H5 que constituye el filtro de selectividad del poro en cada dominio. La topología transmembranal de los canales de K^+ que son mucho más pequeños, es similar a la de cada dominio de los canales de Na^+ y Ca^{2+} .

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

1.03 CANALES DE POTASIO

Los canales de 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 K^+ forman la superfamilia más extendida en los organismos. Se han identificado más de 200 genes que codifican para diferentes proteínas relacionadas

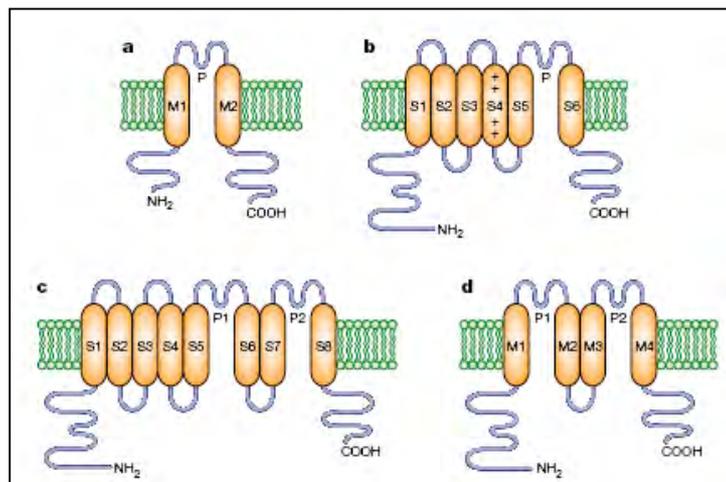


Figura 2. Las cuatro clases de canales de K^+ (Shieh, 2002). a) Los canales 2TM/P consisten de 2 hélices transmembranales (TM) con un asa P entre ellas. Ejemplos de este tipo son los canales rectificadores entrantes de K^+ y canales bacterianos de K^+ como el KcsA. b) Los canales 6TM/P son la clase predominante de los canales de 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.

con los canales de 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 (K_v), dependientes de Ca^{2+} (K_{Ca}) y rectificadores entrantes (K_{ir}) (Coetzee, 1999). Además se pueden agrupar

según el número de segmentos transmembrana de la subunidad alfa que forma el poro del canal (fig. 2) (Shieh, 2002). Los canales de K^+ participan en el control del flujo del 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 K^+ han sido usados en la medicina como agentes contra la isquemia, anti-arrítmicos, anti-angina y anti-hipertensivos.

La importancia de los canales de 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 K^+ con muchas patologías neurológicas, como por ejemplo el síndrome de la ataxia episódica (Browne, 1994; Adelman, 1995) y las arritmias cardíacas (Curran, 1995; Sanguinetti, 1995). Las mutaciones en el gen del receptor a sulfonilureas, una subunidad β del canal de 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 canales de K^+ . Sin embargo, lo importante es que estas anormalidades fisiológicas causadas por mutaciones en varios genes de canales Kv ha facilitado la clonación de varios de estos canales en *Drosophila* y de sus homólogos en otras especies (Jan & Jan, 1992, Gantenzky, 1995).

1.04 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

permeable a Na^+ y K^+ (con una proporción 1:4 vs. 1:100 de los canales de K^+ ; DiFrancesco, 1981), a pesar de tener en el poro el mismo motivo GYG en el filtro de selectividad, que está conservado en todos los canales de 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 fue en las células del nódulo sinoauricular (Brown, 1979) y 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 cardíaco.

Desde entonces, los canales HCN se han investigado ampliamente por sus propiedades de marcapaso en preparaciones cardíacas y no-cardíacas, 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 el potencial de acción cardíaco se regenera. A pesar de que los canales HCN son más selectivos por el K^+ que por el Na^+ , en condiciones fisiológicas no se presentan altas concentraciones de K^+ extracelular, por lo que los canales HCN se comportan como canales de Na^+ ; el influjo de los iones 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 Na^+ lo cual despolariza a la membrana plasmática a un voltaje umbral de activación de los canales de Ca^{2+} sensibles al voltaje, lo que genera un nuevo potencial de acción. Una vez que se llega a la meseta, cerca del equilibrio electroquímico del ion Ca^{2+} , se cierran los canales de Ca^{2+} y la permeabilidad de la membrana al K^+ aumenta

rápidamente con la apertura de los canales de Kv y así el voltaje de reposo se recupera (fig. 3). De esta manera se generan potenciales de acción de manera rítmica (Guyton, 2001).

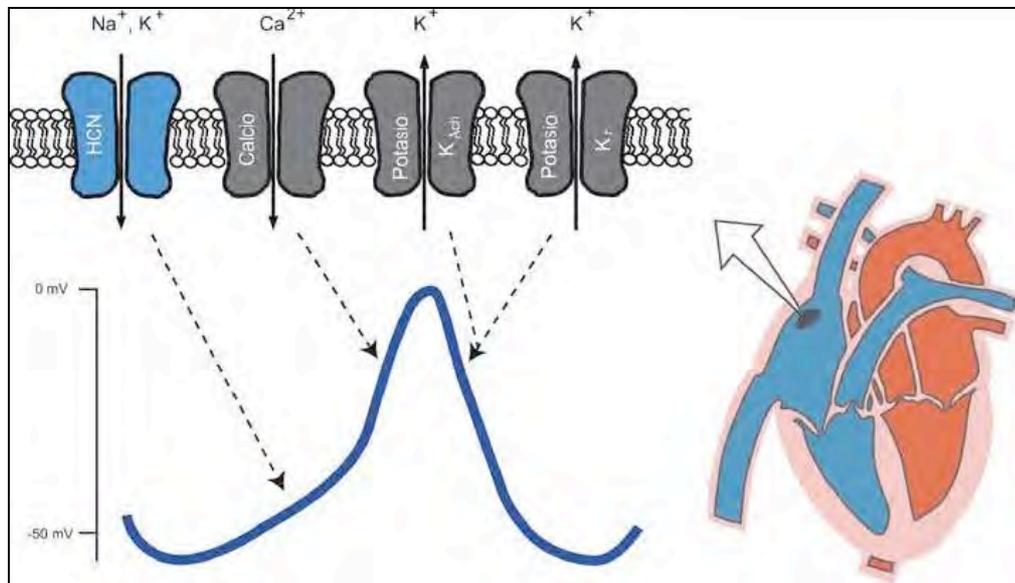


Figura 3. Esquema del potencial en el nódulo sinoauricular (Craven, 2006). Se muestran el nódulo sinoauricular del corazón (ovalo negro) y los canales iónicos responsables de la actividad de marcapaso (arriba a la izquierda), cada canal contribuye a una fase del potencial de acción sinoauricular, cada fase se indica con líneas punteadas.

Localización

Los canales HCN están ampliamente distribuidos en los tejidos excitables. La tabla 1 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 α y β -pancreáticas y ovario.
<u>HCN2</u>	Neuronas periféricas y centrales, retina (células bipolares), células cardíacas y células α y β -pancreáticas, el ovario y en médula interna del riñón.
<u>HCN3</u>	Cerebro, retina (células bipolares), células α y β -pancreáticas y ovario.
<u>HCN4</u>	Tálamo, retina (células bipolares), bulbo olfativo, nódulo sinoauricular, células gustativas, testículos, células α y β -pancreáticas y ovario.

Tabla 1. Distribución regional de la familia de canales HCN en la rata (Hofmann, 2005; Eikoly, 2007; Bolivar, 2008).

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 presenta las características de un canal Kv con seis dominios transmembrana, una α -hélice cargada en el S4 y un dominio de unión a los nucleótidos cíclicos (CNBD) en el carboxilo-terminal intracelular. Después se identificaron otras isoformas de los HCNs (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) los cuales pertenecen 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 lo que permite que se bloquee inmediatamente.
- El ZD7288, un bloqueador relativamente específico de la corriente nativa I_f , los bloquea lenta e irreversiblemente, esto requiere 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. 4). El cuarto dominio transmembranal (S4) contiene varios residuos de aminoácidos cargados positivamente y, al igual que para 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 de NMPc llamado el CNBD (Craven, 2006).

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).

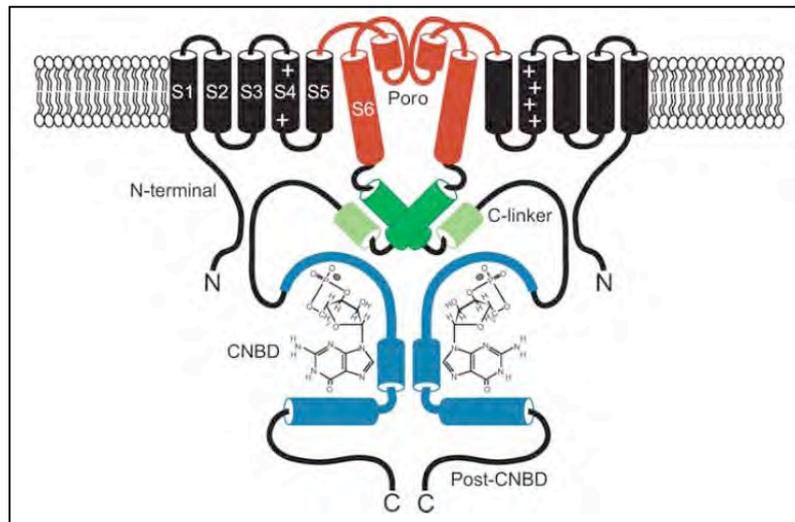


Figura 4. Esquema de la topología de los canales HCN (Craven, 2006) Dos de las cuatro subunidades que forman el canal completo se muestran en la imagen. Los segmentos transmembranales (S1-S6) se muestran en negro, con excepción de la región del poro (S6 y el asa del poro) que se muestran en rojo. El 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.

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 β -adrenérgicos y los antagonistas de Ca^{2+} . La modulación farmacológica de los canales HCN podría aplicarse 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).

II. ANATOMIA Y FISILOGIA RENAL

2.01 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 de los 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 según el 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. 5). La médula a su vez se divide en dos partes, la médula externa y la 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).

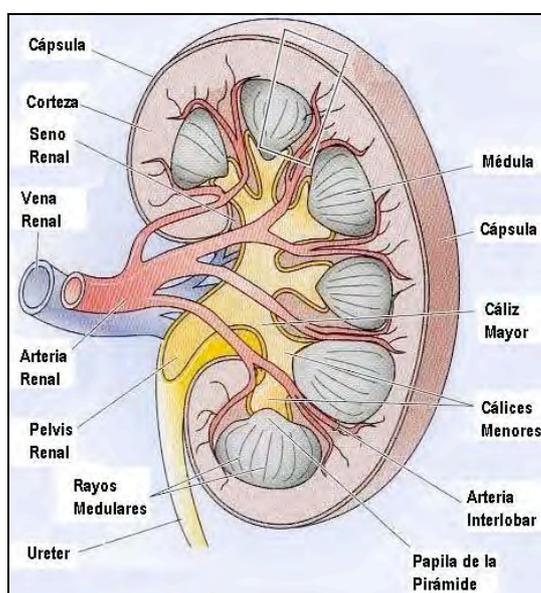


Figura 5. Anatomía del riñón (modificada de Boron, 2003) Se muestra el diagrama de un corte de riñón humano. Una cápsula fibrosa recubre cada riñón. Se pueden apreciar dos capas principales, la corteza (zona externa granular) y la médula (pirámides). La médula se subdivide en 8 a 18 pirámides renales, donde cada una termina en la pelvis renal. De la papila de cada pirámide la orina escapa hacia los cálices menores del seno renal.

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 integrada por los segmentos siguientes: empieza en el espacio de Bowman y le siguen 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 tipo de nefronas, las superficiales corticales y las yuxtamedulares (Fig. 6). Las nefronas corticales

superficiales tienen glomérulos en la corteza externa. Estas nefronas poseen asas de Henle relativamente cortas que solo descienden hasta la médula externa. Los glomérulos de las nefronas yuxtamedulares se encuentran cerca del borde corticomedular. Los glomérulos de estas nefronas son más largos comparados

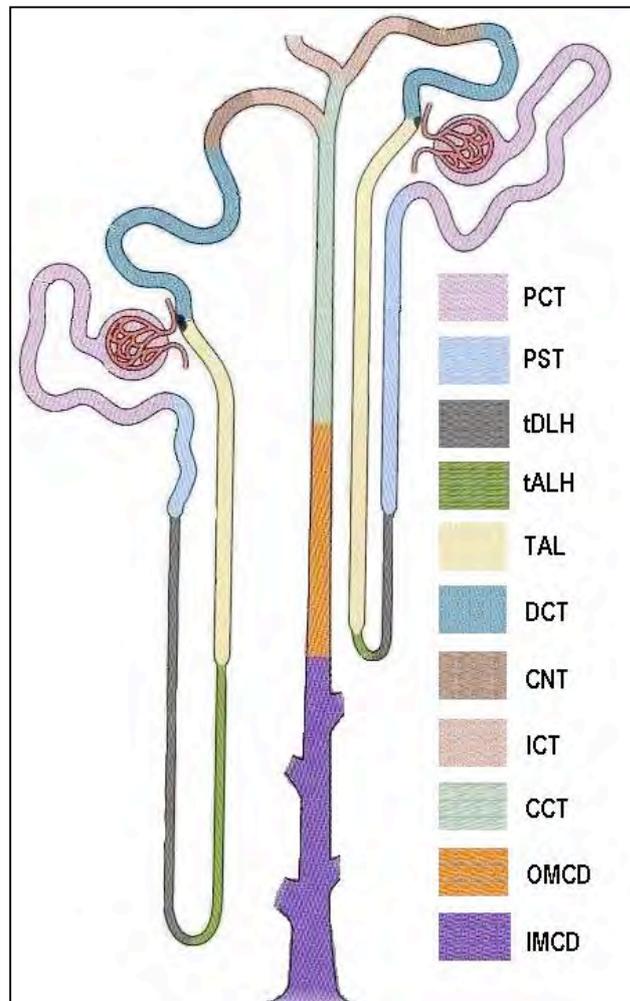


Figura 6. Neuronas yuxtamedulares y corticales. (modificada de Boron, 2003) Se muestran los diferentes segmentos de las nefronas ilustrados con diferentes colores. Los túbulos proximales se dividen en túbulo contorneado proximal (PCT) y el túbulo recto proximal (PST). El asa de Henle se divide en la 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 medula externa y el túbulo colector de la medula interna.

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, que 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 éstos 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 (PT) están extensamente amplificadas (Fig. 6). 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 disminuye progresivamente, lo que esta correlacionado con la disminución gradual de las tasa de reabsorción a lo largo del túbulo. Las células del PT 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 (TAL), 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 esta 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 esta invaginada y es muy extensa. La maquinaria celular que presentan estas células se correlaciona 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 las 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 2 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	S1 S2	Reabsorción: Cl ⁻ , K ⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , H ₂ O, fosfato, sulfato, glucosa, aminoácidos, mono y dicarboxilatos, urea, HCO ₃ ⁻ . Secreción: H ⁺ y NH ₃ y urato.
Túbulo recto proximal	S3	Reabsorción: Na ⁺ , Cl ⁻ , glucosa, urato. Secreción: K ⁺ .
Porción delgada descendente del asa de Henle	Células tDLH	Reabsorción: Na ⁺ . Secreción: K ⁺ , urea y NH ₄ ⁺ .
Porción delgada ascendente del asa de Henle	Células tALH	Reabsorción: Na ⁺ , Cl ⁻ , Ca ²⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ , NH ₄ ⁺ , HCO ₃ ⁻ .
Porción gruesa ascendente del asa de Henle	Células TAL	Reabsorción: Na ⁺ , Cl ⁻ , Ca ²⁺ , H ₂ O, fosfato, HCO ₃ ⁻ .
Túbulo contorneado distal	CDT	Reabsorción: Na ⁺ , Cl ⁻ .
Túbulo conector	Células CNT Células Intercaladas	Reabsorción: Na ⁺ , NH ₄ ⁺ , Cl ⁻ .
Túbulo colector inicial	Células Principales	Secreción: K ⁺ .
	Células Intercaladas	Reabsorción: Na ⁺ , NH ₄ ⁺ , Cl ⁻ . Secreción: K ⁺ .
Túbulo colector cortical	Células Principales	Reabsorción: Na ⁺ . Secreción: K ⁺ .
	Células Intercaladas	Reabsorción: K ⁺ , NH ₄ ⁺ . Secreción: H ⁺ . Reabsorción: Na ⁺ , Cl ⁻ .
Túbulo colector de la médula externa	Células principales	Reabsorción de Ca ²⁺ , HCO ₃ ⁻ . Secreción: NH ₄ ⁺
Túbulo colector de la médula interna	Células IMCC	Reabsorción de K ⁺ , urea, HCO ₃ ⁻ . Secreción: H ⁺

Tabla 2. 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 las células intercaladas y las 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^+ (células intercaladas tipo A) o HCO_3^- (células intercaladas tipo B) y reabsorben K^+ . 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 Na^+ a través del canal epitelial de Na^+ sensible a amilorida y regulado por aldosterona.

El conducto colector de la médula está formado prácticamente por un solo tipo celular que aumenta en longitud conforme se acerca a la papila. El número de las células intercaladas disminuye al inicio del 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 está regulado hormonalmente.

2.02 TRANSPORTE DE Na^+ EN EL RIÑÓN

El Na^+ es el principal catión del compartimiento del líquido extracelular (LEC) que consta de plasma y líquido intersticial. La cantidad de 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 Na^+ tienen una importancia decisiva para conservar el volumen del LEC y el sanguíneo, así como la presión arterial. Los riñones regulan la cantidad de Na^+ en la orina. El Na^+ es el ion con mayor importancia por su contribución a la osmolalidad total del LEC. La excreción normal diaria de Na^+ es solamente una mínima fracción del Na^+ total filtrado por los riñones. De todas las funciones del riñón, la reabsorción de Na^+ es la más importante (Constanzo, 1998).

La reabsorción de Na^+ se realiza tanto por la vía transcelular como por la vía paracelular. En la vía transcelular, la tasa de transporte depende de los gradientes electroquímicos, de los canales iónicos, y de los transportadores de la membrana apical y basolateral. Sin embargo, en la vía paracelular las fuerzas

electroquímicas transepiteliales y las propiedades de permeabilidad de las uniones comunicantes gobiernan el movimiento de los iones (Boron, 2003).

Un riñón normal filtra en un día alrededor de 150 l de plasma, los cuales contienen 135-140 mEq/l de Na^+ (alrededor de 18,000-20,000 mEq/día). Una dieta normal contiene cerca de 100 a 150 mEq de Na^+ /día, por lo que el riñón debe reabsorber el 99.5% del Na^+ que se filtra. Esta reabsorción de Na^+ se lleva a cabo en los túbulos renales (Fig. 7). 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. Aunque en las partes más distales de la nefrona sólo se reabsorbe el 15% del Na^+ filtrado, este último paso de reabsorción es el que regula predominantemente la homeostasis del Na^+ (Meneton, 2004).

Los túbulos colectores han sido los segmentos de la nefrona donde se creyó ocurría el ajuste final de la homeostasis del Na^+ , pero estudios recientes sugieren que el DCT y el CNT son los segmentos donde se ajusta la reabsorción del Na^+ (Meneton, 2004). Se ha observado que en la dieta occidental, caracterizada por ser alta en Na^+ y baja en K^+ , los ajustes en la reabsorción de Na^+ suceden casi completamente en el DCT y en el CNT.

Reabsorción de Na^+ en los Túbulos Distales

El proceso de la reabsorción de Na^+ en los túbulos distales es el resultado de un transporte coordinado de los 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 Na^+ y las rutas apicales transportan pasivamente la entrada del Na^+ , como se puede ver en la figura 7.

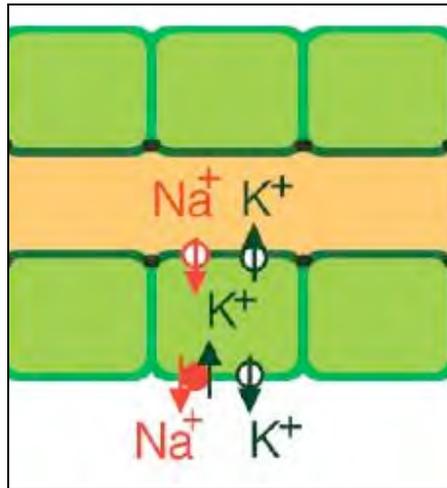


Figura 7. Reabsorción de Na⁺ en los túbulos distales (Tanemoto, 2007). En los túbulos renales el Na⁺ se reabsorbe a través de la vía transcelular desde el lumen (lado apical en amarillo) hacia el espacio intersticial (lado basolateral en blanco) mediante la conducción de la ATPasa Na⁺/K⁺ y la entrada pasiva a través de los transportadores de Na⁺ (membrana apical).

La salida apical de Na⁺ en cada segmento de los túbulos distales se lleva a cabo por diferentes moléculas (Fig. 8). En la porción gruesa ascendente del asa de Henle (TAL) se expresa el co-transportador Na⁺-K⁺-2Cl⁻ (Gamba, 1994), en el DCT el co-transportador Na⁺-Cl⁻ (Gamba, 1993) y en el CNT y en los ductos colectores (CD) se encuentra el canal epitelial de Na⁺ (ENaC; Rossier, 1994; Canessa, 1994). En cualquiera de estos segmentos, así como la ATPasa Na⁺/K⁺ induce la entrada de K⁺ a cambio de la salida de Na⁺, el mecanismo de secreción de K⁺ es necesario para que la reabsorción del Na⁺ pueda continuar. Por lo tanto, la actividad de reciclaje de K⁺ en los túbulos distales regula el LEC por estar acoplado directamente a la reabsorción del Na⁺.

La reabsorción del Na⁺ en el túbulo contorneado distal ocurre casi exclusivamente mediante la ruta transcelular. La entrada apical del Na⁺ se lleva a cabo por un cotransportador Na/Cl (NCC) electroneutro, que es parte de la familia de cotransportador Na/K/Cl en la porción ascendente del asa de Henle. Sin embargo, el NCC es independiente de K⁺ y es sensible a diuréticos de tiazida. A diferencia del cotransportador Na/K/Cl, la reabsorción basolateral de Na⁺ se lleva a cabo por la ATPasa Na⁺/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, mientras que la reabsorción del K^+ esta bajo la de la ruta basolateral (Tanemoto, 2007).

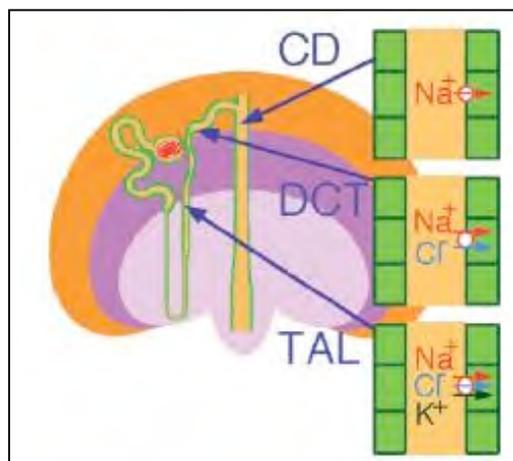


Figura 8. Diferentes proteínas involucradas en la salida apical de Na^+ (Tanemoto, 2007). Como la ATPasa Na^+/K^+ provoca la entrada intracelular de K^+ la ruta para la secreción de K^+ es indispensable para la reabsorción del Na^+ . Existe una ruta diferente de flujo apical del Na^+ para cada segmento de la nefrona. En la porción ascendente del asa de Henle (TAL) es el co-transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$, Na^+ , en los túbulos contorneados distales (DCT) es el co-transportador Na^+/Cl^- y en el ducto colector (CD) el canal de Na^+

El organismo regula el transporte de Na^+ mediante 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 Na^+ y de 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 la concentración de Na^+ y de Cl^- . La capacidad para registrar éstos cambios en concentración iónica se debe a la presencia en la membrana apical del cotransportador $\text{Na}/\text{K}/2\text{Cl}$. Este cotransportador es responsable de que la concentración intracelular de Na^+ y 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 Na^+ en la nefrona cambia porque alteraciones en la hemodinámica modifican la tasa de filtración glomerular, los túbulos proximales responden al reabsorber una fracción constante del Na^+ que está presente. Esta reabsorción de 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 Na^+ .

