

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**Expresión y distribución de los canales  
de potasio activados por voltaje (Kv) en  
el epitelio renal.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**PRESENTA:**

**QFB. ROLANDO CARRISOZA GAYTÁN**

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. LAURA ESCOBAR PÉREZ**

Facultad de Medicina



CIUDAD UNIVERSITARIA, MÉXICO D. F.

MARZO DE 2012.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **Dedicatorias**

**A mis padres: Zenaida y Gregorio.**

**A mis hermanos: Marbella, Javier y Hugo.**

# **Agradecimientos.**

## **Comité Tutorial:**

**Dra. Laura Escobar Pérez (Directora de tesis).**

**Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval.**

**Dr. Gerardo Gamba Ayala.**

**Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas.**

**Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.**

**Proyecto: 41365**

**Beca Doctoral: 189000**

**Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica.**

**Proyectos: IN201110, IN202110-3 e IN224406.**

**Facultad de Medicina, UNAM.**

**Departamento de Fisiología.**

**Jurado para el examen de grado:**

**Presidente: Dra. Marta Menjivar Iraheta.**

**Secretario: Dra. Laura Escobar Pérez.**

**Vocal: Dr. José Pedraza Chaverri.**

**Vocal: Dra. Alicia Ortega Aguilar.**

**Vocal: Dr. José de Jesús García Valdés.**

## **Agradecimientos.**

### **Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina UNAM:**

#### **Laboratorio de canales iónicos del departamento de fisiología de la Facultad de Medicina UNAM:**

**Dra. Laura Escobar Pérez.**

(Profesor Titular B T. C.)

**M en C. Carolina Salvador Hernández.**

(Técnico Académico Titular B T.C)

**A mis compañeros de laboratorio.**

### **Departamento de Pediatría de la Escuela de Medicina Mount Sinai, NY:**

**MD. PhD. Lisa M Satlin.**

(Professor & Chair Pediatrics, Mount Sinai School of Medicine, NY)

**MD. PhD. Wen Liu.**

(Professor Assistant, Mount Sinai School of Medicine, NY)

**AAS. Beth Zvilowitz.**

(Lab Coordinator, Mount Sinai School of Medicine, NY)

### **Hospital de Especialidades del CMNSXXI:**

**Dr. José Ramón Paniagua Sierra.**

(Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Nefrológicas.CMNSXXI).

### **Unidad del Bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM:**

**MVZ. Enrique Pinzón Estrada**

(Jefe de la Unidad)

**MVZ. Victor Manuel Salgado.**

**MVZ. Ismael Torres Saldaña.**

## UN HOMBRE NUEVO

UNA NUEVA CONCIENCIA...  
UN HOMBRE NUEVO,  
TIENE CONCIENCIA DE LA DIGNIDAD,  
DEL VALOR DE LA DIGNIDAD  
PARA VIVIR, PARA TRABAJAR,  
PARA DEVOLVER LA DIGNIDAD  
A TODOS LOS GÉNEROS DE VIDA  
QUE, AL IGUAL QUE TÚ, QUE YO,  
EXISTEN, SIENTEN...  
AÚN CON SU INEFABLE INTELIGENCIA,  
SIENTEN EL MALTRATO, EL HAMBRE,  
LA SED, LA ANGUSTIA, EL DOLOR,  
LAS MANOS DEL EXPERIMENTADOR.  
GRACIAS A ESOS SERES, QUE  
SACRIFICADOS POR LA EXPERIMENTACIÓN  
SE DIERON NUEVOS HORIZONTES A LA VIDA.  
VIEJAS Y NUEVAS GENERACIONES  
HAN VISTO ALEJAR LA MUERTE Y EL DOLOR  
GRACIAS REITERADAMENTE A ESAS RATAS,  
PERROS, GATOS, SIMIOS  
Y DEMÁS “CONEJILLOS DE INDIAS”  
QUE EN ARAS DE LA CIENCIA,  
LA ENSEÑANZA O LA INVESTIGACIÓN,  
MITIGAN LA ANGUSTIA, EL DOLOR...  
LA AGONIA, DEL ETERNO SUEÑO.  
UNA NUEVA CONCIENCIA...  
UN HOMBRE NUEVO.

ANTONIO DUVALIER.  
UNACH.

## ÍNDICE GENERAL

|  |            |
|--|------------|
| <b>ÍNDICE GENERAL</b> .....  | <b>6</b>   |
| <b>Abreviaturas</b> .....  | <b>7</b>   |
| <b>1. RESUMEN / ABSTRACT</b> .....   | <b>10</b>  |
| <b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....   | <b>13</b>  |
| 2.1. Homeostasis del potasio .....   | 13         |
| 2.2. Manejo renal del potasio .....  | 16         |
| 2.3. Mecanismos de transporte de K <sup>+</sup> en los diferentes segmentos de la nefrona .....  | 19         |
| 2.4. Síndromes-Tubulopatías por defecto en el manejo de agua y sales .....   | 26         |
| 2.5. Canales de potasio .....  | 29         |
| 2.6. Canales de potasio activados por voltaje .....  | 31         |
| <b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....  | <b>35</b>  |
| <b>4. ANTECEDENTES</b> .....   | <b>36</b>  |
| <b>5. OBJETIVOS</b> .....  | <b>37</b>  |
| <b>6. HIPÓTESIS</b> .....  | <b>37</b>  |
| <b>7. METODOLOGÍA</b> .....  | <b>38</b>  |
| 7.1. Expresión y la distribución de los canales Kv en el epitelio renal .....  | 38         |
| 7.2. Expresión y la distribución de los Kv1 en respuesta a las dietas con alto contenido en potasio .....  | 47         |
| 7.3 Expresión funcional de los canales Kv localizados en la membrana apical del conducto colector cortical .....   | 49         |
| 7.4 Análisis estadístico .....   | 50         |
| <b>8. RESULTADOS</b> .....   | <b>51</b>  |
| 8.1. Identificación de los canales Kv1.1, Kv1.3, Kv1.6 y Kv11.1 en el riñón de rata .....  | 51         |
| 8.2. Localización diferencial de los canales Kv en los segmentos de la nefrona .....   | 55         |
| 8.3. Efecto de una dieta con alto contenido en K <sup>+</sup> sobre la expresión de los canales Kv1.1, Kv1.3, Kv1.6 y Kv11.1 .....                                 | 64         |
| 8.4. Los canales Kv1.1 y Kv1.3 secretan K <sup>+</sup> en el conducto colector cortical en las ratas sometidas a dietas con alto contenido en K <sup>+</sup> ..... | 74         |
| <b>9. DISCUSIÓN</b> .....  | <b>77</b>  |
| <b>10. REFERENCIAS</b> .....   | <b>84</b>  |
| <b>APENDICE A: Anatomía y fisiología renal</b> .....   | <b>93</b>  |
| <b>APENDICE B:Glosario</b> .....   | <b>107</b> |
| <b>APENDICE B: Publicaciones</b> .....   | <b>111</b> |

## ABREVIATURAS.

**A488:** Alexa 488.

**A594:** Alexa 594.

**AK:** Dieta con alto contenido en potasio (10% <sup>w/w</sup>).

**AQP1:** Canal de agua Acuaporina 1.

**AQP2:** Canal de agua Acuaporina 2.

**CALB:** Calbindina.

**CaSR:** Receptor de calcio extracelular.

**CC:** Conducto colector.

**CCC:** Conducto colector cortical.

**CCI:** Conducto colector inicial.

**CCM:** Conducto colector medular.

**CCME:** Conducto colector de la médula externa.

**CCMI:** Conducto colector de la médula interna.

**cDNA:** Cadena de ácido desoxirribonucleico complementaria.

**Ce:** Cerebelo.

**ci:** Célula(s) intercalada(s).

**ciA:** Célula(s) intercalada(s) tipo A (secretoras de ácido,  $\alpha$ ).

**ciB:** Célula(s) intercalada(s) tipo B (secretoras de bicarbonato,  $\beta$ ).

**CK:** Dieta control de potasio (1.2% <sup>w/w</sup>).

**CIC-K:** Canal de cloro renal.

**Co:** Corteza renal.

**cp:** Célula(s) principal(es).

**CRS:** Corpúsculo renal superficial.

**CRYM:** Corpúsculo renal yuxtamedular.

**DAH:** Porción delgada ascendente del asa de Henle.

**DB:** *Dolichos biflorus*.

**DDH:** Porción delgada descendente del asa de Henle.

**ENaC:** Canal de sodio epitelial (sensible a Amilorida).

**ECaC:** Canal de calcio epitelial.

**GAH:** Porción gruesa ascendente del asa de Henle.



**GAPDH:** Glicer aldehído 3-fosfato deshidrogenasa.

**IgG:** Inmunoglobulina.

**KCC:** Cotransportador de potasio y cloro ( $K^+/Cl^-$ ).

**KChAP:** Proteína accesoria de canal de potasio ( $K^+$ -channel accessory protein).

**KCHIP:** Proteína que interactúa con canales de potasio ( $K^+$ -channel interacting protein).

**KCNA:** Gen que codifica para la subunidad alfa de canales de la subfamilia Kv1.

**KCNE1:** Gen que codifica la subunidad MinK.

**KCNJ1:** Gen que codifica el canal ROMK.

**KCNMA1:** Gen que codifica la subunidad alfa del canal MaxiK.

**KCNQ1:** Gen que codifica para la subunidad alfa del canal Kv7.1.

**Kir:** Canal de potasio rectificador entrante.

**KS-WNK1:** Cinasa de serina y treonina sin lisina 1, isoforma corta específica de riñón.

**Kv:** Canales de potasio activados por voltaje.

**LEC:** Líquido extracelular.

**LIC:** Líquido intracelular.

**MD:** Macula densa.

**ME:** Médula externa.

**MgTx:** Margatoxina.

**MI:** Médula interna.

**MinK:** Subunidad moduladora de canales de potasio activados por voltaje tipo 1, relacionada con la familia Isk (KCNE1).

**MR:** Receptor a mineralocorticoides.

**NaPilla:** Cotransportador de sodio y potasio tipo IIa.

**NCC:** Cotransportador de sodio y cloro ( $Na^+/Cl^-$ ).

**NCX:** Intercambiador de sodio y calcio.

**NH3:** Cotransportador sodio protón 3 ( $Na^+/H^+$ ).

**NKCC:** Cotransportador de sodio potasio y cloro ( $Na^+/K^+/2Cl^-$ ).

**NR3C2:** Gen que codifica a la proteína MR.

**P:** Dominio formador del poro de un canal iónico.

**PC:** Péptido control.

**PKA:** Cinasa de proteínas A (Protein Kinase A).

**ROMK:** Canal de potasio Kir1.1 de la médula externa de rata.

**RT-PCR:** Retro transcripción in vitro y reacción en cadena de polimerasa.

**SCNN1A:** Gen que codifica a la subunidad alfa del canal ENaC.

**SCNN1B:** Gen que codifica a la subunidad beta del canal ENaC.

**SCNN1G:** Gen que codifica la subunidad gamma del canal ENaC.

**SGK1:** Cinasa sérica regulada por glucocorticoides tipo 1.

**SGLT1:** Cotransportador de sodio y glucosa tipo 1.

**SGLT2:** Cotransportador de sodio y glucosa tipo 2.

**SLC12A3:** Gen que codifica a la proteína NCC.

**SLC1A1:** Gen que codifica para el acarreador de solutos de la familia 1 (transportador de aminoácidos excitatorios 3).

**SLC34A1:** Gen que codifica a la proteína NaPilla.

**SLC6A18 – 20:** Genes que codifican para los acarreadores de solutos de pendientes de sodio y cloro de la familia 6 (miembros 18 a 20: cotransportador de sodio y aminoácidos y neurotransmisores).

**TCD:** Túbulo contorneado distal.

**TCN:** Túbulo conector.

**TCP:** Túbulo Contorneado Proximal.

**THP:** Tamm Horsfall glicoproteína.

**TM:** Hélice transmembranal de una proteína de membrana.

**TP:** Túbulo proximal.

**TRP:** Túbulo recto proximal.

**TRP:** Túbulo recto proximal.

**TRPV5:** Canal iónico selectivo para calcio y magnesio 5 (Transient receptor potential vanilloid).

**UT:** Transportador de urea.

**V-ATPasa:** ATPasa vacuolar de protones.

**WNK4:** Cinasa sin lisina (with no lysine kinase, serine threonine kinase).

## 1. RESUMEN.

La regulación fisiológica del potasio ( $K^+$ ), requiere básicamente de dos condiciones para el funcionamiento normal de las células: el mantenimiento de concentraciones altas de  $K^+$  en el citoplasma (140 mM) y bajas en el líquido extracelular (4 mM). Esta diferencia de concentración de  $K^+$  es indispensable en los mecanismos de la excitación neuronal y muscular, y para muchas otras funciones celulares. La alta concentración intracelular de  $K^+$  es generada por la actividad de la ATPasa de  $Na^+/K^+$ . El mantenimiento de la baja concentración extracelular depende de una excreción renal de potasio efectiva.

El riñón es capaz de ajustar la excreción de  $K^+$  en la orina para establecer un balance entre el  $K^+$  excretado y el ingerido en la dieta. Esta excreción es el resultado de tres mecanismos de transporte en la nefrona: filtración glomerular, reabsorción (principalmente en el asa de Henle) y secreción (túbulo conector y conducto colector). La secreción del  $K^+$  en el conducto colector está mediada por canales de potasio apicales. A la fecha se ha identificado a los canales de potasio ROMK y MaxiK en el conducto colector como los responsables de mediar la secreción del  $K^+$ . La regulación de la expresión de tales canales obedece a una respuesta adaptativa del riñón a los niveles de  $K^+$  ingeridos durante la dieta. Sin embargo los estudios de microperfusión de los conductos colectores de ratones deficientes de ROMK, demostraron que ocurre secreción de  $K^+$  a pesar del bloqueo farmacológico del canal MaxiK con Iberiotoxina. La conclusión de estos ensayos fue la presencia de otros canales secretores de  $K^+$  en la nefrona distal, no descritos aún.

En un estudio sistemático en nuestro laboratorio, se identificó la presencia de los transcritos correspondientes a los canales Kv1.1, Kv1.3, Kv1.6 Kv11.1a y Kv11.1b en el riñón de rata.

En este proyecto doctoral se demostró la expresión de las proteínas correspondientes a los canales Kv1.1, Kv1.3, Kv1.6 Kv11.1a y Kv11.1b, tanto en la corteza como en la médula renal de rata. Se estableció la distribución diferencial de tales canales en los segmentos tubulares de la nefrona con una predominancia en las porciones distales de la nefrona, tal distribución sugiere su contribución en los mecanismos de secreción de  $K^+$  renal.

|               | TCP          | GAH                      | TCD                      | TCN                      | CCC                               | CCM                      |
|---------------|--------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| <b>Kv1.1</b>  |              |                          | Perinuclear              | Perinuclear              | Perinuclear                       | Perinuclear              |
| <b>Kv1.3</b>  |              |                          |                          | Citoplásmica y apical    | Citoplásmica                      | Citoplásmica             |
| <b>Kv1.6</b>  |              | Citoplásmica basolateral | Citoplásmica basolateral | Citoplásmica basolateral | Citoplásmica apical y basolateral | Citoplásmica basolateral |
| <b>Kv11.1</b> | Citoplásmica |                          | Apical                   | Apical                   |                                   | Citoplásmica             |

TCP: túbulo contorneado proximal, GAH: porción gruesa ascendente del asa de Henle; TCD: túbulo contorneado distal; TCN: túbulo conector; CCC: conducto colector cortical; CCM: conducto colector medular.

Se probó el efecto de una dieta con alto contenido en  $K^+$  (AK) sobre la expresión y distribución de los canales Kv identificados en el epitelio renal de la rata, el resultado fue que los canales Kv1.1 y Kv1.3 presentan regulación positiva hacia las membranas plasmáticas apicales de las células intercaladas en respuesta a la dieta AK y se expresan como heterotetrámeros. Se demostró, mediante ensayos de microperfusión in vitro de los conductos colectores corticales (CCC), que los canales Kv1.1/Kv1.3 contribuyen a la secreción de  $K^+$  en estos segmentos tubulares en ratas sometidas a dietas de AK.

Como perspectiva, se deben hacer estudios de microperfusión de túbulos renales de ratones manipulados genéticamente, deficientes del ROMK y el uso de cocteles de toxinas bloqueadoras de los canales ROMK y MaxiK, para poder disecar la proporción de la contribución de los canales Kv1.1/Kv1.3 a la secreción renal de  $K^+$ .

### **ABSTRACT.**

The physiological regulation of potassium ( $K^+$ ) requires two basic conditions: maintenance of high concentrations of  $K^+$  in the cytoplasm (140 mM) and low concentration in the extracellular space (4 mM). This  $K^+$  gradient is indispensable for neuronal and muscle excitation, and for many other cellular functions. The high intracellular concentration of  $K^+$  is generated by the  $Na^+/K^+$  ATPase activity. The maintenance of low extracellular concentration depends on an effective renal excretion of  $K^+$ .

To establish a balance between excreted and ingested  $K^+$  in the diet, the kidney is able to adjust the  $K^+$  excretion in the urine. This excretion is the result of three transport mechanisms in the nephron: glomerular filtration, reabsorption (mainly in Henle's loop) and secretion (connecting tubule and collecting duct). In the collecting duct,  $K^+$  secretion is mediated by apical potassium channels. To date, two potassium channels, ROMK and MaxiK, have been identified in the collecting duct as responsible for mediating  $K^+$  secretion. Regulation of the expression of such channels is due to an adaptive response of the kidney to  $K^+$  levels in the diet. However, microperfusion studies of collecting ducts from ROMK's deficient mice showed that  $K^+$  secretion occurs despite pharmacological blockade of MaxiK channel with Iberiotoxin. The conclusion of these experiments was the presence of other secreting  $K^+$  channels, not described yet, in the distal nephron.

In our laboratory, we identified the presence of Kv1.1, Kv1.3, Kv1.6, Kv11.1a and Kv11.1b channel's transcripts in the rat kidney.

In this doctoral project, was demonstrated the expression of proteins corresponding to the channels Kv1.1, Kv1.3, Kv1.6, Kv11.1a and Kv11.1b in the rat renal cortex and medulla. Furthermore, differential distribution of these channels in the tubular segments of the nephron was described, with predominance in the distal nephron; this suggests their contribution to the renal K<sup>+</sup> secretion.

The effect of a high K<sup>+</sup> diet (HK) on the expression and distribution of Kv channels in the renal epithelium was tested; the result shown that Kv1.1 and Kv1.3 were up regulated to the apical plasma membranes of the intercalated cells, in response to HK; moreover Kv1.1 and Kv1.3 formed heterotetramers.

In order to demonstrate the contribution of Kv1.1/Kv1.3 channels to the tubular K<sup>+</sup> secretion, microperfusión of isolated cortical collecting ducts was performed, the results demonstrated an important K<sup>+</sup> secretion in ducts from HK rats.

Microperfusion studies on isolated collecting ducts from ROMK deficient mice and use of blockers for ROMK and MaxiK channels, will allow us to elucidate the proportion of the net contribution of the Kv1.1/Kv1.3 channels to the renal K<sup>+</sup> secretion.

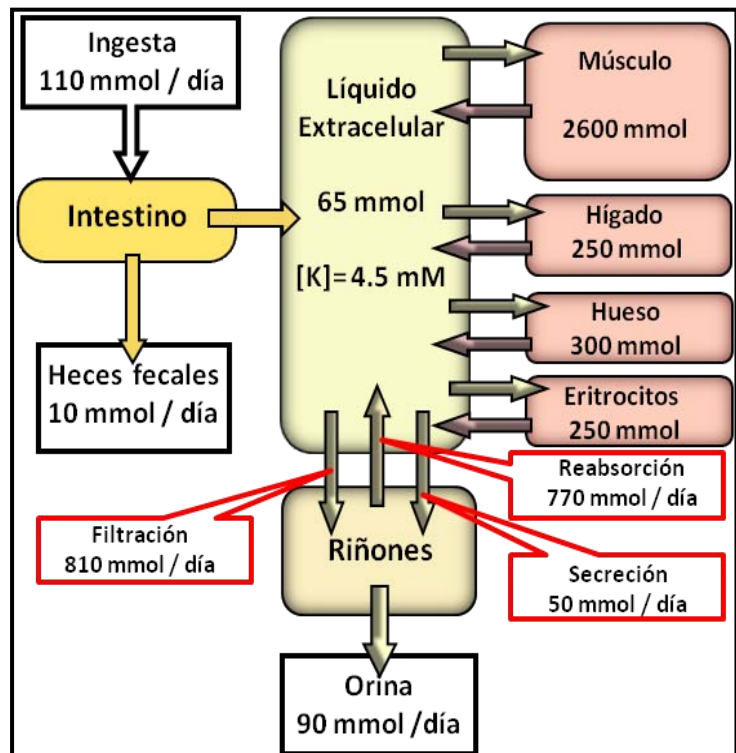
## 2. INTRODUCCIÓN.

### 2. 1. Homeostasis del potasio

El potasio ( $K^+$ ) es el catión más abundante en el cuerpo humano: 50 a 55 mEq / kg de peso corporal. El 98% del  $K^+$  se distribuye en el líquido intracelular (LIC)  $\sim$ 140 mM y el  $\sim$ 3% restante en el líquido extracelular (LEC)  $\sim$ 4 mM. Esta diferencia de concentración de casi 35 veces da lugar a un gradiente a través de la membrana celular, indispensable en los mecanismos de la excitación neuronal y muscular. El  $K^+$  intracelular participa en varios procesos biológicos como son: la división celular, la síntesis de proteínas y de ADN, la regulación del volumen celular y del balance ácido-base, la glucólisis (cofactor enzimático de la piruvato cinasa) y la hidrólisis de ATP por la ATPasa de  $Na^+/K^+$  (Stanton y Giebisch, 1992).

El consumo de alimentos aporta cerca de 100 mmol de  $K^+$  por día. El 90-95% de  $K^+$  se desecha en la orina y el resto en las heces y el sudor (Figura 2.1).

La distribución interna del  $K^+$  necesita una regulación precisa ya que la salida de tan solo el 2% de este catión del interior celular hacia el LEC, duplicaría la concentración del  $K^+$  en el plasma, esto provocaría la despolarización de las membranas celulares y traería consecuencias fisiológicas fatales, como alteraciones en la actividad eléctrica del corazón y una progresión rápida a la fibrilación ventricular (Muto, 2001; Koeppen y Stanton, 2001).

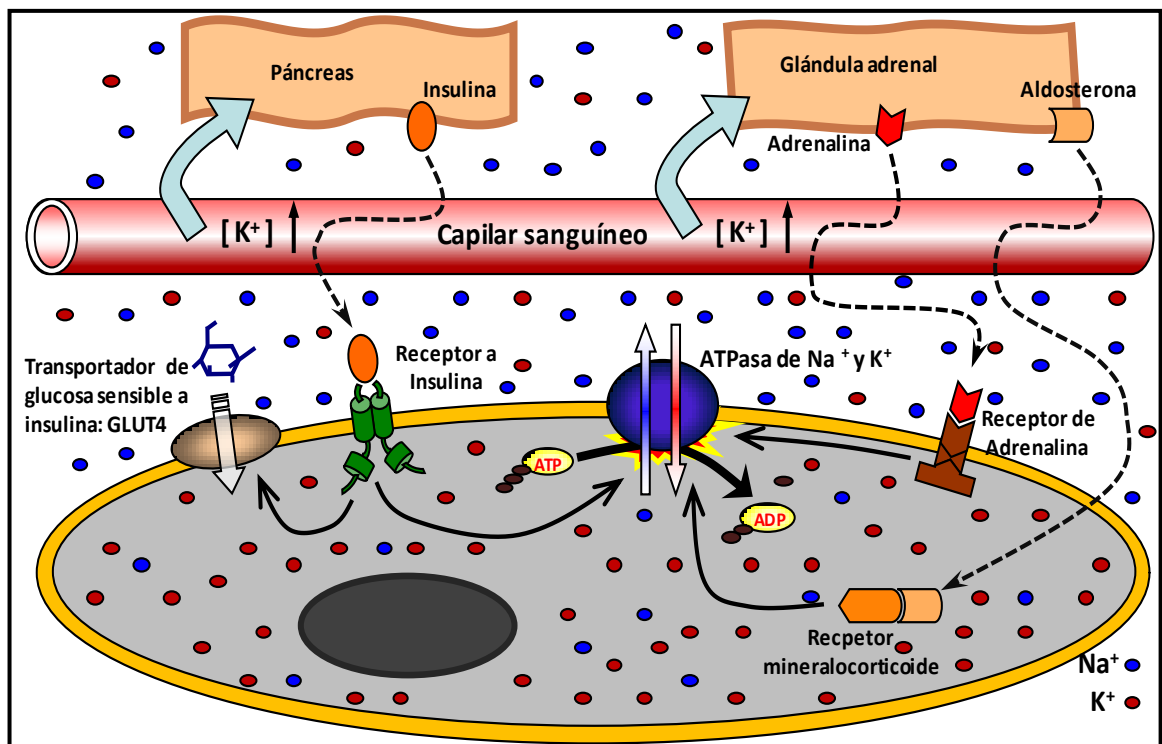


**Figura 2.1. Distribución y balance del  $K^+$  en el organismo** (Modificada de Boron y Boulpaep, 2005).

La homeostasis del  $K^+$  se regula por dos mecanismos. La regulación a corto plazo mantiene la distribución del  $K^+$  entre los compartimientos extracelular e intracelular, por la acción concertada de la ATPasa de  $Na^+/K^+$  y la insulina. La regulación a largo plazo controla el balance externo del  $K^+$  a través del riñón.

### Balance interno del $K^+$ :

El  $K^+$  ingerido con los alimentos se absorbe por vía intestinal. Dicha absorción no está sujeta a mecanismos regulatorios específicos. El  $K^+$  una vez que ingresa al organismo, se distribuye inicialmente en el LEC y de inmediato se redistribuye en los tejidos, principalmente en las células del músculo esquelético y del hígado (Figura 2.1). Las células captan rápidamente este exceso momentáneo de  $K^+$  extracelular gracias a la actividad de la ATPasa de  $Na^+/K^+$ . Debido a la eficiente captación celular, la concentración plasmática del  $K^+$  se mantiene en un intervalo de 3.5 a 5.0 mM. Posteriormente y de forma gradual el  $K^+$  captado se libera al LEC a través de los canales iónicos y los transportadores. El balance interno del  $K^+$  se regula por diversas hormonas y se afecta por el balance ácido-base y la osmolaridad del plasma (Figura 2.2, Tabla 2.1).



**Figura 2.2. Control hormonal de la captación de potasio en las células musculares.**  
(Modificada de Boron y Boulpaep, 2005).

**Tabla 2.1. Factores agudos y crónicos que afectan el balance interno del potasio.**

| <b>FACTORES AGUDOS</b>                    |   |
|---|---|
| <b>Factor</b>                             | <b>Efecto</b>   |
| <i>Insulina</i>                           | <i>Incremento en la actividad de la ATPasa de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup></i>  |
| <i>β-Catecolaminas</i>                    | <i>Incremento en la actividad de la ATPasa de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup></i>  |
| <i>α-Catecolaminas</i>                    | <i>Disminución de la actividad de la ATPasa de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup></i> |
| <i>Acidosis</i>                           | <i>Disminución de la captación de K<sup>+</sup></i>                             |
| <i>Alcalosis</i>                          | <i>Incremento en la captación de K<sup>+</sup></i>                              |
| <i>Daño celular</i>                       | <i>Disminución de la captación celular de K<sup>+</sup></i>                     |
| <i>Hiperosmolaridad extracelular</i>      | <i>Incremento en el eflujo celular de K<sup>+</sup></i>                         |
| <b>FACTORES CRÓNICOS</b>                  |   |
| <b>Factor</b>                             | <b>Densidad de la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup></b>                       |
| <i>Tiroideo</i>                           | <i>Incremento</i>   |
| <i>Hormonas adrenales</i>                 | <i>Incremento</i>   |
| <i>Ejercicio</i>                          | <i>Incremento</i>   |
| <i>Crecimiento celular</i>                | <i>Incremento</i>   |
| <i>Diabetes</i>                           | <i>Disminución</i>  |
| <i>Deficiencia de potasio en la dieta</i> | <i>Disminución</i>  |
| <i>Falla renal crónica</i>                | <i>Disminución</i>  |

(Modificada de Giebisch, 1998).