Si hay una pérdida excesiva de Na^+ (sudoración) del volumen del líquido extracelular (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 Na^+ y agua, que corresponde a una cantidad absoluta menor. Por lo tanto, el equilibrio glomerulotubular ayuda a prevenir una mayor pérdida de Na^+ y de agua. Sin embargo, si la retención del Na^+ causa la expansión del LEC y a su vez aumenta la tasa de filtración glomerular, el túbulo proximal empieza a excretar una fracción constante del 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 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 Na^+ en los ductos colectores iniciales, corticales y de la médula. A pesar de que sólo del 2% al 3% del Na^+ filtrado esta bajo control de la aldosterona, una pérdida de esta magnitud excede significativamente la ingesta diaria de Na^+ . La aldosterona actúa en las células principales de los ductos colectores y del túbulo distal. Los mecanismos celulares de la acción de la aldosterona incluyen la activación de los canales de Na^+ (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 la probabilidad de apertura. La activación de la entrada apical de Na^+ y la salida basolateral asegura que los niveles de 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 trasladan hacia el núcleo y aumentan la transcripción de sus genes blanco.

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

- Los altos niveles de estimulación simpática reducen marcadamente el flujo sanguíneo renal y por lo tanto la tasa de filtración glomerular. La excreción de Na^+ disminuye como consecuencia del equilibrio glomerulotubular proximal y de la respuesta al flujo de la parte distal de la nefrona.
- La norepinefrina estimula a la células granulares para secretar renina, así se activa el eje renina-angiotensina-aldosterona.
- Los estímulos simpáticos activan los receptores α -adrenérgicos en las células de los túbulos renales y se aumenta la reabsorción de

Na⁺, independientemente de cualquier efecto en la hemodinámica y es el resultado de la activación del intercambiador apical Na⁺/H⁺ y la bomba Na⁺/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 lo que causa un aumento en AMPc_i. 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, lo que permite que el agua salga del lumen tubular y entre al intersticio medular hipertónico. La AVP además estimula la reabsorción del Na⁺, aumenta la generación del intersticio hipertónico al estimular al cotransportador apical Na⁺/K⁺/Cl⁻ y a los canales de K⁺ ROMK. La AVP estimula el transporte de Na⁺, en las células principales de los túbulos colectores iniciales y corticales, al aumentar el número de canales de Na⁺ abiertos en la membrana apical (Boron, 2003).

2.03 HOMEOSTASIS ÁCIDO-BASE

Para mantener la homeostasis ácido-base, los túbulos renales secretan protones hacia el fluido tubular a una tasa igual a la suma de la generación extra-renal y de la filtración de bicarbonato.

El sistema de amortiguación del HCO₃⁻ difiere de otros sistemas en el cuerpo, ya que éste se regula tanto por los pulmones como por los riñones.



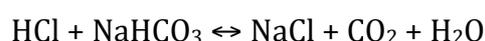
La hidratación/deshidratación del dióxido de carbono es el paso limitante. Esta reacción es normalmente lenta pero se ve significativamente acelerada cuando la enzima anhidrasa carbónica esta presente. La segunda reacción, la ionización del H₂CO₃ es virtualmente instantánea. Existen diferentes causas para un desbalance ácido-base. Si el desbalance es causa de un cambio en la concentración de bicarbonato en el plasma se considera una desorden metabólico ácido-base. Por el otro lado, si el desbalance es causa de un cambio en la presión parcial de CO₂ (Pco₂) se considera un desorden respiratorio ácido-base. Los riñones son los principales encargados de regular la concentración de bicarbonato en plasma y

en el fluido extracelular, asimismo los pulmones controlan la P_{CO_2} (Koeppen, 2006).

Producción metabólica de ácido-base

Los ácidos se pueden diferenciar en dos tipos, ácidos volátiles y no-volátiles. Los primeros, son producto de la hidratación del CO_2 al generar H^+ y los segundos (como el ácido láctico) son aquellos que no se derivan de esta reacción. Se debe tomar en cuenta que la producción de ácidos no-volátiles es altamente dependiente de la dieta. Por ejemplo, el metabolismo de amino ácidos da lugar a una producción neta de ácidos no-volátiles por lo que un individuo con una dieta alta en proteínas tendrá una producción alta de ácidos, en contraste un individuo con una dieta vegetariana tendría una producción neta de ácido disminuida.

Los ácidos no-volátiles producidos durante el metabolismo no circulan como ácidos libres sino que son amortiguados inmediatamente.



Este proceso de amortiguación da lugar a sales de Na^+ de los ácidos fuertes y quita al HCO_3^- del fluido extracelular. Para mantener el balance ácido-base los riñones deben excretar estas sales de Na^+ y reabastecer el HCO_3^- perdido en la titulación. Para mantener el balance ácido-base la excreción neta de ácidos debe igualar a la producción de ácidos no-volátiles. Bajo condiciones normales casi todo el HCO_3^- filtrado se reabsorbe y no hay rastros de este en la orina (Koeppen, 2006).

La membrana apical de la células proximales contiene un intercambiador Na^+/H^+ que secreta H^+ hacia el fluido tubular, se usa la energía del gradiente de Na^+ del lumen hacia la célula para lograrlo. A pesar de que el gradiente electroquímico del HCO_3^- favorece su movimiento pasivo hacia el exterior de la célula a través de la membrana basolateral, la difusión simple no parece ocurrir en una cantidad significativa.

El movimiento de HCO_3^- hacia el espacio peritubular esta acoplado a otros iones. La mayoría éste sale acoplado a Na^+ a través del cotransportador $Na^+/3HCO_3^-$.

Además el HCO_3^- sale al intercambiarse con Cl^- por el intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. En el fluido tubular los H^+ secretados se combinan con el HCO_3^- filtrado para formar H_2CO_3 . Este se convierte rápidamente a $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ con la ayuda de la anhidrasa carbónica presente en la membrana apical. El efecto neto es que por cada HCO_3^- que se quita del fluido tubular, un HCO_3^- aparece en la circulación peritubular (Koeppen, 2006).

Transporte ácido-base

Túbulo proximal

El túbulo proximal es el primero en recibir el ultrafiltrado glomerular que tiene una concentración aproximada de 25 mEq/l de HCO_3^- . El túbulo contorneado proximal acidifica la orina al secretar protones al fluido tubular lo que provoca la reabsorción de aproximadamente el 75% del HCO_3^- filtrado y así se disminuye la concentración tubular del HCO_3^- alrededor de 5 y 10 mEq/l y el pH de 7.4 a 6.8. El túbulo recto proximal tiene una menor aportación pero también contribuye en la secreción de protones y la reabsorción de HCO_3^- (Hamm, 1993).

Las células del túbulo proximal tienen un voltaje en el rango de -50 y -70 mV comparado con el espacio peritubular y su pH fluctúa entre 7.15 y 7.30 (Alpern, 1985; Biagi, 1981; Fromter, 1984; Yoshitomi, 1984). Con estos valores sabemos que los protones pueden entrar y las bases equivalentes pueden salir de la célula por la membrana basolateral de manera pasiva, mientras que se requiere de un transporte activo para la secreción de protones de la célula hacia el fluido tubular a través de la membrana apical (Hamm, 1993).

Transporte activo

Kinne-Saffrin y Kinne fueron los primeros en demostrar la presencia y la actividad de la ATPasa de protones en vesículas de las membranas de cepillo del túbulo proximal. Se demostró que la actividad de la ATPasa era independiente de Na^+ en experimentos donde se acidificaba las células del segmento S3, al quitar el Na^+ tanto del fluido tubular como del espacio peritubular, el pH intracelular regresaba a valores más básicos que los iniciales (Nakhoul, 1988). Tal vez la mejor evidencia disponible para demostrar la presencia de la ATPasa de

protones es el marcaje con anticuerpos específicos contra las subunidades de la ATPasa vacuolar (Brown, 1988).

Basándonos en los ejemplos anteriores se puede concluir que existe evidencia robusta que demuestra la presencia de la ATPasa vacuolar en las membranas apicales del túbulo proximal y su contribución en la acidificación del fluido tubular.

La membrana apical de los túbulos proximales tiene al intercambiador Na/H que es responsable de la absorción de la mayoría del NaHCO_3 y de la reabsorción del NaCl (Preisig, 1987; Preisig, 1988). Este intercambiador representa un tipo de transporte activo secundario porque no está directamente acoplado al metabolismo, pero usa la baja concentración de Na^+ en la célula establecido por la ATPasa Na^+/K^+ para conducir a los protones en contra del gradiente electroquímico. El intercambiador de la membrana apical del túbulo proximal se inhibe con amilorida y aún más con análogos de amilorida con sustituciones hidrofóbicas en la región amino terminal (Kleyman, 1988).

Los primeros en demostrar la actividad del intercambiador Na^+/H^+ en el túbulo proximal utilizaron Na^{22} radioactivo para poder cuantificar el transporte de Na^+ . Observaron que el fluido tubular se acidifica en respuesta a un gradiente entrante de Na^+ y a un gradiente saliente de H^+ dirigido por el ingreso de Na^+ . El transporte del intercambiador Na^+/H^+ es electroneuro, ya que los iones están acoplados 1:1 (Murer, 1976).

El Asa de Henle

El asa de Henle reabsorbe entre el 10% y el 20% del HCO_3 filtrado (Capasso, 2002). Existen dos mecanismos que influyen en la reabsorción de HCO_3 en el asa de Henle. Primero se reabsorbe agua en la porción delgada descendente que hace que el fluido tubular se concentre y el nivel de HCO_3 se eleve de ~10 a 25 mM junto con el aumento del pH (Buerkert, 1983; DuBose, 1983). Gracias a esto se reabsorbe el HCO_3 en la porción ascendente del asa de Henle, la reabsorción de HCO_3 en este segmento de la nefrona es dependiente de la concentración, es decir que el TAL no podría reabsorber el HCO_3 con la concentración con la que

viene del túbulo proximal sino es dependiente del correcto funcionamiento de la porción delgada descendente (Good, 1985; Good, 1984).

El TAL también es capaz de reabsorber amonio, probablemente como NH_4^+ a través del cotransportador Na/K/2Cl y posiblemente vía canales de K^+ apicales. Se ha demostrado que la membrana apical del TAL tiene una permeabilidad especialmente baja para NH_3 comparada con otras membranas biológicas por lo que se descarta el transporte apical de NH_3 por difusión. Por otro lado, la mayor vía de transporte de amonio en la membrana basolateral probablemente es por difusión de NH_3 .

Como en la mayoría de los segmentos involucrados en el transporte ácido-base la reabsorción de bicarbonato es dependiente de anhidrasa carbónica (Good, 1985). Evidencia de esto es que el TAL del conejo no puede reabsorber HCO_3^- , porque no tiene presencia de anhidrasas carbónicas. La regulación ácido-base en el TAL se ha examinado tanto *in vivo* como *in vitro*. Se ha observado que en casos de acidosis metabólica, la reabsorción de HCO_3^- en el TAL aumenta y se sobre-expresa el NHE3 apical y el co-transportador Na/HCO_3^- basolateral.

La nefrona distal

El fluido del lumen que pasa a la nefrona distal es normalmente bajo en HCO_3^- entre 5 a 7 mEq/l y también en pH con valores de entre 6.5 a 6.7 (Buerkert, 1983; DuBose, 1991). El túbulo distal reabsorbe el HCO_3^- restante vía la secreción de H^+ , de la misma manera que en el túbulo proximal. Sin embargo, a diferencia del túbulo proximal la secreción de H^+ continua después de la reabsorción de prácticamente todo el HCO_3^- del lumen, lo que propicia la caída del pH del fluido tubular y de la orina a un valor menor a 5.5 en condiciones normales.

A pesar que la nefrona distal tiene distintos tipos celulares, los mecanismos generales de la secreción de H^+ al lumen (reabsorción de HCO_3^-) son probablemente similares a lo largo de esta. Se ha propuesto un modelo de la células secretoras de H^+ , originado de los estudios de vejiga de tortuga y confirmado por estudios en las células intercaladas del conducto colector en conejo (Hamm, 1993; Schuster, 1990; Steinmetz, 1986).

Las características generales de una célula secretora de H^+ en la nefrona distal son la presencia de la ATPasa vacuolar de H^+ apical, el intercambiador Cl^-/HCO_3^- basolateral y un canal de cloro basolateral. Además se puede encontrar una ATPasa H^+/K^+ apical en muchas de estas células en condiciones normales y patológicas (DuBose, 1999; Wingo, 1993; Wingo, 1995).

En la mayoría, sino en todas las células secretoras de H^+ , el proceso de secreción se ve acelerado por una anhidrasa carbónica citosólica y/o asociada a la membrana. Las células con el proceso contrario, la secreción de HCO_3^- , tienen como características principales el intercambiador Cl^-/HCO_3^- apical, ATPasa vacuolar de H^+ basolateral y un canal de Cl^- basolateral (Schuster, 1990; Steinmetz, 1986).

La evidencia de estos dos tipos celulares proviene de estudios *in vitro* de vejiga de tortuga y de conductos colectores de conejo. Sin embargo, casi todos los estudios de la fisiología *in vivo* de la acidificación de la nefrona distal vienen de estudios en la rata. A pesar de que la información obtenida de ratas y conejos es complementaria, existen algunas diferencias que limitan la extrapolación de los datos interespecie (Hamm, 1993).

Túbulo distal

El túbulo distal incluye cuatro segmentos o regiones en secuencia: una pequeña porción del TAL, el túbulo contorneado distal, el túbulo conector y el inicio del túbulo colector.

Ducto Colector Cortical

Existe una considerable cantidad de evidencia que sugiere que la reabsorción de HCO_3^- y la secreción son dos procesos separados mediados por diferentes tipos celulares, las células intercaladas tipo A y B (Schuster, 1990).

EL CCD consiste de células principales (CP) y de más de dos tipos de células intercaladas (CI). Las células principales representan dos tercios de las células del DCC y estas regulan el transporte de sodio, agua y probablemente la mayoría,

sino todo, el potasio en condiciones normales (O'Neil, 1985). La mayoría de la evidencia que se tiene sugiere que las células principales no están involucradas en el transporte transepitelial ácido-base (Chaillet, 1985; Wang, 1990; Weiner, 1990).

Tanto la células intercaladas A, como las B tienen canales de Cl^- y un intercambiador Na^+/H^+ para regular el pH intracelular (Breyer, 1989; Schuster, 1987; Weiner, 1990). La secreción de H^+ es un proceso electrogénico (genera un voltaje transepitelial positivo del lumen en ausencia del Na^+), sodio-independiente y sensible a la inhibición por acetazolamida (Koeppen, 1982; McKinney, 1978).

Algunos datos sugieren que los mineralocorticoides en el DCC aumentan la secreción de H^+ independientemente del aumento del voltaje transepitelial negativo del lumen (Koeppen, 1982). Sin embargo la reabsorción de HCO_3^- también se ve aumentada cuando se administran mineralocorticoides *in vivo* (García-Austt, 1985).

La secreción de HCO_3^- en el DCC es electro-neutra, sodio-independiente, acoplado a la absorción de Cl^- y sensible a acetazolamida (Levine, 1986; McKinney, 1978; Schuster, 1985). La secreción de HCO_3^- se disminuye por cargas ácidas *in vivo* e *in vitro* y se ve aumentada por mineralocorticoides *in vivo* (al menos en animales alcalóticos)(García-Austt, 1985; Hamm, 1987; Satlin, 1989; Schuster, 1985).

En resumen, el DCC tiene al menos dos tipos diferentes de células intercaladas que controlan procesos independientes de reabsorción y secreción de HCO_3^- . El transporte neto de HCO_3^- depende de la suma de estos procesos, que son determinados por la dieta.

Producción y excreción de amonio renal

El aumento de la amoniogénesis y gluconeogénesis renal mediante la glutamina del plasma constituye una respuesta fisiológica esencial a la acidosis metabólica que parcialmente restaura el balance ácido-base (Brosnan, 1987; Halperin, 1993; Tannen, 1990). La glutamina extraída por el riñón se desamina y se desamida para dar lugar a dos iones amonio. La glutaminasa mitocondrial activada por

fosfatos (GA) cataliza la reacción inicial en la ruta catabólica renal de la glutamina y es un regulador clave del aumento de la amoniogénesis y la gluconeogénesis (Curthoys, 1995).

El aumento en la expresión de la GA es resultado de la estabilización selectiva del ARNm de la GA, mientras que la inducción de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK) se produce de la transcripción aumentada del gen PEPCK (Curthoys, 2001). El intercambiador apical Na^+/H^+ contribuye a la translocación activa del H^+ y el NH_4^+ hacia la orina (Karim, 2002). La alta concentración de iones amonio hacia la medula renal provee la fuerza necesaria para el transporte final de iones amonio hacia la orina vía transportadores de amonio específicos (Knepper, 2004). El pH 7.4 de la sangre es constante. El pCO_2 se mantiene a 40 mm Hg y la concentración de HCO_3^- a 24mM. Cerca del 80% del HCO_3^- filtrado se reabsorbe en el túbulo proximal (Aalkjaer, 2004). La anhidrasa carbónica usa los iones H^+ para protonar el HCO_3^- filtrado para formar CO_2 y H_2O .

Después de difundir hacia las células epiteliales del túbulo proximal, una anhidrasa carbónica citosólica hidrata el CO_2 y lo regenera el HCO_3^- y los iones H^+ excretados. Los iones HCO_3^- son transportados después a través de la membrana basolateral por NBC1, un cotransportador $\text{Na}^+/\text{3HCO}_3^-$.

El proceso general se inhibe por: la alcalosis y la hipocalcemia y aumenta por: la acidosis, la hipercalcemia y los altos niveles de angiotensina II. Además se regula en los segmentos distales que son responsables de la reabsorción del HCO_3^- .

III. ANTECEDENTES

Desde el descubrimiento de las corrientes catiónicas activadas por hiperpolarización (I_f en el corazón e I_h en el cerebro), 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 y el cerebro. 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. Por medio de la técnica de patch-clamp en un cultivo primario de TCMI, se obtuvo una corriente entrante de 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 Na^+ y 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 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 Cs^+ , a diferencia de las descritas en cerebro y corazón cuya constante de inhibición (K_i) es de 1 - 2 mM (Robinson, 2003).

Recientemente se reportó la presencia del canal HCN2, que en cultivos primarios de la médula interna del riñón genera la corriente que se describió anteriormente (Bolivar, 2008). En ese estudio se demostró la presencia de HCN1, HCN2 y HCN4 a nivel de transcrito y solamente del canal HCN2 a nivel de proteína. Al tomar en cuenta la gran diversidad de tipos celulares en el riñón, nos pareció importante estudiar la familia HCN en el contexto del riñón completo.

IV. HIPÓTESIS

Los cuatro integrantes de la familia de canales iónicos HCN se expresan en el riñón de la rata.

V. OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar el papel fisiológico de las familia de canales HCN en el riñón de la rata.

5.01 OBJETIVO PARTICULARES

- Determinar la distribución de los integrantes de la familia de canales catiónicos activados por hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos (HCN) en el epitelio renal.
- Establecer si existen cambios en la expresión de los canales HCN en diferentes condiciones metabólicas.

VI. RESULTADOS

Los resultados de los ensayos de inmunofluorescencia y de Western blot en el riñón de la rata, en resumen, fueron positivos en los túbulos de la corteza y de la médula renal para todos los integrantes de la familia HCN. Cada canal tiene una distribución particular a lo largo de la nefrona y al parecer también se regulan de manera diferencial. La tabla siguiente resume la distribución de cada integrante de la familia HCN:

Segmento de la Nefrona	Marcador	HCN1	HCN2	HCN3	HCN4
PT	AQP1	✓	X	✓	X
TAL	THP	X	X	X	✓
CNT y DCT	Calbindina	X	✓	X	X
CD	AQP2	X	✓	X	X

Tabla 3. ✓ = colocaliza; X = no colocalizan; PT = túbulo proximal; TAL = porción gruesa del asa de Henle; CNT = túbulo conector; DCT = túbulo contorneado distal; DC = ducto colector; AQP1 = aquaporina 1; THP = proteína Tamm-Horsfall; AQP2 = aquaporina 2.

A continuación se presentan los resultados obtenidos para cada uno de los integrantes de la familia HCN en los ensayos de inmunofluorescencia y de Western blot en condiciones normales y, cuando fue posible, en condiciones de acidosis metabólica y de dieta alta en K⁺.

6.01 HCN1

La figura 9 muestra imágenes representativas de la inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos primarios contra los canales HCN1 y anticuerpos secundarios acoplados a Alexa 488. Se detectó la presencia de los canales HCN1 en la corteza (Fig. 9A y B) y la médula (Fig. 9C y D) renal. La especificidad de los anticuerpos se comprobó al incubar el anticuerpo primario con su péptido control durante una hora antes de realizar el ensayo de inmunofluorescencia (Fig. 9E y F).