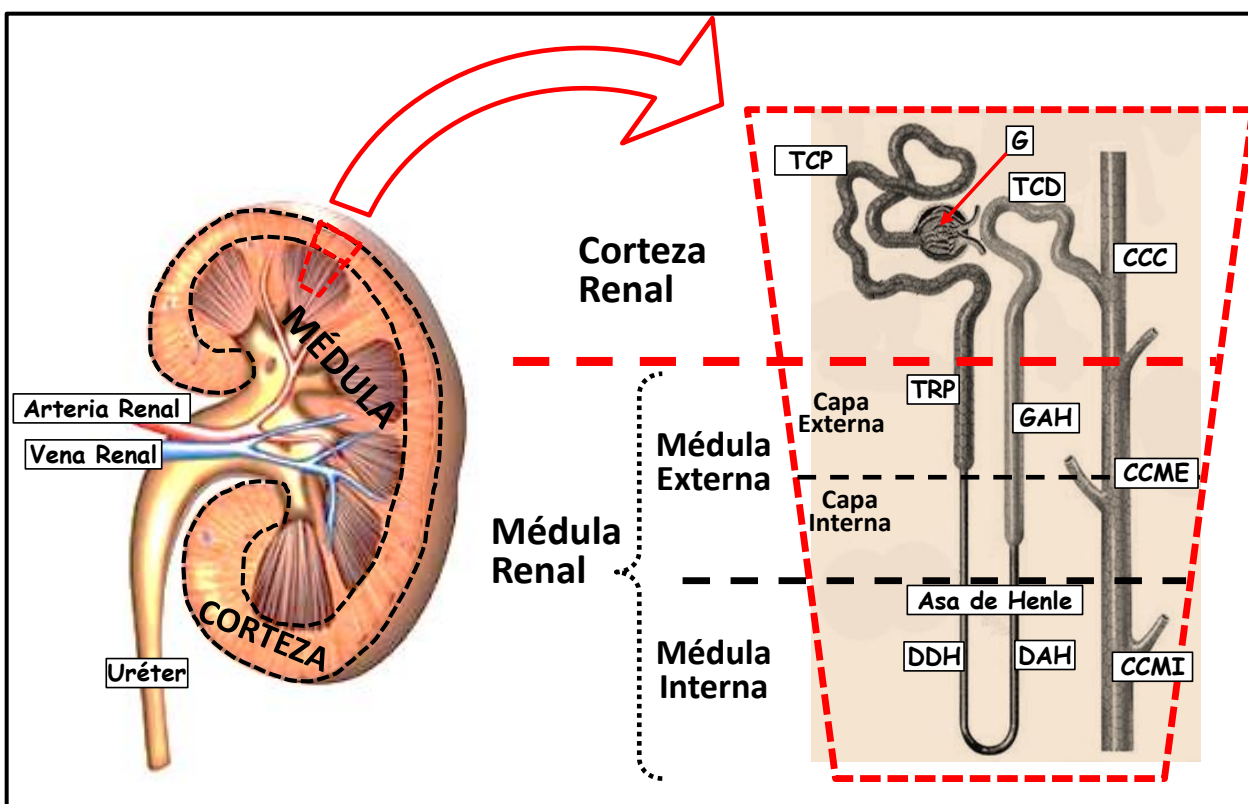
Balance externo del potasio.

La ingesta de K<sup>+</sup> depende básicamente de las costumbres alimenticias del individuo. El K<sup>+</sup> al igual que el Na<sup>+</sup> puede salir del organismo por tres rutas: el sudor, las heces y la orina. La concentración promedio del K<sup>+</sup> en el sudor es igual a la del plasma; por consiguiente, la cantidad de K<sup>+</sup> que se excreta en el sudor en condiciones normales es despreciable. La excreción promedio de K<sup>+</sup> en las heces es de sólo 5-10 mmol/día. La principal vía de excreción es la renal (90 – 95 % del K<sup>+</sup> ingerido). En un adulto la excreción urinaria promedio de K<sup>+</sup> es de 45-90 mEq/día, aunque puede variar desde 10 hasta 500 mmol/día (Stanton y Giebisch, 1992).



## 2.2. Manejo renal del potasio.

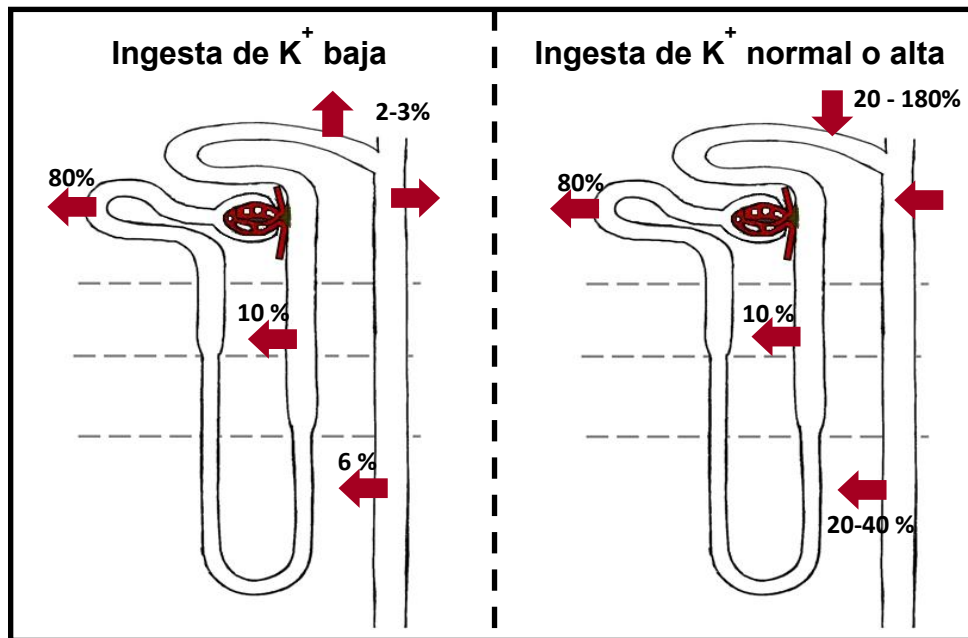
Los riñones son un órgano par, que se encarga de mantener el balance de los fluidos y electrolitos corporales mediante la excreción de agua, solutos y varios productos de desecho a través de la orina. La formación de la orina tiene lugar en las nefronas, que son la unidad anatómica y funcional del riñón, a través de los procesos de filtración, reabsorción y secreción. En la Figura 2.3 se muestra un esquema de la organización estructural de un riñón y de una nefrona. En el apéndice A se describe más detalladamente la anatomía y fisiología renal.



**Figura 2.3. Localización de la nefrona en la estructura renal.** El tejido renal se divide en dos capas corteza y médula renal, a lo largo de las cuales se distribuyen las nefronas. G: Glomérulo; TCP: Túbulo contorneado proximal, TRP: Túbulo recto proximal; DDH: Porción delgada descendente del asa de Henle; DAH: Porción delgada ascendente del asa de Henle; GAH: Porción gruesa ascendente del asa de Henle; TCD: Túbulo contorneado distal; CCC: Conducto colector cortical; CCME: Conducto colector de la médula externa; CCMI: Conducto colector de la médula interna.

La excreción renal de  $K^+$  se lleva a cabo en tres procesos: la filtración glomerular, la reabsorción tubular (en el TP y en la asa de Henle) y un proceso bidireccional de secreción o reabsorción tubular (en la asa de Henle, en el TCN y en el CC) que depende de la ingesta del  $K^+$  en la dieta.

La filtración glomerular es regulada por los mecanismos hemodinámicos y de superficie (descritos en el apéndice A), que permiten la filtración de la sangre a través de las paredes de los capilares glomerulares, hacia el espacio urinario contenido por la cápsula de Bowman. En los humanos se filtran  $\sim 720$  mEq de  $K^+$  en los glomérulos cada día. La tasa de excreción es de 5 a 15% del filtrado, lo cual indica la presencia de mecanismos de absorción de  $K^+$  a lo largo de la nefrona. Por otro lado, cuando la ingesta de  $K^+$  se eleva y/o la tasa de filtración glomerular está por debajo de los valores normales (125 mL/min), la cantidad de  $K^+$  excretado puede ser mayor que la del  $K^+$  filtrado, y se evidencia la participación de un mecanismo de secreción en la nefrona (Figura 2.4).



**Figura 2.4. Transporte de  $K^+$  en la nefrona.** Los porcentajes de absorción o secreción son relativos al 100% filtrado en el glomérulo. (Adaptada de Boron 2005).

Los procesos de reabsorción y secreción tubular son regulados por mecanismos celulares de transporte transepitelial de agua y de solutos (Apéndice A). La dirección y magnitud del transporte del  $K^+$  a través del epitelio renal, depende de la distribución de diferentes proteínas de transporte en las membranas apical y basolateral. Además de las rutas transcelulares, la vía paracelular también contribuye al transporte transepitelial del  $K^+$  en algunos segmentos de la nefrona (Giebisch y Wang, 1996; Giebisch, 1998).

Al menos seis vías celulares contribuyen al transporte vectorial y al mantenimiento de las concentraciones óptimas del  $K^+$  en las células epiteliales renales:

- **La ATPasa de  $Na^+/K^+$**  en la membrana basolateral. Este mecanismo electrogénico intercambia tres iones intracelulares de sodio por dos iones extracelulares de potasio. La ATPasa de  $Na^+/K^+$  mantiene así una alta concentración intracelular de potasio y una baja concentración intracelular de sodio con respecto al espacio extracelular. La ATPasa de  $Na^+/K^+$  se localiza en todos los segmentos de la nefrona.
- **Los canales de potasio.** La distribución de los canales de potasio en las membranas apicales y basolaterales determina la dirección y magnitud del transporte transcelular de potasio.
- **El cotransportador de  $Na^+/2Cl^-/K^+$  (NKCC).** Este transportador acopla el movimiento de sodio, cloro y potasio al interior celular, en la membrana apical de la porción GAH (NKCC2) y en la membrana basolateral del CCM (NKCC1).
- **El cotransportador de  $K^+/Cl^-$  (KCC).** Acopla el transporte de potasio y cloro al exterior celular, a través de la membrana apical del TCD (KCC?) y en la membrana basolateral del túbulo proximal (KCC3, KCC4), de la porción GAH, del TCD y de las células  $\alpha$  intercaladas del CC (KCC4) (Velázquez y Silva, 2003; Garzón-Muvdi et al., 2007).
- **La ATPasa  $H^+/K^+$ .** Esta ATPasa participa en la absorción de potasio y secreción de  $H^+$ , especialmente durante los periodos de ingesta carente de potasio, y se localiza en la membrana apical del CCC y CCME.
- **Difusión paracelular.** Existe una alta permeabilidad al potasio a través de las uniones celulares estrechas, que facilitan el flujo de  $K^+$  en dirección de su gradiente de concentración, en los segmentos tubulares proximales. (Stanton y Giebisch, 1992).

### 2.3. Mecanismos de transporte de $K^+$ en los diferentes segmentos de la nefrona.

#### Transporte de potasio en el túbulo proximal.

El  $K^+$  se filtra libremente en el glomérulo. La carga filtrada de  $K^+$  es del orden de 700 mmol por día. La mayor parte del  $K^+$  filtrado (70%) se reabsorbe en el TCP por difusión pasiva en dirección de su gradiente electroquímico y ocurre principalmente por vía paracelular como consecuencia de la reabsorción de agua (Figura 2.5). Aunque se han identificado diversos canales de potasio en las membranas apical y basolateral de las células que conforman al TCP, no existe evidencia de su participación en la reabsorción transcelular del  $K^+$ , pero sí de su participación en el mantenimiento del potencial negativo de la membrana celular, la regulación del volumen celular y del reciclamiento del  $K^+$  a través de la membrana basolateral. Generalmente ocurre una secreción pasiva de  $K^+$  en el Túbulo recto proximal y en la porción delgada descendente del asa de Henle (Stanton y Giebisch, 1992; Wang, 2004; Malnic et al., 2008).

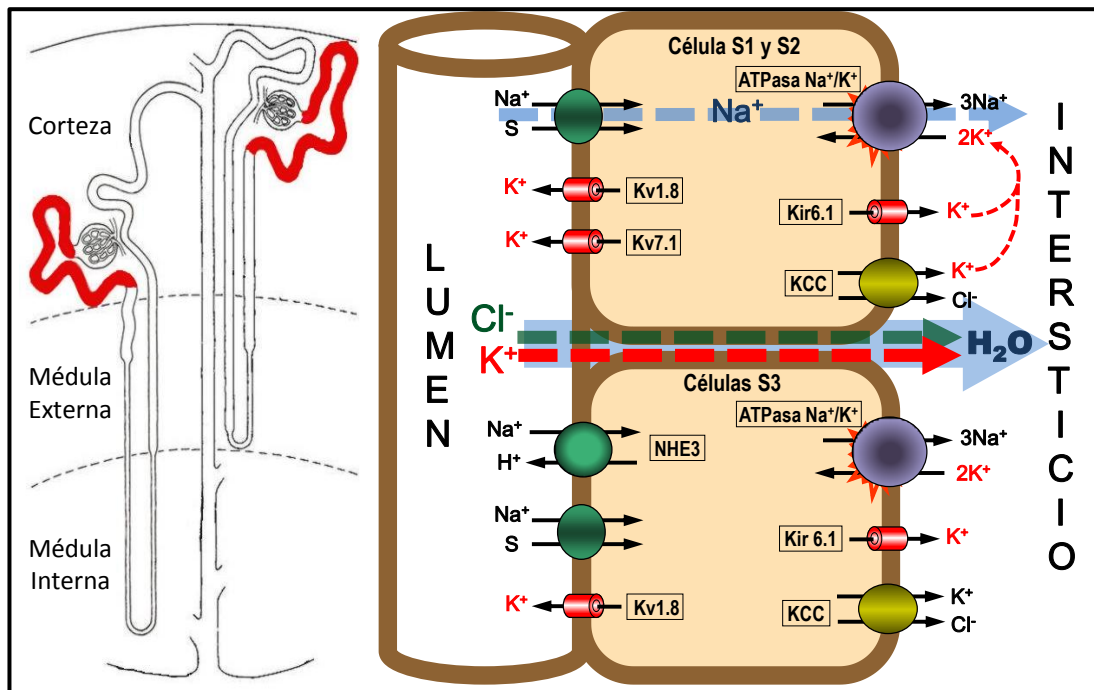


Figura 2.5. Transporte de  $K^+$  en el túbulo proximal. S: Sustrato, puede ser glucosa, aminoácido o fosfato.

## Transporte de potasio en la porción gruesa ascendente del asa de Henle.

El  $K^+$  se reabsorbe de manera pasiva en la DAH y de manera activa y por difusión pasiva paracelular en la porción GAH, de manera que al final del túbulo contorneado distal solo 10-15% de la carga filtrada de  $K^+$  permanece en la luz tubular (Figura 2.4). La ATPasa de  $Na^+/K^+$  en la membrana basolateral de las células que conforman la GAH, intercambia con el espacio intersticial tres iones de  $Na^+$  por dos de  $K^+$ . Esto genera un gradiente electroquímico (de  $Na^+$ ) que provee la energía para la entrada de  $Na^+$ , a través de la membrana apical y que es mediada por el cotransportador  $Na^+/K^+/2Cl^-$  (NKCC2). La reabsorción apical del  $K^+$  ocurre entonces acoplada a la reabsorción del  $Na^+$  y de  $Cl^-$  con una estequiometría de 1:1:2. El gradiente de concentración del  $K^+$  favorece la salida del  $K^+$  hacia el espacio intersticial a través de la membrana basolateral, donde se ha reportado la presencia de cotransportadores de  $K^+/Cl^-$  y  $K^+/HCO_3^-$ , así como de canales de  $Cl^-$  y de  $K^+$ . En la membrana apical se han identificado canales de  $K^+$  (ROMK: Rat Outer Medulla potassium channel), que contribuyen al reciclamiento del  $K^+$  a través de la membrana apical, esencial para el funcionamiento del cotransportador NKCC2; por otro lado, la salida de  $K^+$  a través de los canales ROMK provee un potencial transepitelial lumen positivo que favorece la difusión paracelular del  $K^+$  y demás cationes (Stanton y Giebisch, 1992; Boron y Boulpaep, 2005).

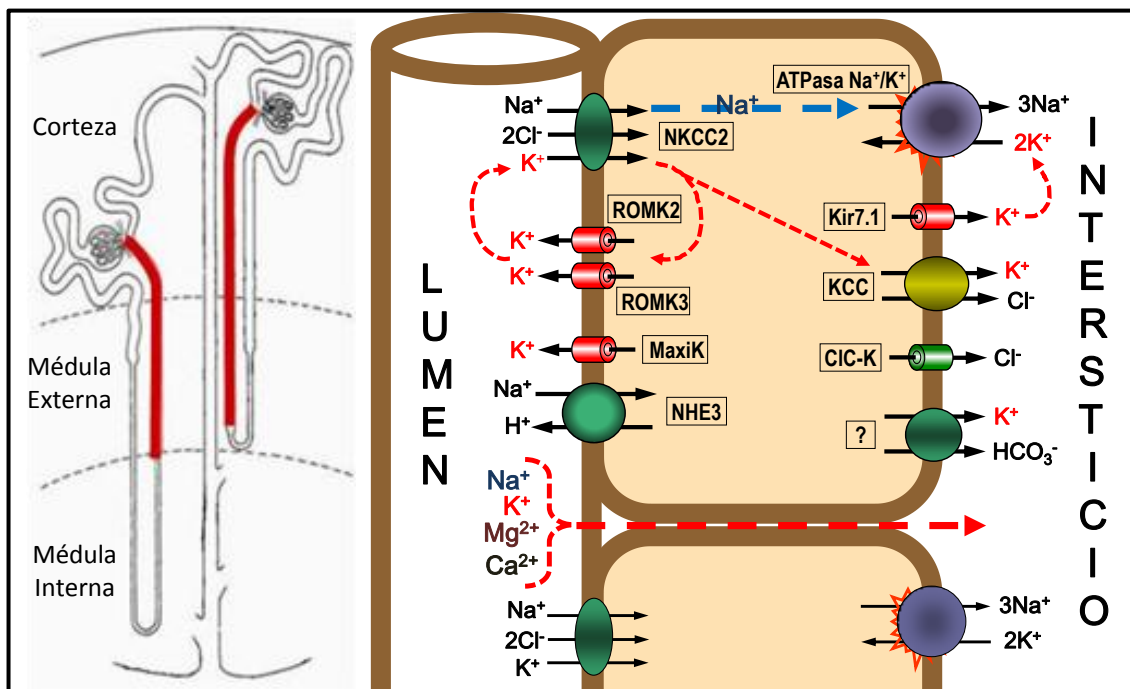


Figura 2.6. Transporte de  $K^+$  en la porción gruesa ascendente del asa de Henle.

## Transporte de potasio en el túbulo contorneado distal.

El túbulo contorneado distal secreta  $K^+$ , aunque en menor proporción que el conducto colector cortical; el mecanismo de secreción del  $K^+$  en el TCD involucra a dos cotransportadores en la membrana apical: un cotransportador de  $K^+/Cl^-$  en la dirección luminal (KCC) y un cotransportador de  $Na^+/Cl^-$  sensible a tiazida (NCC) en dirección citoplasmática, debido a que operan en direcciones opuestas, el resultado es la secreción del  $K^+$ , la reabsorción del  $Na^+$  y el reciclamiento del  $Cl^-$  a través de la membrana apical (Figura 2.7; Wang, 2004).

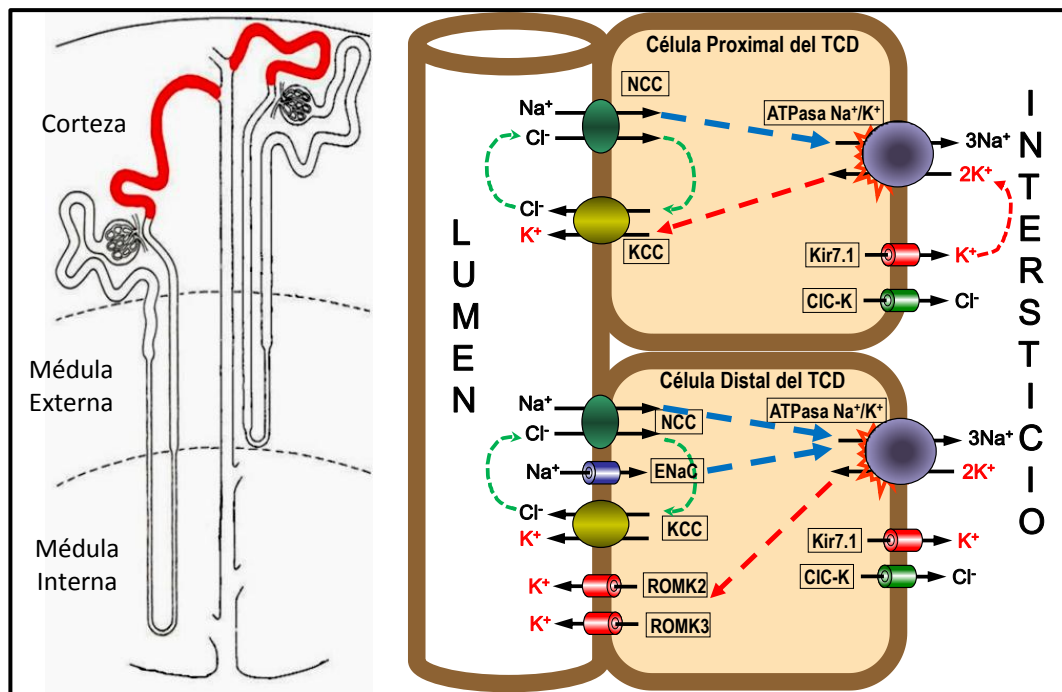


Figura 2.7. Transporte de  $K^+$  en el túbulo contorneado distal.

## Transporte de potasio en el conducto colector cortical.

En el CCC se lleva a cabo la regulación final de la secreción y la excreción urinaria del  $K^+$ . La secreción de  $K^+$  tiene lugar en las células principales y depende de varios mecanismos de transporte en las membranas apical y basolateral. A la fecha se han descrito en la membrana apical: un canal epitelial de  $Na^+$  sensible a Amilorida (ENaC), dos isoformas de un canal de  $K^+$  de baja conductancia (ROMK1 y ROMK2) y un canal de  $K^+$  de alta conductancia y dependiente de  $Ca^{2+}$  (MaxiK); y en la membrana basolateral: la ATPasa de  $Na^+/K^+$ , el cotransportador

NKCC1 y canales de  $K^+$  cuya identidad molecular no se ha descrito aún. El  $K^+$  entra desde el intersticio a las células por la ATPasa de  $Na^+/K^+$  basolateral y se secreta al lumen a través de los canales ROMK en favor del gradiente electroquímico. La reabsorción apical de  $Na^+$  a través del canal ENaC y el gradiente de concentración de  $K^+$  brindan la fuerza electroquímica para la secreción del  $K^+$  a través de los canales ROMK. El gradiente electroquímico de  $K^+$  se incrementa cuando la reabsorción de  $Na^+$  aumenta por la acción de la aldosterona. La aldosterona promueve el tráfico de los canales ENaC en la membrana luminal y estimula la actividad de la ATPasa de  $Na^+/K^+$  (Stanton y Giebisch, 1992; Wang, 2004).

El epitelio del CCC es de tipo hermético, por lo que la permeabilidad de la vía paracelular es baja, de esta manera prácticamente todo el  $K^+$  se excreta en la orina. En consecuencia, en condiciones normales la carga tubular de  $K^+$  que abandona el CCC corresponde a cerca del 40% de la carga filtrada. En este nivel la carga tubular de agua corresponde comúnmente al 5% de la carga filtrada, por ello la concentración luminal de  $K^+$  al final del CCC es mucho mayor que en el plasma (Muto, 2001; Stanton y Giebisch 1992).

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

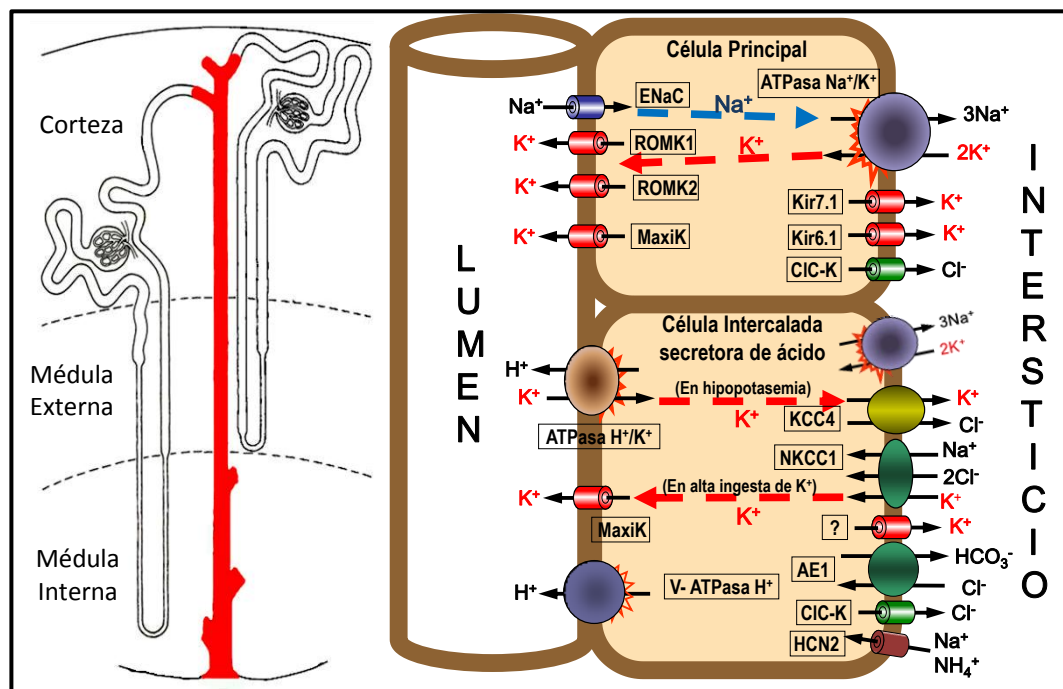


Figura 2.8. Transporte de  $K^+$  en el conducto colector.

## Transporte de potasio en el conducto colector de la médula externa e interna.

El CCME consta de dos segmentos: el segmento de la capa externa y el segmento de la capa interna. El segmento de la capa externa es muy similar al CCC, aunque su participación en la secreción de  $K^+$  es menor. El segmento de la capa interna está formado por células similares a las del CCC, pero se diferencia de éste en que su epitelio es de tipo no hermético, por lo que la permeabilidad de su vía paracelular es alta. Debido a ello y a que la concentración luminal de  $K^+$  es muchas veces mayor que en el plasma, en este epitelio puede producirse la reabsorción pasiva de  $K^+$ , que forma parte del mecanismo del reciclamiento medular de  $K^+$  (Figura 2.9).

En el CCME el  $K^+$  puede reabsorberse también por vía transcelular: El  $K^+$  entra a la célula por la membrana apical a través de la ATPasa de  $H^+/K^+$  y es transportado del citoplasma al intersticio por canales de  $K^+$ , presentes en la membrana basolateral, en favor del gradiente electroquímico.

El CCMI puede reabsorber o secretar  $K^+$  dependiendo de la homeostasis del  $K^+$ , pero los mecanismos de transporte no están completamente dilucidados. Al igual que en el conducto colector de la capa interna de la médula externa, el epitelio del CCMI es de tipo no hermético y la permeabilidad de su vía paracelular es alta. Esta característica le permite participar en el reciclamiento del  $K^+$  (Figura 2.9; Stanton y Giebisch 1992; Malnic et al., 2008).

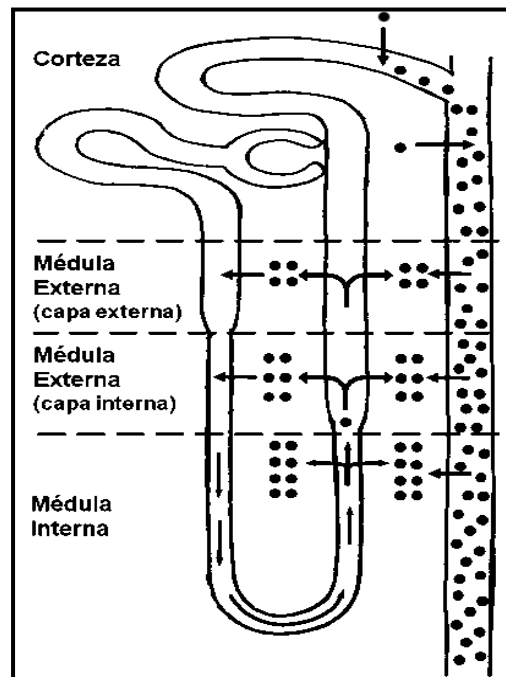


Figura 2.9. Reciclamiento de  $K^+$  en la médula renal.