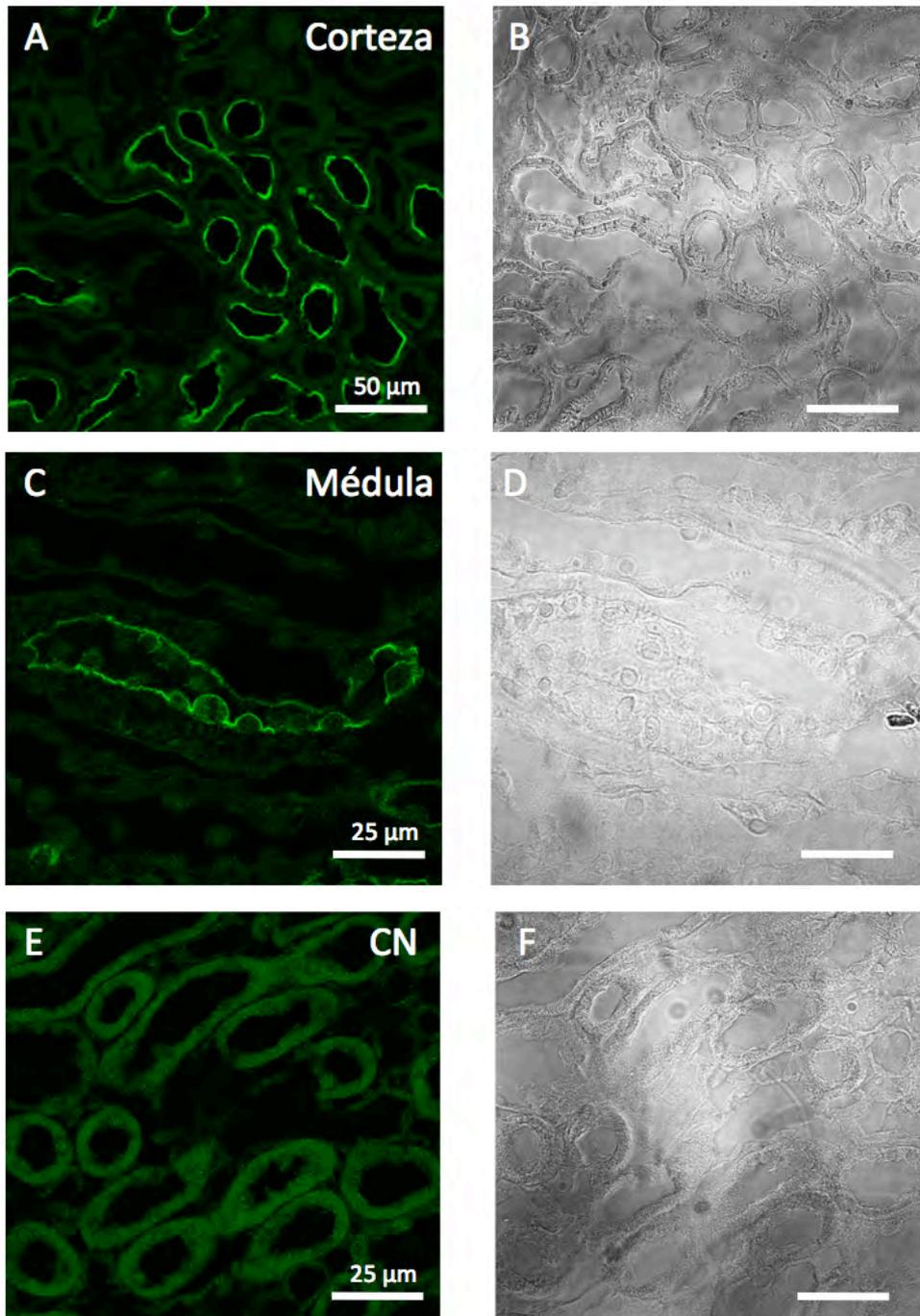
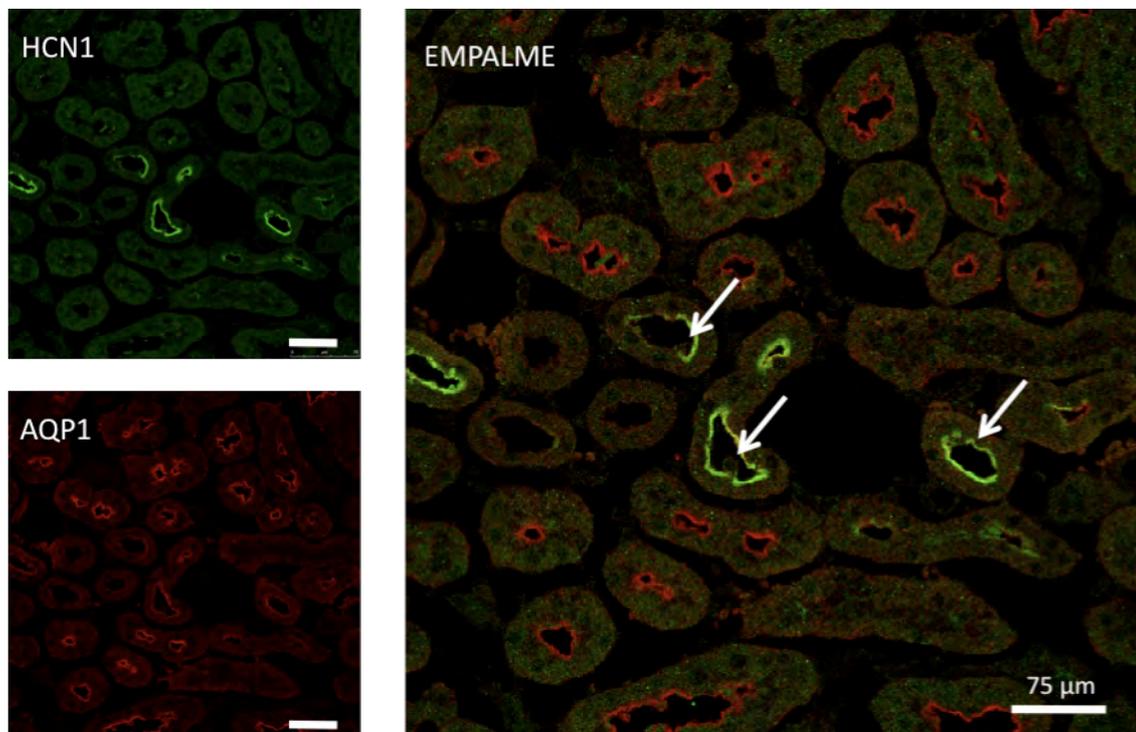
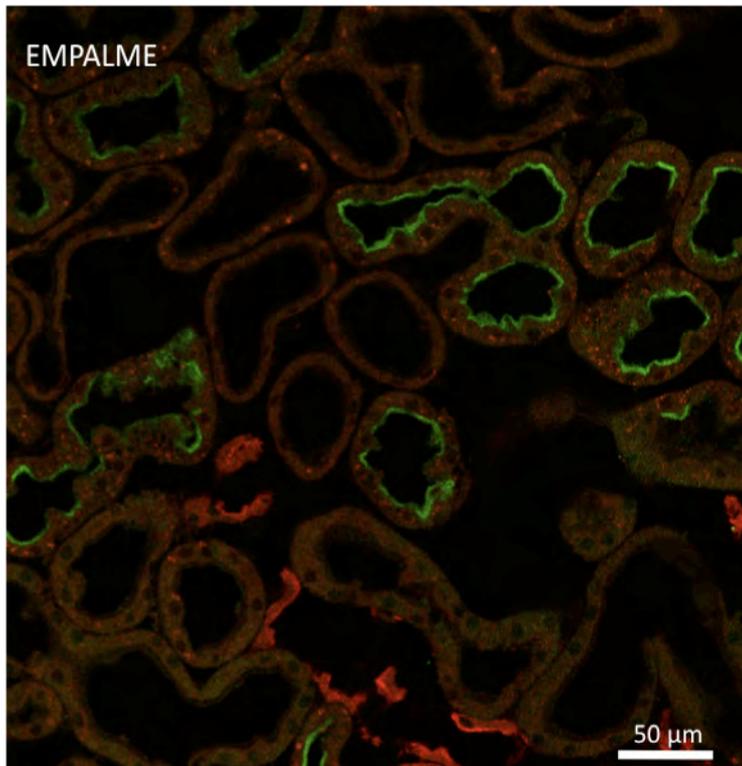
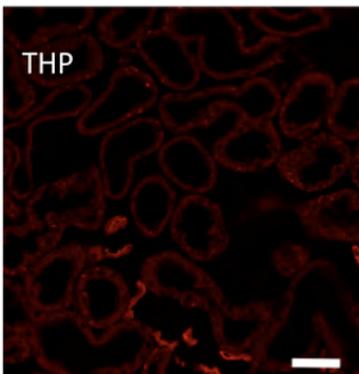
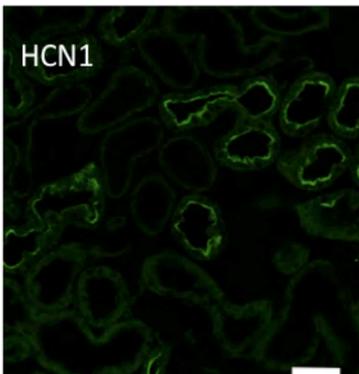
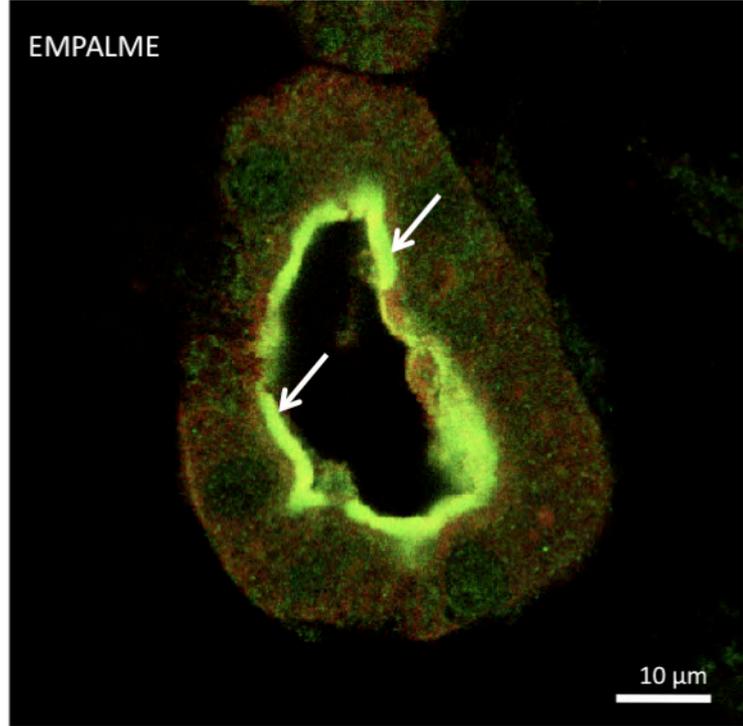
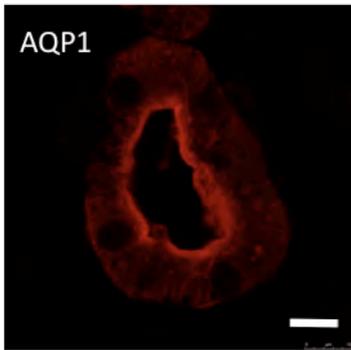
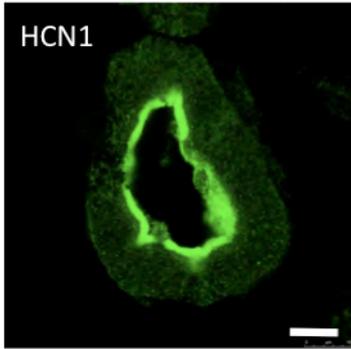


Figura 9. Inmunofluorescencia anti HCN1. *A, B)* Corte sagital de riñón de rata en el que se observa la corteza renal. *C, D)* Corte sagital de riñón de rata en el que se observa la médula renal. *E, F)* Un corte sagital de riñón de rata con la incubación previa del anticuerpo HCN1 con su péptido control.

Una vez que comprobamos la presencia de los canales HCN1 mediante inmunofluorescencia, proseguimos a determinar su localización en los diferentes segmentos de la nefrona. Para esto realizamos dobles marcajes con anticuerpos contra HCN1 y contra la aquaporina 1, la proteína Tamm-Horsfall, la calbindina y la

aquaporina 2. Los últimos son anticuerpos contra proteínas específicas para los túbulos proximales, la porción ascendente del asa de Henle, los túbulos conectores y los túbulos colectores, respectivamente. Las imágenes representativas de los dobles marcajes se presentan en la figura 10. Observamos que en las membranas apicales de los túbulos proximales la marca de los canales HCN1 co-localiza con la marca de la aquaporina 1. Los dobles marcajes para la porción ascendente del asa de Henle, para los túbulos conectores, y para los túbulos colectores no presentaron en ningún caso co-localización con la marca de los canales HCN1.





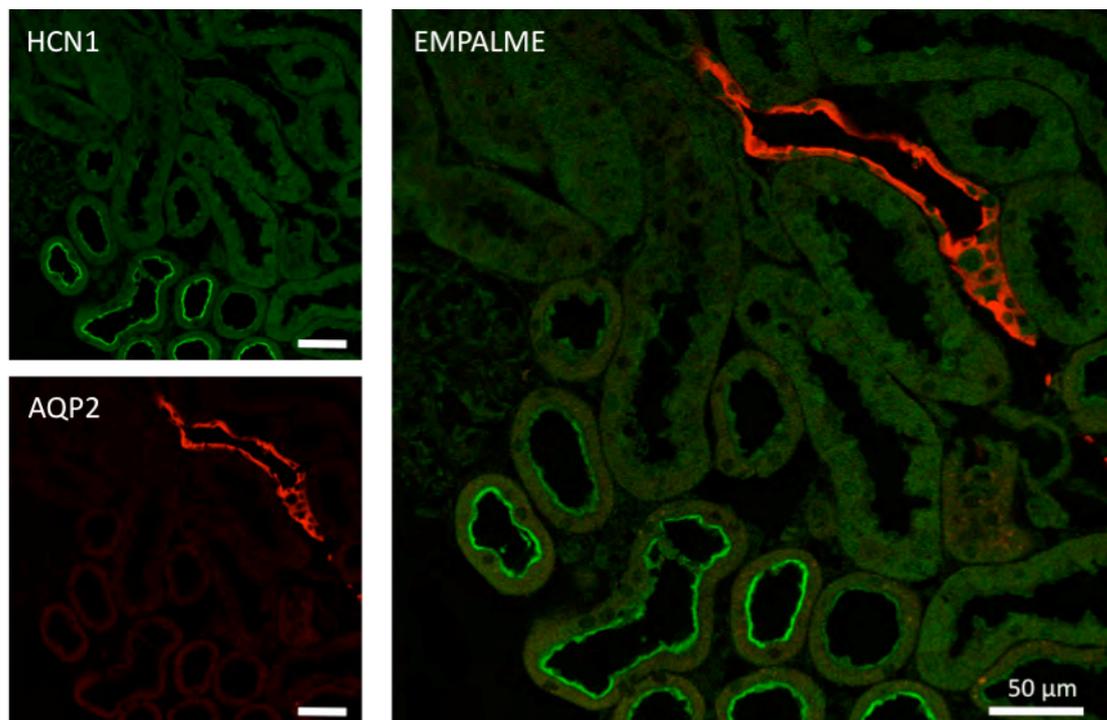
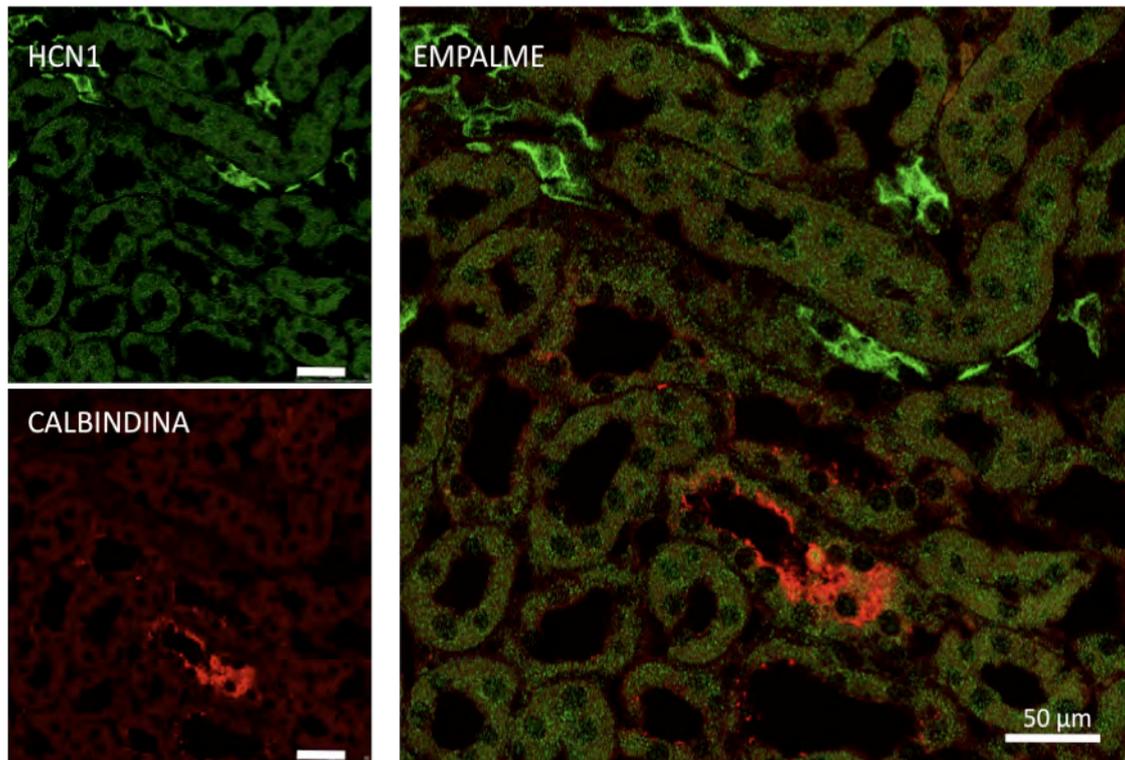


Figura 10. Localización de los canales HCN1 en los segmentos de la nefrona. Cortes de riñón de rata con doble marcaje con anticuerpos contra HCN1 (verde) y contra proteínas específicas de los segmentos de la nefrona (rojo). En las membranas apicales (flechas) de los túbulos proximales se puede observar claramente la marca de HCN1 (verde) y de aquaporina 1 (rojo) co-localizando. La porción ascendente del asa de Henle, los túbulos conectores y los túbulos colectores se marcaron con anticuerpos contra la proteína Tamm-Horsfall, Calbindina y Aquaporina 2, respectivamente.

Western blot HCN1

El análisis por Western blot identificó productos inmunoreactivos en las muestras de proteínas de membrana del cerebro, pero no del riñón (Fig. 11A). Como obtuvimos resultados claros de inmunofluorescencia pero no en los ensayos de Western blot, decidimos cambiar a un método de detección más sensible, del ECL Plus al ECL advance. Además el riñón se dividió en corteza y médula renal para su inmunodetección. Con el nuevo método de detección ahora observamos una banda con un peso de alrededor de 90 kDa en la médula, pero en la corteza no se detectó ninguna banda. Esta banda de menor peso nunca se ha descrito en la literatura y probablemente represente una proteína HCN1 modificada proteolíticamente, post-traduccionalmente o también podría ser una isoforma. Interesantemente, a diferencia de las condiciones normales, en la corteza de las ratas con acidosis metabólica, si se detectó una banda de 90 kDa. Por otro lado, la banda de 120 kDa encontrada en el cerebro es congruente con los informes previos del canal HCN1 en este tejido (Notomi, 2004).

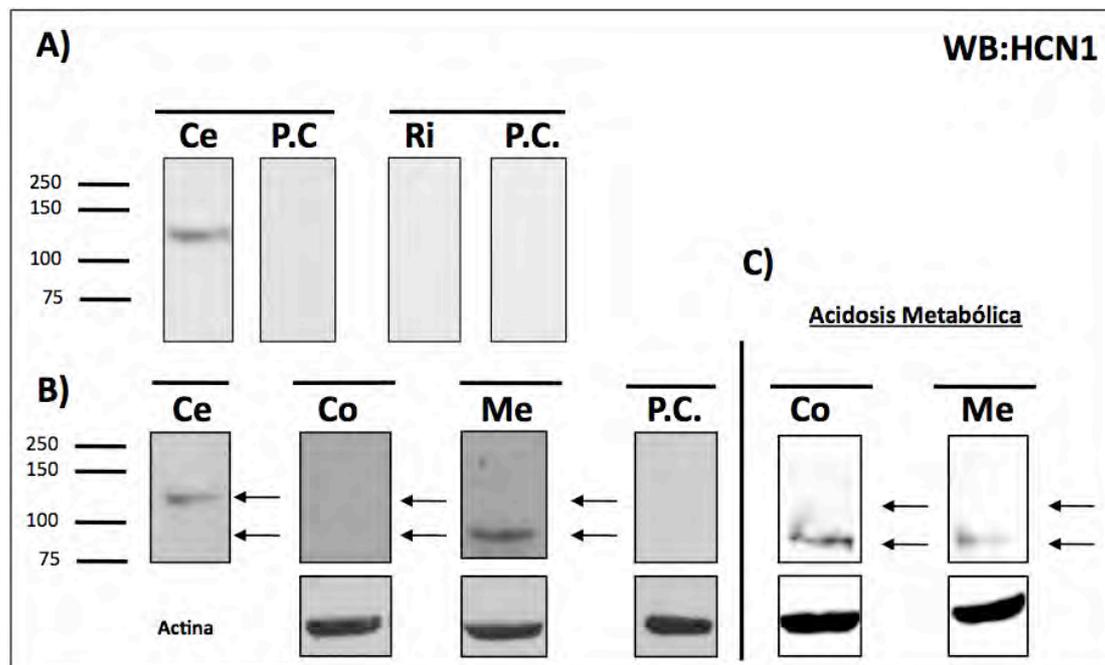


Figura 11. Western blot contra HCN1. A) Extractos de membranas totales de riñón y cerebro B) Extractos de membranas plasmáticas de cerebro, corteza y médula renal C) Extractos de membranas plasmáticas en animales en acidosis metabólica inducida. Ce: cerebro; P.C.: péptido control; Ri: riñón; Co: corteza renal; Me: médula renal. En todos los carriles se cargó 100 μ g de proteína.

6.02 HCN2

Las imágenes representativas de la inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos primarios contra los canales HCN2 y anticuerpos secundarios acoplados a Alexa 488 se presentan en la figura 12.