## **Reciclamiento medular del $K^+$ .**

El reciclamiento de  $K^+$  es un fenómeno de transporte pasivo que ocurre en dirección del gradiente electroquímico que hay entre el CCMI y la porción descendente del asa de Henle de las nefronas juxtamedulares. En el reciclamiento medular del  $K^+$  participan tres mecanismos de transporte:

- Secreción pasiva de  $K^+$  en la porción DDH,
- Reabsorción de  $K^+$  en las porciones delgada y gruesa ascendentes del asa y que se acumula en el líquido intersticial.
- El CCM también reabsorbe  $K^+$ , el cual también se transporta hacia el intersticio medular.

Este fenómeno mantiene una concentración de  $K^+$  en el intersticio medular elevada, y se le conoce como trampa de  $K^+$ , la cual evita un incremento en la tasa de absorción de  $K^+$  en el CCMI y hace más eficiente la excreción urinaria del  $K^+$  (Figura 2.9; Stanton y Giebisch, 1992).

## **Regulación de la excreción urinaria de $K^+$ .**

La excreción renal de  $K^+$  se regula por diversos factores lumbales y peritubulares, los cuales actúan en sitios de transporte distintos en respuesta a influencias extra renales. La tasa final de la excreción de  $K^+$  resulta de la suma de los mecanismos que pueden ser cooperativos o competitivos entre sí. En algunas situaciones los factores regulatorios individuales pueden actuar juntos, mientras que en otros casos, actúan en direcciones opuestas y se anulan mutuamente.

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

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

Un ejemplo de los factores cooperativos que modulan el transporte de  $K^+$  se observa en la respuesta renal a una ingesta de alto potasio. Para mantener la homeostasis de  $K^+$  en el plasma en estas condiciones se estimula la actividad de la ATPasa de  $Na^+/K^+$ , y de esta forma se incrementa la captación de  $K^+$  a través de la membrana basolateral en las células secretoras de  $K^+$ ; lo cual incrementa la concentración intracelular de  $K^+$  e incrementa el gradiente electroquímico para la salida de  $K^+$  a través de la membrana apical. La dieta alta de  $K^+$  también estimula la secreción de aldosterona en la corteza de la glándula adrenal, la que a su vez promueve la transcripción y expresión de proteínas cinasas como la SGK1 (serum glucocorticoid regulated kinase 1) y KS-WNK1 (kidney specific – with no lysine serine-threonine kinase 1), que regulan positivamente la expresión y actividad de los canales ENaC y de los canales secretores de  $K^+$  ROMK en la membrana apical de las células principales en el CCC. La filtración glomerular aumenta y se inhibe la reabsorción de agua y de  $Na^+$  en el túbulo proximal, lo que favorece un incremento del flujo luminal de  $Na^+$  hacia la nefrona distal. El incremento del flujo del volumen de  $Na^+$  en los segmentos distales activa a los canales apicales MaxiK que secretan  $K^+$  en las células intercaladas de los conductos colectores (Wang, 2004; Wang y Giebisch, 2009).

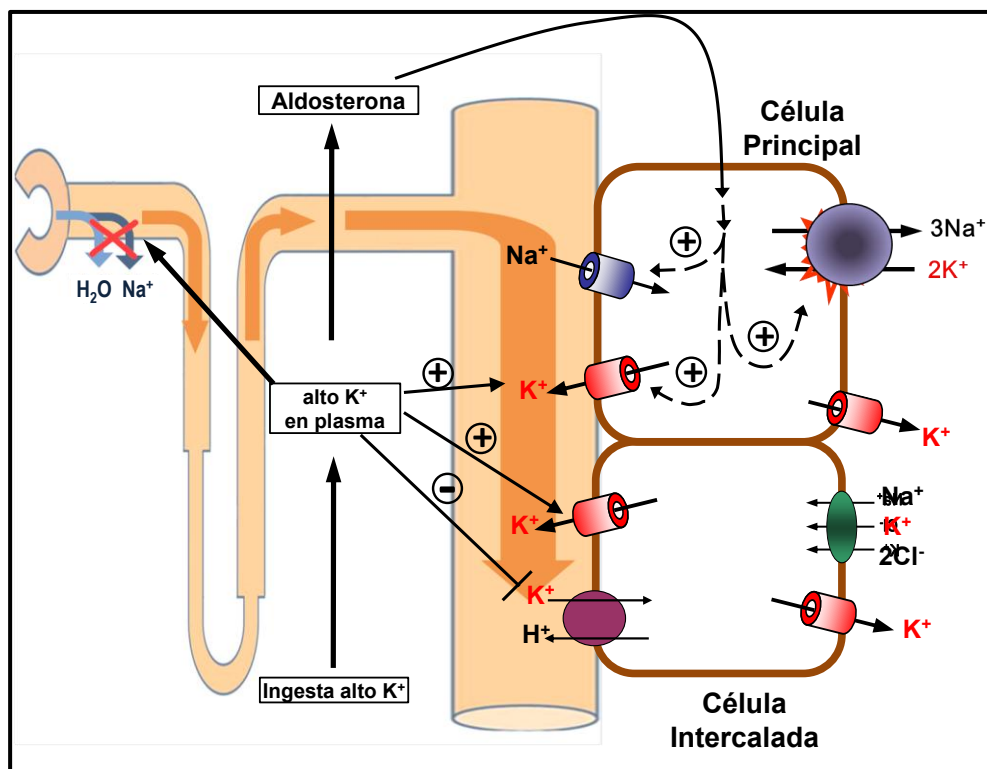


Figura 2.10. Secreción de  $K^+$  en respuesta a una dieta con alto contenido en  $K^+$ .

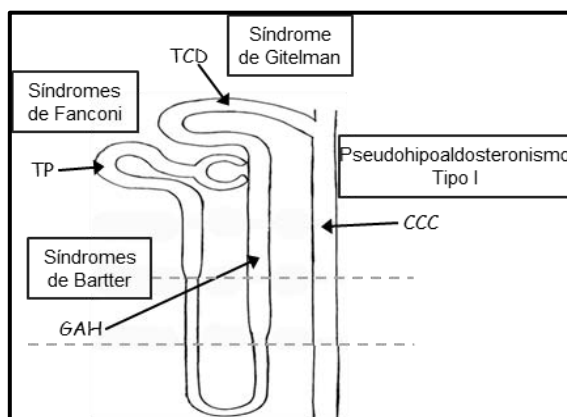
## 2.4. Síndromes-Tubulopatías por defecto en el manejo de agua y sales.

Debido a que la absorción de  $\text{Na}^+$  esta acoplada con la secreción de  $\text{K}^+$  en las porciones distales de la nefrona, un defecto en el transporte de  $\text{Na}^+$  conlleva a un inadecuado manejo renal del  $\text{K}^+$ .

Existe una gran variedad de enfermedades genéticas o adquiridas, que afectan a los diferentes mecanismos de transporte de agua y de sales ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{MgCl}_2$ , etc.) en el riñón, y son de gran importancia clínica debido a su impacto en el desarrollo muscular, motriz o intelectual de los individuos, en sus primeros días de nacidos o durante su infancia. Los sistemas de transporte afectados se localizan en los diferentes segmentos de la nefrona (Figura 2.11).

**Figura 2.11. Segmentos tubulares de la nefrona asociados con algunos síndromes.**

Síndromes de Fanconi: Túbulo proximal, Síndromes de Bartter: Porción gruesa ascendente del asa de Henle, Síndrome de Gitelman: Túbulo contorneado distal, Pseudohipoaldosteronismo Tipo I: Conducto colector cortical. (Tomada de Kleta y Bockenhauer, 2006).



**Síndromes de Fanconi.** Son un conjunto de desordenes autosómicos recesivos, que se caracterizan por la disminución de la reabsorción de agua y solutos en los túbulos proximales. En consecuencia los pacientes con síndrome de Fanconi presentan polidipsia, poliuria y fosfaturia, acompañadas de algunas de las siguientes características clínicas: glucosuria, hiperaminoaciduria, hipernatriuria, hipercaliuria y proteinuria de bajo peso molecular, insuficiencia renal progresiva, hipofosfatemia con raquitismo u osteomalacia. Recientemente se ha identificado una mutación en el gen  $\text{SLC34A1}$ , que codifica para el cotransportador de  $\text{Na}^+/\text{Pi}$  tipo IIa ( $\text{NaPiIIa}$ ), asociada con la presencia de síndrome de Fanconi (Magen et al., 2010). El síndrome de Fanconi puede adquirirse por el consumo de algunos fármacos o por la contaminación con metales pesados; también se presenta como un padecimiento secundario a problemas en el catabolismo de varios aminoácidos como es la cistinosis, un desorden lisosomal en el que se almacenan cristales de cistina (dímero de cisteína), en células renales, cornea, músculo esquelético, páncreas, cerebro y tiroides (Kleta y Bockenhauer, 2006; Amirlak y Dawson, 2003; Zelikovic, 2003).

**Síndromes de Bartter.** Son un grupo de enfermedades renales autosómicas recesivas raras (de bajas incidencia y prevalencia). Actualmente se han descrito cinco variantes genéticas asociadas con los mecanismos de transporte de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y de  $\text{Cl}^-$ , distribuidos en la porción GAH (Tabla 2.2).

Los síndromes de Bartter se caracterizan clínicamente por presentar poliuria con pérdida de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en la orina, alcalosis metabólica con hipocalcemia, hiperaldosteronismo con hiperreninemia y presión sanguínea normal o baja, con variabilidad fenotípica de otros indicadores (Tabla 2.2).

**Tabla 2.2. Clasificación Genotípica de los Síndromes de Bartter.**

| Síndrome de Bartter Tipo | GENOTIPO (Genes alterados) | Proteínas o transportadores afectados                                   | FENOTIPO clínico   |  |
|--------------------------|----------------------------|---|--|--|
| I                        | SLC12A                     | Cotransportador de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ tipo 2 (NKCC2) |  | <u>Prenatal:</u> poliuria, polihidramnios, niveles de cloro elevados en el líquido amniótico.<br><u>Postnatal:</u> Isostenuria - hipostenuria, hipermagnesiuria, hipercalcemia, niveles séricos de prostaglandina E2 elevados, hipomagnesemia ocasional, nefrocalcinosis |
| II                       | KCNJ1                      | Canal de $\text{K}^+$ rectificador entrante Kir 1.1 (ROMK)              | Hipercalcemia neonatal con cambio gradual a hipocalcemia   |  |
| III                      | CLCNKB                     | Canal de $\text{Cl}^-$ renal tipo b (ClC-Kb)                            | Clásico, con síntomas leves, bicarbonato sérico elevado, hipo o normo calciuria, sin nefrocalcinosis   |  |
| IV                       | BSND                       | Subunidad $\beta$ de los canales ClC-Ka y ClC-Kb                        | Síndrome de Bartter con hipostenuria, prostaglandina E urinaria, hiponatremia, hipocloremia, sordera sensorial-neural, insuficiencia renal crónica, sin nefrocalcinosis. |  |
| V                        | CASR                       | Receptor de calcio extracelular (CaSR)                                  | Pérdida de la función del CaSR (autosómica recesiva): Hipercalcemia con Hipocalciuria.   |  |
|                          |                            |   | Función del CaSR incrementada (autosómica dominante): Hipocalcemia, hipercalcemia, hipoparatiroidismo.   |  |

Los pacientes con síndrome de Bartter comparten otras características fenotípicas como son: el nacimiento prematuro, baja estatura o retraso en el desarrollo físico, hipotonía o debilidad muscular, calambres y tetania. Los pacientes con los tipos I y II padecen convulsiones, parestesias, constipación, vómito y diarreas; además, junto con el tipo IV, muestran retraso mental y motor. En particular, los pacientes con síndrome de Bartter tipo II exhiben un fenotipo morfológico de cabeza grande, frente prominente, rostro triangular, orejas y

ojos grandes. (Kleta y Bockenhauer, 2006; Amirlak y Dawson, 2003; Zelikovic, 2003; Hebert, 2003).

**Síndrome de Gitelman.** Es una enfermedad tubular autosómica recesiva inducida por mutaciones en el gen SLC12A3 que codifica para el cotransportador de  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  (NCC), localizado en la membrana apical del TCD. Se caracteriza por un defecto en la reabsorción de NaCl, a nivel del TCD. Las anomalías renales y metabólicas que acompañan al síndrome de Gitelman son: poliuria, hipercaliuria, hipermagnesiuria, hipocalciuria, hipocalemia e hipomagnesemia, hiperreninemia, hiperaldosteronismo secundario y alcalosis metabólica. Debido a estas alteraciones clínicas los pacientes pueden presentar una variedad de signos y síntomas musculares y neurológicos, de moderados a severos como: hipotensión, debilidad muscular generalizada, calambres, tetania, convulsiones, parestesia, episodios de parálisis posterior a un ejercicio extenuante, deseo de comer sal acompañado de polidipsia. A diferencia de los pacientes con síndromes de Bartter, los pacientes con síndrome de Gitelman son diagnosticados en la infancia tardía o en la adultez ya que las sintomatologías pueden ser leves o moderadas (Kleta y Bockenhauer, 2006; Graziani, 2010).

**Pseudohipoaldosteronismo Tipo I (PHA-1).** Es un síndrome clínico con afectación en la reabsorción de  $\text{Na}^+$  en el CCC. Las características clínicas son: pérdida de  $\text{Na}^+$  en la orina con hiponatremia, hipercalemia, acidosis tubular distal, aldosterona sérica y renina elevadas, vómitos, desarrollo físico retardado y estatura baja. Tales características se presentan en la infancia y pueden verse disminuidas con la edad. Se presenta por mutaciones en el gen NR3C2, que codifica el receptor a mineralocorticoides (MR) con herencia autosómica dominante (Pseudohipoaldosteronismo tipo 1A). También puede haber mutaciones en alguno de los genes SCNN1A, SCNN1B o SCNN1G, que codifican las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$  del canal de sodio epitelial (ENaC), y son de herencia autosómica recesiva con síntomas más severos (Pseudohipoaldosteronismo tipo 1B). Debido a que el ENaC se expresa en tejidos diferentes al renal, se aprecian alteraciones sistémicas como el incremento de contenido de sal en el sudor, la saliva y las heces, y notablemente infecciones pulmonares recurrentes (Kleta y Bockenhauer, 2006; Amirlak y Dawson, 2003; Zelikovic, 2003; Furgeson y Linas, 2010).

## 2.5. Canales de potasio.

El  $K^+$  desempeña papeles críticos en los procesos de señalización celular que regulan la liberación de neurotransmisores, la excitabilidad neuronal, el ritmo cardiaco, la contracción del músculo esquelético y del músculo liso, así como la secreción de la insulina.

En los epitelios los canales de potasio están involucrados en diferentes funciones celulares:

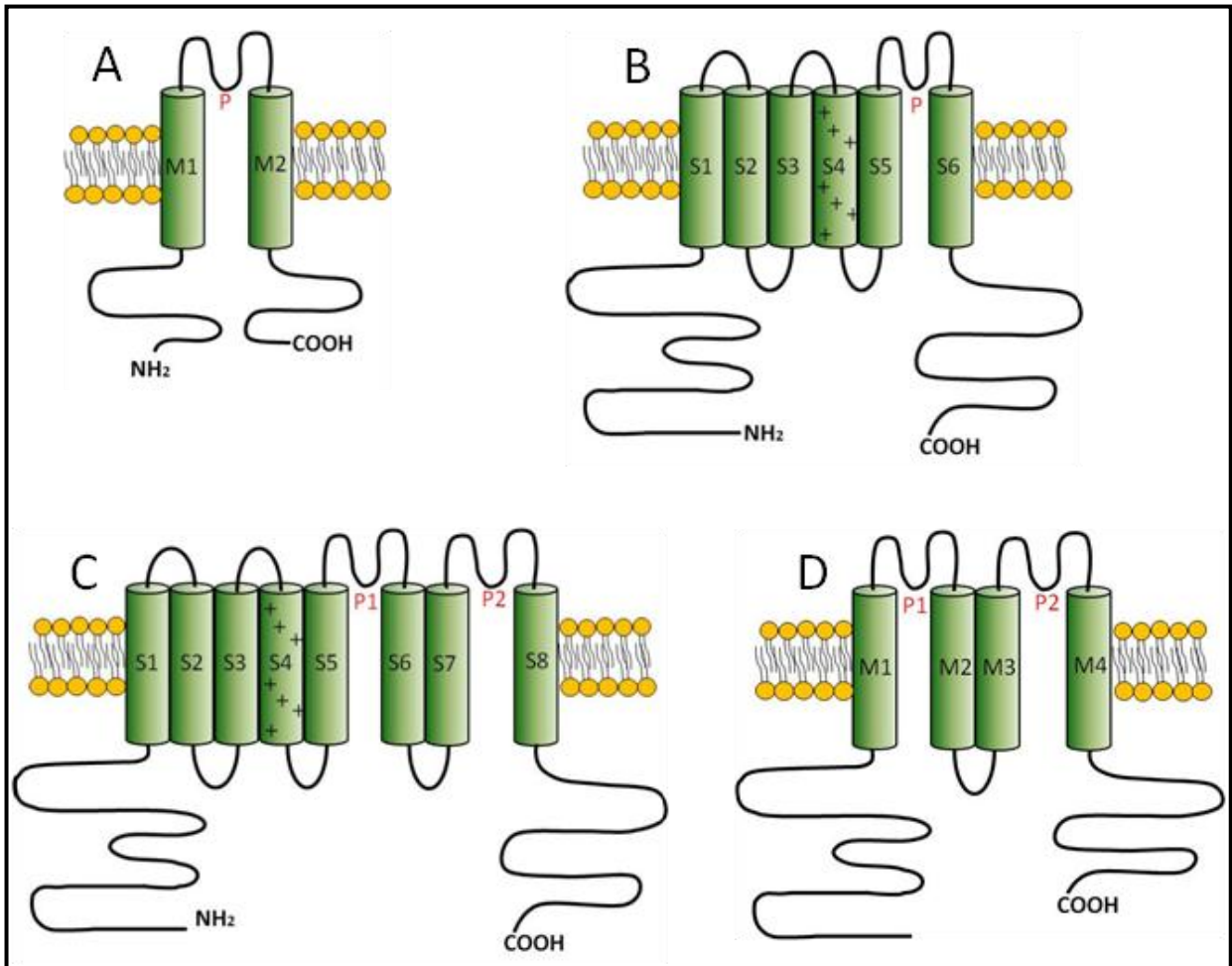
- Mantenimiento de la membrana celular polarizada como una fuerza motriz para el transporte electrogénico.
- Regulación del volumen celular.
- Excreción de  $K^+$  de acuerdo con las necesidades metabólicas.
- Reciclamiento del  $K^+$  a través de las membranas lumbales y basolaterales (funcionalmente acoplados con las bombas de iones que intercambia potasio).
- Destino celular: diferenciación vs proliferación o apoptosis (Warth, 2003).

Los canales selectivos al  $K^+$  conforman una de las superfamilias de canales iónicos más extendida en los organismos vivos. Se han identificado más de 200 genes que codifican para diferentes proteínas relacionadas con los canales de potasio, y 90 genes en el genoma humano (Shieh et al., 2000).

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

Los canales de potasio constan de cuatro subunidades transmembranales (subunidades  $\alpha$  o subunidades formadoras del poro) que se agregan para formar un canal funcional; las subunidades  $\alpha$  frecuentemente se asocian con otras subunidades reguladoras ( $\beta$ ) en la región citoplásmica. Cada subunidad  $\alpha$  comprende de 2 a 8 dominios transmembranales (S1 a S8) unidos por asas citoplasmáticas y extracelulares, uno o dos dominios formadores del poro (P loop), y los dominios citoplasmáticos amino y carboxilo terminales.

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

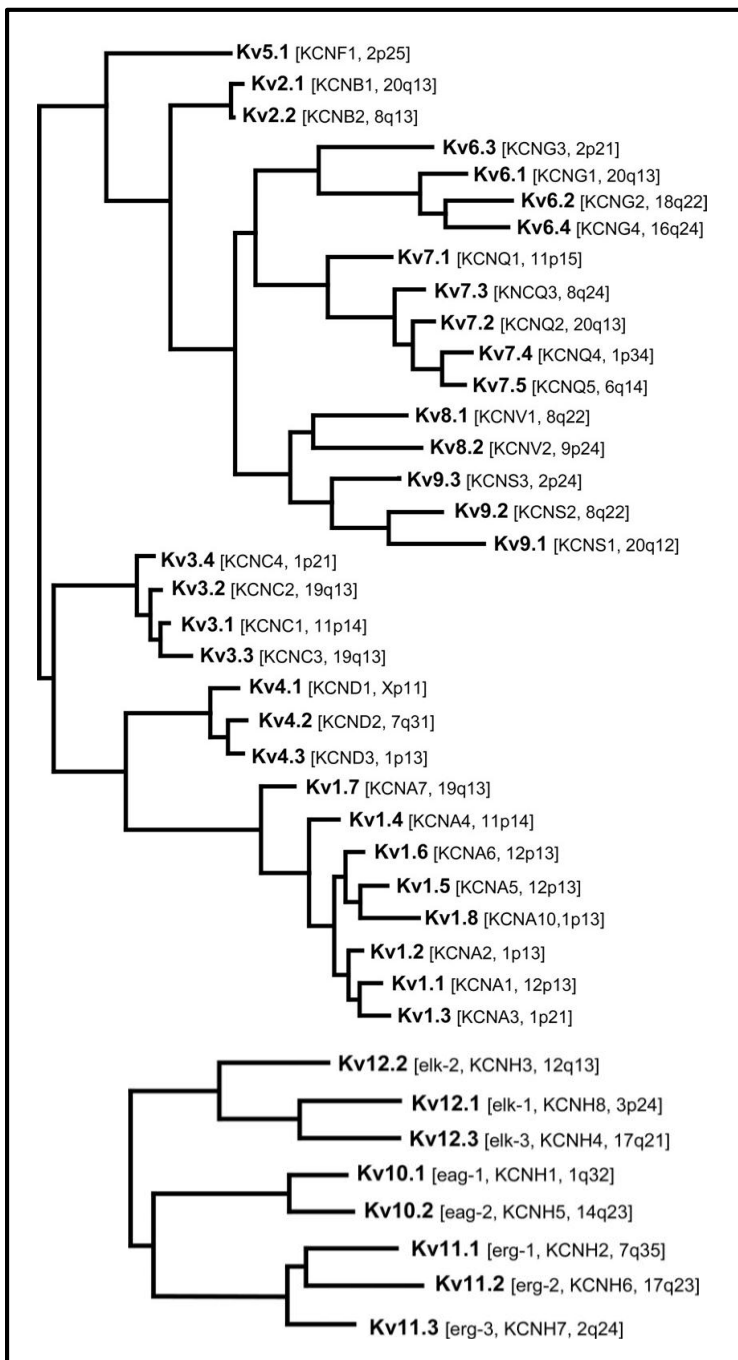


**Figura 2.12. Topología de los canales de potasio.**

**A):** Canales 2TM/P. Constan de dos helices transmembranales (TM), y un dominio formador del poro (P); un ejemplo de estos canales son los K<sub>ir</sub>. **B):** Canales 6TM/P. Constan de seis TM y un P; los canales K<sub>v</sub> presentan esta topología. Los canales 2TM/P y los canales 6TM/P forman tetrámeros. **C):** Canales 8TM/2P. Canales híbridos de 6TM/P y 2TM/P. **D):** Canales 4TM/2P. Consisten de dos repeticiones de canales 2TM/P. Los canales 8TM/2P y 4TM/2P, probablemente se asocian en dímeros para formar un canal funcional. (Tomado de Choe, 2002).

## 2.6. Canales de potasio activados por voltaje.

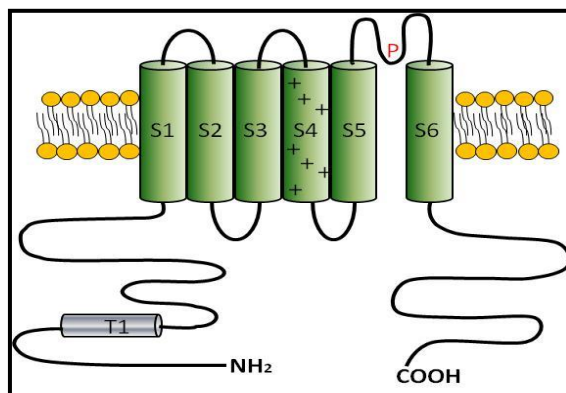
Los canales de potasio activados por voltaje (Kv) comprenden la familia de los canales iónicos más grande y diversa de la superfamilia de canales de potasio. Se han caracterizado 40 genes en el genoma humano, los cuales se agrupan en 12 subfamilias, de la Kv1 a la Kv12 (Gutman et al., 2003; Gutman et al., 2005). En la figura siguiente se presenta un árbol filogenético donde se agrupan todos los canales Kv identificados hasta el momento.



**Figura 2.13. Clasificación filogenética de los canales Kv (IUPHARM).** Tomado de Gutman et al., 2005.



Los canales Kv funcionales están compuestos por cuatro subunidades  $\alpha$  formadoras del poro idénticas (homotetrámero) o por diferentes subunidades pertenecientes a la misma subfamilia (heterotetrámero), como es el caso de las subfamilias Kv1, Kv7 y Kv10, cuyos heterotetrámeros presentan propiedades biofísicas completamente distintas a las de sus homotetrámeros (Cobarruvias et al., 1991). Cada subunidad  $\alpha$  consta de seis dominios transmembranales (S1–S6), entre los dominios S5 y S6 se encuentra un asa extracelular que forma el filtro de selectividad del poro (Yellen, 2002), en el segmento S4, existen siete aminoácidos con carga positiva (5 argininas, 1 lisina y 1 histidina) y constituye el sensor del voltaje. Los canales Kv poseen un dominio T1 de reconocimiento en la región amino terminal que les confiere especificidad para el ensamblaje y la formación de los tetrámeros (Nagaya y Papazian, 1997; Lu et al., 2001).



**Figura 2.14. Representación topológica de los segmentos transmembranales de un Kv** (Tomado de de Potassium Chanel Structures; Choe, 2002).

No todas las subunidades  $\alpha$  de Kv forman canales funcionales por si solas; cuatro de las subfamilias de Kv (Kv5, Kv6, Kv8 y Kv9) codifican proteínas que actúan como subunidades modificadoras y forman heterotetrámeros con subunidades de la subfamilia Kv2, de esta forma se ve incrementada la diversidad funcional de esta subfamilia (Gutman et al., 2005). Además de estas subunidades, se han identificado otras proteínas que funcionan como proteínas accesorias, que se asocian con los tetrámeros de Kv y modifican sus propiedades biofísicas: Subunidades  $\beta$ , KChIP, KChAP, MinK (Hebert et al., 2005).

Los Kv se encuentran ampliamente expresados en las células excitables donde juegan un papel crítico en la regulación del potencial de reposo, la duración y la frecuencia del potencial de acción y en consecuencia, en la liberación de neurotransmisores (Pongs, 1999).

Las membranas celulares se encuentran polarizadas, con mayor cantidad de cargas positivas acumuladas en la cara extracelular. Una despolarización de las membranas ocurre por el movimiento de estas cargas (principalmente el ión  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ ) hacia la cara citoplásmica de las membranas. Los canales Kv se abren en respuesta a la despolarización del voltaje

transmembranal y facilitan el flujo del potasio al exterior celular, de esta forma el potencial de la membrana regresa a su estado de reposo (polarizado). Esta es la manera en que los Kv sensan la despolarización y la inhiben (Hille, 1992).

La subfamilia Kv1 (*Shaker*) cuenta con el mayor número de componentes identificados (Kv1.1 a Kv1.8) clonados originalmente de *Drosophila melanogaster* (Papazian et al., 1987; Tempel et al., 1987; Schwarz et al., 1988; Timpe et al., 1988; Kamb et al., 1988; Pongs et al., 1988). Su identificación y caracterización ha sido principalmente en el sistema nervioso central, donde participan en el control de la excitabilidad neuronal. Por el gran número de combinaciones multiméricas que pueden presentar los Kv, éstos mantienen las condiciones óptimas para el estricto control del patrón de disparo de los potenciales de acción en los tejidos excitables (Grunnet et al., 2003).

**Tabla 2.3. Propiedades biofísicas de las canales Kv1 identificados molecularmente (IUPHARM).**

| Nombre | Gene Humano | Locus                                  | Longitud (aa)                  | Conductancia | Activación  | Inactivación  |
|--------|-------------|--|--------------------------------|--------------|---|---|
| Kv1.1  | KCNA1       | Hu: 12p13.3<br>Mu: 6<br>Rat: 4q42      | Hu: 494<br>Mu: 495<br>Rat: 495 | 10 pS        | $V_a = -32$ mV<br>$\kappa_a = 8.5$ mV<br>$\tau_n = 5$ ms (-32 mV)   | $V_h = -51$ mV<br>$\kappa_h = 3$ mV<br>$\tau_h = 11$ s (40 mV)                            |
| Kv1.2  | KCNA2       | Hu: 1p13<br>Mu: 3<br>Rat: 2q34         | Hu: 499<br>Mu: 499<br>Rat: 499 | 14 – 18 pS   | $V_a = 5$ to 27 mV<br>$\kappa_a = 13$ mV<br>$\tau_n = 6$ ms (60 mV) | $V_h = -33$ a -15 mV<br>$\kappa_h = 8$ mV   |
| Kv1.3  | KCNA3       | Hu: 1p13.3<br>Mu: 3<br>Rat: 2q34       | Hu: 523<br>Mu: 528<br>Rat: 525 | 13 pS        | $V_a = -35$ mV<br>$\kappa_a = 6$ mV<br>$\tau_n = 3$ ms (40 mV)      | Inactivación tipo C<br>$V_h = -63$ mV<br>$\kappa_h = 7.7$ mV<br>$\tau_h = 250$ ms (40 mV) |
| Kv1.4  | KCNA4       | Hu: 11p14.3-15.2<br>Mu: 2<br>Rat: 3q33 | Hu: 653<br>Mu: 654<br>Rat: 654 | 5 pS         | $V_a = -22$ mV; -34 mV<br>$\kappa_a = 5$ mV                         | Inactivación tipo N<br>$V_h = -62$ mV<br>$\tau_h = 47$ ms (0 mV)                          |
| Kv1.5  | KCNA5       | Hu: 12p13.3<br>Mu: 6<br>Rat: 4q42-44   | Hu: 613<br>Mu: 602<br>Rat: 602 | 8 pS         | $V_a = -14$ mV; -34 mV<br>$\kappa_a = 6 - 12$ mV                    | $V_h = -25$ a -10 mV<br>$\kappa_h = 3 - 5$ mV<br>$\tau_{h1} = 460$ ms (40 mV)             |
| Kv1.6  | KCNA6       | Hu: 12p13.3<br>Mu: 6<br>Rat: 4q42      | Hu: 528<br>Mu: 529<br>Rat: 530 | 9 pS         | $V_a = -20$ mV<br>$\kappa_a = 8$ mV                                 | $\kappa_h = -43$ mV<br>$\tau_{h1} = >3$ s (40 mV)   |
| Kv1.7  | KCNA7       | Hu: 19q13.3<br>Mu: 7<br>Rat: 1q22      | Hu: 456<br>Mu: 532<br>Rat: 457 | 21 pS        | $V_a = -8$ mV<br>$\tau_n = 6$ ms                                    | Inactivación muy lenta  |
| Kv1.8  | KCNA10      | Hu: 1p13.1<br>Mu: 3<br>Rat: 2q34       | Hu: 511<br>Mu: 503<br>Rat: 511 | 10 – 12 pS   | $V_a = 3.6$ mV<br>$\tau_n = 18$ ms (60 mV)                          | $\tau_n = 10$ s   |

Hu: Humano; Mu: Murino; Rat: Rata.

Los estudios electrofisiológicos, con la técnica de parche perforado en las células epiteliales, han revelado la presencia de corrientes de K<sup>+</sup>, con propiedades biofísicas y farmacológicas características de los canales Kv. Mediante técnicas moleculares de RT-PCR e inmunohistoquímica se ha demostrado que las células epiteliales de diferentes órganos y sistemas expresan una gran diversidad de subunidades  $\alpha$  (Tabla 2.4).

**Tabla 2.4. Expresión de los canales Kv1 en los epitelios.**

| Células epiteliales  | Canales Kv1                                     | Referencia               |
|--|---|--------------------------|
| Línea celular de epitelio de riñón de cerdo: LLC-PK1           | Kv1.1 ; Kv1.2 (mRNA)                            | Desir et al., 1992       |
| HEK-293  | Kv1.1; Kv1.2; Kv1.3; Kv1.4; Kv1.6 (mRNA)        | Jiang et al., 2002       |
| Células epiteliales del intestino de rata: IEC-6               | Kv1.1; Kv1.2; Kv1.3; Kv1.4; Kv1.5; Kv1.6 (mRNA) | Rao et al, 2002          |
| Líneas celulares de cáncer de próstata de rata: MAT-LyLu, AT-2 | Kv1.3; Kv1.4; Kv1.6 (mRNA, proteína)            | Fraser et al., 2003      |
| Líneas celulares de epitelio gástrico: RGM-1                   | Kv1.1; Kv1.6 (mRNA)                             | Wu et al., 2006          |
| MDCK   | Kv1.4; Kv1.6; Kv1.7 (mRNA)                      | García et al., 2007      |
| Carcinoma colónico de ratón.                                   | Kv1.3; Kv1.5 (mRNA)                             | Ousingsawat et al., 2007 |
| Células de riñón de conejo                                     | Kv1.1; Kv1.2 (mRNA)                             | Desir et al., 1992       |
| Túbulo proximal del riñón de rata.                             | Kv1.8 (proteína)                                | Yao et al., 2002         |
| Células del epitelio alveolar de rata.                         | Kv1.1; Kv1.3; Kv1.4 (mRNA, proteína)            | Lee et al., 2003         |
| Conducto colector de la médula interna del riñón de rata.      | Kv1.1; Kv1.3; Kv1.6 (mRNA, proteína)            | Escobar et al., 2004     |
| Células epiteliales del plexo coroideo de rata.                | Kv1.1; Kv1.3 (proteína)                         | Speake et al., 2004      |

mRNA: Identificación del transcrito

Debido a la amplia distribución de los Kvs en los epitelios, se han propuesto diversas funciones para estos canales de potasio: regulación del volumen, migración celular, proliferación celular, apoptosis y sensores de O<sub>2</sub> (O'Grady y Lee, 2005). A diferencia de las neuronas y miocitos, las células epiteliales no generan potenciales de acción. El hecho de que muchos canales Kv expresados en las células epiteliales presentan inactivación sugiere que su actividad es transitoria, dificultando con ello la asignación de una función para estos canales en el transporte transepitelial de electrolitos o nutrientes.

Los potenciales de membrana varían entre los -60 y -90 mV en los epitelios renales, en condiciones fisiológicas. Sin embargo en los túbulos proximales y conductos colectores, se pueden presentar cambios en los potenciales de membrana por arriba de los -50 mV, debido al intenso transporte de  $\text{Na}^+$ , suficientes para alcanzar el umbral de activación de los canales Kv y con ello el restablecimiento del potencial de membrana y la reabsorción de sodio (Yao et al., 1996). Se requieren estudios funcionales *in situ* para determinar la participación de los canales Kv en el transporte transepitelial de iones.

La capacidad de los canales Kv para responder a diferentes estados metabólicos, los involucra en diversas vías de señalización celular. El uso y mejoramiento de diversas técnicas de biología molecular, proteómica, microscópicas, farmacológicas y electrofisiológicas, aplicadas al estudio de los canales Kv en los epitelios, permitirá dilucidar funciones diferentes al mantenimiento del potencial de membrana, descrito en las células excitables.

### 3. JUSTIFICACIÓN.

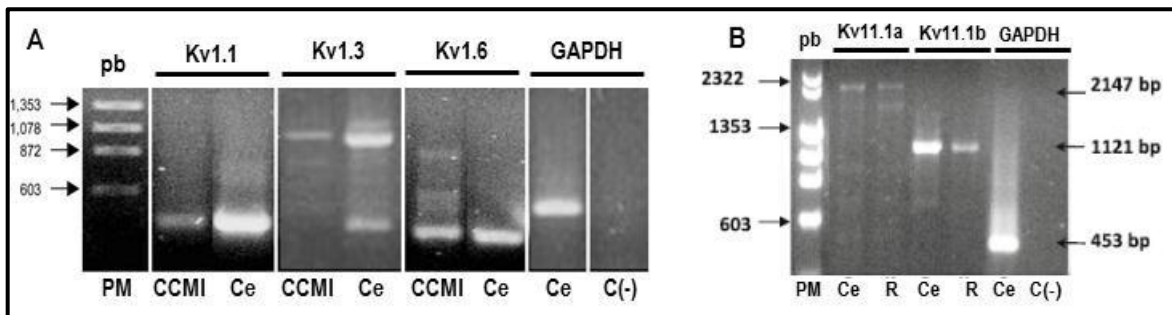
Los pacientes neonatos con síndrome de Bartter tipo II, presentan mutaciones en el gen KCNJ1, que codifica el canal secretor de  $\text{K}^+$  Kir1.1 (ROMK). Dichos pacientes presentan hipercalemia durante las primeras semanas de nacidos. Sin embargo, esta condición clínica cambia gradualmente a hipocalemia acompañada de hipercaliuria (Cho, 2003; Finer et al., 2003; Peters et al., 2002). Estas características clínicas sugieren la presencia de otros canales secretores de  $\text{K}^+$  cuya función se ve incrementada en este síndrome. Estudios de microperfusión de los conductos colectores de ratones manipulados genéticamente, deficientes en los canales ROMK, demostraron que los canales MaxiK participan en la excreción del  $\text{K}^+$  renal; sin embargo, a pesar del bloqueo farmacológico del canal MaxiK con Iberiotoxina, los conductos perfundidos mostraron una secreción de  $\text{K}^+$  que no correspondía a la actividad de MaxiK o ROMK (Bailey et al., 2006). **Esto nos lleva a especular sobre la presencia de otros canales secretores de  $\text{K}^+$  en las porciones distales de la nefrona (incluido el CCC) donde tiene lugar la secreción de  $\text{K}^+$ .**

La identificación de nuevos canales de potasio en la nefrona, permitirá dilucidar vías secretoras de  $\text{K}^+$ , no descritas aún, que podrían estar sobre expresadas en padecimientos congénitos y adquiridos, en los que el riñón falla en la homeostasis del  $\text{K}^+$ .

#### 4. ANTECEDENTES de nuestro laboratorio.

En un estudio electrofisiológico de parche perforado en células completas, se registraron las conductancias selectivas al  $K^+$ , en un cultivo primario de células del CCMI del riñón de rata. Los resultados sugieren que las corrientes registradas corresponden a un tipo de canal de la familia Kv (Escobar et al., 2004).

Mediante la técnica de RT-PCR y Western blot, se identificaron los canales de  $K^+$  pertenecientes a la subfamilia Kv1 (*Shaker*): Kv1.1, Kv1.3, Kv1.6 en las células del CCMI. Se confirmó la presencia de las proteínas correspondientes a estos canales por los métodos de Western blot e Inmunohistoquímica (Escobar et al., 2004). En un estudio sistemático en nuestro laboratorio, también se identificó la presencia del transcrito correspondiente a las dos isoformas del canal Kv11.1 (Kv11.1a y Kv11.1b) en el riñón de rata (Figura 4.1).



**Figura 4.1. Identificación por PCR de los transcritos para Kv1.1, Kv1.3, Kv1.6, Kv11.1a y Kv11.1b** **A)** Amplificación del cDNA con cebadores diseñados hacia la región carboxilo de las proteínas codificada. **B)** Amplificación del cDNA con cebadores diseñados hacia la región amino de las proteínas codificadas. PM: Peso molecular (en pares de bases), CCMI: células del conducto colector de la médula interna, Ce: cerebro, R: riñón, (modificados de Escobar et al., 2004; Carrisoza-Gaytán et al., 2010).

Una vez descrita la presencia de los canales Kv en el riñón, es importante establecer su distribución en los diferentes segmentos de la nefrona y su papel fisiológico.

Se ha observado una modificación en la distribución subcelular, de citoplásmica a apical, en el CCC, de un canal de potasio dependiente de voltaje y calcio (MaxiK), como una respuesta del riñón al incremento en la ingesta de potasio (Najjar et al., 2005). Estos resultados nos llevaron a plantear la posibilidad de un efecto similar en la distribución de los canales Kv1.1, Kv1.3 Kv1.6 y Kv11.1, así como su participación en la secreción de  $K^+$  en función de la ingesta del mismo.

## **5. OBJETIVO.**

**Estudiar la expresión y distribución de los canales de potasio activados por el voltaje, Kv1.1, Kv1.3, Kv1.6 y Kv11.1, en los epitelios renales, así como su regulación en respuesta a un ingesta elevada de  $K^+$ ,**

### **Objetivos particulares:**

- Describir la distribución diferencial de los canales Kv1.1, Kv1.3, Kv1.6 y Kv11.1 en el epitelio renal de rata.
- Estudiar el efecto de una dieta con alto contenido de potasio sobre la expresión y la distribución de la subfamilia de los canales Kv1.1, Kv1.3, Kv1.6 y Kv11.1 en el epitelio renal de rata.

## **6. HIPÓTESIS.**

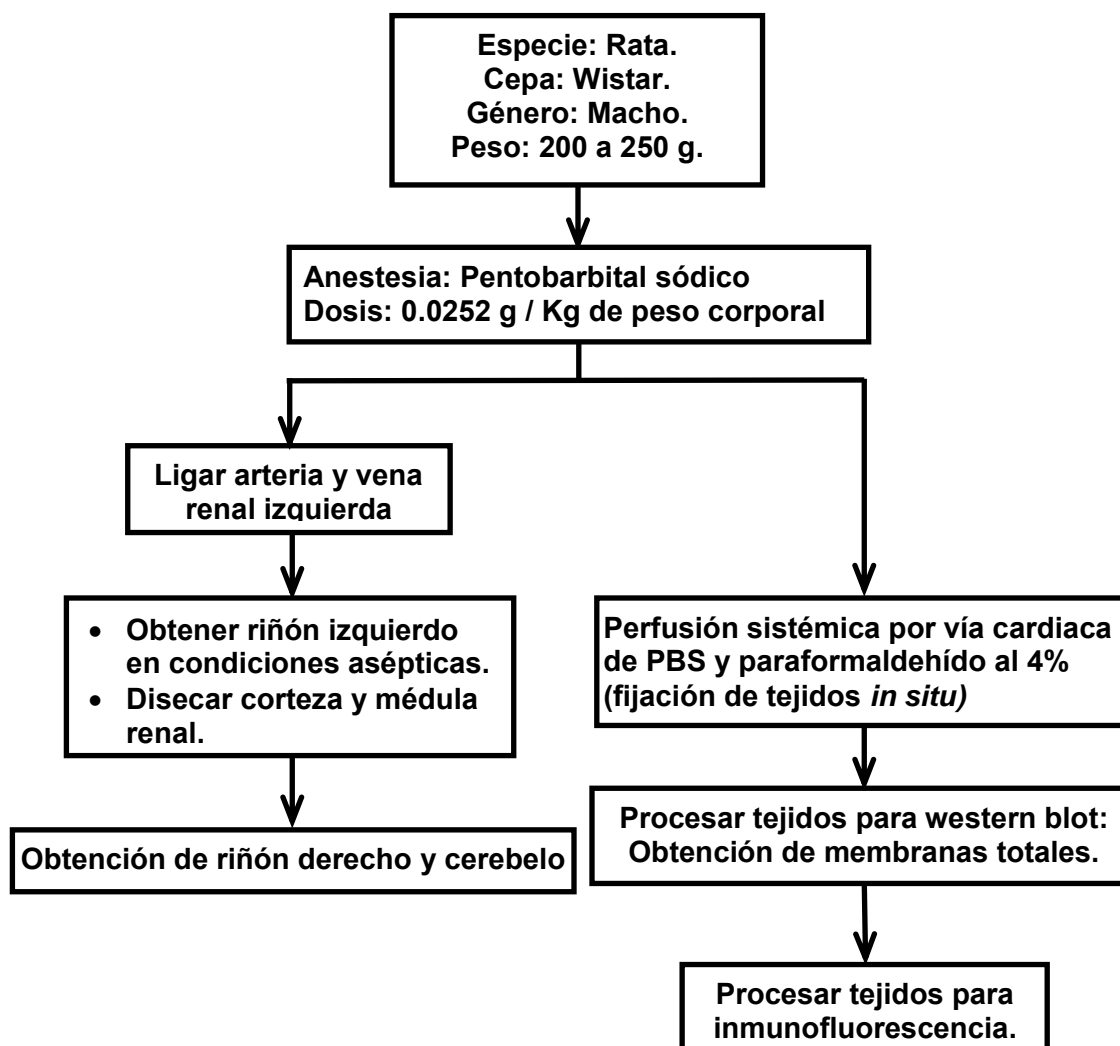
**Si están presentes los transcritos de los canales de potasio Kv1.1, Kv1.3, Kv1.6 y Kv11.1a y Kv11.1b en el riñón de rata, la expresión de las proteínas correspondientes será de forma diferencial y regulada, dependiendo de las características de transporte de soluto de los segmentos tubulares renales.**

## 7. METODOLOGÍA.

La estrategia experimental desarrollada para el estudio de la expresión de los canales Kv1.1, Kv1.3, Kv1.6, y Kv11.1 en el riñón de la rata, consta de tres partes:

- Expresión y distribución diferencial de los canales Kv en el epitelio renal de rata.
- Expresión y distribución de los canales Kv en respuesta a las dietas con diferente contenido en K<sup>+</sup>.
- Expresión funcional de los canales Kv localizados en la membrana apical del conducto colector cortical.

### 7.1. Expresión y distribución diferencial de los canales Kv en el epitelio renal de rata.



### Western blot.

Se utilizaron los extractos membranales completos (membranas totales), de corteza, médula externa y medula interna renales por separado. Como control positivo se utilizó el extracto de cerebelo, donde se ha identificado a los canales Kv (Chung et al., 2001).

Las proteínas totales (50 µg) fueron solubilizadas y separadas con la técnica de electroforesis vertical en geles de poliacrilamida al 10%. Las proteínas separadas se electrotransfirieron a un soporte sólido (membrana de nylon), en donde se realizó la inmunodetección de los canales Kv1.1, Kv1.3, Kv1.6 y Kv11.1. Para ello se utilizaron anticuerpos primarios específicos para cada canal (ver tabla 7.1), así como la técnica ECL (Enhanced Chemiluminescence; Amersham Biosciences), que incluye el uso de anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano. Esta enzima cataliza la reacción de oxidación del sustrato luminol, cuyo producto es luminiscente, en un medio alcalino que incrementa la emisión de luz. Las bandas (blots) correspondientes a la inmunodetección se expusieron a placas autorradiográficas y se fotodocumentaron digitalmente con el equipo EDAS 290 de Kodak.

**Tabla 7.1. Anticuerpos y condiciones de incubación, para el Western blot.**

| Anticuerpo Primario                 | Dilución | Incubación  | Anticuerpo Secundario                                  | Dilución | Incubación |
|-------------------------------------|----------|-------------|--|----------|------------|
| <b>Conejo α Kv1.1</b><br>(Alomone)  | 1:300    | 4 °C / 18 h | <b>Burro α IgG de conejo</b><br>(Amersham Biosciences) | 1:5000   | T A / 1 h  |
| <b>Conejo α Kv1.3</b><br>(Alomone)  | 1:300    | 4 °C / 18 h |  |          |            |
| <b>Conejo α Kv1.6</b><br>(Alomone)  | 1:300    | 4 °C / 18 h |  |          |            |
| <b>Conejo α Kv11.1</b><br>(Alomone) | 1:300    | 4 °C / 18 h |  |          |            |

T A: Temperatura ambiente.

### Inmunofluorescencia indirecta.

Previo desenmascaramiento de antígeno, se utilizaron los mismos anticuerpos primarios que se utilizaron para el Western blot (dilución 1:100).

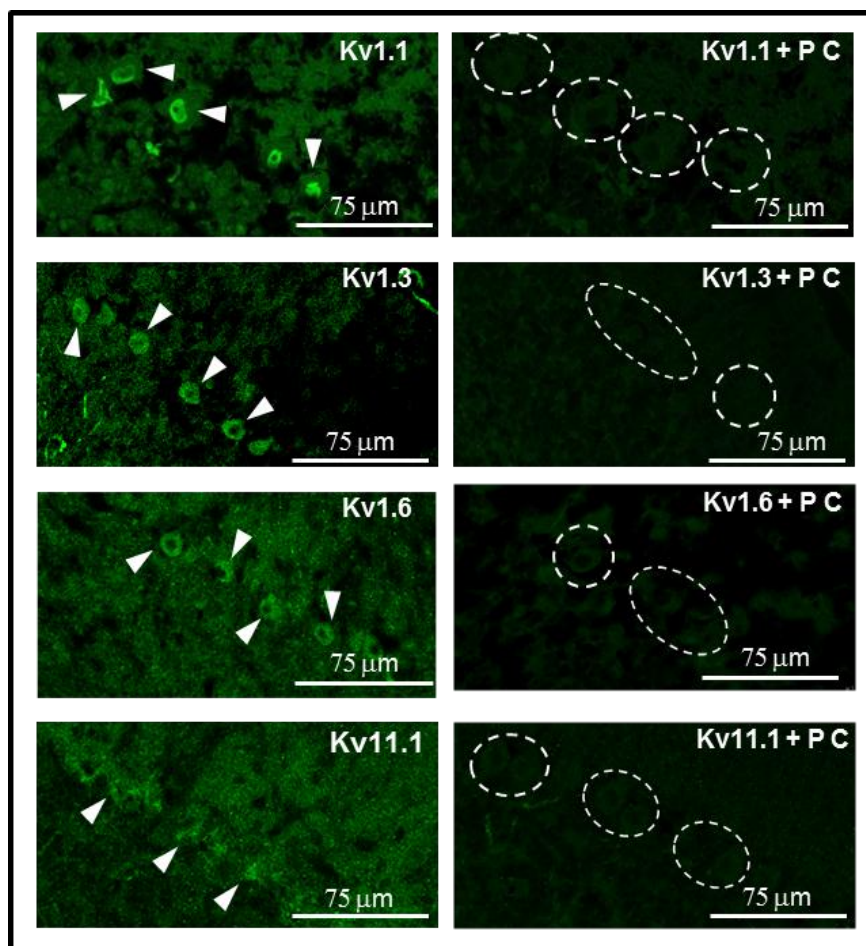
La técnica de inmunofluorescencia indirecta implica el uso de anticuerpos secundarios unidos a moléculas con capacidad de fluorescer (fluoróforos). Los fluoróforos son excitados con radiación electromagnética a una longitud de onda determinada y emiten luz a otra longitud de onda (Tabla 7.2).



**Tabla 7.2. Fluoróforos acoplados a los anticuerpos o lectina, usados para la inmunodetección.**

| Fluoróforo             | Longitud de onda ( $\lambda$ ) |                     |
|------------------------|--------------------------------|---------------------|
|                        | Excitación máxima (nm)         | Emisión máxima (nm) |
| Alexa Flúor 488 (A488) | 495                            | 519                 |
| Alexa Flúor 594 (A594) | 590                            | 617                 |
| Fluoresceína           | 494                            | 518                 |
| Rojo de Texas (R T)    | 595                            | 615                 |

La inmunorreactividad positiva se observó en un microscopio confocal de la marca Leica, modelo TCS-SP5, con objetivos de inmersión en aceite 20X y 40X y evidenció detalles sobre la distribución general de los canales Kv en el tejido renal. Se utilizaron cortes histológicos del cerebelo como control positivo en las células de Purkinje (Figura 7.1; Chung et al., 2001).



**Figura 7.1. Control positivo para la inmunorreactividad de los canales Kv en las células de Purkinje.** Inmunorreactividad positiva para los canales Kv en cortes de cerebelo, en las células de Purkinje (señalada con cabezas de flecha). En los paneles derechos los anticuerpos para los canales Kv fueron preincubados con su respectivo péptido control (PC) y no es posible detectar inmunorreactividad, se indica con líneas punteadas la región donde se localizan células de Purkinje.

### Comarcaje con inmunofluorescencia indirecta.

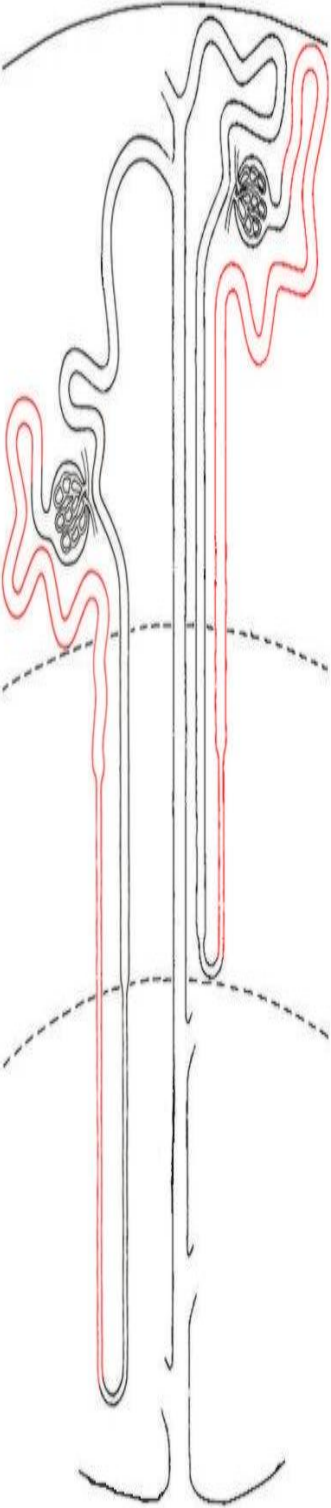
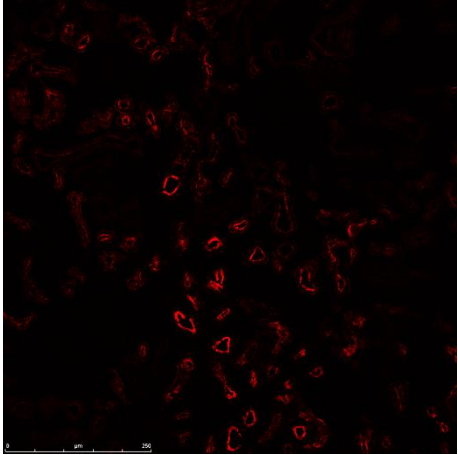
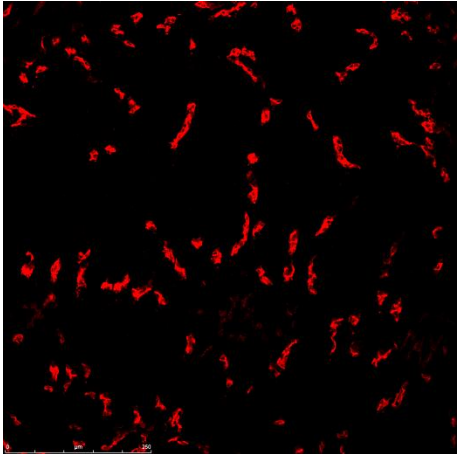
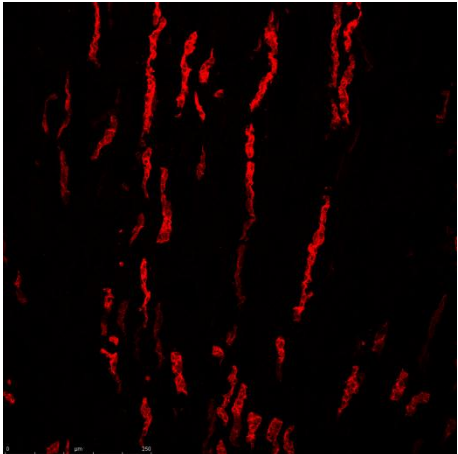
En este caso, se realizó el marcaje de cada canal Kv de la forma antes descrita, pero también se marcaron otras proteínas que se expresan de forma localizada en distintos segmentos tubulares de las nefronas (Tabla 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8). Esto con la finalidad de establecer la distribución diferencial de los canales Kv en los epitelios renales. Se utilizaron condiciones específicas de dilución e incubación para cada anticuerpo de acuerdo con la tabla siguiente.