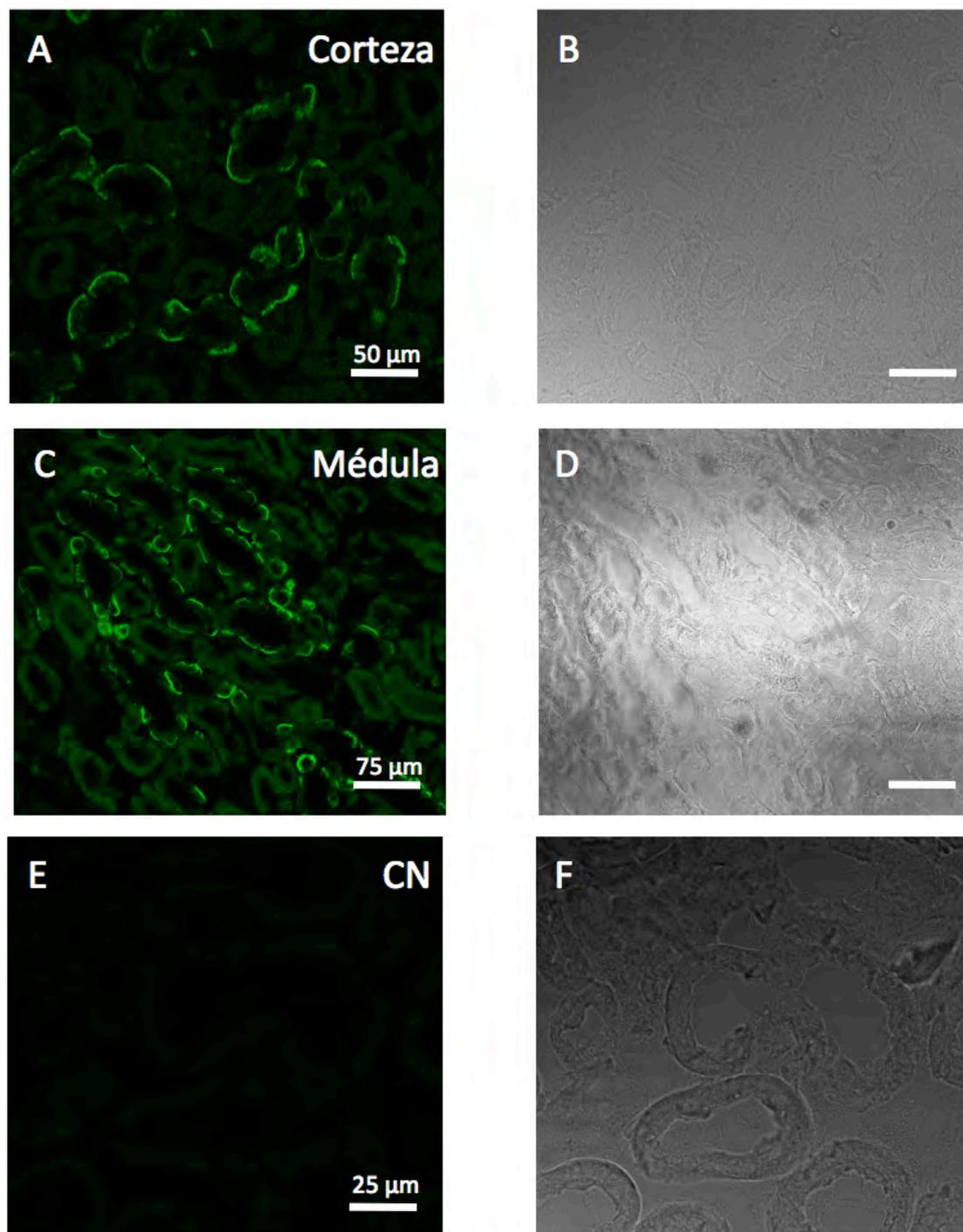
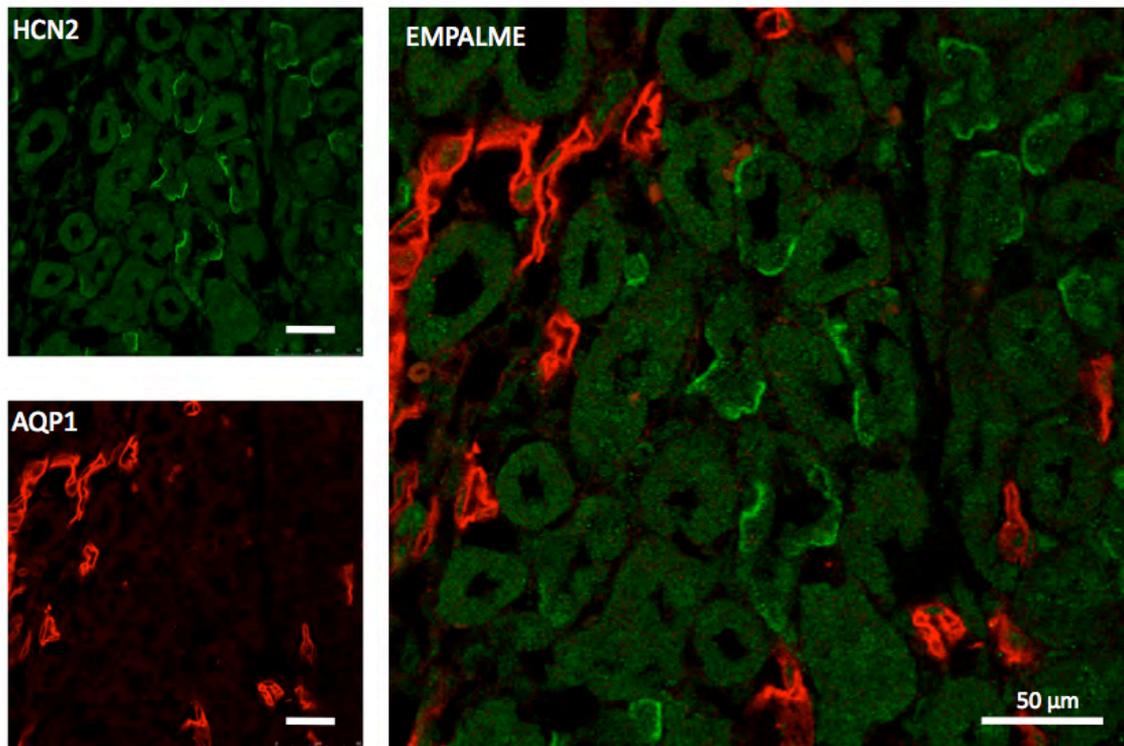
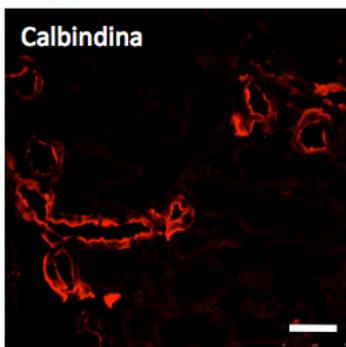
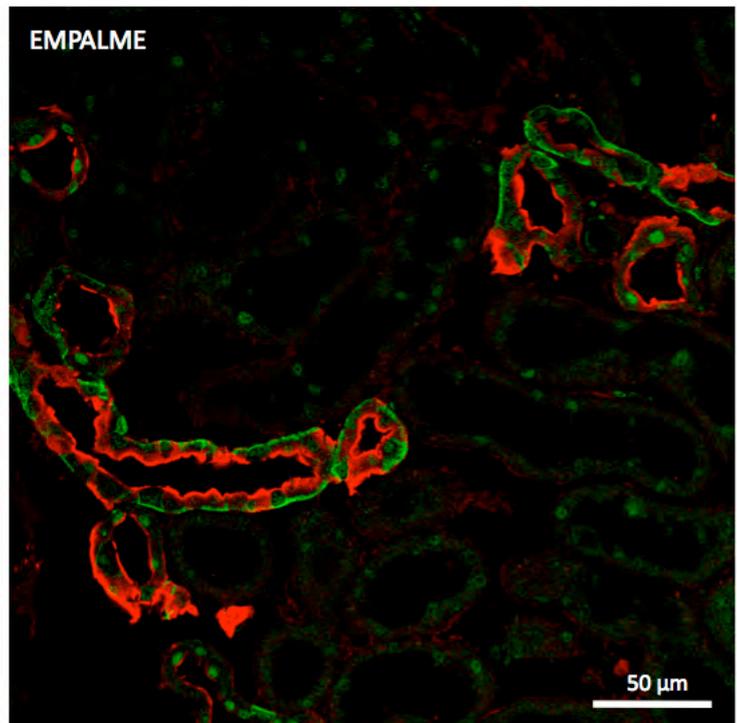
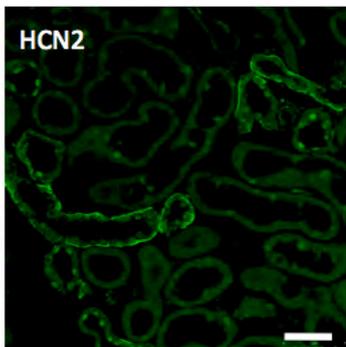
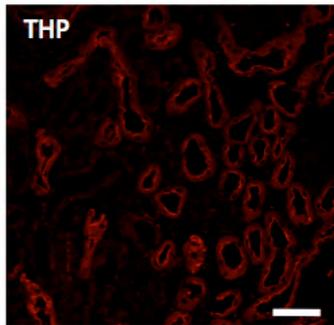
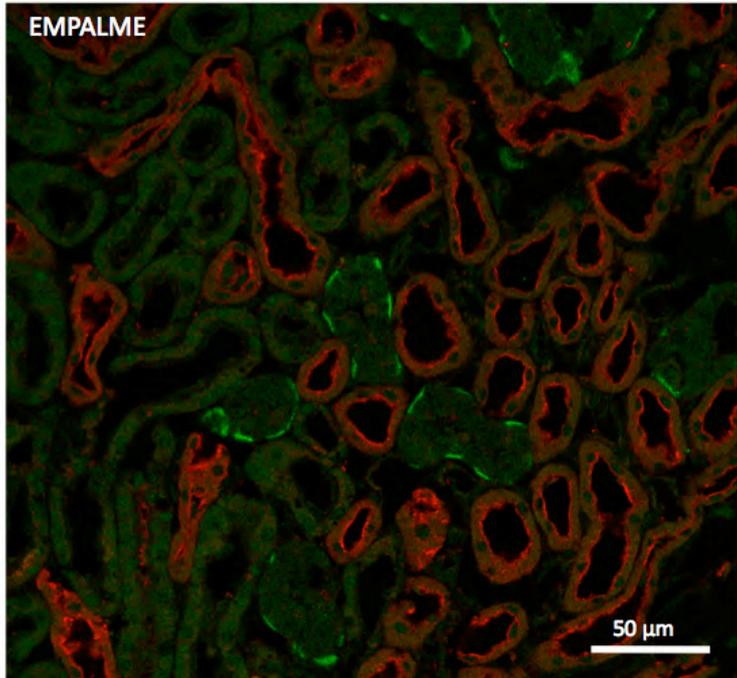
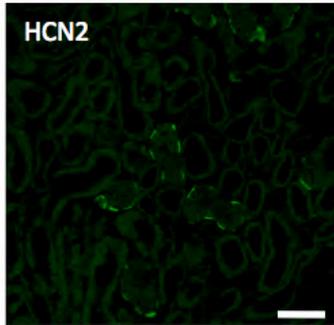
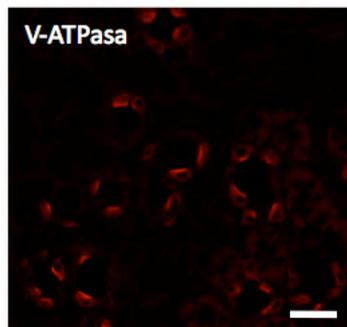
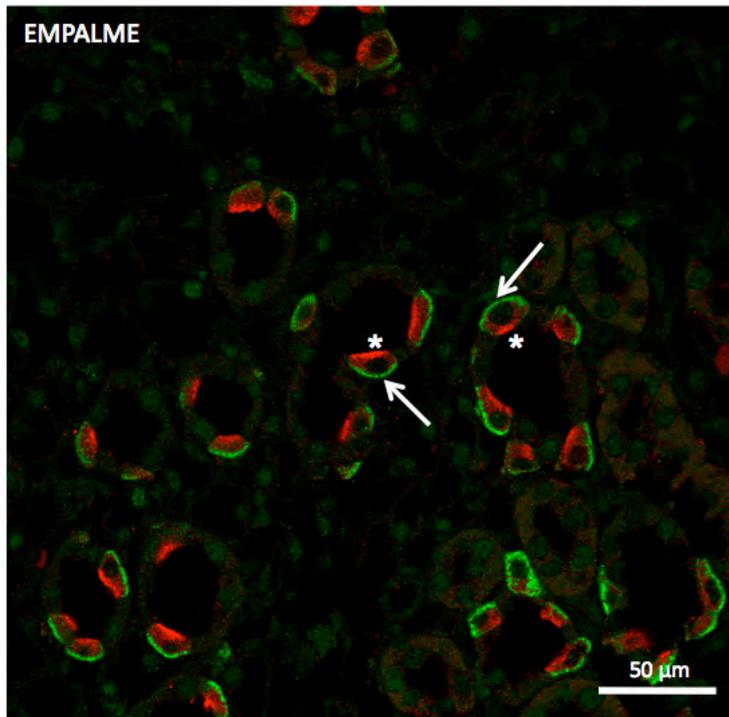
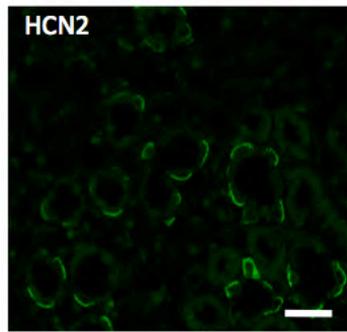
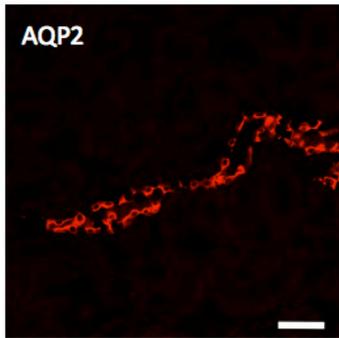
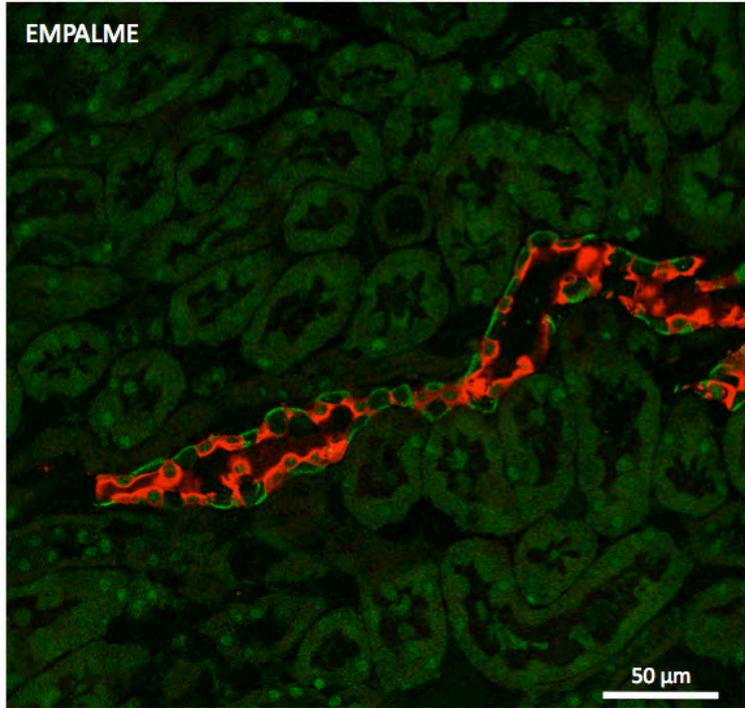
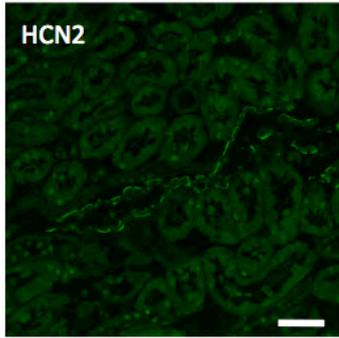


Figura 12. Inmunofluorescencia anti HCN2. *A, B)* Corte sagital de riñón de rata en el que se observa la corteza renal. *C, D)* Corte sagital de riñón de rata en el que se observa la médula renal. *E, F)* Un corte sagital de riñón de rata con la incubación previa del anticuerpo HCN2 con su péptido control.

Se detectó la presencia de los canales HCN2 en la corteza (Fig. 12A y B) y en la médula (Fig. 12C y D) renal. La especificidad de los anticuerpos se comprobó al incubar el anticuerpo primario con su péptido control durante una hora antes de realizar el ensayo de inmunofluorescencia (Fig. 12E y F). Una vez que comprobamos la presencia de los canales HCN2 mediante inmunofluorescencia proseguimos a determinar su localización en los diferentes segmentos de la nefrona. Para esto realizamos dobles marcajes con anticuerpos contra HCN1 y contra la aquaporina 1, la proteína Tamm-Horsfall, cabildina y contra aquaporina 2, que son proteínas específicas para los túbulos proximales, la porción ascendente del asa de Henle, los túbulos conectores y los túbulos colectores, respectivamente. Las imágenes representativas de todos los dobles marcajes se presentan en la figura 13.







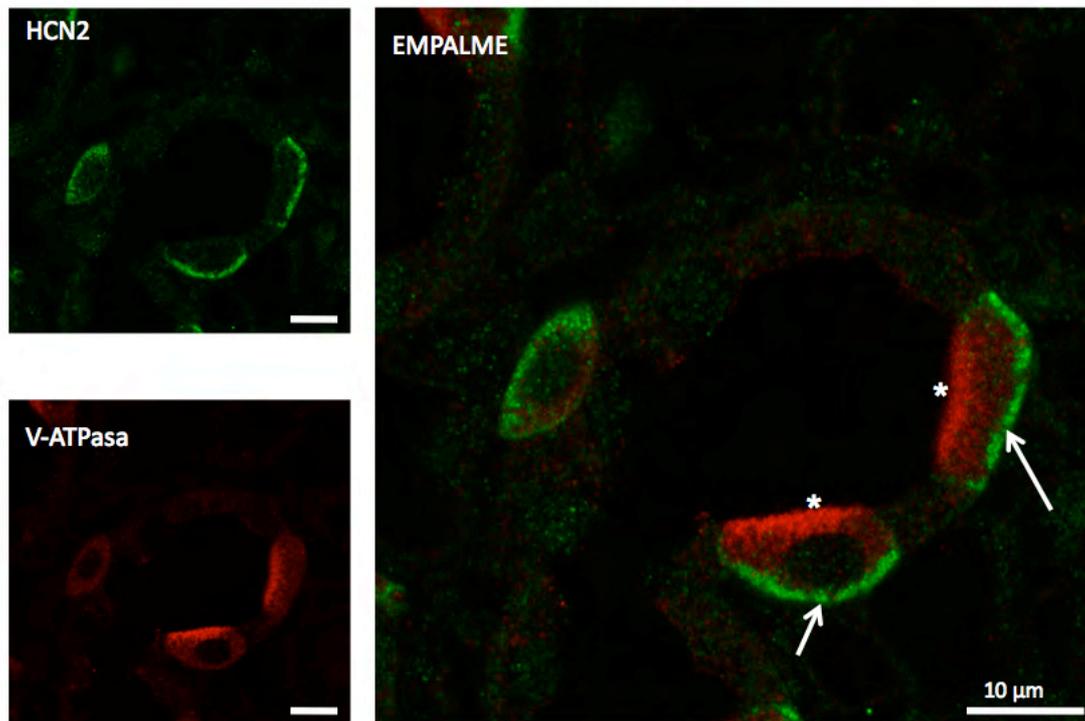


Figura 13. Localización de los canales HCN2 en los segmentos de la nefrona. Cortes de riñón de rata con doble marcaje con anticuerpos contra HCN2 (verde) y contra proteínas específicas de los segmentos de la nefrona (rojo). En las membranas basolaterales (flechas) de las células intercaladas acido-secretoras se puede observar claramente la marca de HCN2 (verde) y en las membranas apicales (*) la ATPasa vacuolar (rojo) marcando la misma célula. Los túbulos proximales, la porción ascendente del asa de Henle, los túbulos conectores y los túbulos colectores se marcaron usando anticuerpos contra la Aquaporina 1, la proteína Tamm-Horsfall, la calbindina y la aquaporina 2, respectivamente.

Observamos que en los túbulos conectores y los colectores, la marca de los canales HCN2 no co-localiza con la marca de la calbindina y de la aquaporina 2, respectivamente, esto nos indicó que el canal HCN2 se localiza en un tipo celular distinto. Sabemos que en la nefrona distal, que empieza en el túbulo conector y termina en los túbulos colectores, podemos encontrar 3 tipos celulares definidos, las células principales y las células intercaladas tipo A y Tipo B. Por lo tanto proseguimos a realizar un doble marcaje adicional con anticuerpos contra la ATPasa vacuolar, cuya presencia en la membrana apical o basolateral es característica particular de las células intercaladas Tipo A (acido-secretoras) o Tipo B (base-secretoras). Interesantemente observamos claramente que la marca de los canales HCN2 en las membranas basolaterales co-localizan específicamente en las células que marca la ATPasa vacuolar en las membranas apicales (Fig. 13). Esta observación indica que los canales HCN2 se encuentran exclusivamente en las membranas

basolaterales de las células intercaladas Tipo A. Por otro lado, no pudimos encontrar en ningún caso co-localización con la marca para los canales HCN2 en los dobles marcajes para los túbulos proximales y la porción ascendente del asa de Henle.

Western blot

El análisis por Western blot identificó productos inmunoreactivos en las muestras de proteínas de membrana del cerebro, pero no del riñón (Fig. 14A). La banda detectada en cerebro de peso molecular de alrededor de 120 kDa, fue congruente con los reportes previos del canal HCN2 en el cerebro (Notomi, 2004). Al igual que en el caso de HCN1 al tener resultados claros de inmunofluorescencia decidimos cambiar a un método de detección más sensible y el riñón se dividió en corteza y médula renal para su inmunodetección. De esta manera se detectaron dos bandas tanto en la corteza como en la médula. Una muy tenue con un peso alrededor de 120 kDa y una banda más intensa alrededor de 90 kDa. Este patrón de inmunodetección que observamos en nuestros resultados son congruentes con las observaciones de Bolivar y *colaboradores*, 2008. En condiciones de acidosis metabólica no se observó un cambio en la cantidad de proteína.

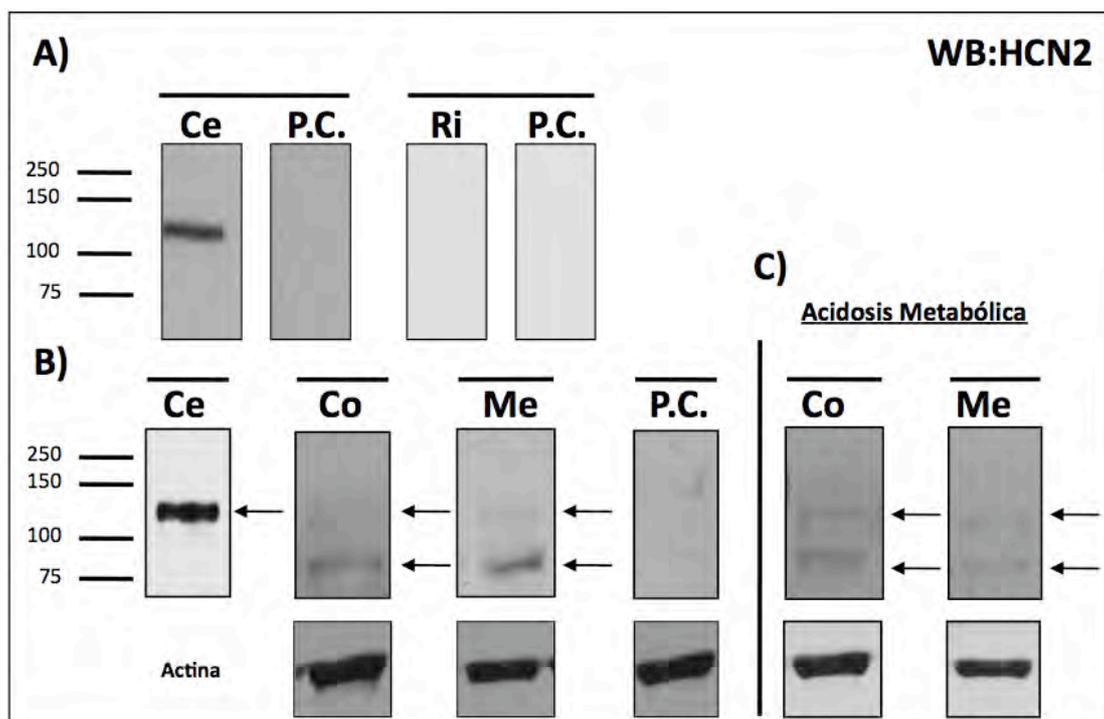


Figura 14. Western blot contra HCN2. A) Extractos de membranas totales de riñón y cerebro B) Extractos de membranas plasmáticas de cerebro, corteza y médula renal C) Extractos de membranas plasmáticas en animales en acidosis metabólica inducida. En todos los carriles se cargaron 100 μ g de proteína.

6.03 HCN3

Las imágenes representativas de la inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos primarios contra los canales HCN3 y anticuerpos secundarios acoplados a Alexa 488 se presentan en la figura 15.