**Tabla 7.3. Anticuerpos utilizados para los ensayos Inmunofluorescencia indirecta.**

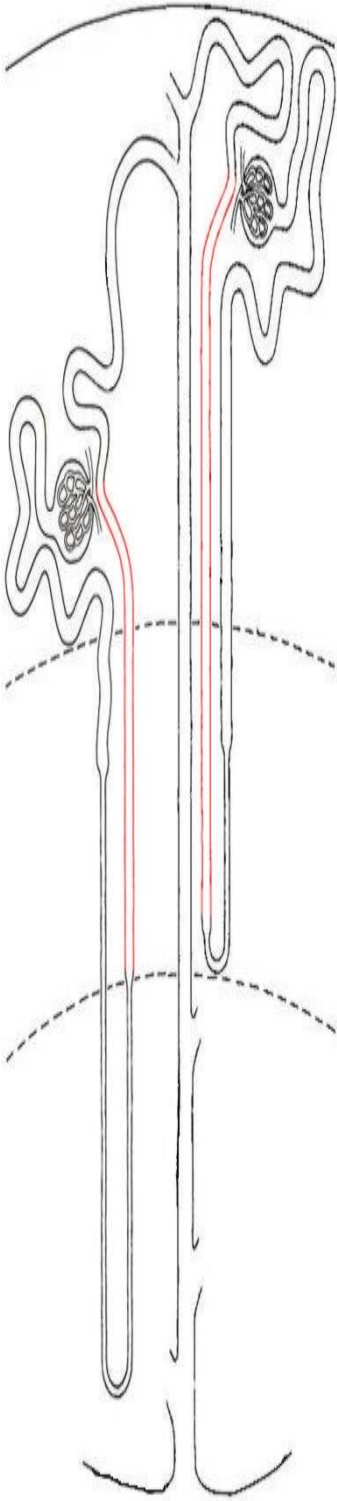
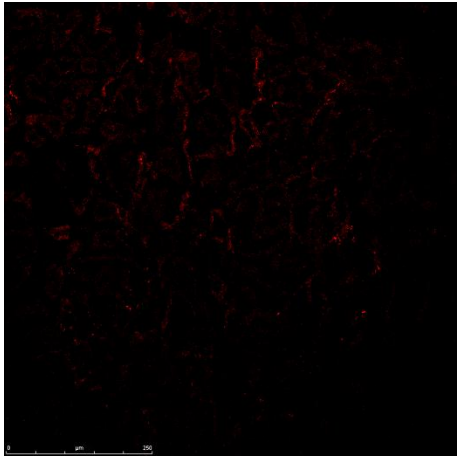
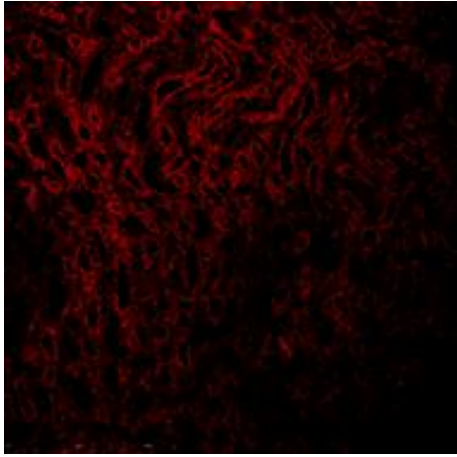
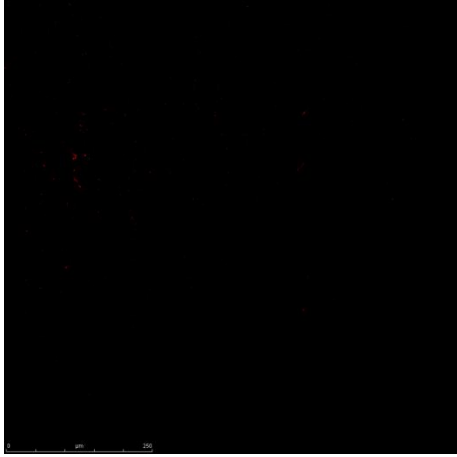
| Anticuerpo Primario   | Dilución | Incubación  | Anticuerpo Secundario  | Dilución | Incubación |
|---|----------|-------------|--|----------|------------|
| <b>Conejo <math>\alpha</math> Kv1.1</b><br>(Alomone)          | 1:100    | 4 °C / 24 h | <b>Burro <math>\alpha</math> Conejo/A488</b><br>(Molecular Probes) | 1:500    | T A / 1 h  |
| <b>Conejo <math>\alpha</math> Kv1.3</b><br>(Alomone)          | 1:100    | 4 °C / 24 h | <b>Burro <math>\alpha</math> Conejo/A488</b><br>(Molecular Probes) | 1:500    | T A / 1 h  |
| <b>Conejo <math>\alpha</math> Kv1.6</b><br>(Alomone)          | 1:100    | 4 °C / 24 h | <b>Burro <math>\alpha</math> Conejo/A488</b><br>(Molecular Probes) | 1:500    | T A / 1 h  |
| <b>Conejo <math>\alpha</math> Kv11.1</b><br>(Alomone)         | 1:100    | 4 °C / 24 h | <b>Burro <math>\alpha</math> Conejo/A488</b><br>(Molecular Probes) | 1:200    | T A / 1 h  |
| <b>Ratón <math>\alpha</math> AQP1</b><br>(Santa Cruz)         | 1:50     | 4 °C / 12 h | <b>Caballo <math>\alpha</math> Ratón/RT</b><br>(Vector)            | 1:1000   | T A / 1 h  |
| <b>Cabra <math>\alpha</math> THP</b><br>(Santa Cruz)          | 1:100    | 4 °C / 12 h | <b>Burro <math>\alpha</math> Cabra/A594</b><br>(Molecular Probes)  | 1:500    | T A / 1 h  |
| <b>Cabra <math>\alpha</math> Calb (28kDa)</b><br>(Santa Cruz) | 1:100    | 4 °C / 12 h | <b>Burro <math>\alpha</math> Cabra/A594</b><br>(Molecular Probes)  | 1:500    | T A / 1 h  |
| <b>Cabra <math>\alpha</math> AQP2 (C17)</b><br>(Santa Cruz)   | 1:100    | 4 °C / 12 h | <b>Burro <math>\alpha</math> Cabra/A594</b><br>(Molecular Probes)  | 1:500    | T A / 1 h  |
| <b>Cabra <math>\alpha</math> V-ATPasa</b><br>(Santa Cruz)     | 1:200    | 4 °C / 12 h | <b>Burro <math>\alpha</math> Cabra/A488</b><br>(Molecular Probes)  | 1:500    | T A / 1 h  |

Condiciones de incubación: dilución, temperatura / tiempo de incubación. T A: Temperatura ambiente, A: Alexa, RT: Rojo de Texas.

**Tabla 7.4. Inmunodetección de la Acuaporina 1 como marcador de los túbulos proximales.**

| MARCADOR  | LOCALIZACIÓN   | MICROGRAFIA   |
|---|--|---|
| <p><b>Acuaporina 1 (AQP1).</b></p> <p>La AQP1 se expresa en las membranas apicales de las células de los <b>túbulos proximales</b> hasta la porción descendente del asa de Henle (Nielsen et al., 2002).</p> <p><u>Anticuerpo 1°:</u><br/> <b>Mouse monoclonal anti AQP1 (C-20)</b><br/>           (Santa Cruz Biotechnology, cat: sc-58610)</p> <p>Dilución: 1:50</p> <p>Incubación: 4°C / 12h.</p> <p><u>Anticuerpo 2°:</u><br/>           Donkey anti mouse.<br/>           Fluoróforo: A-594<br/>           (Molecular Probes, cat: A-21203).</p> <p>Dilución: 1:100</p> <p>Incubación: T A / 1h.</p> |  | <p><b>CORTEZA</b></p>  <p><b>MÉDULA EXTERNA</b></p>  <p><b>MÉDULA INTERNA</b></p>  |

**Tabla 7.5. Inmunodetección de la glicoproteína Tamm Horsfall como marcador de la porción gruesa ascendente del asa de Henle.**

| MARCADOR   | LOCALIZACIÓN   | MICROGRAFIA   |
|--|--|---|
| <p><b>Glicoproteína Tamm Horsfall (THP).</b></p> <p>La THP se expresa en las células de la <b>porción gruesa ascendente del asa de Henle</b> (Bachman et al., 1985).</p> <p><u>Anticuerpo 1°:</u><br/> <b>Goat policlonal anti THP (G-20)</b> (Santa Cruz Biotechnology, cat: sc-21554).</p> <p>Dilución: 1:50.</p> <p>Incubación: 4°C / 12 h.</p> <p><u>Anticuerpo 2°:</u><br/>           Donkey anti goat.<br/>           Fluoróforo: A-594 (Molecular Probes, cat: A11058).</p> <p>Dilución: 1:500.</p> <p>Incubación: T A / 1 h.</p> |  | <p><b>CORTEZA</b></p>  <p><b>MÉDULA EXTERNA</b></p>  <p><b>MÉDULA INTERNA</b></p>  |

**Tabla 7.6. Inmunodetección de la Calbindina como marcador del túbulo contorneado distal y del túbulo conector.**

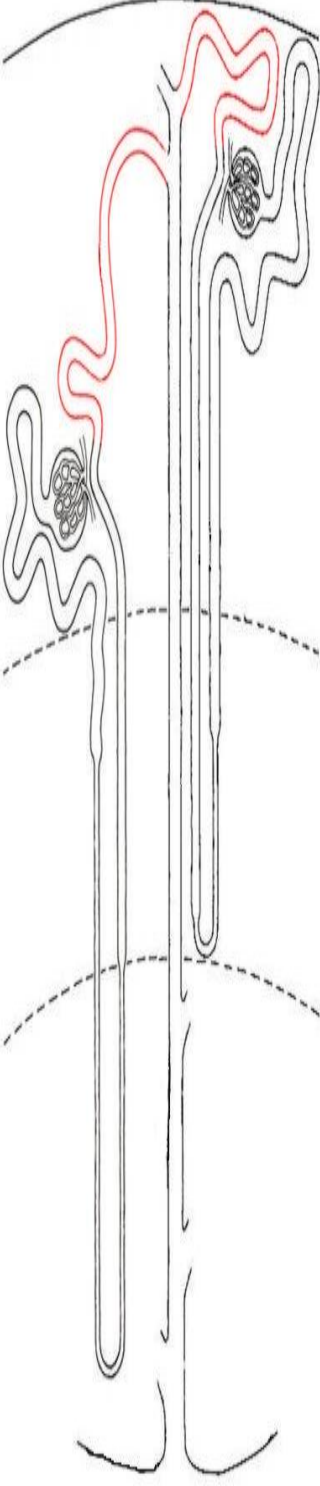
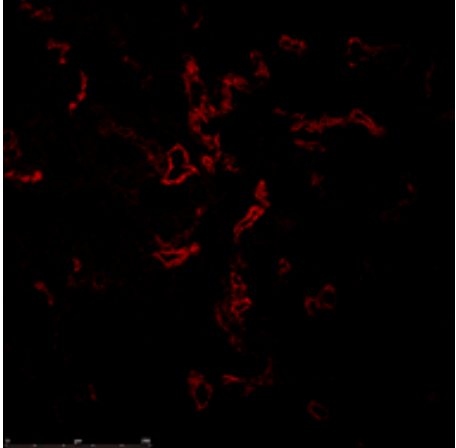
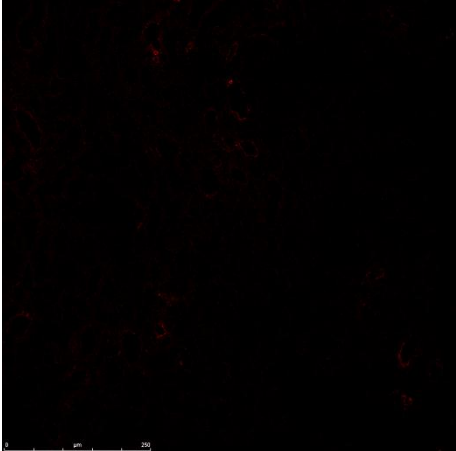

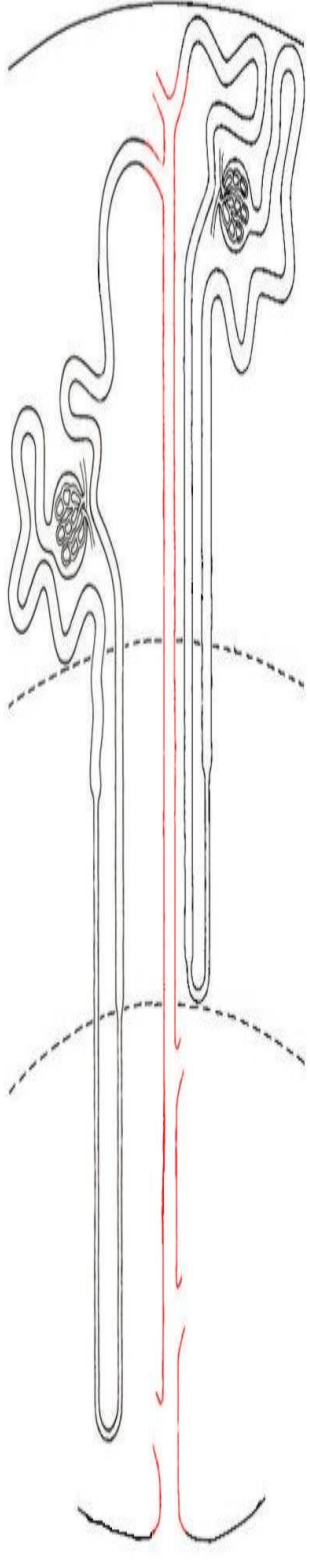
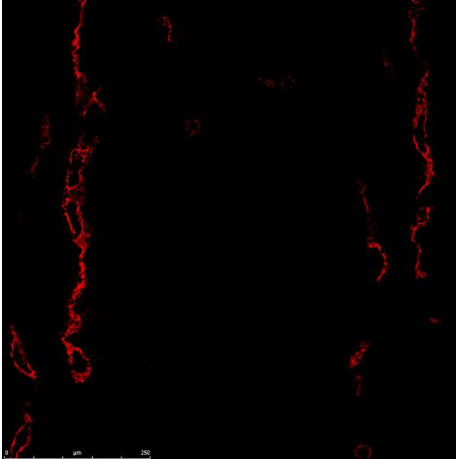
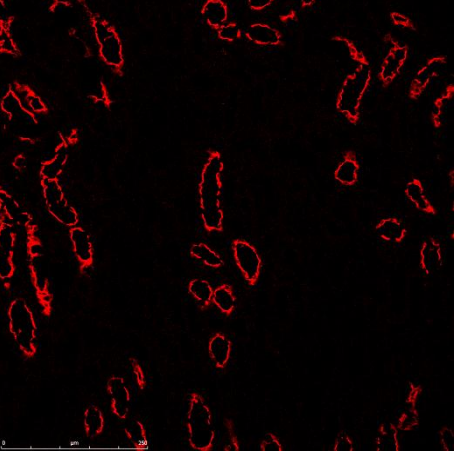
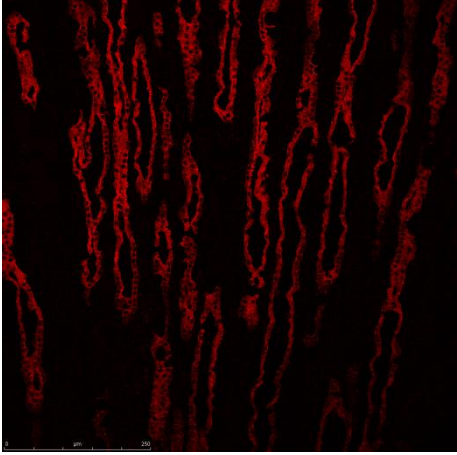
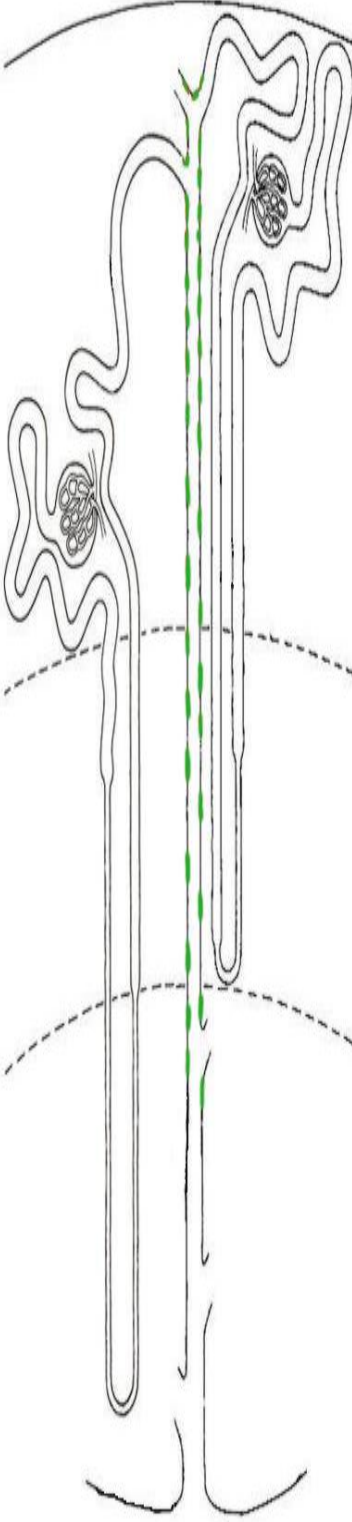
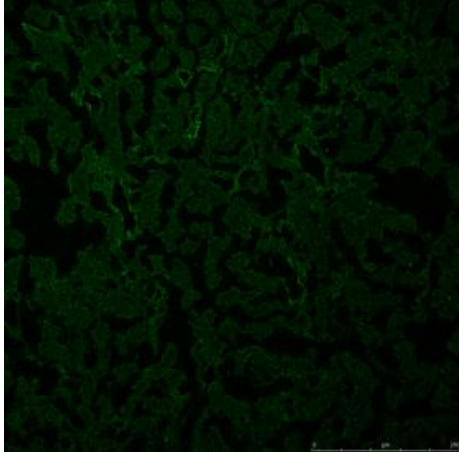
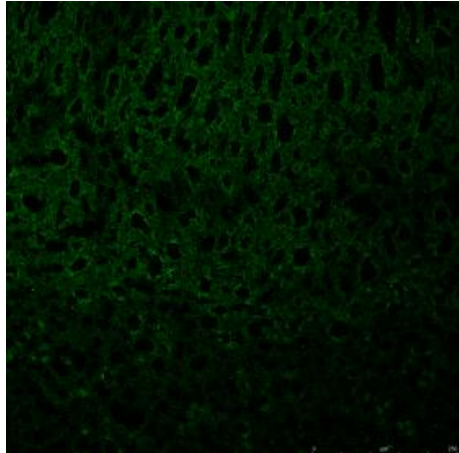
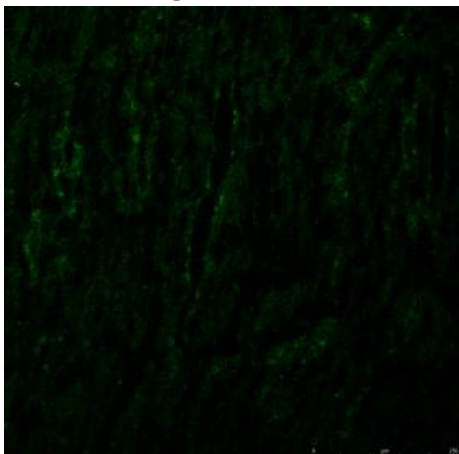
| MARCADOR   | LOCALIZACIÓN   | MICROGRAFIA   |
|--|--|---|
| <p><b>Calbindina-D<sub>28k</sub> (CALB).</b></p> <p>La CALB se expresa en las membranas de las células de los <b>túbulos contorneados distales</b> y de los <b>túbulos conectores</b> (Campean et al., 2001).</p> <p><u>Anticuerpo 1°:</u><br/> <b>Goat policlonal anti CALB-D28K (C-20)</b><br/>           (Santa Cruz Biotechnology, cat: sc-7691).</p> <p>Dilución: 1:100.</p> <p>Incubación: 4°C / 12 h.</p> <p><u>Anticuerpo 2°:</u><br/>           Donkey anti goat.<br/>           Fluoróforo: A-594.<br/>           (Molecular Probes, cat: A-11058).</p> <p>Dilución: 1:500.</p> <p>Incubación: T A / 1h.</p> |  | <p><b>CORTEZA</b></p>  <p><b>MÉDULA EXTERNA</b></p>  <p><b>MÉDULA INTERNA</b></p>  |



Tabla 7.7. Inmunodetección de la Acuaporina 2 como marcador del conducto colector.

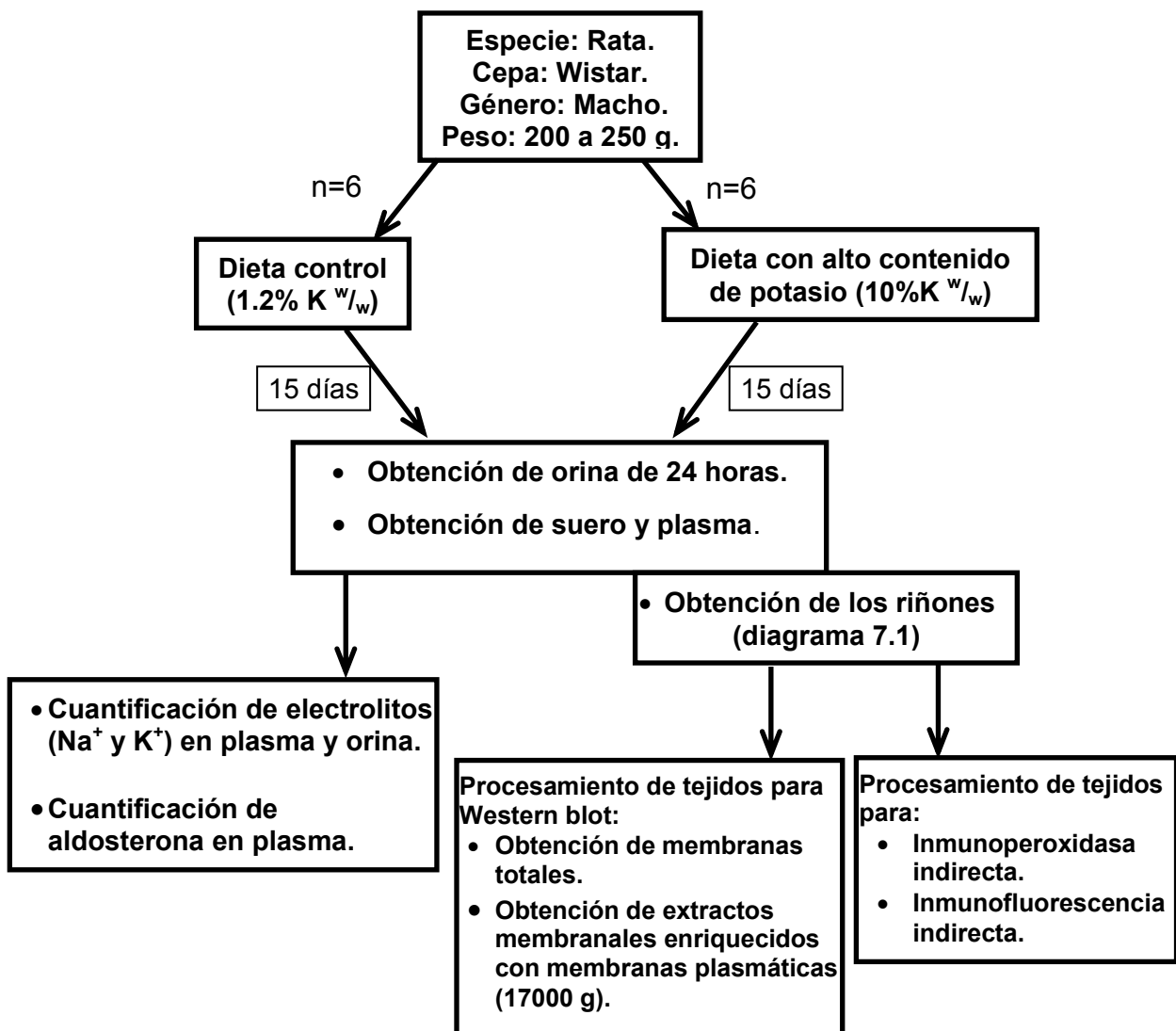
| MARCADOR  | LOCALIZACIÓN   | MICROGRAFIA   |
|---|--|---|
| <p><b>Acuaporina 2 (AQP2).</b></p> <p>La AQP2 se expresa en las <b>células principales del conducto colector</b> cortical y medular (Nielsen et al., 1993).</p> <p><u>Anticuerpo 1°:</u><br/> <b>Goat policlonal anti AQP2 (C-17)</b><br/>           (Santa Cruz Biotechnology, cat: sc-9882).</p> <p>Dilución: 1:100.</p> <p>Incubación: 4°C / 12 h.</p> <p><u>Anticuerpo 2°:</u><br/>           Donkey anti goat.<br/>           Fluoróforo: A-594<br/>           (Molecular Probes, cat: A-11058).</p> <p>Dilución: 1:500.</p> <p>Incubación: T A / 1 h.</p> |  | <p><b>CORTEZA</b></p>  <p><b>MÉDULA EXTERNA</b></p>  <p><b>MÉDULA INTERNA</b></p>  |

**Tabla 7.8. Inmunodetección de la ATPasa vacuolar de protones como marcador de las células intercaladas secretoras de ácido en el conducto colector.**

| MARCADOR  | LOCALIZACIÓN   | MICROGRAFIA   |
|---|--|---|
| <p><b>ATP asa Vacuolar de Protones (V-ATPasa).</b></p> <p>La V-ATPasa se expresa en las membranas apicales de las <b>células intercaladas del conducto colector</b> (Brown et al., 1992).</p> <p><u>Anticuerpo 1°:</u><br/> <b>Goat policlonal anti V-ATPasa B1 (N-20)</b><br/>           (Santa Cruz Biotechnology; Cat: sc-21206).</p> <p>Dilución: 1:100</p> <p>Incubación: 4°C / 12 h.</p> <p><u>Anticuerpo 2°:</u><br/>           Donkey anti goat.<br/>           Fluoróforo: A-488.<br/>           (Molecular Probes, cat: A-11055).</p> <p>Dilución: 1:500.</p> <p>Incubación: T A / 1 h.</p> |  | <p style="text-align: center;"><b>CORTEZA</b></p>  <p style="text-align: center;"><b>MÉDULA EXTERNA</b></p>  <p style="text-align: center;"><b>MÉDULA INTERNA</b></p>  |

## 7.2. Expresión y distribución de los canales Kv en respuesta a las dietas con alto contenido en potasio.

Las ratas se dividieron en dos grupos de estudio, un grupo control, alimentado con una dieta normal de  $K^+$  (1.2% de  $K^+$  w/w; CK) y un grupo experimental, alimentado con una dieta con alto contenido en  $K^+$  (10% de  $K^+$  w/w; AK) durante 15 días, posteriormente fueron puestas en cajas metabólicas individuales para coleccionar orina de 24 horas, así como una toma de muestra de sangre al momento de sacrificarlas para obtener los riñones.





### **Determinación de electrolitos en plasma y orina.**

Los niveles de sodio y potasio se determinaron en suero y orina por el método ión-selectivo utilizando el aparato analizador de electrolitos Nova-4.

### **Determinación de aldosterona en plasma.**

Se determinaron los niveles plasmáticos de aldosterona mediante el método de radioinmunoanálisis (RIA) con un estuche comercial (Dia Sorin Sp A Italy). Este es un método de competencia, en el cual se empleó aldosterona purificada marcada con yodo<sup>125</sup> (I<sup>125</sup>) y aldosterona purificada no marcada.

### **Western blot a partir de extractos membranales totales.**

Se utilizaron 50 µg de proteínas de membranas totales para hacer el ensayo de Western blot y comparar la expresión de cada canal Kv entre las dietas CK y AK. Adicionalmente se detectó la banda correspondiente a la proteína β-actina (constitutiva en todos los extractos membranales), la densidad óptica de la banda inmunodetectada es relativa a la cantidad de proteína total sometida a electroforesis. Se utilizaron anticuerpos de conejo anti β-actina (Santa Cruz), y los mismos anticuerpos secundarios usados para revelar las bandas de los canales (Tabla 7.1). Las bandas (blots) correspondientes a la inmunodetección se fotodocumentaron digitalmente con el equipo EDAS 290 de Kodak y la densidad óptica relativa de las bandas fue analizada con el software Kodak 1D 3.6.

### **Western blot a partir de extractos membranales enriquecidos con membranas plasmáticas.**

Se utilizaron 20 µg de proteínas de extractos membranales enriquecidos con membranas plasmáticas, obtenidas por centrifugación a 17000 g, para hacer el ensayo de Western blot y comparar la expresión de cada canal Kv entre las dietas CK y AK.