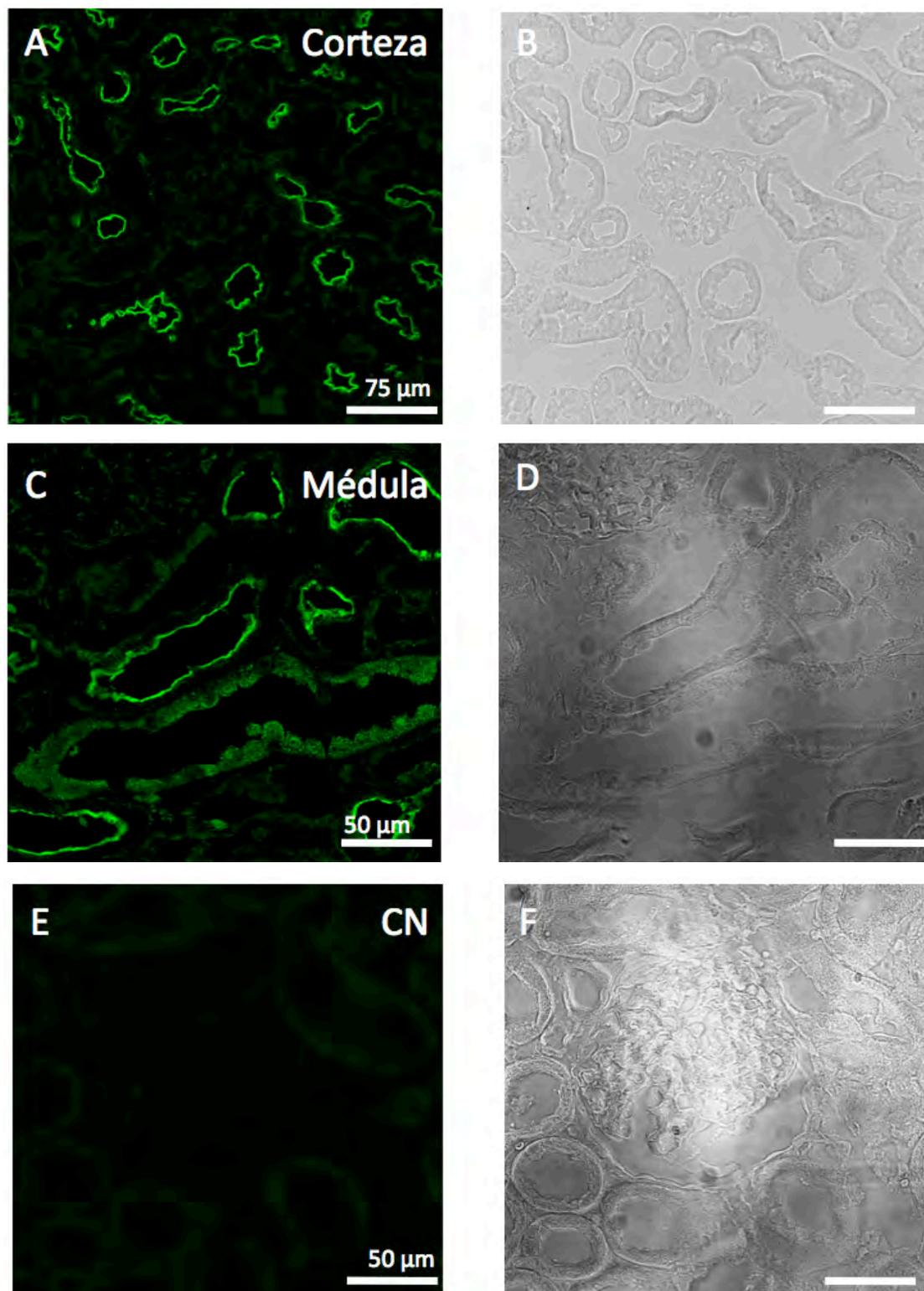
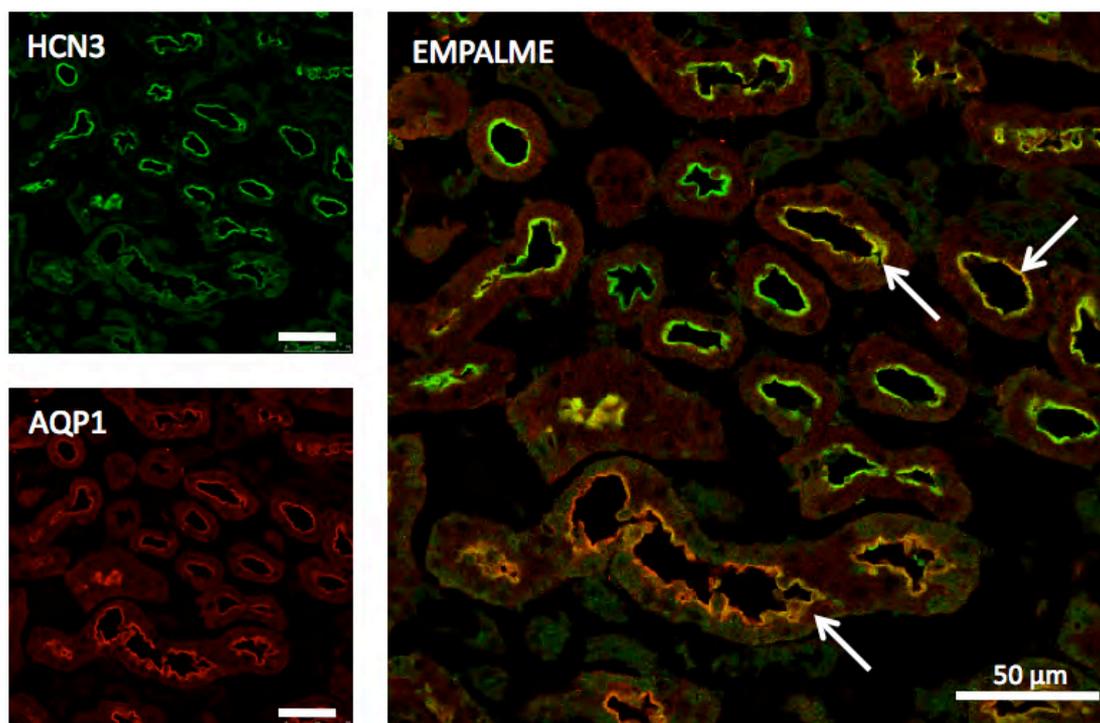
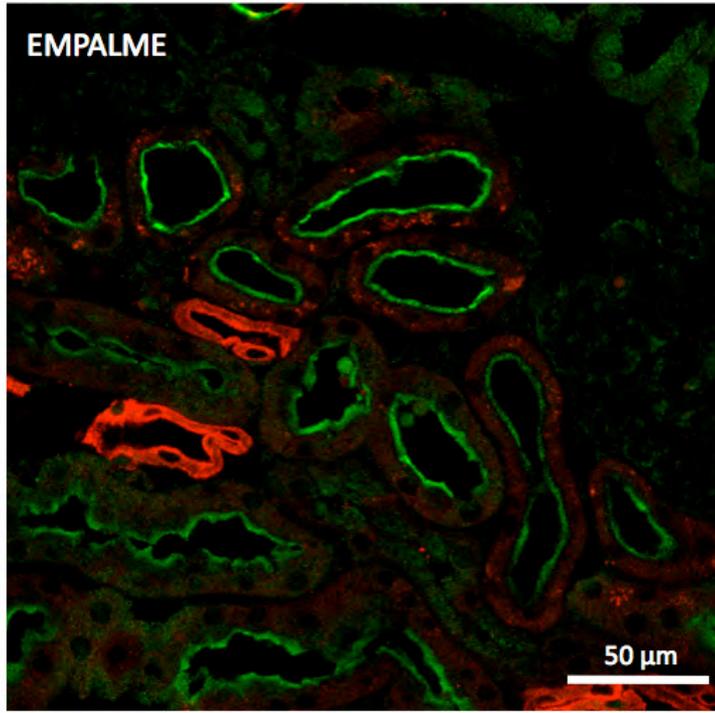
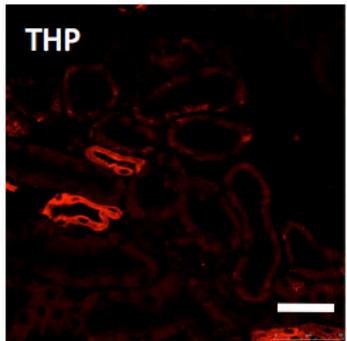
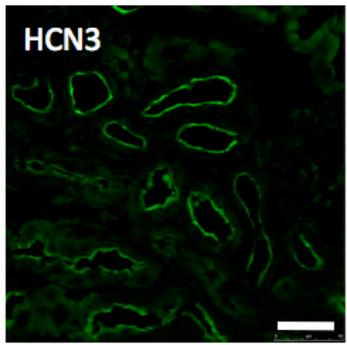
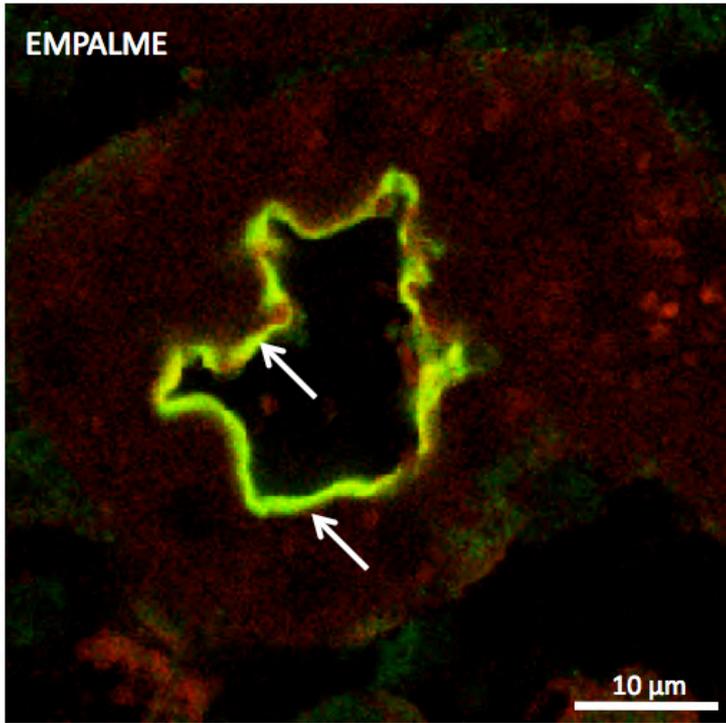
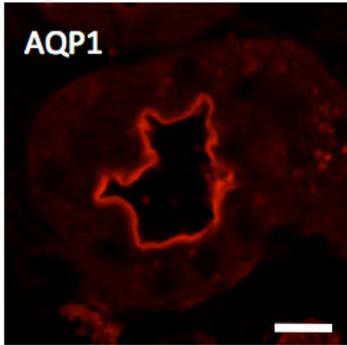
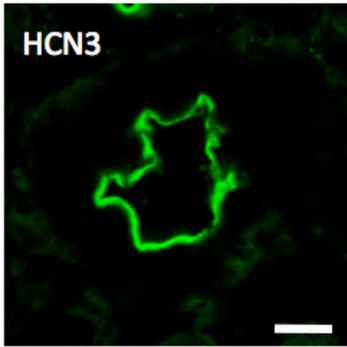


Figura 15. Inmunofluorescencia anti HCN3. *A, B)* Corte sagital de riñón de rata en el que se observa la corteza renal. *C, D)* Corte sagital de riñón de rata en el que se observa la médula renal. *E, F)* Un corte sagital de riñón de rata con la incubación previa del anticuerpo HCN3 con su péptido control.

Se detectó la presencia de los canales HCN3 en la corteza (Fig. 15A y B) y en la médula renal (Fig. 15C y D). La especificidad de los anticuerpos se comprobó al incubar el anticuerpo primario con su péptido control durante una hora antes de realizar el ensayo de inmunofluorescencia (Fig. 15E y F).

Una vez que comprobamos la presencia de los canales HCN3 mediante inmunofluorescencia proseguimos a determinar su localización en los diferentes segmentos de la nefrona. Para esto realizamos dobles marcajes con anticuerpos contra los canales HCN3 y contra proteínas específicas para los túbulos proximales, la porción ascendente del asa de Henle, los túbulos conectores y los túbulos colectores, respectivamente. La figura 16 muestra las imágenes representativas de los dobles marcajes.





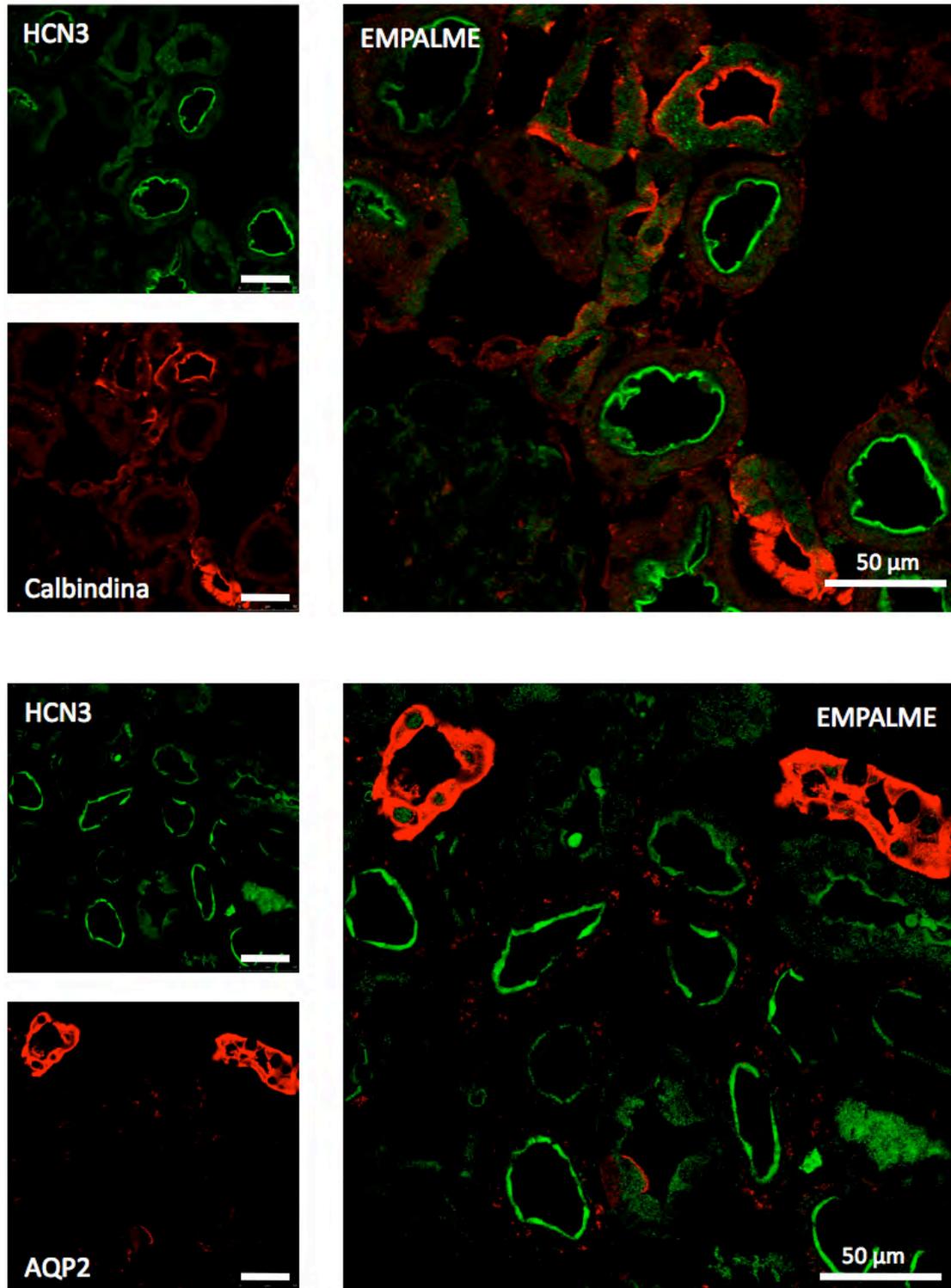


Figura 16. Localización de los canales HCN3 en los segmentos de la nefrona. Cortes de riñón de rata con doble marcaje con anticuerpos contra HCN3 (verde) y contra proteínas específicas de los segmentos de la nefrona (rojo). En las membranas apicales (flechas) de los túbulos proximales se puede observar claramente la marca de HCN3 (verde) comarcando con la aquaporina 1 (rojo). La porción ascendente del asa de Henle, los túbulos conectores y los túbulos colectores se marcaron usando anticuerpos contra la proteína Tamm-Horsfall, la Calbindina y la Aquaporina 2, respectivamente.

Pudimos observar que en las membranas apicales de los túbulos proximales la marca de los canales HCN3 co-localiza con la marca de la aquaporina 1. En los dobles marcajes para la porción ascendente del asa de Henle, para los túbulos conectores, y para los túbulos colectores no pudimos encontrar en ningún caso co-localización con la marca para los canales HCN3.

Western blot

Por medio del análisis por Western blot se identificaron productos inmunoreactivos en las muestras de proteínas de membrana del cerebro, del riñón, de la corteza y de la médula renal (Fig. 17). Se detectaron bandas de un peso molecular de alrededor de 75 kDa y esto es congruente con los informes previos del canal HCN3 en cerebro (Notomi, 2004). En condiciones de acidosis metabólica no se observó ningún cambio en la cantidad de proteína.

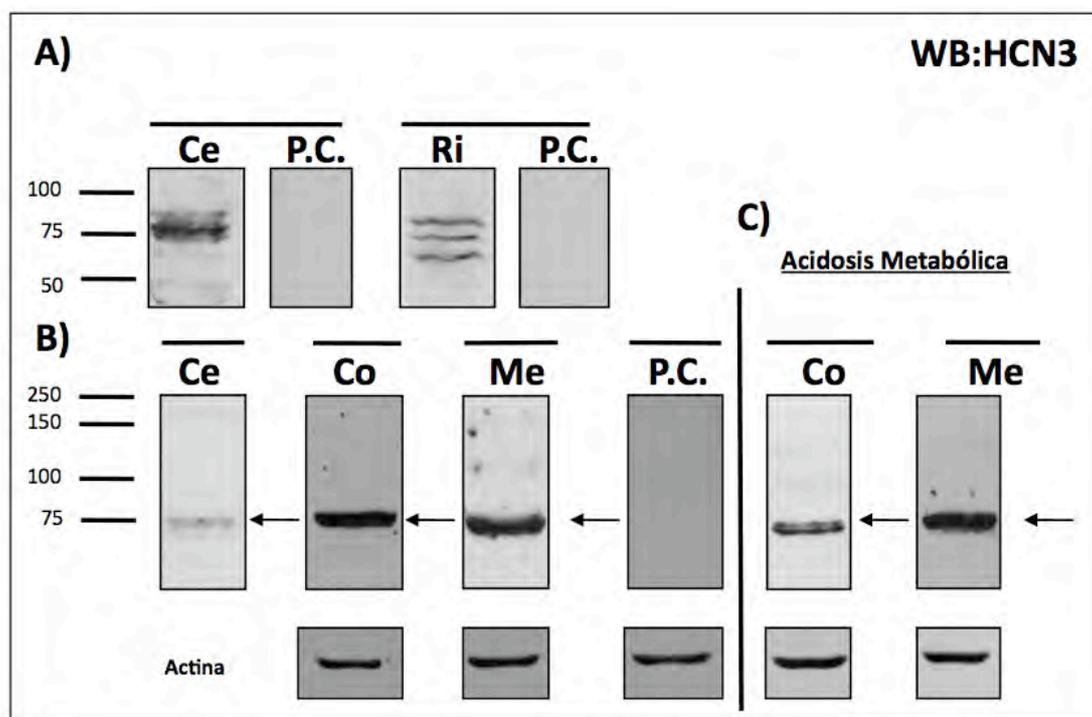


Figura 17. Western blot contra HCN3. A) Extractos de membranas totales de riñón y cerebro B) Extractos de membranas plasmáticas de cerebro, corteza y médula renal C) Extractos de membranas plasmáticas en animales en acidosis metabólica inducida. En todos los carriles se cargó 100 µg de proteína.

6.04 HCN4

Las imágenes representativas de la inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos primarios contra los canales HCN4 y anticuerpos secundarios acoplados a Alexa 488 se muestran en la figura 18.