### **Inmunoperoxidasa indirecta.**

Para la inmunoperoxidasa indirecta se utilizaron los mismos anticuerpos primarios y secundarios que se usaron para el Western blot. El revelado de la reactividad positiva se realizó con Diaminobencidina, una sustancia que al ser oxidada forma un polímero de color marrón que precipita y tiñe al tejido. La observación se realizó en un microscopio óptico de campo claro de la marca Nikon, modelo Eclipse 80i, con objetivos 20X y 40X. Las micrografías se capturaron con una cámara digital marca Nikon modelo Coolpix-4300 acoplada al microscopio.

### Inmunofluorescencia indirecta (comarcaje).

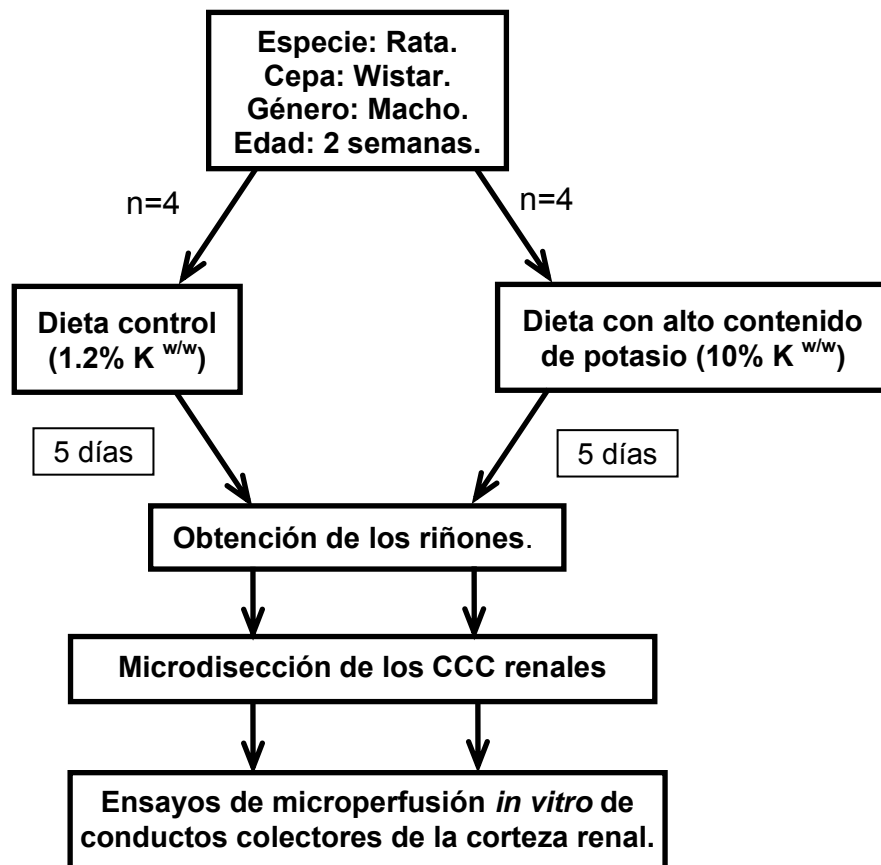
Se comarcaron las células principales con el canal Kv1.3 y las células intercaladas con el canal Kv1.3, para ello se utilizaron los anticuerpos y reactivos de la tabla siguiente:

**Tabla 7.3. Anticuerpos utilizados para los ensayos Inmunofluorescencia indirecta de células principales y células intercaladas.**

| Marcador primario  | Dilución     | Incubación  | Anticuerpo Secundario  | Dilución | Incubación |
|--|--------------|-------------|--|----------|------------|
| <b>Conejo <math>\alpha</math> Kv1.3</b><br>(Alomone)                       | 1:100        | 4 °C / 24 h | <b>Burro <math>\alpha</math> Conejo/A594</b><br>(Molecular Probes) | 1:200    | T A / 1 h  |
| <b>Cabra <math>\alpha</math> V-ATPasa</b><br>(Santa Cruz)                  | 1:200        | 4 °C / 12 h | <b>Burro <math>\alpha</math> Cabra/A488</b><br>(Molecular Probes)  | 1:500    | T A / 1 h  |
| <b>Lectina de Dolichus biflorus (aglutinina A) acoplada a Fluoresceína</b> | 5 $\mu$ g/mL | T A / 5 min |  |          |            |

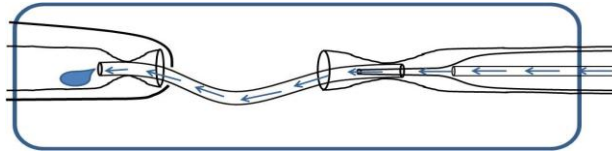
Condiciones de incubación: dilución, temperatura / tiempo de incubación. T A: Temperatura ambiente, A: Alexa

### 7.3. Expresión funcional de los canales Kv localizados en la membrana apical del conducto colector cortical.



### **Microperfusión de Conductos colectores *in vitro*.**

Para el ensayo de microperfusión de los CCC *in vitro* se utilizaron ratas de dos semanas de edad, debido a que los túbulos colectores de ratas adultas pierden su integridad al momento de la disección por presentar gran cantidad de tejido conectivo circundante. Nuevamente, se dividieron dos grupos de ratas machos, con dieta de AK y dieta CK durante cinco días, se diseccionaron los CCC y en seguida se perfundieron con solución de Burg en un baño con la misma solución, a 37°C, pH7.4,  $290 \pm 2$  mosmol/kg H<sub>2</sub>O. La cámara de perfusión se burbujeó continuamente con una mezcla de gases 95% de O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>, para mantener el pH de 7.4. El fluido tubular se recolectó antes y después de la adición de Margatoxina (MgTx, 110 pM) a la solución de perfusión. Se analizaron las concentraciones de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> del fluido colectado, por flamometría en cámara de helio, se calcularon las tasas de secreción de K<sup>+</sup> y de absorción de Na<sup>+</sup>.



**Figura 7.2. Esquema de la microrperfusión de túbulos.**

### **7.4. Análisis estadístico.**

Todos los datos se analizaron con el programa comercial Sigma Stat 3.5 y se evaluaron para determinar una distribución normal (paramétrica). Los valores de concentración de electrolitos, aldosterona, densidad óptica relativa de las bandas y transporte de K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup> presentaron una distribución paramétrica y se expresaron en términos de media  $\pm$  error estándar. Se aplicó a los datos el análisis de varianzas de una cola, combinada con la prueba de Bonferroni. Se consideró una  $P < 0.05$  con significancia estadística.

## 8. RESULTADOS.

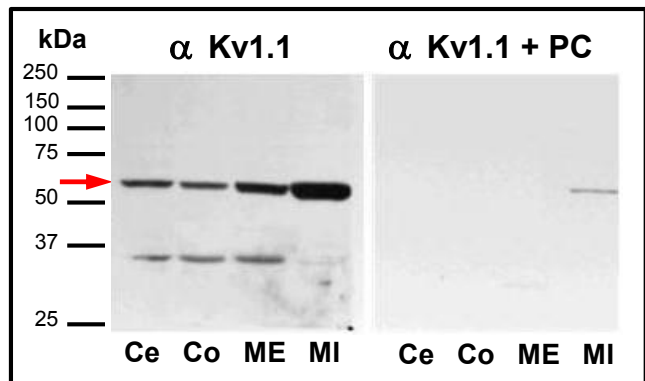
### 8.1. identificación de los canales Kv1.1, Kv1.3, Kv1.6 y Kv11.1 en el riñón de rata.

#### Detección de los canales Kv1.1, Kv1.3 y Kv1.6.

Se identificaron por Western blot las proteínas correspondientes a los canales Kv1.1, Kv1.3, Kv1.6 en extractos de membranas totales (50  $\mu$ g de proteína) en todas las secciones del riñón: corteza, médula externa y médula interna. Se utilizó como control positivo un extracto de membranas de cerebelo (Ce); como control negativo se preincubaron los anticuerpos primarios con sus correspondientes péptido control, durante una hora y a temperatura ambiente (Figuras 8.1, 8.2 y 8.3).

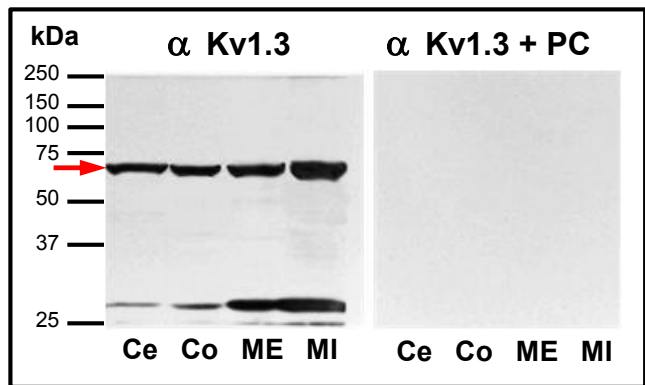
#### Figura 8.1. Western blot de los canales Kv1.1.

Se detectó una banda de ~66 kDa correspondiente al canal Kv1.1 (flecha roja, panel izquierdo) en los extractos membranales de la corteza renal (Co), médula externa (ME) y médula interna (MI) del riñón de rata. La banda no fue detectada cuando se preincubó el anticuerpo primario con su correspondiente péptido control ( $\alpha$  Kv1.1 + PC, panel derecho). Se utilizaron extractos membranales de cerebelo como control positivo (Ce).



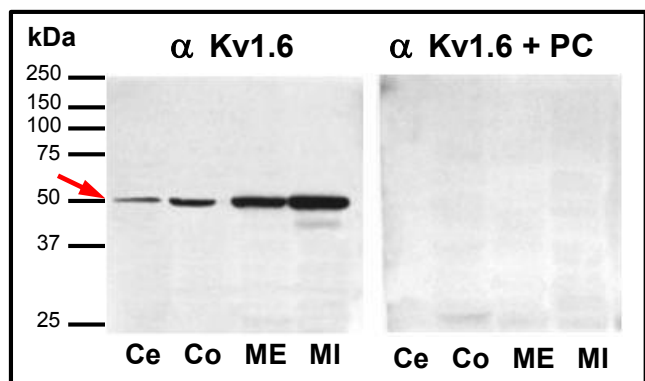
#### Figura 8.2. Western blot de los canales Kv1.3.

Se detectó una banda de ~70 kDa correspondiente al canal Kv1.3 (flecha roja, panel izquierdo) en los extractos membranales de la corteza renal (Co), médula externa (ME) y médula interna (MI) del riñón de rata. La banda no fue detectada cuando se preincubó el anticuerpo primario con su correspondiente péptido control ( $\alpha$  Kv1.3 + PC, panel derecho). Se utilizaron extractos membranales de cerebelo como control positivo (Ce).



#### Figura 8.3. Western blot de los canales Kv1.6.

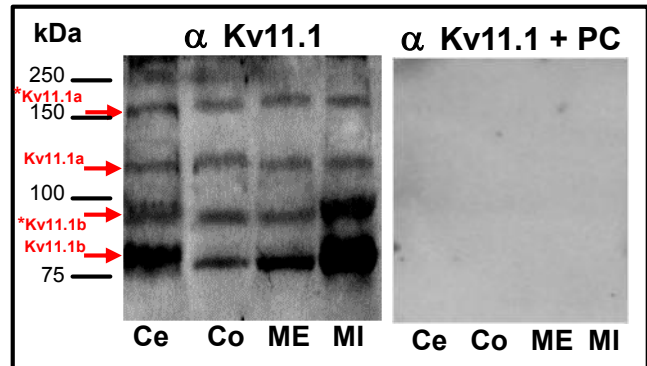
Se detectó una banda de ~50 kDa correspondiente al canal Kv1.6 (flecha roja, panel izquierdo) en los extractos membranales de la corteza renal (Co), médula externa (ME) y médula interna (MI) del riñón de rata. La banda no fue detectada cuando se preincubó el anticuerpo primario con su correspondiente péptido control ( $\alpha$  Kv1.6 + PC, panel derecho). Se utilizaron extractos membranales de cerebelo como control positivo (Ce).



### Detección de las isoformas a y b del canal Kv11.1.

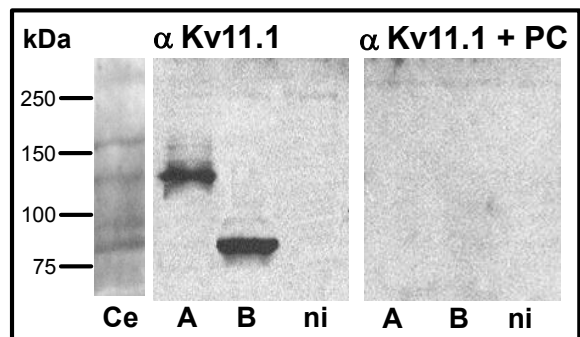
Los anticuerpos para el canal Kv11.1, detectan un epítipo localizado en el extremo carboxilo de la proteína. Las isoformas Kv11.1a y Kv11.1b, son idénticas en el extremo carboxilo y solo varían en su extremo amino. Esto permitió detectar a las dos isoformas en el riñón de rata en sus formas glicosilada y no glicosilada.

**Figura 8.4. Western blot de los canales Kv11.1a y Kv11.1b.** En el panel izquierdo, se señala con flechas las bandas correspondientes a las isoformas Kv11.1a (de ~135 kDa), y Kv11.1b (de ~80 kDa). Las bandas desaparecen al preincubar los anticuerpos primarios con su correspondiente péptido control ( $\alpha$ Kv11.1 + PC; panel derecho). Los \* indican las formas glicosiladas de los canales (\*Kv11.1a: ~155 kDa; \*Kv11.1b: ~95 kDa). Ce: Cerebelo, Co: corteza renal, ME: médula externa renal, MI: médula interna renal.



Se comprobó la especificidad de los anticuerpos en la inmunodetección de las isoformas Kv11.1a y Kv11.1b, con inmunoensayos de detección de las isoformas recombinantes (Kv11.1a y Kv11.1b) expresadas en ovocitos de *Xenopus leavis* (Figura 8.5).

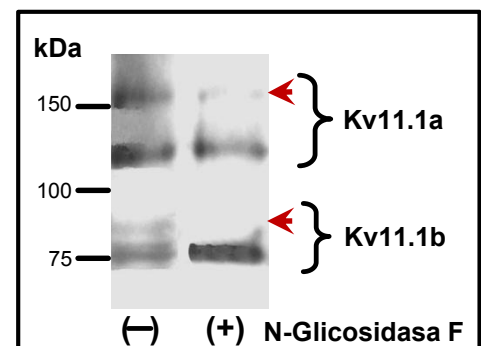
**Figura 8.5. Western blot de los canales recombinantes Kv11.1a y Kv11.1b, expresados en ovocitos de *Xenopus leavis*.** Las bandas detectadas en el panel izquierdo correspondientes a las isoformas a y b del canal Kv11.1 inyectadas en los ovocitos desaparecen al preincubar los anticuerpos primarios con el correspondiente péptido control (PC) C: extractos membranales de cerebro, A: extractos membranales de ovocitos inyectados con la isoforma Kv11.1a, B: extractos membranales de ovocitos inyectados con la isoforma Kv11.1b, ni: extractos membranales de ovocitos no inyectados.



### Las isoformas del canal Kv11.1 están glicosiladas.

Al incubar los extractos de membrana con N-Glicosidasa F, para hidrolizar las cadenas de polisacáridos unidas a la proteínas de membrana, se observó la desaparición de la banda de ~150 kDa y de ~95 kDa (Figura 8.6).

**Figura 8.6. Western blot de los canales Kv11.1a y Kv11.1b, preincubados con N-Glicosidasa F.** La bandas de ~150 y ~95 kDa desaparecen al preincubar 50  $\mu$ g de proteína con 2 U de N-glicosidasa F (Roche Diagnostics) durante 18h a 37°C, previo a la electroforesis.



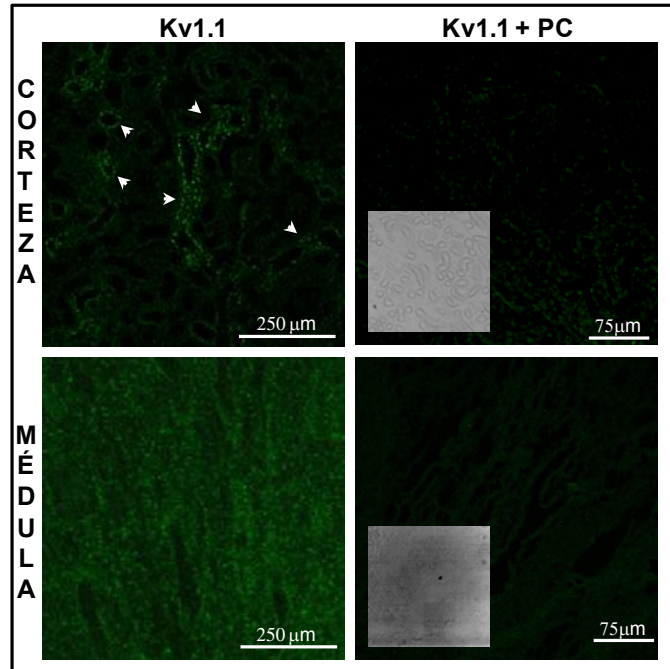
### Localización de los canales Kv en el epitelio renal.

Se identificaron los canales Kv1.1, Kv1.3, Kv1.6 y Kv11.1 por inmunofluorescencia indirecta en cortes sagitales de corteza y médula renal, donde se localizaron en diferentes estructuras tubulares en la corteza y en la médula renal. Como control negativo se preincubaron los anticuerpos primarios con su correspondiente péptido control, durante una hora, a temperatura ambiente. Las micrografías fueron obtenidas por microscopía confocal. Las flechas señalan a las estructuras tubulares donde se observó inmunoreactividad positiva.

**Figura 8.7. Inmunofluorescencia indirecta para el canal Kv1.1.**

Paneles izquierdos: inmunorreactividad positiva para los canales Kv1.1 en la corteza (señalada con puntas de flecha) y en la médula renal.

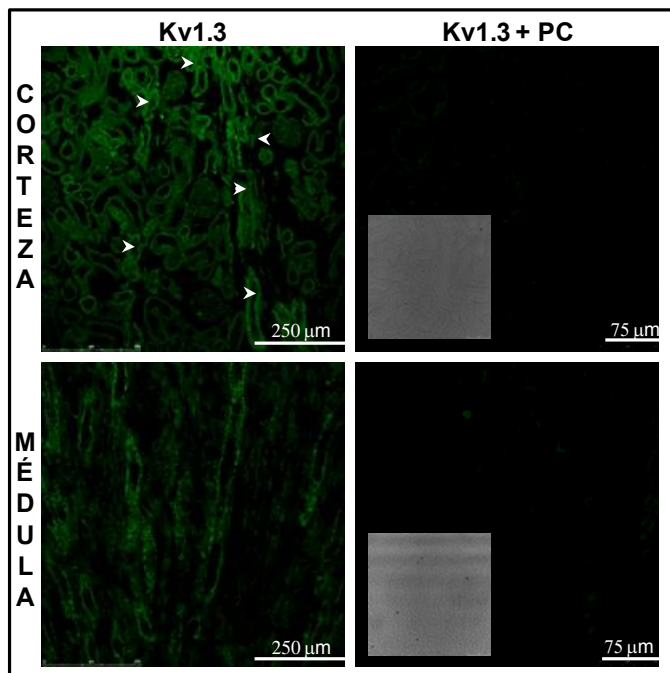
Paneles derechos: control negativo, el anticuerpo primario se preincubó con su correspondiente péptido control (Kv1.1 + PC). No se detectó inmunorreactividad.



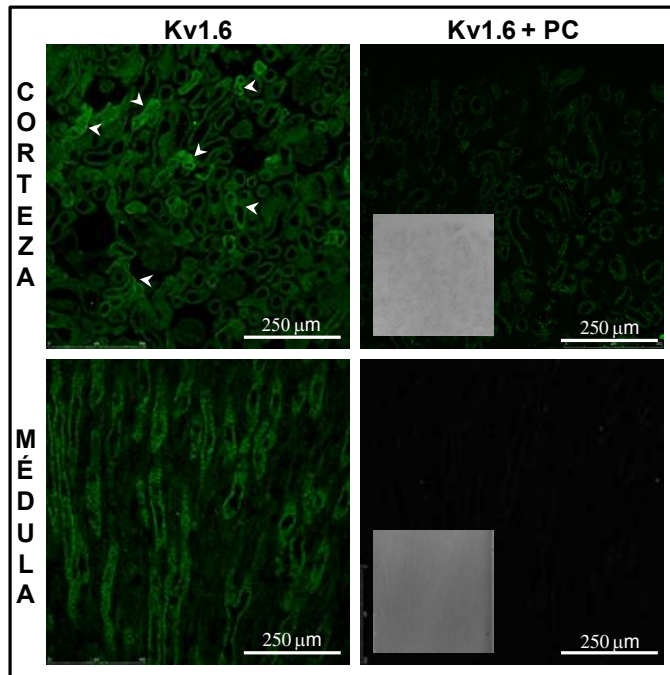
**Figura 8.8. Inmunofluorescencia indirecta para el canal Kv1.3.**

Paneles izquierdos: inmunorreactividad positiva para los canales Kv1.3 en la corteza (señalada con puntas de flecha) y en la médula renal.

Paneles derechos: control negativo, el anticuerpo primario se preincubó con su correspondiente péptido control (Kv1.3 + PC). No se detectó inmunorreactividad.



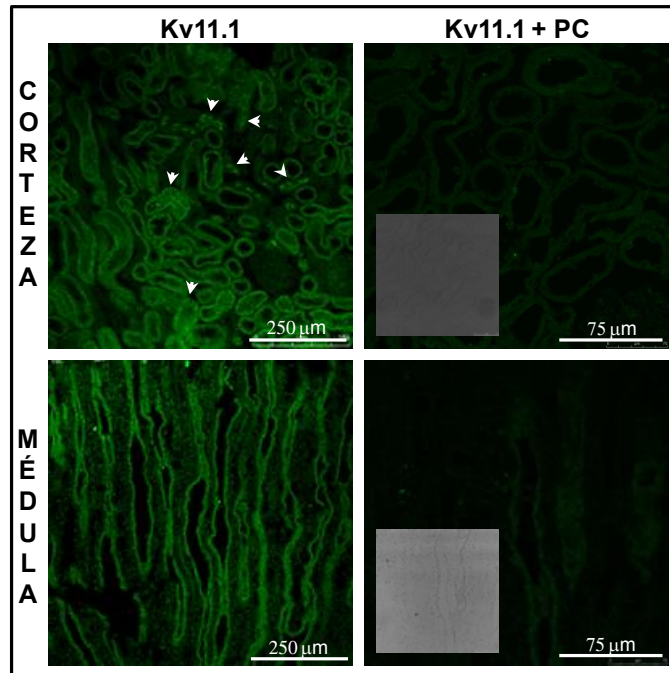




**Figura 8.9. Inmunofluorescencia indirecta para el canal Kv1.6.**

Paneles izquierdos: inmunorreactividad positiva para los canales Kv1.6 en la corteza (señalada con puntas de flecha) y en la médula renal.

Paneles derechos: control negativo, el anticuerpo primario se preincubó con su correspondiente péptido control (Kv1.6 + PC). No se detectó inmunorreactividad.



**Figura 8.10. Inmunofluorescencia indirecta para el canal Kv11.1.**

Paneles izquierdos: inmunorreactividad positiva para los canales Kv11.1 en la corteza (señalada con puntas de flecha) y en la médula renal.

Paneles derechos: control negativo, el anticuerpo primario se preincubó con su correspondiente péptido control (Kv11.1 + PC). No se detectó inmunorreactividad.

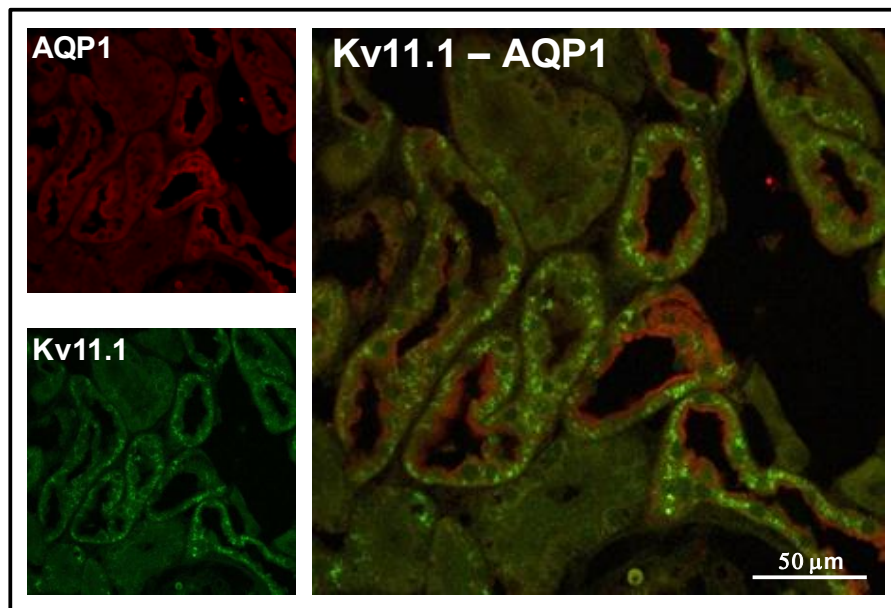
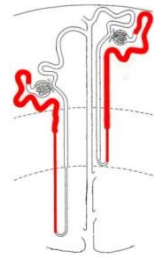
Se detectó la reactividad positiva para los canales Kv en distintas estructuras tubulares de la corteza. En la médula renal todos los canales se localizaron en los conductos colectores.

## 8.2. Localización diferencial de los canales Kv1 en los segmentos de la nefrona.

Para establecer la localización específica de los canales Kv1.1, Kv1.3, Kv1.6 y Kv11.1 en la corteza y en la médula renal, estos se comarcaron con proteínas que se expresan de forma exclusiva en distintos segmentos tubulares de la nefrona. (Metodología 7.1). A continuación se presentan las micrografías de los cortes histológicos con inmunoreactividad positiva para los Kv, ordenadas por su colocación en los segmentos tubulares de la nefrona: TP, GAH, TCD y CC.

### Túbulo proximal (TP).

Los túbulos proximales fueron marcados con anticuerpos anti AQP1, que se expresa en la membrana apical (borde de cepillo) de los túbulos contorneado y recto proximal (en la región cortical), y en la porción delgada descendente del asa de Henle (en la médula).

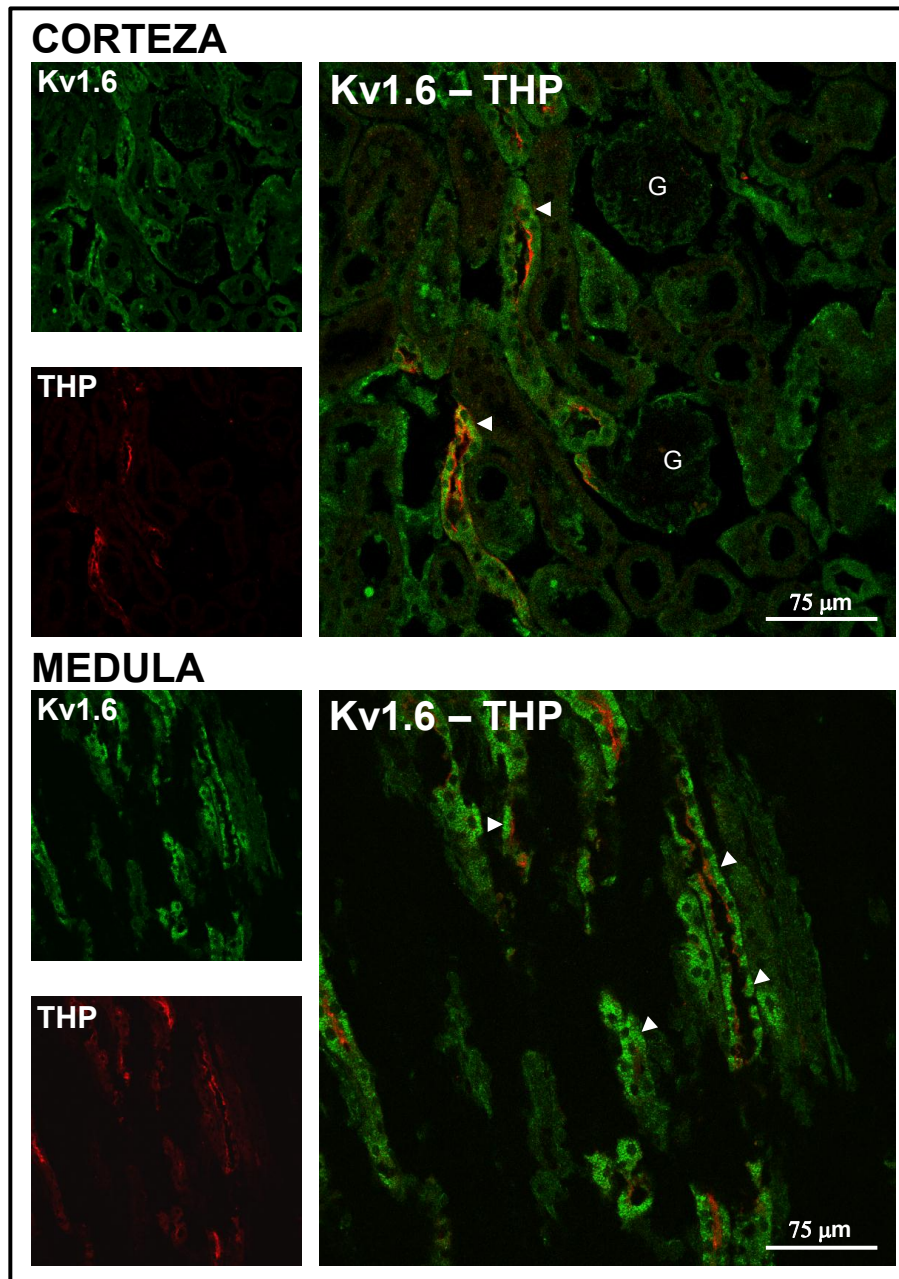
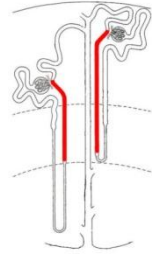


**Figura 8.11. Localización del canal Kv11.1 en los túbulos proximales.** El canal Kv11.1 se localiza en el citoplasma de los túbulos proximales (verde) comarcados con AQP1 (rojo) en la corteza renal.