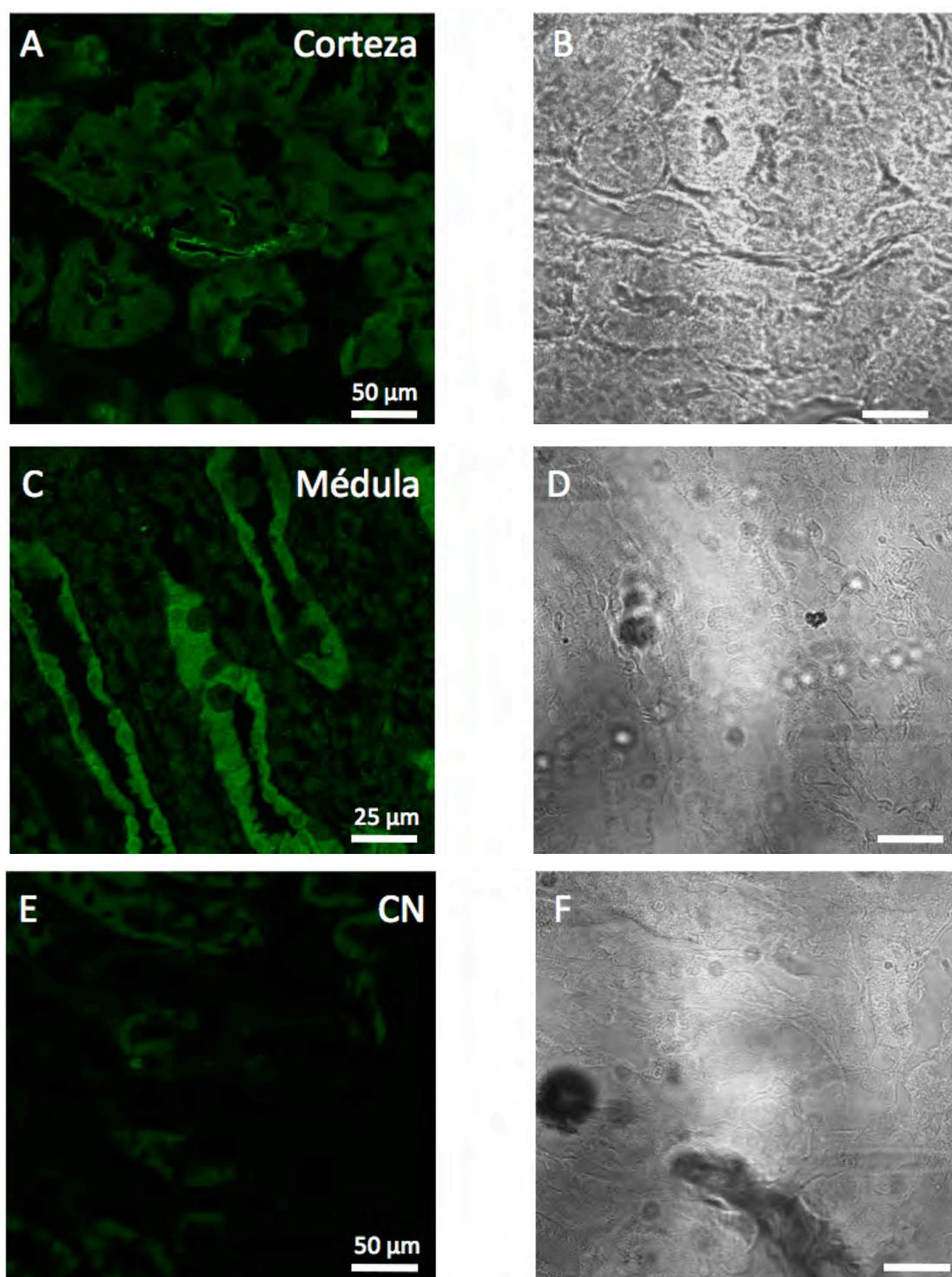
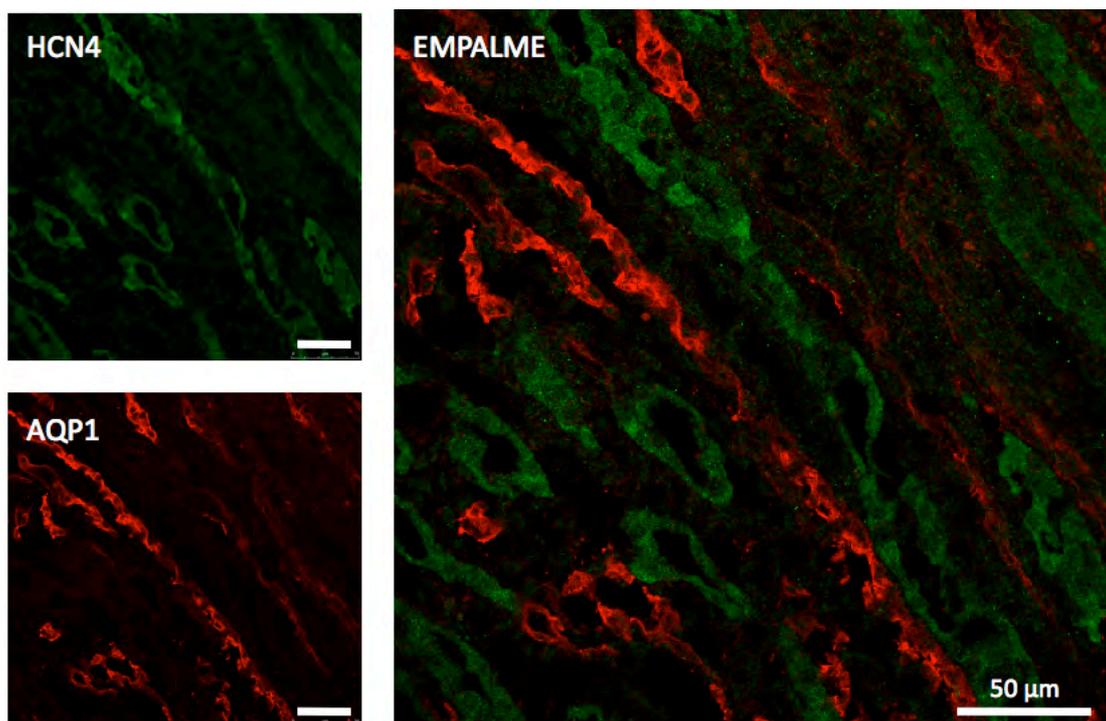
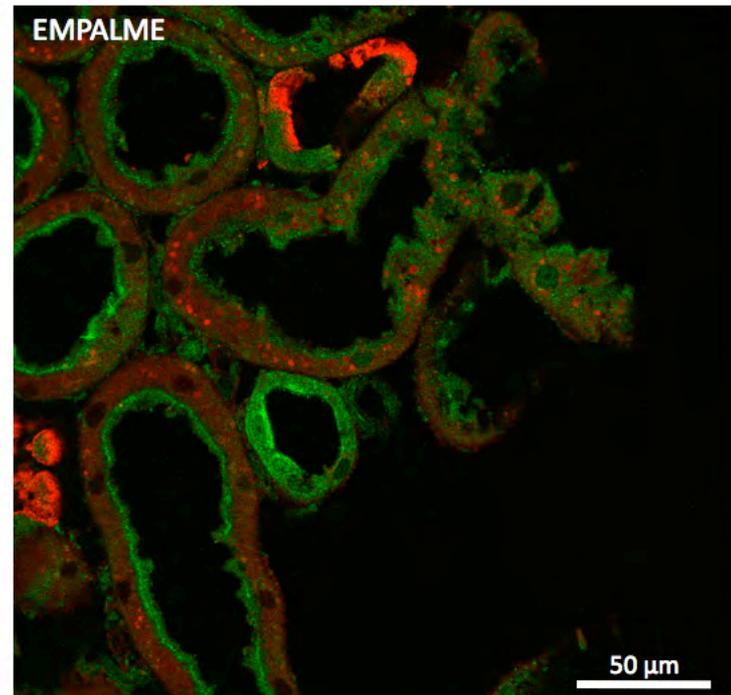
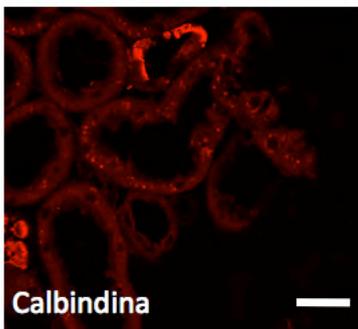
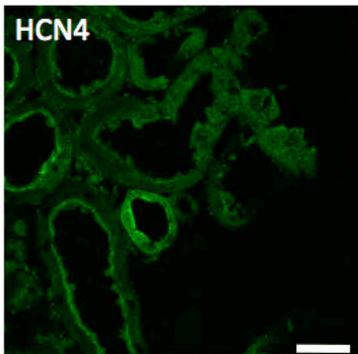
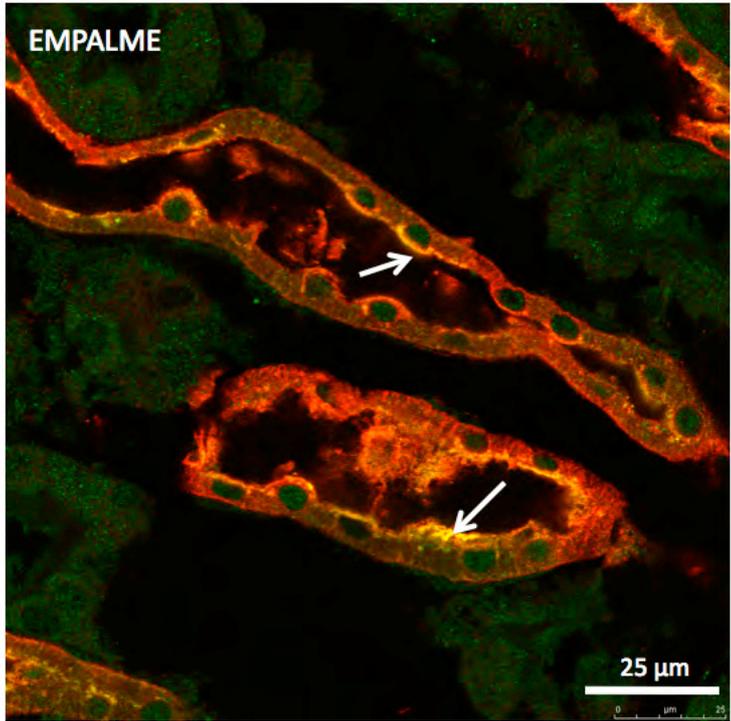
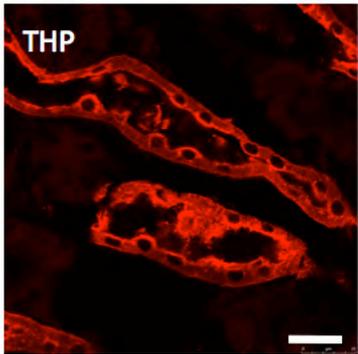
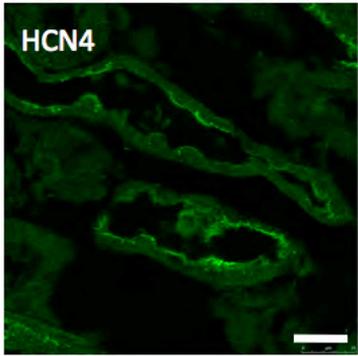


Figura 18. Inmunofluorescencia anti HCN4. *A, B)* Corte sagital de riñón de rata en el que se observa la corteza renal. *C, D)* Corte sagital de riñón de rata en el que se observa la médula renal. *E, F)* Un corte sagital de riñón de rata con la incubación previa del anticuerpo HCN4 con su péptido control.

Se detectó la presencia de los canales HCN4 en la corteza (Fig. 18A y B) y la médula (Fig. 18C y D) renal. La especificidad de los anticuerpos se comprobó al incubar el anticuerpo primario con su péptido control durante una hora antes de realizar el ensayo de inmunofluorescencia (Fig. 18E y F).

Una vez que comprobamos la presencia de los canales HCN4 mediante inmunofluorescencia proseguimos a determinar su localización en los diferentes segmentos de la nefrona. Para esto realizamos dobles marcajes con anticuerpos contra los canales HCN4 y contra proteínas específicas para los túbulos proximales, la porción ascendente del asa de Henle, los túbulos conectores y los túbulos colectores, respectivamente. La figura 19 muestra la imágenes representativas de los dobles marcajes.





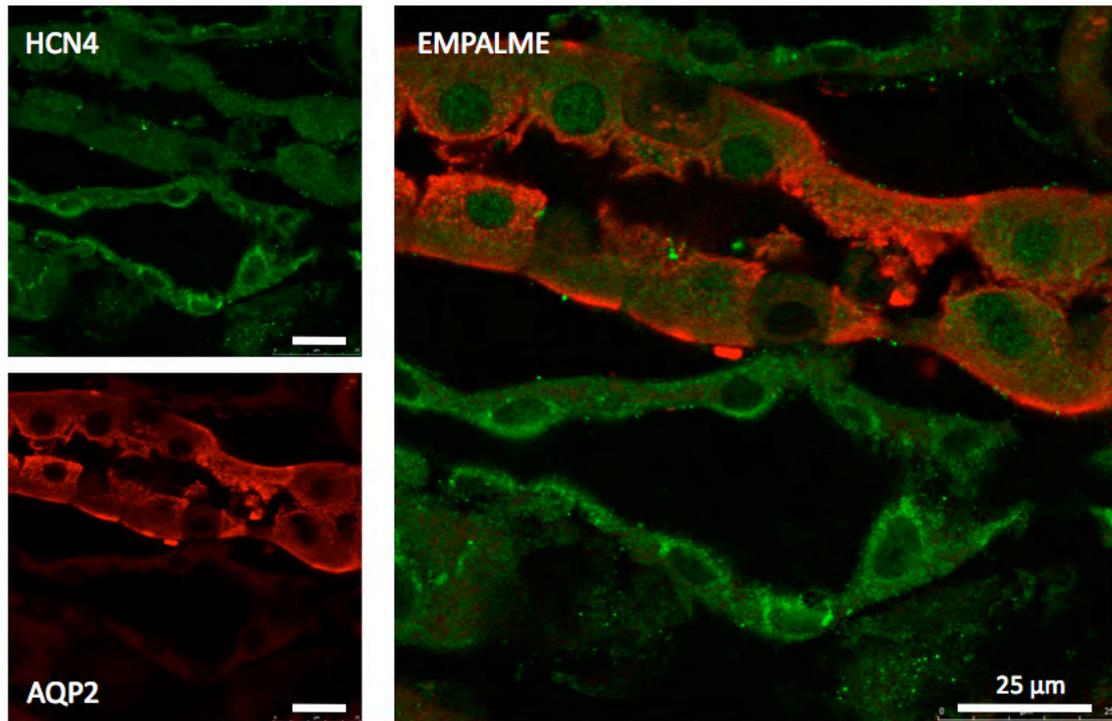


Figura 19. Localización de los canales HCN4 en los segmentos de la nefrona. Cortes de riñón de rata con doble marcaje con anticuerpos contra HCN4 (verde) y contra proteínas específicas de los segmentos de la nefrona (rojo). En las membranas apicales (flechas) de la porción ascendente del asa de Henle se puede observar claramente la marca de HCN4 (verde) comarcando con la proteína Tamm-Horsfall (rojo). Los túbulos proximales, los túbulos conectores y los túbulos colectores se marcaron usando anticuerpos contra la Aquaporina 1, la Calbindina y la Aquaporina 2, respectivamente.

Pudimos observar que en las membranas apicales de la porción ascendente del asa de Henle la marca de los canales HCN4 co-localiza con la marca de la proteína Tamm-Horsfall. En los dobles marcajes para los túbulos proximales, los túbulos conectores, y para los túbulos colectores no pudimos encontrar en ningún caso co-localización con la marca para los canales HCN4.

Western Blot

El análisis por Western blot identificó productos inmunoreactivos en las muestras de proteínas de membrana del cerebro, pero no del riñón (Fig. 20A). La banda detectada en cerebro de un peso molecular de alrededor de 140 kDa, fue congruente con los reportes previos del canal HCN4 en cerebro (Notomi, 2004). Como para los casos de los canales HCN1 y HCN2 se cambió a un método de detección más sensible y el riñón se dividió en corteza y médula renal para su inmunodetección. En este caso se detectó una banda de menor peso alrededor de 90 kDa en médula pero en corteza no

se detectó ninguna banda (Fig. 20B). Esta nueva banda de menor peso nunca se ha reportado hasta el momento. De manera interesante, a diferencia con las condiciones normales en corteza, al igual que en el caso de HCN1, el canal HCN4 parece estar regulado positivamente en condiciones de acidosis metabólica (Fig. 20C).

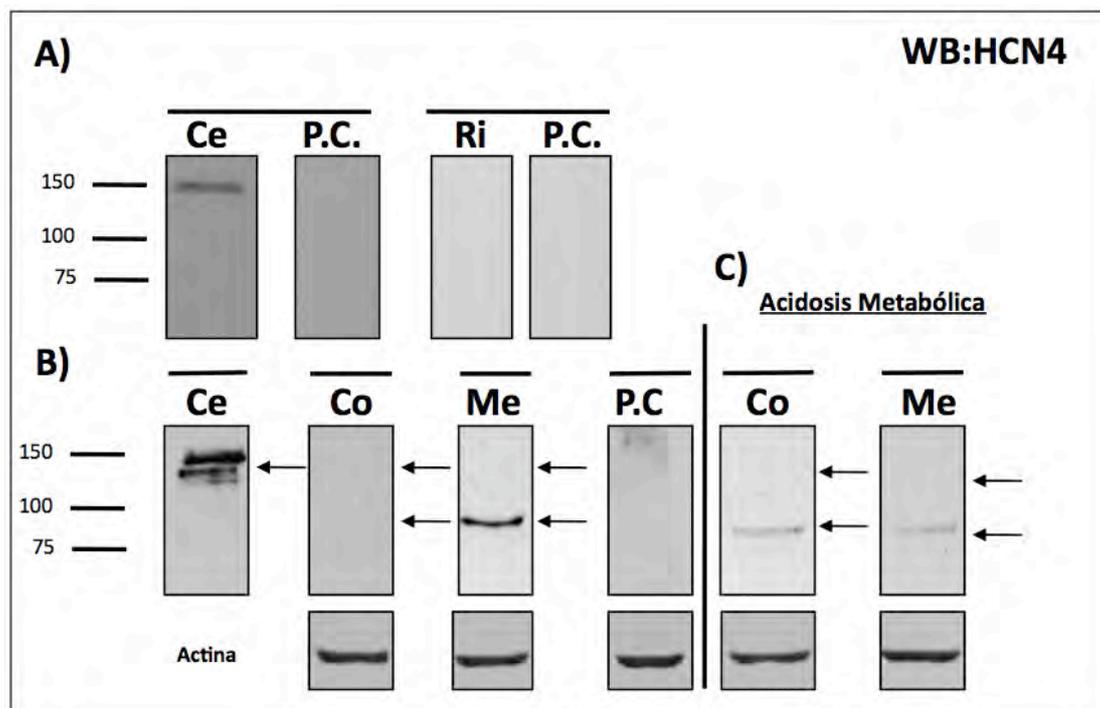


Figura 20. Western blot contra HCN4. A) Extractos de membranas totales de riñón y cerebro B) Extractos de membranas plasmáticas de cerebro, corteza y médula renal C) Extractos de membranas plasmáticas en animales en acidosis metabólica inducida. En todos los carriles se cargó 100 μ g de proteína.

6.05 DIETA ALTA EN K^+ Y ACIDOSIS METABÓLICA

En cada caso se tomaron dos grupos de ratas Wistar ($n=6$ en cada grupo). Un grupo se alimentó durante 15 días, con una dieta con un contenido alto en K^+ (10%), y el otro grupo que sirvió como control se alimentó con una dieta normal de K^+ (1.2%). En experimentos separados se tomó otro grupo y se le indujo la acidosis metabólica mediante el protocolo descrito por Farroqui, 2006 (280 mM de NH_4Cl en el agua durante 6 días), en el grupo control se usó agua de la llave. En la figura 21 se muestran imágenes representativas de la comparación entre los riñones normales, los sometidos a una dieta alta en K^+ y a los que se les indujo la acidosis metabólica. No pudimos observar en ningún caso un cambio claro en la intensidad de fluorescencia ni en la localización de los canales HCN. Será necesario medir la intensidad de fluorescencia para determinar si estos datos son estadísticamente significativos.

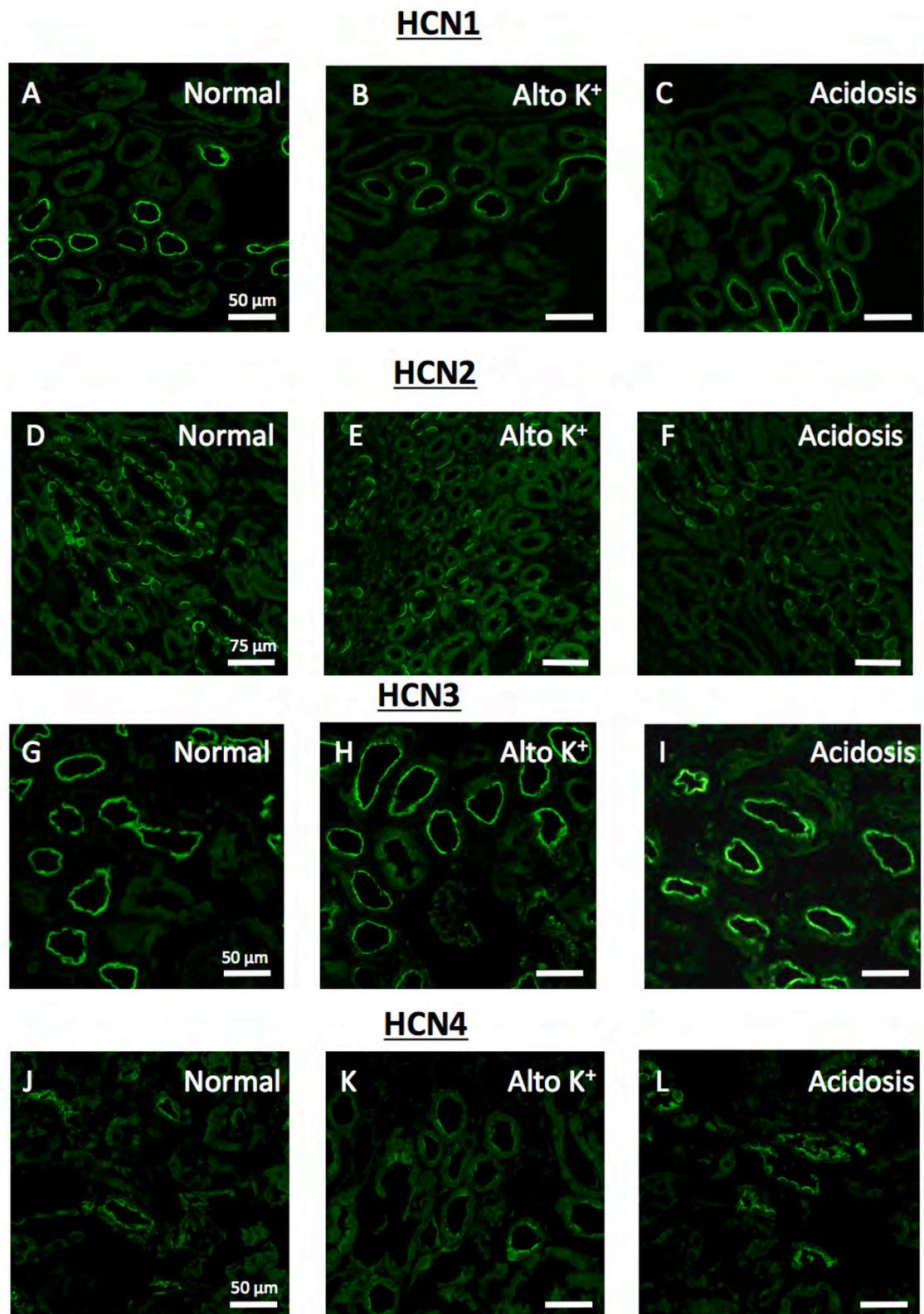


Figura 21. Inmunofluorescencia en Condiciones Normales vs Dieta Alta en K⁺. Cortes de riñón de rata en condiciones normales, en dieta alta en K⁺ y en acidosis metabólica utilizando anticuerpos *A, B, C*) anti-HCN1 *D, E, F*) anti-HCN2 *G, H, I*) anti-HCN3 y *J, K, L*) anti-HCN4.

VII. DISCUSIÓN

La identificación de la familia de canales HCN en el riñón de la rata da lugar a una línea de investigación novedosa en la fisiología renal. A la fecha solamente se tiene evidencia de la presencia de un canal iónico que permite la entrada de sodio a la célula (Tanemoto, 2007). El canal de sodio epitelial ENac ha sido ampliamente caracterizado y es completamente diferente de los canales HCN en su estructura, activación y selectividad. El objetivo de esta tesis fue diseccionar la distribución de la familia de canales HCN en el riñón en los diferentes segmentos de la nefrona.

Los ensayos de inmunofluorescencia con muestras de animales con una dieta crónica alta en K^+ y con una carga ácida en el agua para promover la acidosis metabólica no mostraron un cambio aparente en la abundancia o distribución de las proteínas. Sin embargo, observamos un cambio en los niveles de transcrito al utilizar la técnica de RT-PCR en tiempo real. Esta técnica es mucho más sensible que el RT-PCR tradicional donde solo se pueden cuantificar cambios en ordenes de magnitud en contraste con el tiempo real donde se pueden detectar cambios hasta de 2 veces el transcrito original. Estos resultados se ilustran en la figura 22 en condiciones de dietas alta y baja en K^+ y en la figura 23 en acidosis metabólica.