## Porción gruesa ascendente del asa de Henle (GAH).

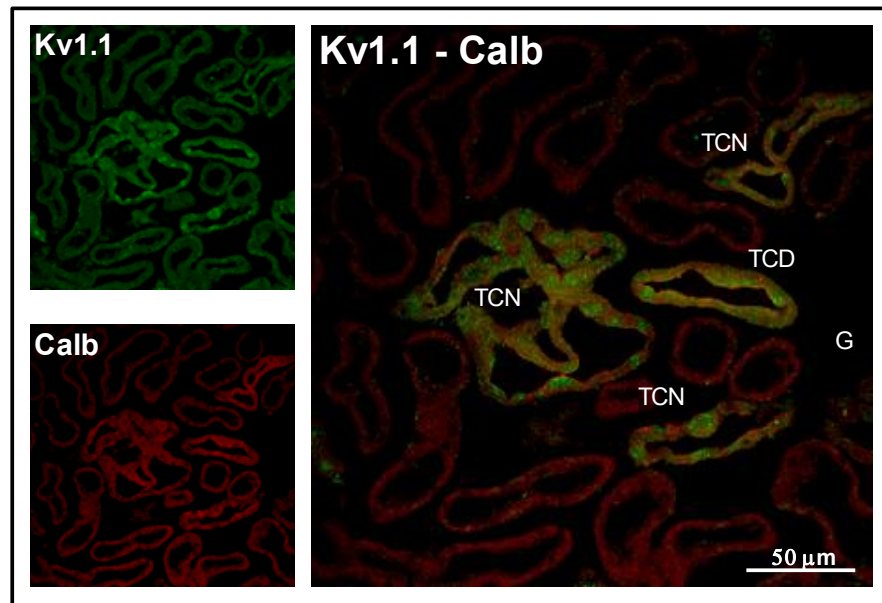
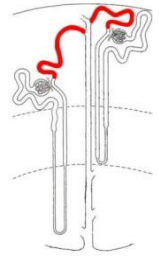
La porción gruesa ascendente del asa de Henle se marcó con anti glicoproteína Tamm-Horsfall, y comprende una región medular y una región cortical. En esta porción tubular se localizó al canal Kv1.6.



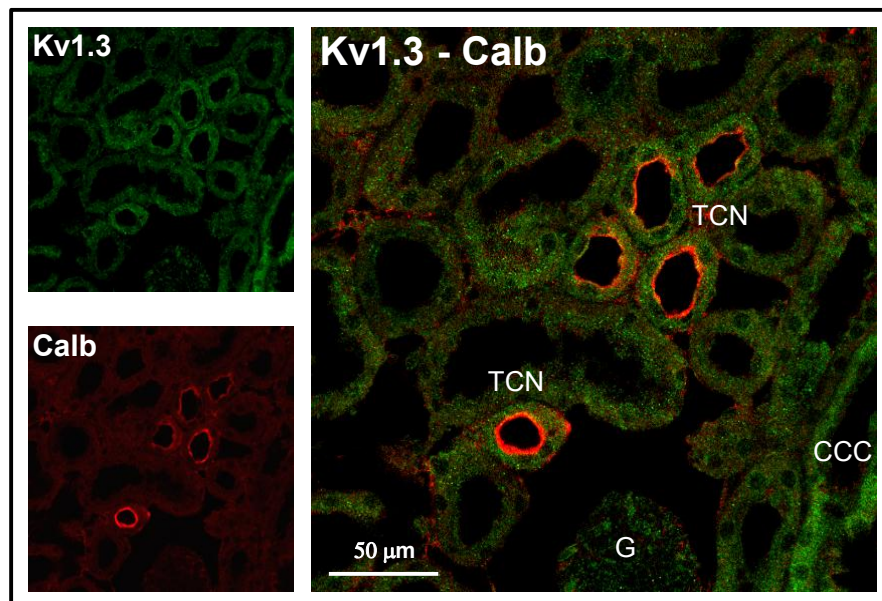
**Figura 8.12. Localización del canal Kv1.6 en la GAH.** El canal Kv1.6 se localiza en el citoplasma y en la región basolateral (punta de flecha) de la porción gruesa ascendente del asa de Henle (verde); comarcados con GPTH (rojo) tanto en la corteza como en la médula renal. En ningún caso se observa colocalización de ambas proteínas en la membrana luminal.

## Túbulo contorneado distal (TCD) y túbulo conector (TCN).

El TCD y el TCN se localizan en la corteza renal, se marcaron con anti Calbindina-D<sub>28 kDa</sub>. En estos segmentos tubulares se localizaron los canales Kv1.1, Kv1.3, Kv1.6 y Kv11.1.

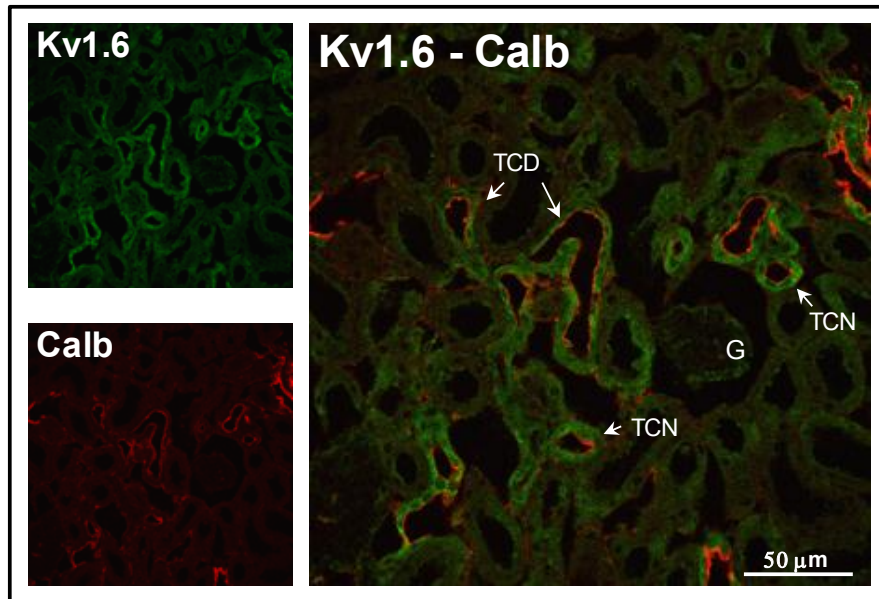
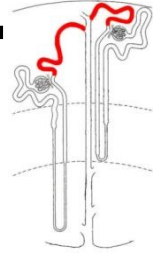


**Figura 8. 13. Localización del canal Kv1.1 en el TCD y TCN.** El canal Kv1.1 se localiza perinuclear en el TCD y en el TCN (verde) comarcados con anti Calb (rojo).

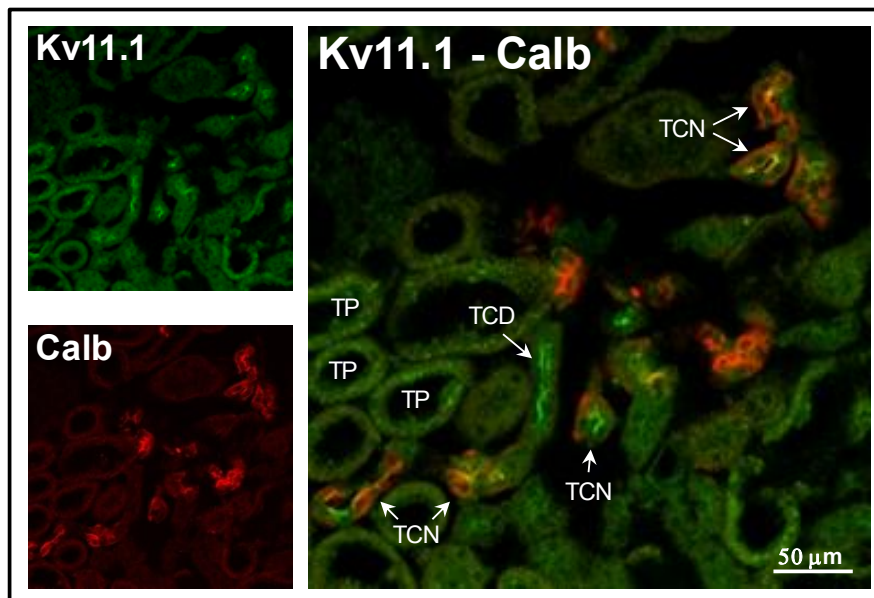


**Figura 8.14. Localización del canal Kv1.3 en el TCD.** El canal Kv1.3 se localiza en el citoplasma de las células del TCD (verde) con perfil apical, comarcados con anti Calb (rojo).

Túbulo contorneado distal (TCD) y túbulo conector (TCN).



**Figura 8.15. Localización del canal Kv1.6 en el TCD y TCN.** El canal Kv1.6 se localiza en el citoplasma de las células del TCD y TCN (verde) comarcados con anti Calb (rojo).

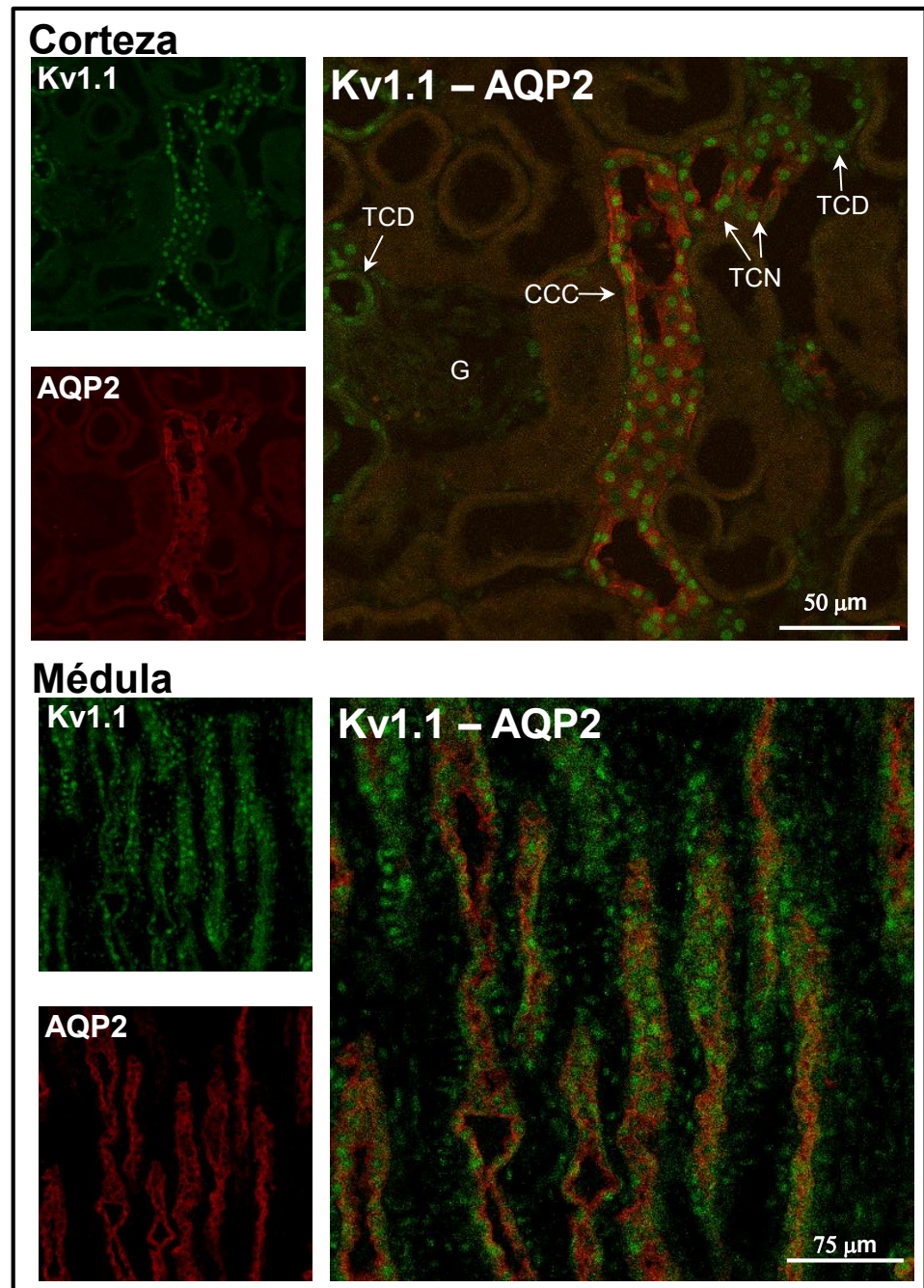
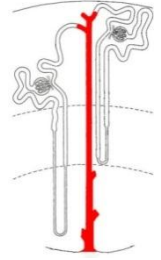


**Figura 8.16. Localización del canal Kv11.1 en el TCD y TCN.** El canal Kv11.1 se localiza en la membrana apical de las células del TCD y del TCN (verde) comarcados con anti Calb (rojo).

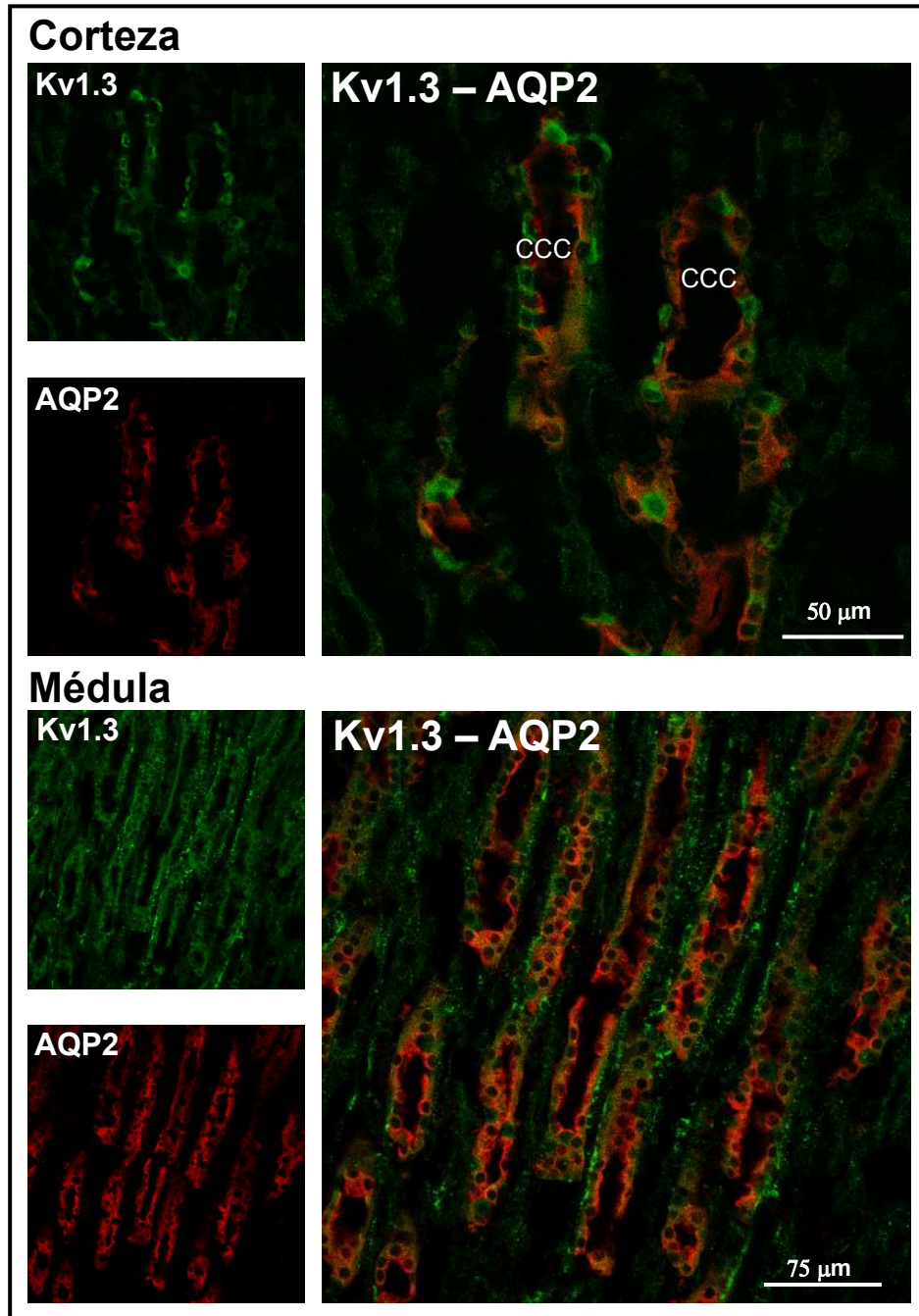
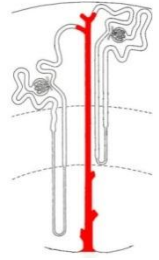


## Conducto colector (CC).

El CC se marcó con anti AQP2. El CC se extiende desde la corteza (conducto colector cortical: CCC), atraviesa las diferentes capas medulares (conducto colector medular: CCM), hasta llegar a la papila renal. Se localizaron los canales Kv1.1, Kv1.3, Kv1.6 y Kv11 a lo largo de todo el conducto, tanto en la porción cortical como en la porción medular.

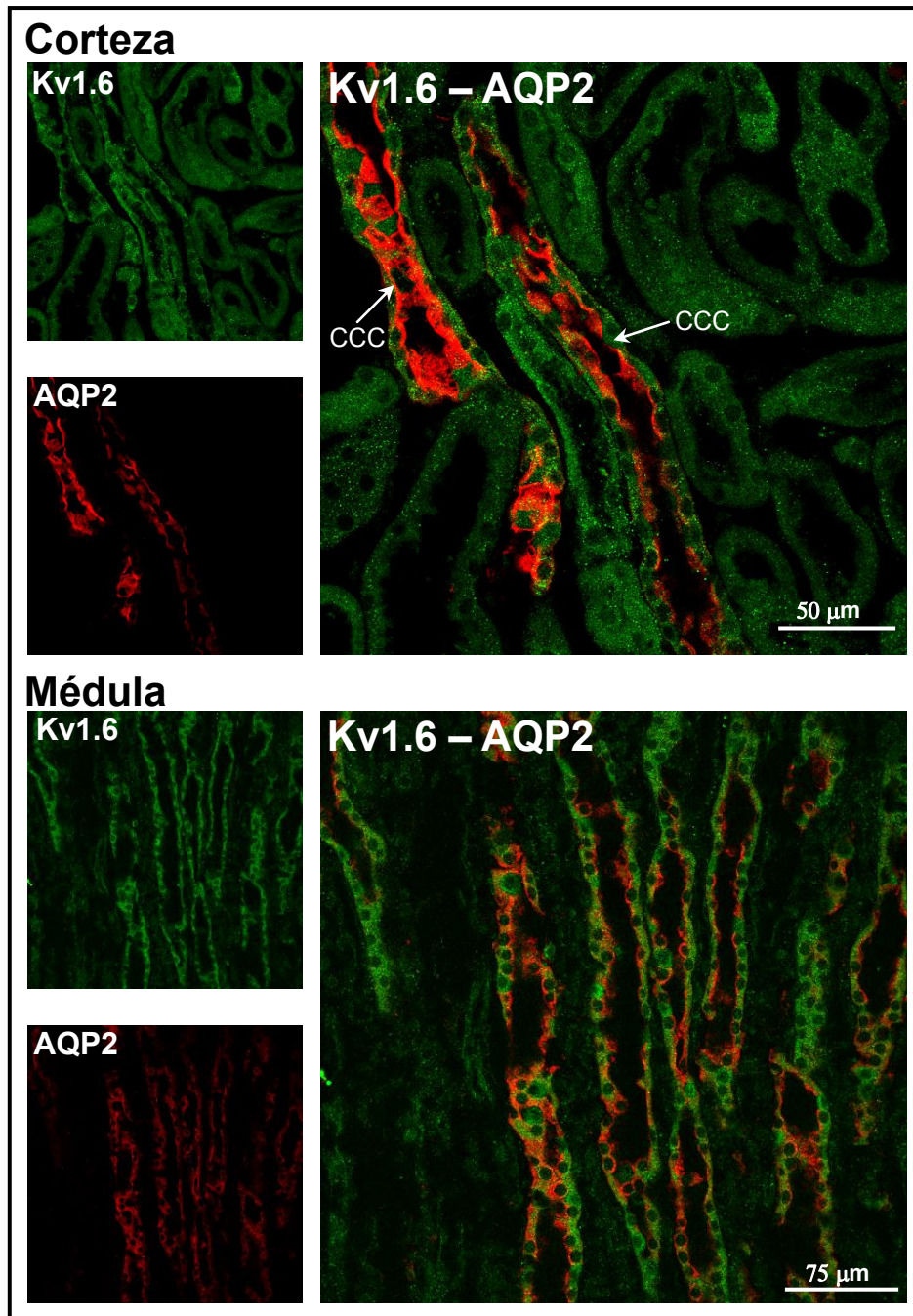
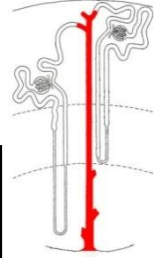


**Figura 8.17.** Localización del canal Kv1.1 en el CCC y CCM. El canal Kv1.1 se localiza perinuclear en las células del TCD y del TCN (verde). Este último comarcado con anti AQP2 (rojo), en la corteza renal. El canal Kv1.1 también se localiza en el CC tanto en la corteza como en la médula renal. En la corteza renal se aprecia una marca más definida que en la médula.

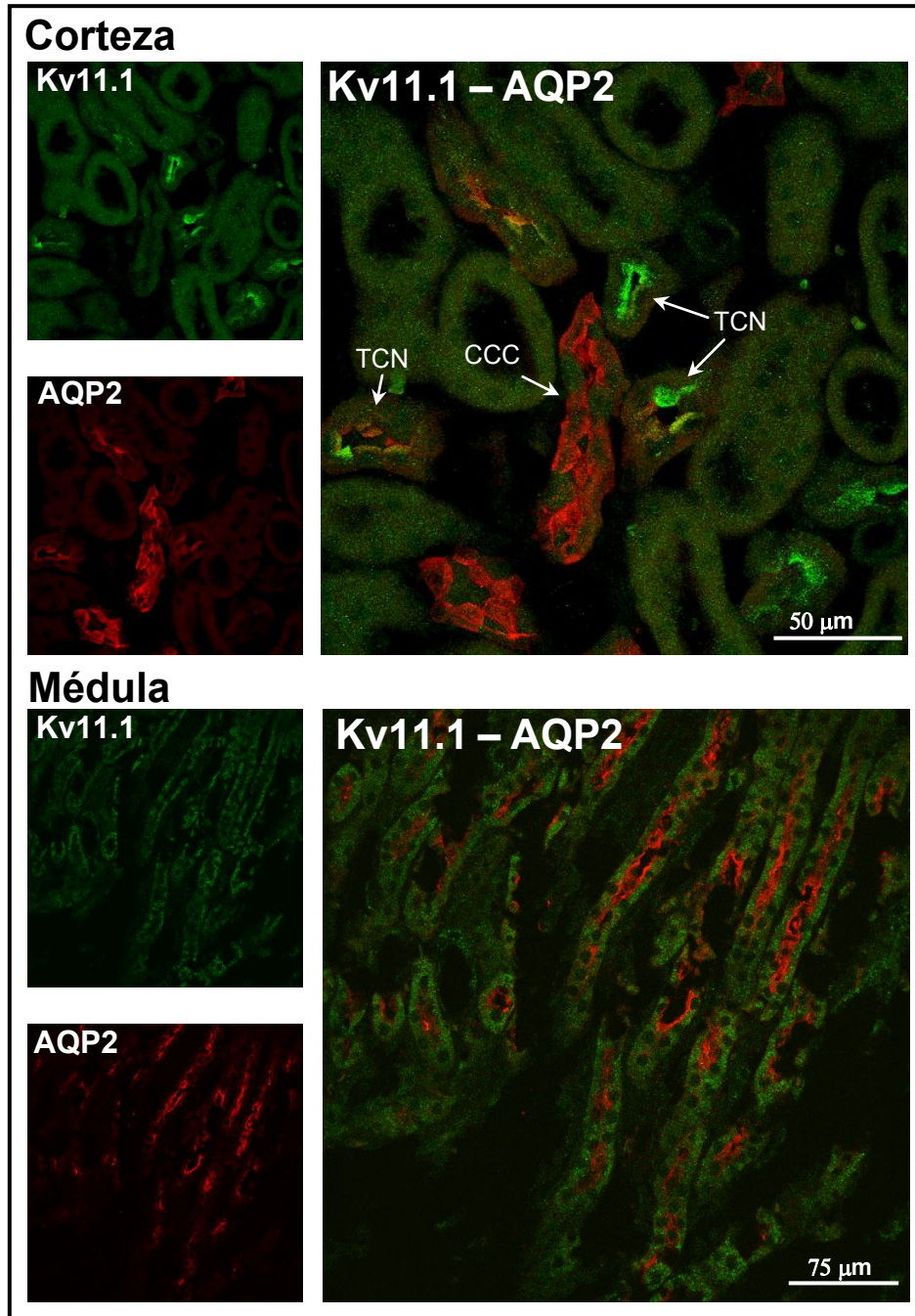
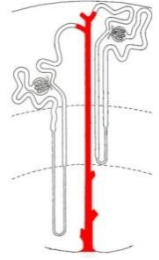


**Figura 8.18. Localización del canal Kv1.3 en el CCC y CCM.** El canal Kv1.3 se localiza en el citoplasma, con perfil basolateral, de las células del CC (verde), comarcado con anti AQP2 (rojo), tanto en la porción cortical como en la porción medular.





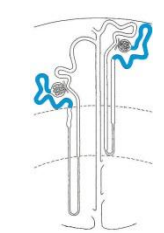
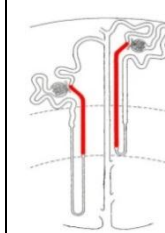
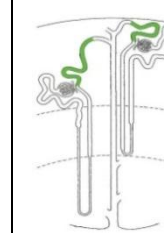
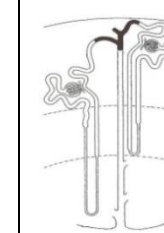
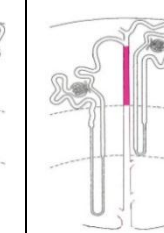
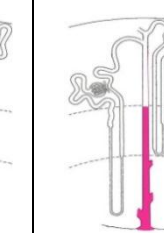
**Figura 8.19. Localización del canal Kv1.6 en el CCC y CCM.** El canal Kv1.6 se localiza en el citoplasma, con perfil apical y basolateral, de las células del CC (verde), comarcado con anti AQP2 (rojo), tanto en la porción cortical como en la porción medular.



**Figura 8.20. Localización del canal Kv11.1 en el CCM.** El canal Kv11.1 se localiza en las células del TCN (verde) con un perfil apical, comarcado con anti AQP2 (rojo) en la corteza renal. El canal no fue detectado en el CCC, sin embargo en la médula renal, el canal se localiza en el citoplasma de las células del CCM.