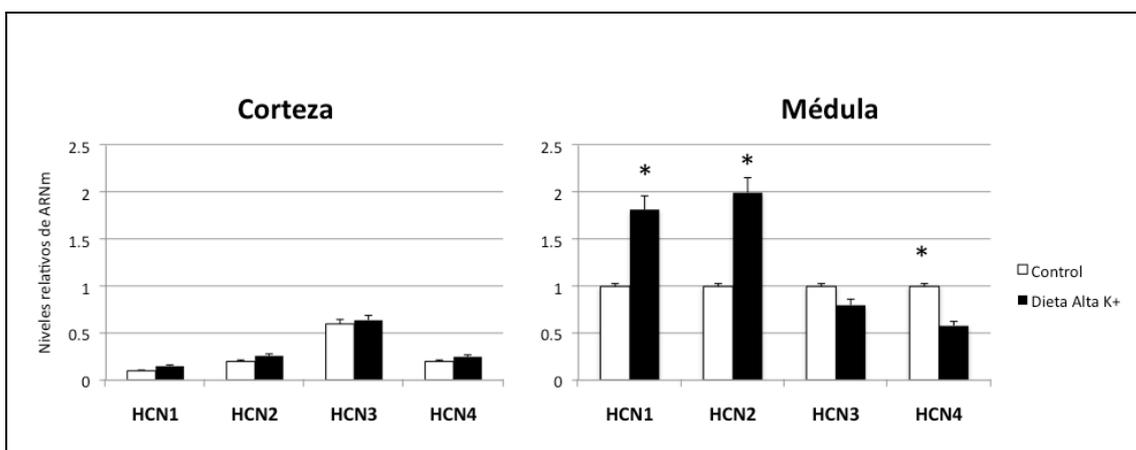


Figura 22. Niveles de ARNm en ratas con dieta alta en K^+ . n= 6;* p= .05. Estos resultados se obtuvieron en colaboración con el laboratorio de la Dra. Bobadilla en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

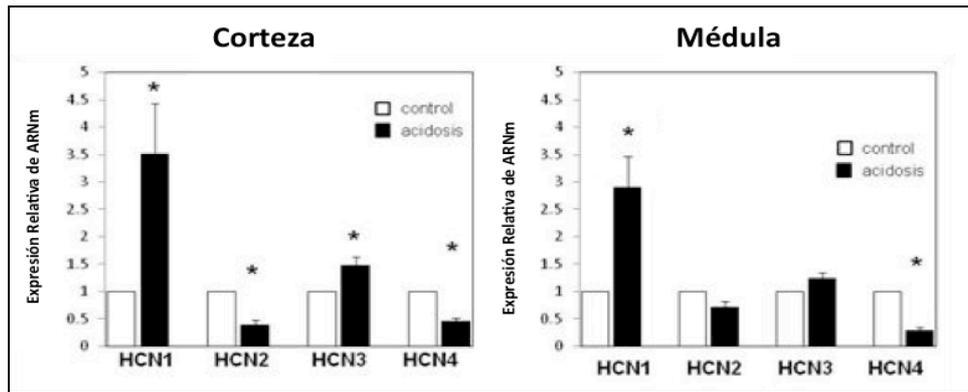


Figura 23. Niveles de ARNm en ratas con acidosis metabólica. n= 6;* p= .05. Estos resultados se obtuvieron en colaboración con el laboratorio de la Dra. Bobadilla en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Se han podido detectar y contabilizar los niveles de todos los integrantes de la familia HCN mediante RT-PCR en tiempo real. Esta es una diferencia importante con los resultados que obtuvieron Bolívar y colaboradores, 2008 que detectaron la presencia de todos los transcritos HCN con la excepción del transcrito para el canal HCN3. Estas diferencias probablemente se deban al diseño que usaron para los oligonucleótidos, ya que en nuestro laboratorio si hemos logrado la amplificación del transcrito del HCN3 (Bolívar, 2008).

Interesantemente observamos que los segmentos involucrados en la reabsorción de Na^+ de las nefronas tienen al menos un canal HCN. A continuación se discutirán los resultados obtenidos ordenándolos según su distribución en la nefrona.

7.01 HCN1 y 3 EN LOS TÚBULOS PROXIMALES

Nuestros ensayos de inmunofluorescencia muestran que las isoformas HCN1 y HCN3 comarcan con AQP1 en forma intensa y clara en las membranas apicales de los túbulos proximales (Fig. 10 y 16). Los túbulos proximales reabsorben de dos a tres cuartas partes del filtrado glomerular (Giebisch, 2007). Los túbulos proximales juegan un papel muy importante en el balance de electrolitos y de fluidos en el cuerpo. Solamente se tiene evidencia de la presencia de un canal iónico que permite la entrada de sodio a la célula; sin embargo, este canal se localiza en la nefrona distal (Tanemoto, 2007).

Los túbulos proximales reabsorben alrededor del 50% al 60% del sodio filtrado mediante diferentes transportadores y bombas (Meneton, 2004). Por lo tanto, los

canales HCN1 y HCN3 deben ser responsables de un nuevo mecanismo no reportado de transporte de Na^+ en el túbulo proximal. La presencia de los canales HCN se ve apoyada con reportes sobre canales de Na^+ en el túbulo proximal, sin embargo su identidad molecular no ha sido definida hasta el momento (Jacobsen, 1988). Además se han registrado corrientes que se bloquean por amilorida en el túbulo proximal. Se debería analizar si los canales HCN se bloquean por amilorida para tener una evidencia robusta de que las corrientes antes mencionadas son generadas por los canales HCN. Otro reporte demuestra la presencia de transcritos para las subunidades del ENaC, como la amilorida es un bloqueador comúnmente utilizado para inhibir las corrientes producidas por el canal ENaC, se asumió que debería ser este canal el responsable de generar las corrientes (Willmann, 1997). Sin embargo, a la fecha no se ha detectado este canal a nivel de proteína en los túbulos proximales. Esto soporta que los canales HCN1 y HCN3 en este segmento de la nefrona son responsables de un porcentaje de la reabsorción de Na^+ .

Durante la acidosis metabólica crónica la reabsorción de Na^+ en los túbulos proximales aumenta. Este aumento se había explicado anteriormente con la sobre-expresión del intercambiador NHE3 en el PT y en el TAL aunque se concluyó que estos cambios no están relacionados con un aumento del transcrito del NHE3 (Ambühl, 1996).

Al conocer el efecto de la acidosis metabólica en la reabsorción de Na^+ nosotros esperábamos observar un aumento en los niveles de HCN1 y HCN3. Sin embargo, nuestros resultados fueron congruentes con las expectativas únicamente en el caso del canal HCN1. Inicialmente no detectamos una banda para HCN1 en corteza pero detectamos un aumento visible en la corteza en condiciones de acidosis metabólica (Fig. 11 B y C). Este resultado además se apoya en los resultados de RT-PCR en tiempo real donde los transcritos de HCN1 aumentan 3.5 veces y los de HCN3 solamente 1.5 veces (Fig. 23).

Tomando esto en consideración ilustramos en la figura 24 como los canales HCN1 y HCN3 podrían contribuir con un porcentaje de la reabsorción de Na^+ en el túbulo proximal para ayudar de manera indirecta a la reabsorción de HCO_3^- , ya sea con una mayor cantidad de canales activos en la membrana o por una mayor síntesis de proteína.

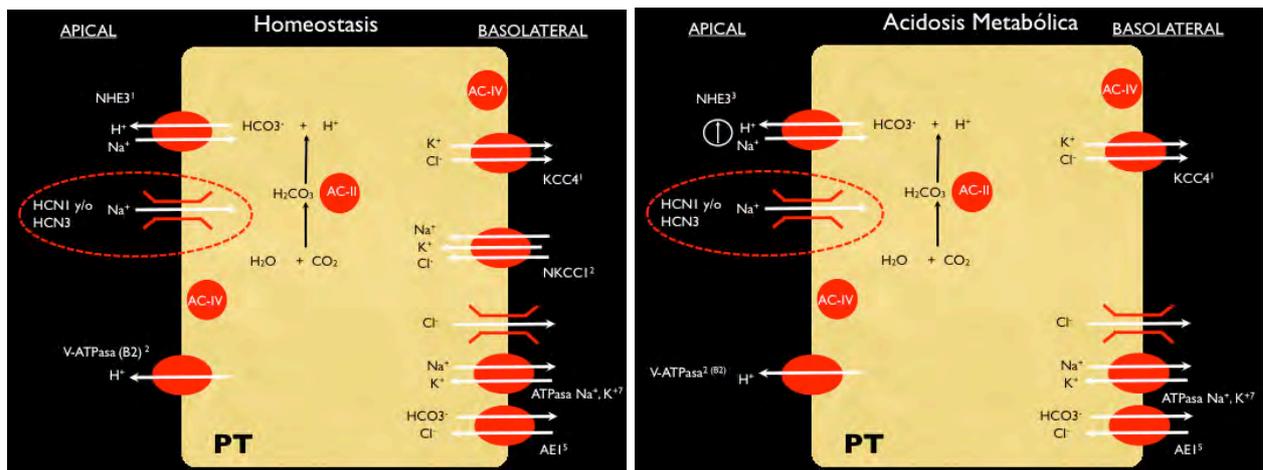


Figura 24. Mecanismos de transporte en el túbulo proximal (PT).

Por otro lado nuestros resultados son la primera evidencia directa que se tiene del canal HCN1 y HCN3 a nivel de proteína en el riñón de rata. Aunque existe un reporte donde detectaron solamente a nivel de transcrito una variante alternativa del canal HCN3 en el riñón de ratón (Santoro, 1997). Sin embargo, será necesario clonar estos canales renales para poder analizar las diferencias y similitudes que puedan tener repercusiones importantes en el comportamiento de los canales renales comparados con los reportados en tejidos excitables.

Al analizar las imágenes de inmunofluorescencia de los canales HCN1 y HCN3 podemos notar que tienen una distribución muy similar (Fig. 9 y 15). Pensamos que muy probablemente estos dos canales formen heteromultímeros para poder ser regulados en diferentes condiciones fisiológicas. Esta conclusión la basamos en las observaciones de Much y *colaboradores*, 2003 donde este grupo haciendo uso de construcciones quiméricas de los cuatro integrantes de la familia de canales HCN demuestran que la heteromultimerización es posible en cualquier combinatoria entre dos diferentes canales, con excepción del canal HCN2 con el HCN3 (Much, 2003).

7.02 HCN2 EN LA NEFRONA DISTAL

El canal HCN2 es hasta el momento de escribir esta tesis el único miembro de la familia HCN que se ha reportado se encuentra a nivel de proteína en el riñón de rata (Bolivar, 2008). Nuestros resultados de Western blot son consistentes con este reporte. Sin embargo, Bolivar y *colaboradores*, 2008 únicamente demuestran *in situ* la presencia de HCN2 en la médula interna en ensayo de Western blot e inmunofluorescencia. Ellos observan que en cultivos primarios de la médula interna cambia la abundancia de las bandas detectadas por Western blot. Es decir que la

banda de menor peso (≈ 90 kDa) en la médula interna es la más intensa pero en los cultivos primarios al igual que en cerebro la banda más intensa es la de mayor peso (≈ 120 kDa). En los canales HCN en cerebro, se ha observado que la glicosilación puede tener un cambio en las bandas detectadas por Western blot de 20 a 30 kDa y que esta modificación podría tener un papel positivo para la heteromerización (Much, 2003; Zha, 2007). Nuestros resultados y la evidencia anterior nos sugiere que el canal HCN2 tiene dos estados, uno glicosilado y otro inmaduro. En este trabajo no pudimos realizar ensayos con glicosidasa para concluir con certeza que este es el caso, sin embargo esto es una perspectiva importante para continuar con esta línea de investigación.

Por medio de ensayos de inmunofluorescencia se demostró una clara localización de los canales HCN2 en la membrana basolateral de las células intercaladas tipo A. Las células intercaladas son las encargadas de la secreción de protones para acidificar la orina y mantener la homeostasis en la sangre. Por lo tanto, su localización nos dio un claro indicio de su papel en la fisiología renal. Esta fue la razón principal para analizar los niveles de proteína en condiciones de acidosis metabólica. Esperábamos observar un aumento de la proteína, esto nos parecía la respuesta lógica ya que en diferentes modelos animales en donde se ha inducido acidosis metabólica se observa que la cantidad de células intercaladas tipo A aumenta y las tipo B disminuyen (Madsen, 1986). Sin embargo, no encontramos aumento en la proteína. Este resultado sugiere que tal vez el aumento de la proteína, que debería ocurrir al aumentar la población de células intercaladas tipo A en acidosis, no es suficiente en el límite de detección del Western blot. De hecho hay pocos estudios de la expresión proteica de los canales HCN en el cerebro y en el corazón, y ninguno de la regulación de su expresión de proteína por alguna variable fisiopatológica.

Para lograr sugerir un posible papel fisiológico del canal HCN2 tenemos que conocer como responden las células intercaladas a diferentes condiciones patológicas. Las células intercaladas se encuentran dispersas entre las células principales de los ductos colectores corticales y de la médula a lo largo de la nefrona distal, más comúnmente en el túbulo conector y el inicio del colector (Madsen, 1986).

Un insulto ácido, que normalmente se induce experimentalmente al adicionar NH_4Cl al agua del animal ocasiona la sobre-expresión de las subunidades de la ATPasa vacuolar en la membrana apical de las CI-A en el túbulo distal, el segmento conector

y los ductos colectores. La ATPasa vacuolar del riñón es electrogénica y su tasa de secreción de H^+ depende del voltaje transmembrana, el cual está predominantemente influenciado por el transporte de Na^+ en la nefrona distal (revisado en Wagner, 2004). Tomando eso en consideración, proponemos que los canales HCN2 pueden contribuir al aumento en la secreción de H^+ mediante la reabsorción de Na^+ a través de la membrana basolateral de las CI-A.

Por otro lado, sabemos que en respuesta a la acidosis metabólica y durante condiciones normales el principal constituyente de la excreción neta de ácido por los riñones es el NH_4^+ (DuBose, 1991; Hamm, 1987). Los túbulos proximales producen amonio como amoniaco y lo secretan hacia el fluido luminal. Se ha propuesto que este proceso ocurre vía el intercambiador apical NHE3 (Nagami, 1988). Aunque puede haber absorción de NH_4^+ en los túbulos proximales (Good y DuBose 1987). Después, el TAL reabsorbe amonio luminal predominantemente por el transporte de NH_4^+ a través del cotransportador- Na^+-K^+-2Cl apical (NKCC2), al intercambiar el K^+ por el NH_4^+ (DuBose, 1991; Hamm, 1987, Knepper, 1991). Pero también se ha reportado que puede absorberse por un canal de K^+ no identificado hasta el momento (Kikeri, 1992; Watts y Good, 1994) y que puede ser muy probablemente el canal HCN4. Este proceso coordinado resulta en la acumulación intersticial de amonio (DuBose, 1991; Hamm, 1987). Finalmente los túbulos colectores secretan amonio del intersticio renal hacia el fluido luminal.

Al tener en mente la vía de transporte del amonio y la localización de los canales HCN2 en las células intercaladas tipo A, podríamos sugerir que uno de los mecanismos por los cuales el NH_4^+ es transportado del intersticio renal hacia la célula intercalada podría ser a través de los canales HCN2 en la membrana basolateral. Esta posibilidad la fundamentamos en que el transporte de amonio a través de las membranas celulares ocurre por la sustitución del H^+ o el K^+ por NH_4^+ en diversos transportadores como el intercambiador NHE3, los cotransportadores $Na^+/K^+/2Cl$ y la ATPasa Na^+/K^+ (Good, 1994). Esta hipótesis se podría comprobar fácilmente mediante ensayos de electrofisiología.

En contraparte, en nuestros resultados de inmunofluorescencia con las muestras de ratas en una dieta alta en K^+ no pudimos observar ningún cambio (Fig. 21). Es importante mencionar que solo realizamos estudios por PCR en tiempo real. Solo se observa un aumento en los niveles de los transcritos en la médula (Fig. 22). Considerando estos resultados, tal vez el tráfico de los canales HCN2 este regulado en

condiciones de hiperkalemia. Sabemos que durante una dieta crónica alta en K^+ la nefrona distal incrementa su tasa de secreción de K^+ significativamente (Berliner, 2001). El aumento en la excreción de K^+ de las células de la nefrona distal promueve la tolerancia al K^+ , esto es la habilidad que le permite a un animal con una dieta alta en K^+ sobrevivir a una carga de K^+ aguda que de otra manera le resultaría fatal.

En las células intercaladas, una dieta alta en K^+ no solo disminuye la reabsorción de K^+ al bajar la actividad de la ATPasa $H^+ - K^+$ sino también aumentando el reciclaje apical de K^+ posiblemente mediante el canal Maxi-K (Wang, 2004) u otros canales de K^+ . Englobando estos mecanismos podemos intentar explicar el papel fisiológico de los canales HCN2 en la membrana basolateral de las células intercaladas tipo A en los animales con hiperkalemia. En este estado metabólico los canales HCN2 podrían permitir la entrada de Na^+ , que despolarizaría la membrana permitiendo que los canales apicales de K^+ se abran y, por lo tanto, promoverían directamente la excreción de K^+ . La figura 25 ilustra los posibles mecanismos de transporte que proponemos para el canal HCN2 en las células intercaladas.

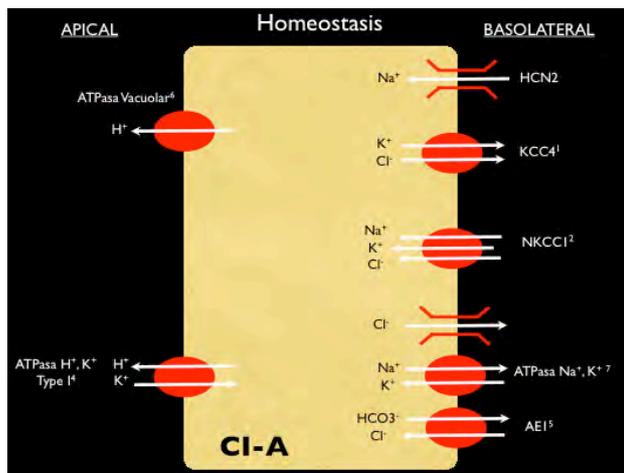
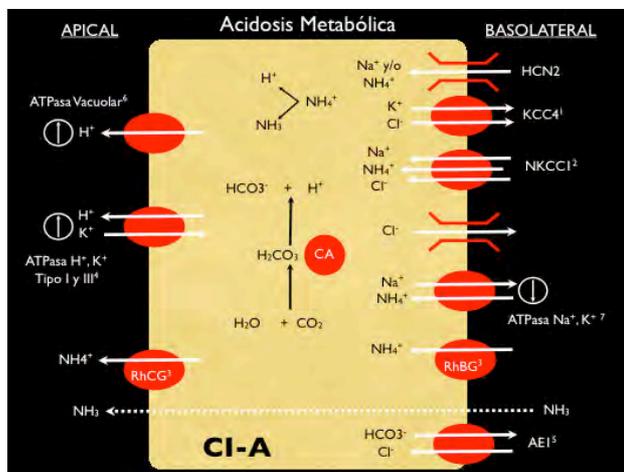
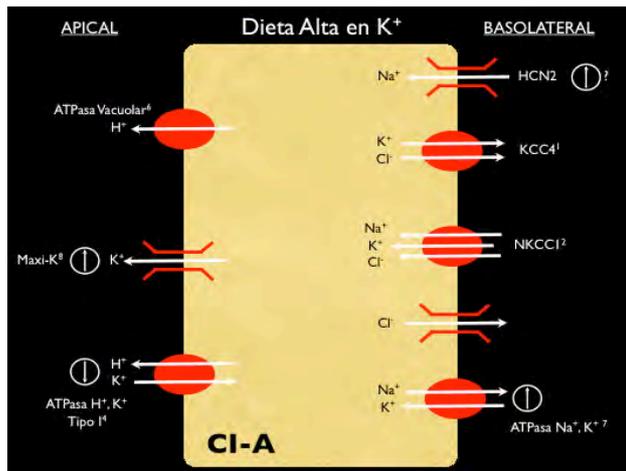


Figura 25. Mecanismos de transporte en las células intercaladas tipo A.





7.03 HCN4 EN LA PORCIÓN ASCENDENTE DEL ASA DE HENLE

El asa de Henle es responsable de la reabsorción de entre el 25% y el 40% de Na⁺ filtrado (Giebisch, 2008), además reabsorbe amoníaco luminal predominantemente por el transporte de NH₄⁺ por el cotransportador Na⁺/K⁺/2Cl apical (NKCC2) (DuBose, 1991; Hamm, 1987, Knepper, 1991) y además por un canal de K⁺ no identificado (Kikeri, 1992; Watts y Good, 1994).

Por su localización en las membranas apicales del TAL puede ser posible que el canal HCN4 contribuya a la reabsorción de Na⁺ en condiciones normales. En condiciones de acidosis metabólica el NH₄⁺ podría reabsorberse a través del HCN4 en este segmento de la nefrona y además por el cotransportador Na⁺/K⁺/2Cl. La ATPase vacuolar del riñón es electrogénica y se encuentra en este segmento de la nefrona acumulado en vesículas subapicales. La tasa de secreción de H⁺ varía dependiendo del voltaje transmembranal, que esta influenciado por el transporte de Na⁺ en la nefrona distal (revisado en Wagner, 2004). Por lo tanto, podríamos sugerir que los canales HCN4 contribuyen al aumento en la secreción de H⁺ mediante la reabsorción de Na⁺ a través de la membrana apical de la porción ascendente del asa de Henle o directamente con la reabsorción de NH₄⁺ para acumularlo en el intersticio, para que después sea excretado por los conductos colectores. Esta hipótesis se apoya en que en condiciones de acidosis metabólica observamos que la proteína del HCN4 aumenta en la corteza.

Por medio de ensayos de Western blot detectamos una banda de menor peso (≈90 kDa) en la médula y la corteza que la reportada para el cerebro (≈140 kDa; Notomi, 2004) (Fig. 23). Este resultado sugiere, al igual que en el caso del HCN2, que el HCN4 del riñón puede tener dos estados uno glicosilado y otro inmaduro.

Con base en nuestros resultados podemos sugerir (Fig. 26) que los canales HCN4 en la porción gruesa ascendente del asa de Henle pueden estar involucrados en la reabsorción de Na^+ y probablemente también en la del NH_4^+ .

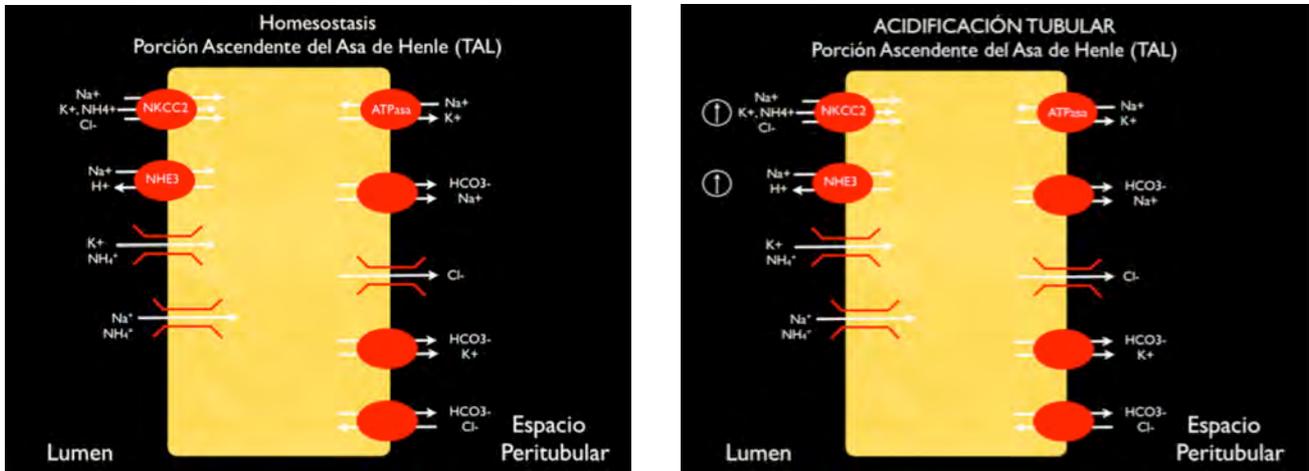


Figura 26. Mecanismos de transporte en el la porción gruesa ascendente del asa de Henle (TAL).

Encontramos diferencias entre nuestros resultados a nivel de proteína y los que se obtuvieron de los niveles de los transcritos. Esto no es causa de preocupación ya que esta diferencia se puede explicar como el resultado de una menor degradación o una mejor eficiencia en la tasa de síntesis de proteínas. También puede deberse a la inserción de canales contenidos en una poza intracelular de endosomas. En un estudio reciente en líneas celulares de cardiomiocitos ventriculares, se observó que este puede ser el caso para los canales HCN2 y HCN4, donde detectan que un mecanismo de reciclaje de endosomas que contiene a los canales HCN contribuye a la adaptación rápida a estímulos extracelulares en este tipo celular (Hardel, 2008).

En el caso del canal Maxi-K se observó que aumentan los niveles de ARNm pero no los de la proteína en homogenados el riñón en condiciones experimentales de hiperkalemia e hipokalemia (Najjar, 2005). Además se encuentran reportes donde los niveles de transcritos y de proteína no necesariamente corresponden en corteza y en médula. En un estudio de los canales ROMK, observaron que en animales sometidos a una dieta alta en K^+ , los niveles de transcritos aumentan en la médula exclusivamente y en los animales con adrenalectomía en corteza disminuyen y en la médula aumentan (Wald, 1998). Con estos resultados los autores concluyen que la expresión de ROMK se regula por medio de K^+ y aldosterona en la corteza, mientras que en la médula se regula únicamente por los niveles de K^+ . Existen similitudes con

el canal HCN2 ya que se observó un aumento del transcrito en la corteza. De la misma manera, otro estudio en los canales ROMK en animales en dieta alta en K^+ los transcritos detectados por hibridación *in situ* no cambiaron, por lo que concluyen que los cambios en la densidad de los canales que observaron no se debe a aumentos del ARNm (Frindt, 1998).

Por otra parte es importante discutir porque la presencia de los canales HCN en el riñón no se había identificado anteriormente. La respuesta más lógica puede ser que estos canales deben ser bloqueados por fármacos como amilorida que bloquean otras corrientes de Na^+ y por lo tanto la presencia de estos podría haberse visto enmascarada. Asimismo lo que observamos es que fue muy difícil detectar a los canales por medio de Western blot probablemente por la abundancia relativa. Se tuvo que cambiar a un método de detección más sensible, de ECL Plus a ECL Advance, además de tener que cambiar de homogenizados de membranas totales a homogenizados enriquecidos con membranas plasmáticas para poder llegar a ver las bandas en los ensayos de Western blot.

Además, como estos canales proporcionan un comportamiento cíclico a los tejidos excitables difícilmente alguien hubiera pensado que también pudieran tener un papel importante en los epitelios.

VIII. CONCLUSIONES

En resumen la presencia de la familia de canales no-selectivos HCN en el riñón se apoya en tres evidencias principales.

- La detección de los canales HCN por medio de ensayos de inmunofluorescencia es probablemente la evidencia más fuerte y clara que tenemos. Los 4 canales fueron detectados tanto en la corteza renal y la médula. Todos los canales HCN se localizan en las membranas apicales, con excepción del canal HCN2 que se localiza en las membranas basolaterales.
- El nivel de expresión de los transcritos para los 4 integrantes de la familia HCN varía con la acidosis y la dieta alta en K^+ .
- Por último los ensayos de Western blot donde detectamos dos bandas para todos los canales, con excepción del canal HCN3, sugieren que pueda tratarse de formas glicosiladas e inmaduras de los canales.

La familia de canales HCN son canales catiónicos dependientes de voltaje, que permiten el transporte de Na^+ y K^+ , es lógico pensar que la flexibilidad que le confiere esta capacidad de transporte en el contexto de la nefrona le permita adaptar el transporte iónico a las necesidades de la célula. Tomando en cuenta esto y nuestros resultados en conjunto podríamos sugerir que los canales HCN están involucrados en una variedad de procesos de transporte. Al parecer la reabsorción de Na^+ y de NH_4^+ que de manera indirecta ayudarían a la reabsorción de HCO_3^- , al reciclaje de K^+ , o a la secreción neta de ácido, podrían ser algunos de los procesos más importantes siendo estos siempre dependientes del contexto celular y del segmento de la nefrona en que se encuentren.

IX. PERSPECTIVAS

Nuestros resultados todavía no nos permiten concluir con seguridad cual sería el papel fisiológico de esta familia de canales. Para poder tener conclusiones más robustas se deberán utilizar diferentes métodos experimentales como:

- La clonación los canales, para poder determinar con certeza que los canales HCN pueden ser isoformas no reportadas hasta el momento
- La determinación de su farmacología que apoyaría fuertemente que las corrientes generadas por los canales HCN se veían enmascaradas por otras corrientes de Na^+ en el riñón.
- Ensayos con glicosidasa para poder concluir que las dos bandas que se observan en los resultados de Western blot para los canales HCN1, HCN2 y HCN4 se deben a estas modificaciones post-traduccionales.
- Experimentos de microperfusión como estrategia más importante para poder medir la contribución directa y determinar que iones transportan los canales HCN en diferentes condiciones experimentales.

Con lo anterior se podrán tener evidencias más firmes que sugieran porque estos canales no se habían identificado anteriormente y que era lo que enmascaraba su detección en el riñón. Todavía existe una gran gama de descubrimientos por hacer con respecto a los canales HCN renales y será muy importante para el estudio de la fisiología renal seguir disecando sus propiedades y mecanismos de regulación.

X. MATERIALES Y MÉTODOS

10.01 OBTENCIÓN DE TEJIDOS PARA WESTERN-BLOT

1. Anestesiarse una rata Wistar macho de 200-250 g 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°C , para su uso posterior.

10.02 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°C por un día y a -70°C por periodos de tiempo mayores.

10.03 FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS CRUDOS

1. Centrifugar los extractos crudos de las membranas a 17,000 x g 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 más de 24 horas y a -70 °C si el almacenamiento será por periodos más largos.
3. Centrifugar el sobrenadante a 100,000 x g durante una hora. El botón resultante se resuspende en 200 ml de la solución de extracción para obtener una suspensión enriquecida con membranas de baja densidad (membranas microsomales). Almacenar en las mismas condiciones del paso previo.
4. Cuantificar las proteínas con el método de Lowry.

10.04 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 minicentrífuga por 20 segundos a 3,000 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 μ 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.

10.05 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:
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.

10.06 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/cm² 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 para que se estabilice 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.

10.07 PERFUSIÓN, OBTENCIÓN Y FIJADO DE LOS TEJIDOS PARA INMUNOFLUORESCENCIA

1. Anestésiar a una rata Wistar macho de 200-250 g con cloroformo.
2. Una vez que el animal se encuentre anestésiado 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 4º 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 tejidos flotan en la solución y a medida que la solución vaya incluyéndose, estos descienden al fondo del frasco contenedor. Este proceso se realiza a 4° C.

10.08 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.

10.09 INMUNOFLORESCENCIA

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. Si se desea hacer un doble marcaje se inicia desde el paso 7 para el segundo anticuerpo primario.
12. Montar los cortes en fresco (sin deshidratar) con medio para fluorescencia VECTASHIELD (Vector)

10.10 MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA CONFOCAL

Los tejidos procesados con las técnicas de inmunofluorescencia, se observan en el microscopio invertido de epifluorescencia. Las imágenes se capturan utilizando el sistema confocal. El fluoróforo utilizado (Alexa 488, Alexa 598 y Rojo de Texas) se excita utilizando una línea de argón y la emisión es detectada utilizando un filtro a la longitud de onda adecuada.

10.11 PROTOCOLO PARA DIETA ALTA EN K⁺

Se alimentan ratas Wistar macho de 200-250 g con una dieta alta en K⁺ (10%) y un grupo control (1.2% de K⁺) (Harlan–Teklad, Madison, WI) durante 15 días (n=6 en cada grupo). Al final del estudio las ratas son puestas en cajas metabólicas y se colecta la orina durante 24 horas y se miden los electrolitos.

10.12 PROTOCOLO PARA ACIDOSIS METABÓLICA CRÓNICA

Se les adiciona cloruro de amonio en el agua (280 mM) a un grupo de ratas Wistar macho de 200-250 g y a otro grupo igual que se usa como control con agua destilada. Ambos grupos se les da alimento *ad libitum* durante 6 días (n=6 en cada grupo). Al final del estudio las ratas son puestas en cajas metabólicas y se colecta la orina durante 24 horas y se mide el pH y los electrolitos.

XI. SOLUCIONES Y REACTIVOS

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.

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)

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

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

Solución de electroforesis (BioRad)

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

Gel de SDS-poliacrilamida

Gel separador (10%) 5ml

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

4 ml	H ₂ 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 (4µl)	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 µl 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 H₂O y llevar a 100 ml de aforo. Almacenar a 4° C en un frasco ámbar.

Gel concentrador (5%)

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

3.4 ml	H ₂ 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 (5µl)	TEMED (mezclar y verter inmediatamente)

Solución de transferencia (pH 8.3)

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

Reactivo para cuantificar proteínas

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

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)

Solución reveladora para placas radiográficas (Kodak)

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

Almacenar en frasco Ámbar.

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.

Solución desnaturalizante (Laemmli)

Tris-HCl (pH 6.8) 50 mM

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.

Solución de lavado (PBS)

PB 0.2M pH 7.4 100 ml

NaCl 8.76 g

KCl 0.2 g

H₂O cbp 1000 ml

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.

Solución Bloqueadora

Solución de lavado con Tritón X100 al 0.1 %

Suero de caballo al 5 %

Suero bovino fetal al 5 %

Solución para anticuerpos

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

XII. REFERENCIAS

- **Aalkjaer, C.**, Frische, S., Leipziger, J., Nielsen, S., & Praetorius, J. (2004). Sodium coupled bicarbonate transporters in the kidney, an update. *Acta Physiol Scand*, 181(4), 505-512.
- **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.
- **Aidley, D. J.**, Stanfield, P. R. (1998) "Ion Channels Molecules in Action" chap. 1. Introduction. 1st Ed. Cambridge University Press, UK.
- **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
- **Alpern, R. J.** (1985). Mechanism of basolateral membrane H⁺/OH⁻/HCO₃⁻ transport in the rat proximal convoluted tubule. A sodium-coupled electrogenic process. *J Gen Physiol*, 86(5), 613-636.
- **Ambühl, P. M.**, Amemiya, M., Danczkay, M., Lötscher, M., Kaissling, B., Moe, O. W., et al. (1996). Chronic metabolic acidosis increases NHE3 protein abundance in rat kidney. *Am J Physiol*, 271(4 Pt 2), F917-925.
- **Berliner, R. W.**, & Giebisch, G. (2001). Remembrances of renal potassium transport. *J Membr Biol*, 184(3), 225-232.
- **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⁺ and Ca²⁺ and modulated by cAMP. *Nature* 365:445-48
- **Brosnan, J. T.**, Lowry, M., Vinay, P., Gougoux, A., & Halperin, M. L. (1987). Renal ammonium production--une vue canadienne. *Can J Physiol Pharmacol*, 65(4), 489-498.
- **Brown, D.**, Hirsch, S., & Gluck, S. (1988). Localization of a proton-pumping ATPase in rat kidney. *J Clin Invest*, 82(6), 2114-2126.
- **Buerkert, J.**, Martin, D., & Trigg, D. (1983). Segmental analysis of the renal tubule in buffer production and net acid formation. *Am J Physiol*, 244(4), F442-454.
- **Bucchi, A.**, M. Baruscotti & D. DiFrancesco. (2002). Current-dependent block of rabbit sino-atrial node I_f channels by ivabradine. *J. Gen. Physiol.* 120: 1-13.
- **Calloe, K.**, Elmedy, 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. (1994). Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature*; 367:463-7.
- **Capasso, G.**, Unwin, R., Rizzo, M., Pica, A., & Giebisch, G. (2002). Bicarbonate transport along the loop of Henle: molecular mechanisms and regulation. *J Nephrol*, 15 Suppl 5, S88-96.
- **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.
- **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⁺ Channels. *Annals of the New York Academy of Sciences* 868:233-255.
- **Constanzo, L.** (1998). Fisiología. Cap. 6. Fisiología Renal. 1era Ed. McGraw Hill. USA. Pp. 228-288
- **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⁺ 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.
- **Curthoys, N. P.**, & Gstraunthaler, G. (2001). Mechanism of increased renal gene expression during metabolic acidosis. *Am J Physiol Renal Physiol*, 281(3), F381-390.
- **Curthoys, N. P.**, & Watford, M. (1995). Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annu Rev Nutr*, 15, 133-159.
- **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.
- **DuBose, T. D.**, Good, D. W., Hamm, L. L., & Wall, S. M. (1991). Ammonium transport in the kidney: new physiological concepts and their clinical implications. *J Am Soc Nephrol*, 1(11), 1193-1203.
- **DuBose, T. D.**, Lucci, M. S., Hogg, R. J., Pucacco, L. R., Kokko, J. P., & Carter, N. W. (1983). Comparison of acidification parameters in superficial and deep nephrons of the rat. *Am J Physiol*, 244(5), F497-503.
- **El-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-Téllez, J.C., 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.
- **Faroqui, S.** (2006). Metabolic acidosis has dual effects on sodium handling by rat kidney. *AJP: Renal Physiology*, 291(2), F322-F331.
- **Frindt, G.**, & Palmer, L. G. (2004). Apical potassium channels in the rat connecting tubule. *Am J Physiol Renal Physiol*, 287(5), F1030-1037.
- **Frömter, E.** (1984). Viewing the kidney through microelectrodes. *Am J Physiol*, 247(5 Pt 2), F695-705.
- **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.
- **Garcia-Austt, J.**, Good, D. W., Burg, M. B., & Knepper, M. A. (1985). Deoxycorticosterone-stimulated bicarbonate secretion in rabbit cortical collecting ducts: effects of luminal chloride removal and in vivo acid loading. *Am J Physiol*, 249(2 Pt 2), F205-212.
- **Gauss, R.**, R. Seifert & B.U. Kaupp. 1998. Molecular identification of a hiperpolarization-activated channel in a sea urchin sperm. *Nature* 393: 583-587.
- **Giebisch, G.**, Krapf, R., & Wagner, C. (2007). Renal and extrarenal regulation of potassium. *Kidney Int*, 72(4), 397-410.
- **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.
- **Good, D. W.**, Knepper, M. A., & Burg, M. B. (1984). Ammonia and bicarbonate transport by thick ascending limb of rat kidney. *Am J Physiol*, 247(1 Pt 2), F35-44.
- **Good, D. W.** (1985). Sodium-dependent bicarbonate absorption by cortical thick ascending limb of rat kidney. *Am J Physiol*, 248(6 Pt 2), F821-829.
- **Good, D. W.**, Caflish, C. R., & DuBose, T. D. (1987). Transepithelial ammonia concentration gradients in inner medulla of the rat. *Am J Physiol*, 252(3 Pt 2), F491-500.
- **Good, D. W.** (1994). Ammonium transport by the thick ascending limb of Henle's loop. *Annu Rev Physiol*, 56, 623-647.
- **Guyton, A. C.**, Hall J. E. (2001). Textbook of Medical Physiology. chap. 26. Urine formation by the kidneys by Guyton, A. C. 3rd. Edition. Saunders. USA. Pp. 279-293.
- **Halperin, M. L.** (1993). Metabolic aspects of metabolic acidosis. *Clinical and investigative medicine Médecine clinique et expérimentale*, 16(4), 294-305.
- **Hamm, L. L.**, & Hering-Smith, K. S. (1993). Acid-base transport in the collecting duct. *Semin Nephrol*, 13(2), 246-255.
- **Hardel, N.**, Harmel, N., Zolles, G., Fakler, B., & Klöcker, N. (2008). Recycling Endosomes Supply Cardiac Pacemaker Channels for Regulated Surface Expression. *Cardiovasc Res*.
- **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.**, Gono, 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.
- **Jacobsen, C.**, Røigaard-Petersen, H., & Sheikh, M. I. (1988). Demonstration of Na⁺-selective channels in the luminal-membrane vesicles isolated from pars recta of rabbit proximal tubule. *FEBS Lett*, 236(1), 95-99.
- **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.
- **Karim, Z.**, Attmane-Elakeb, A., & Bichara, M. (2002). Renal handling of NH₄⁺ in relation to the control of acid-base balance by the kidney. *J Nephrol*, 15 Suppl 5, S128-134.
- **Kikeri D.**, Sun A, Zeidel ML, Hebert SC (1992) Cellular NH₄⁺/K⁺ transport pathways in mouse medullary thick limb of Henle. Regulation by intracellular pH. *J Gen Physiol* 99, 435-461.
- **Kleyman, T. R.**, & Cragoe, E. J. (1988). Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport. *J Membr Biol*, 105(1), 1-21.
- **Knepper, M. A.**, & Agre, P. (2004). Structural biology. The atomic architecture of a gas channel. *Science*, 305(5690), 1573-1574.
- **Koeppen, B. M.**, & Helman, S. I. (1982). Acidification of luminal fluid by the rabbit cortical

- collecting tubule perfused in vitro. *Am J Physiol*, 242(5), F521-531.
- **Levine, D. Z.**, & Jacobson, H. R. (1986). The regulation of renal acid secretion: new observations from studies of distal nephron segments. *Kidney Int*, 29(6), 1099-1109.
 - **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. (2001) Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell*; 104:545-56.
 - **Ludwig, A.**, Zong, X., Jeglitsch, M. *et al.* (1998). A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* 393: 587-591.
 - **Ludwig, A.**, Zong, X., Hofmann, F., Biel, M. (1999). Structure and function of cardiac pacemaker channels. *Cell Physiol. Biochem.* 9, pp. 179-186.
 - **Madsen, K. M.**, & Tisher, C. C. (1986). Structural-functional relationships along the distal nephron. *Am J Physiol*, 250(1 Pt 2), F1-15.
 - **McKinney, T. D.**, & Burg, M. B. (1978). Bicarbonate absorption by rabbit cortical collecting tubules in vitro. *Am J Physiol*, 234(2), F141-145.
 - **McKinney, T. D.**, & Davidson, K. K. (1987). Bicarbonate transport in collecting tubules from outer stripe of outer medulla of rabbit kidneys. *Am J Physiol*, 253(5 Pt 2), F816-822.
 - **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.
 - **Mistrík, 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.
 - **Murer, H.**, Hopfer, U., & Kinne, R. (1976). Sodium/proton antiport in brush-border-membrane vesicles isolated from rat small intestine and kidney. *Biochem J*, 154(3), 597-604.
 - **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]
 - **Najjar, F.**, Zhou, H., Morimoto, T., Bruns, J. B., Li, H. S., Liu, W., et al. (2005). Dietary K+ regulates apical membrane expression of maxi-K channels in rabbit cortical collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol*, 289(4), F922-932.
 - **Nakhoul, N. L.**, & Boron, W. F. (1988). Acetate transport in the S3 segment of the rabbit proximal tubule and its effect on intracellular pH. *J Gen Physiol*, 92(3), 395-412.
 - **Notomi, 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. (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry*. Pp. 369-380.
 - **O'Neil, R. G.**, & Hayhurst, R. A. (1985). Functional differentiation of cell types of cortical collecting duct. *Am J Physiol*, 248(3 Pt 2), F449-453.
 - **Preisig, P. A.**, Ives, H. E., Cragoe, E. J., Alpern, R. J., & Rector, F. C. (1987). Role of the Na+/H+ antiporter in rat proximal tubule bicarbonate absorption. *J Clin Invest*, 80(4), 970-978.
 - **Preisig, P. A.**, & Rector, F. C. (1988). Role of Na+-H+ antiport in rat proximal tubule NaCl absorption. *Am J Physiol*, 255(3 Pt 2), F461-465.
 - **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.
- **Satlin, L. M.**, & Schwartz, G. J. (1989). Cellular remodeling of HCO₃⁻-secreting cells in rabbit renal collecting duct in response to an acidic environment. *J Cell Biol*, 109(3), 1279-1288.
- **Schuster, V. L.** (1990). Bicarbonate reabsorption and secretion in the cortical and outer medullary collecting tubule. *Semin Nephrol*, 10(2), 139-147.
- **Schuster, V. L.**, & Stokes, J. B. (1987). Chloride transport by the cortical and outer medullary collecting duct. *Am J Physiol*, 253(2 Pt 2), F203-212.
- **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
- **Steinmetz, P. R.** (1986). Cellular organization of urinary acidification. *Am J Physiol*, 251(2 Pt 2), F173-187.
- **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⁺-recycling” for Na⁺-reabsorption in renal tubules. *Clin. Exp. Nephrol.* 11:1–6
- **Tannen, R. L.**, & Sahai, A. (1990). Biochemical pathways and modulators of renal ammoniogenesis. *Mineral and electrolyte metabolism*, 16(5), 249-258.
- **Thomas, P. M.**, Cote, G. J., Wohllk, 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.
- **Wald, H.**, Garty, L.G., Palmer., Popovtzer, M. (1998). Differential regulation of ROMK expression in kidney cortex and medulla by aldosterone and potassium. *Am J Physiol* vol. 275 (2 Pt 2) pp. F239-45
- **Wagner, C. A.**, Finberg, K. E., Breton, S., Marshansky, V., Brown, D., & Geibel, J. P. (2004). Renal vacuolar H⁺-ATPase. *Physiol Rev*, 84(4), 1263-1314.
- **Wang, X.**, & Kurtz, I. (1990). H⁺/base transport in principal cells characterized by confocal fluorescence imaging. *Am J Physiol*, 259(2 Pt 1), C365-373.
- **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.
- **Wang, W.** (2004). Regulation of renal K transport by dietary K intake. *Annu Rev Physiol*, 66, 547-569.
- **Watts BA 3rd**, Good DW (1994) Effects of ammonium on intracellular pH in rat medullary thick ascending limb: mechanisms of apical membrane NH₄⁺ transport. *J Gen Physiol* 103:917-36.

- **Weiner, I. D., & Hamm, L. L.** (1990). Regulation of intracellular pH in the rabbit cortical collecting tubule. *J Clin Invest*, 85(1), 274-281.
- **Willmann, J. K.,** Bleich, M., Rizzo, M., Schmidt-Hieber, M., Ullrich, K. J., & Greger, R. (1997). Amiloride-inhibitable Na⁺ conductance in rat proximal tubule. *Pflugers Arch*, 434(2), 173-178.
- **Wingo, C. S.,** & Cain, B. D. (1993). The renal H-K-ATPase: physiological significance and role in potassium homeostasis. *Annu Rev Physiol*, 55, 323-347.
- **Wingo, C. S.,** & Smolka, A. J. (1995). Function and structure of H-K-ATPase in the kidney. *Am J Physiol*, 269(1 Pt 2), F1-16.
- **Yoshitomi, K.,** & Frömter, E. (1984). Cell pH of rat renal proximal tubule in vivo and the conductive nature of peritubular HCO₃⁻ (OH⁻) exit. *Pflugers Arch*, 402(3), 300-305.
- **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.
- **Zha, Q.,** Brewster, A. L., Richichi, C., Bender, R. A., & Baram, T. Z. (2007). Activity-dependent heteromerization of the hyperpolarization-activated, cyclic-nucleotide gated (HCN) channels: role of N-linked glycosylation. *J Neurochem*.