En la tabla siguiente se resume la localización de los canales Kv1.1, Kv1.3, Kv1.6 y Kv11.1 en los diferentes segmentos de la nefrona.

**Tabla 8.2. Distribución de los canales Kv en la nefrona.**

| Canal Kv      | TCP   | GAH   | TCD   | TCN  | CCC   | CCM   |
|---------------|---|---|---|--|---|---|
| <b>Kv1.1</b>  |  |  |  |  |  |  |
| <b>Kv1.3</b>  |   |   |   | Citoplásmica y apical  | Citoplásmica  | Citoplásmica  |
| <b>Kv1.6</b>  |   | Citoplásmica basolateral  | Citoplásmica basolateral  | Citoplásmica basolateral   | Citoplásmica apical y basolateral   | Citoplásmica basolateral  |
| <b>Kv11.1</b> | Citoplásmica  |   | Apical  | Apical   |   | Citoplásmica  |

Cabe señalar que en el Western blot, la separación electroforética de las proteínas permitió identificar, por su tamaño molecular, a las dos isoformas del canal Kv11.1 (a y b) en el tejido renal, debido a que ambas comparten el mismo epítipo para el anticuerpo utilizado. Sin embargo, no fue posible determinar por Inmunofluorescencia la localización diferencial de cada isoforma en particular, por lo que la localización del canal Kv11.1 en los segmentos tubulares puede corresponder a una o ambas isoformas.

La respuesta renal a un aumento del contenido de  $K^+$  en la dieta consiste principalmente en elevar la excreción urinaria del  $K^+$ , la cual es consecuencia de un incremento en la secreción de  $K^+$ , en la porción distal de la nefrona (Wright et al., 1971; Stanton y Giebisch, 1982). Esta respuesta adaptativa del riñón se asocia a un incremento en la densidad de los canales de  $K^+$  ROMK y MaxiK en las membranas lumbales del TCN y del CCC (Najjar et al., 2005; Wang y Giebisch, 2009).

Los canales Kv identificados en el epitelio renal, se localizaron principalmente en las porciones distales de las nefronas, en donde tiene lugar la regulación fina de la secreción del  $K^+$ . Para determinar su regulación por el contenido de K, se probó el efecto de una dieta con alto contenido en  $K^+$  sobre la expresión y distribución de los canales de potasio Kv1.1, Kv1.3, Kv1.6 y Kv11.1 en el epitelio renal (sección 8.3).



### 8.3. Efecto de una dieta con alto contenido en K<sup>+</sup> (AK) sobre la expresión de los canales Kv1.1, Kv1.3, Kv1.6 y Kv11.1.

Se estudiaron dos grupos de ratas, uno con una dieta control de K<sup>+</sup> (CK: 1.2% de K<sup>+</sup> w/w) y otro con una dieta alta en K<sup>+</sup> (AK: 10% de K<sup>+</sup> w/w) durante 15 días. Se tomaron muestras de sangre y orina de 24 horas de ambos grupos de ratas para medir los niveles de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> séricos y urinarios, así como la concentración de aldosterona sérica, con la finalidad de verificar la adaptación renal al incremento en la ingesta de K<sup>+</sup>. En la tabla siguiente se resumen los resultados de las mediciones de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y aldosterona.

**Tabla 8.3. Efecto de una dieta con alto contenido en K<sup>+</sup> sobre los niveles de electrolitos y aldosterona.**

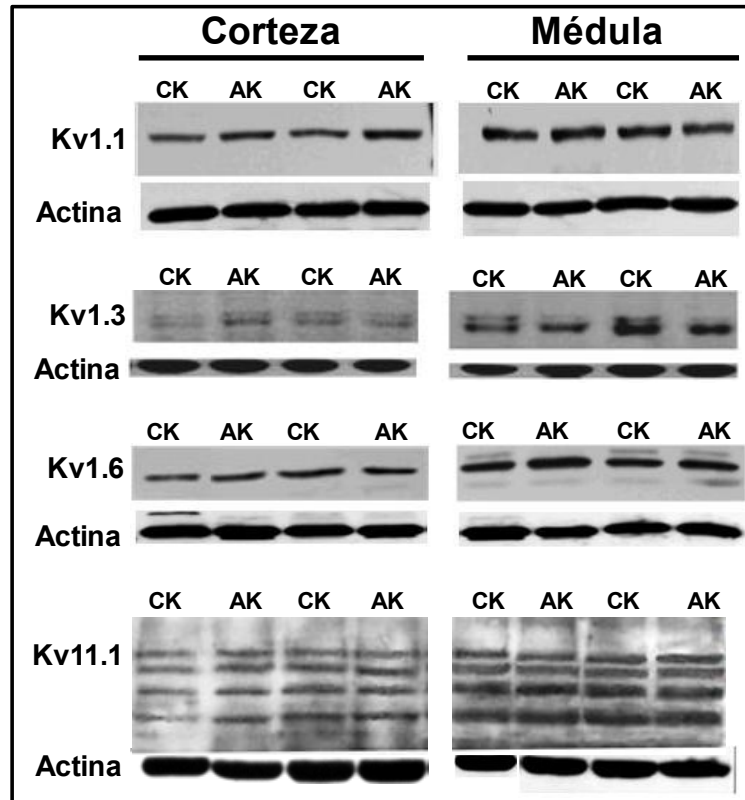
| Dieta   | Na <sup>+</sup> sérico (mEq/L) | K <sup>+</sup> sérico (mEq/L) | Na <sup>+</sup> urinario (mEq/mL) | K <sup>+</sup> urinario (mEq/ mL) | Aldosterona sérica (pg/mL) |
|---|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|
| Control K (CK)<br>(1.2% K <sup>+</sup> )<br>(n=4) | 147.0 ± 0.6                    | 4.3 ± 0.3                     | 0.022 ± 0.001                     | 0.055 ± 0.005                     | 213.8 ± 20                 |
| Alto K (AK)<br>(10% K <sup>+</sup> )<br>(n=6)     | 145.6 ± 0.8                    | 4.2 ± 0.2                     | 0.014 ± 0.003                     | <b>0.277 ± 0.02*</b>              | <b>1097.0 ± 200.1*</b>     |

Los valores son el promedio de n ± error estándar. Las ratas fueron alimentadas durante 15 días y posteriormente se colectaron las muestras de orina de 24 h y sangre. \*p<0.05 vs control K.

Los niveles séricos de Na<sup>+</sup> y de K<sup>+</sup> no se modificaron estadísticamente entre las ratas de la dieta CK y las ratas de la dieta AK. Tampoco los niveles urinarios de Na<sup>+</sup> presentaron cambios significativos entre los dos grupos. Sin embargo la excreción urinaria de K<sup>+</sup> así como los niveles de aldosterona sérica se incrementaron cinco veces en el grupo AK con respecto los valores del grupo CK. Estos resultados demostraron que las ratas con una dieta AK tuvieron una respuesta excretora renal de K<sup>+</sup> positiva.

## Efecto de la dieta AK sobre la expresión de los canales Kv en el epitelio renal.

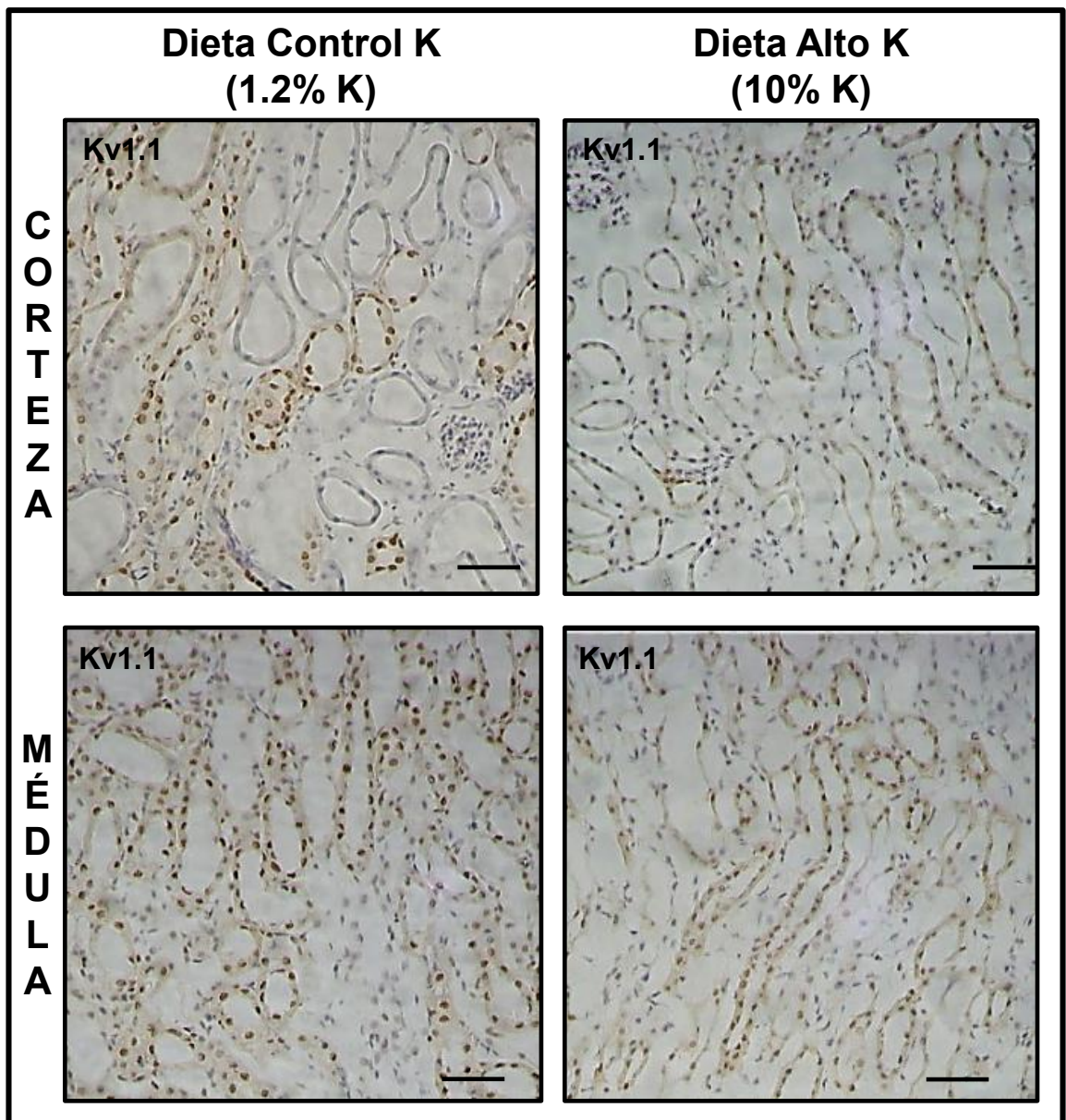
Se compararon los niveles de expresión de las proteínas correspondientes a los canales Kv1.1, Kv1.3, Kv1.6 y Kv11.1 en los dos grupos CK y AK, para evaluar la respuesta en la síntesis de proteínas de los canales al incremento en la ingesta de K<sup>+</sup>. No se observaron cambios significativos en los niveles de expresión de las proteínas a partir de los extractos de membranas totales (incluyen membranas plasmáticas y microsomales).



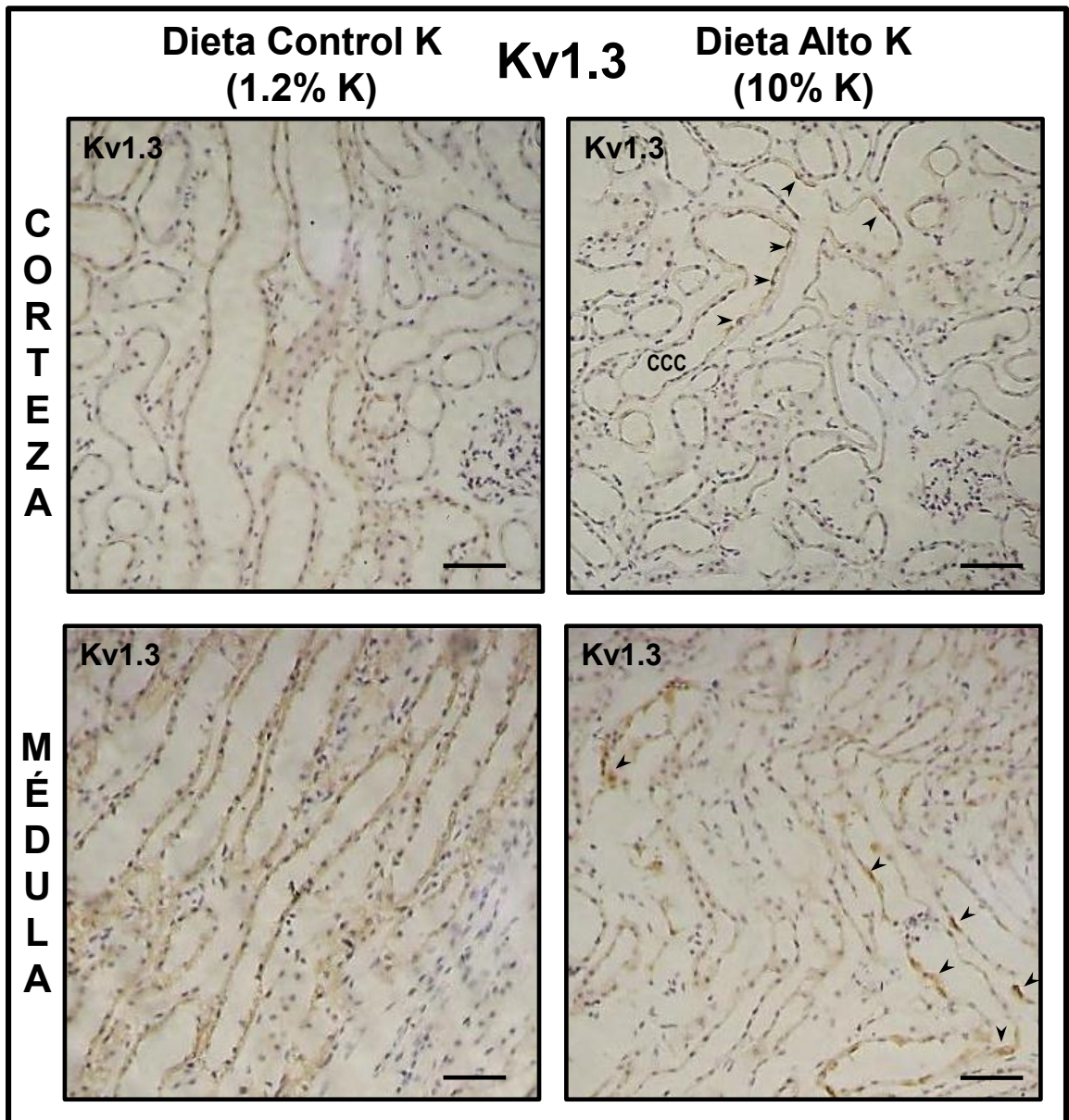
**Figura 8. 21. Efecto de una dieta con alto contenido en K<sup>+</sup> sobre la expresión de los canales Kv1.1, Kv1.3, Kv1.6 y Kv11.1a y Kv11.1b.** Western blot comparativo de la expresión de las proteínas de los canales Kv en la corteza y en la médula renal, de extractos de membranas totales, entre los dos grupos. CK: grupo control (1.2% de K<sup>+</sup> en la dieta); AK: grupo experimental (10% de K<sup>+</sup> en la dieta).

## Efecto de la dieta AK sobre la distribución de los canales Kv en el epitelio renal.

Se comparó la distribución de los canales Kv principalmente en los conductos colectores en la corteza (CCC) y en la médula (CCM) renales, entre el grupo CK y el grupo AK.

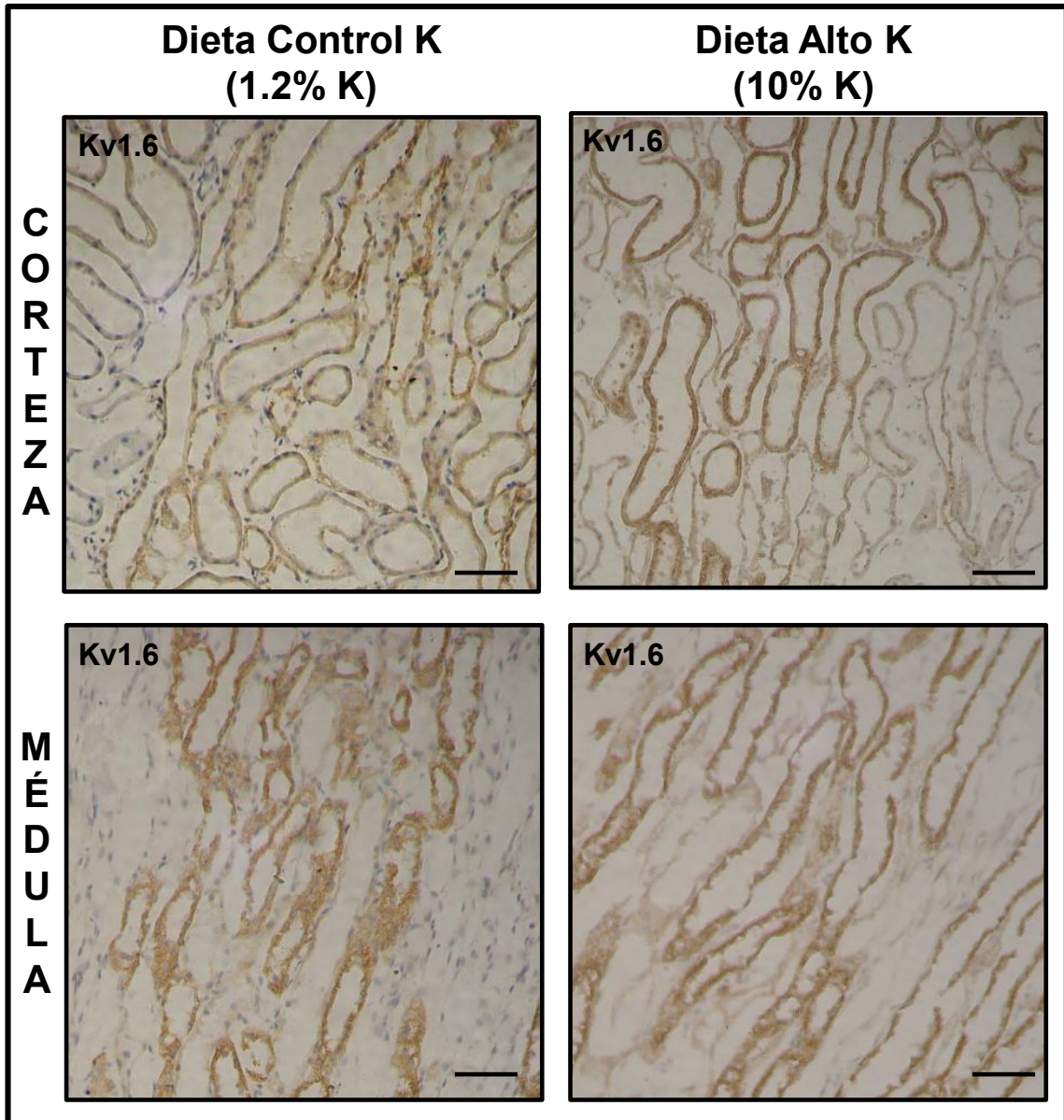


**Figura 8.22. Inmunoperoxidasa indirecta para el canal Kv1.1 en la corteza y en la médula renal, entre los grupos CK y AK.** Se observa inmunorreactividad positiva perinuclear sin cambios de localización entre los dos grupos. Imágenes capturadas con objetivos 20X. La barra corresponde a 50  $\mu\text{m}$ .



**Figura 8.23. Inmunoperoxidasa indirecta para el canal Kv1.3 en la corteza y en la médula renal, entre los grupos CK y AK.** En CK se observa la inmunoreactividad positiva para el canal Kv1.3 en el citoplasma de las células de los CCC y CCM (paneles izquierdos). Con la dieta AK se observa una relocalización de la inmunoreactividad hacia las membranas apicales de algunas células de los CCC y CCM (putas de flechas). En la figura 8.26 se presentan micrografías con mayor aumento, donde se aprecian dichos cambios más claramente. La barra corresponde a 50  $\mu$ m.





**Figura 8. 24. Inmunoperoxidasa indirecta para el canal Kv1.6 en la corteza y en la médula renal, entre los grupos CK y AK.** Se observa inmunorreactividad positiva para el canal Kv1.6 en diferentes estructuras tubulares, sin cambios aparentes entre CK y AK, tanto en la corteza como en médula renal. La barra corresponde a 50  $\mu$ m.

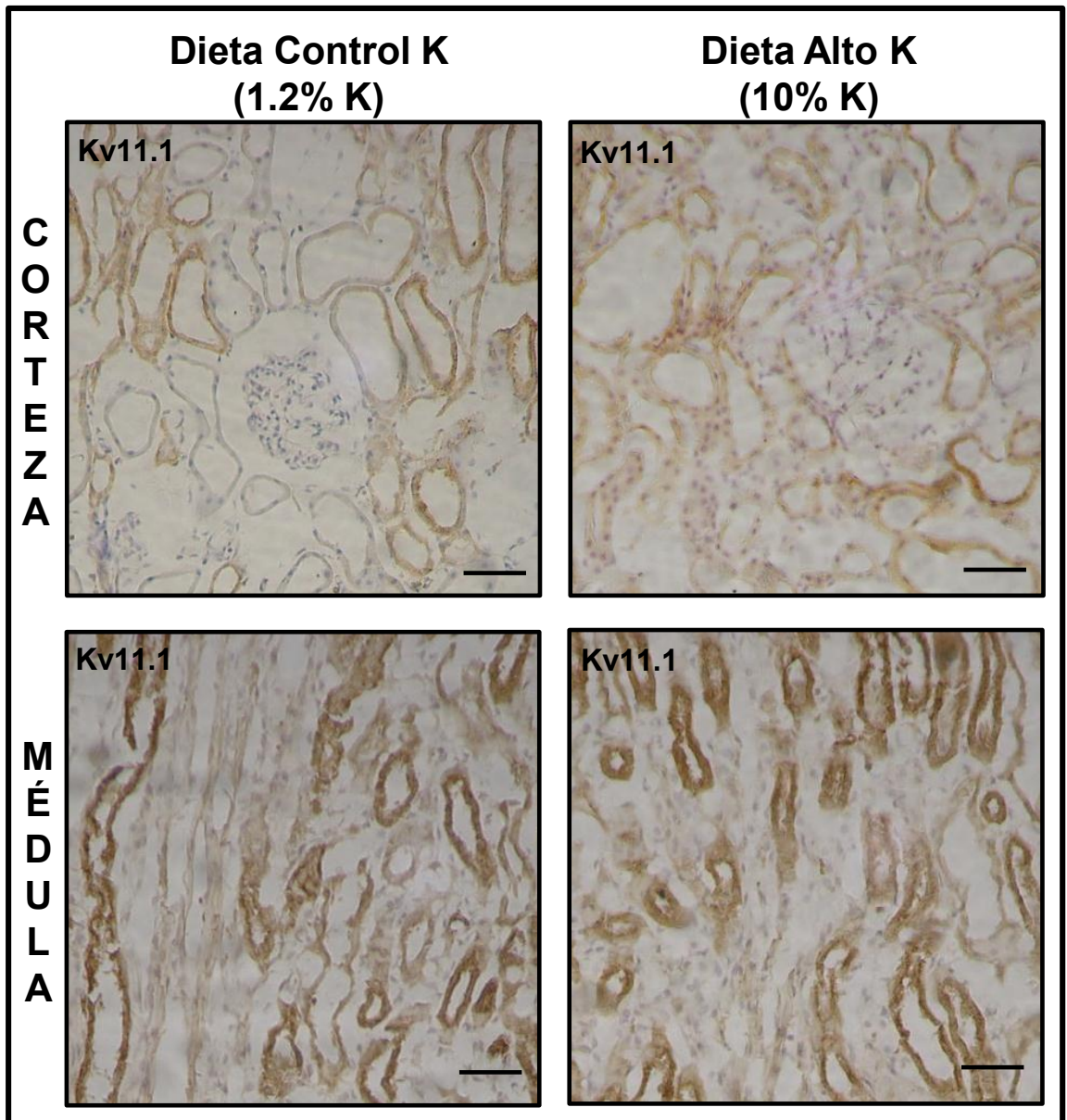
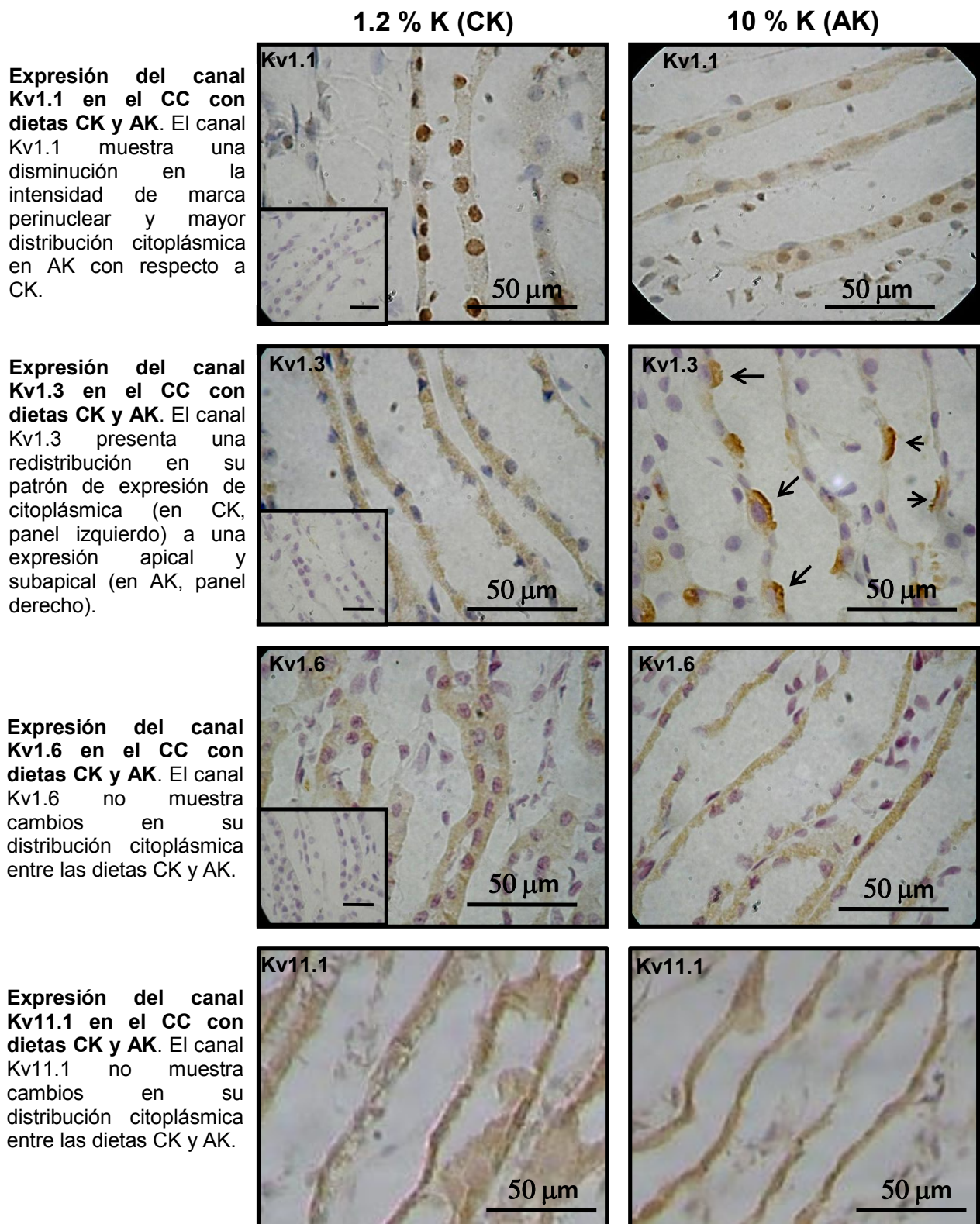


Figura 8. 25. Inmunoperoxidasa indirecta para el canal Kv11.1 en la corteza y en la médula renal, entre los grupos CK y AK. Se observa inmunoreactividad positiva para el canal Kv11.1 en diferentes estructuras tubulares, sin cambios aparentes entre CK y AK, tanto en la corteza como en médula renal. La barra corresponde a 50  $\mu$ m.



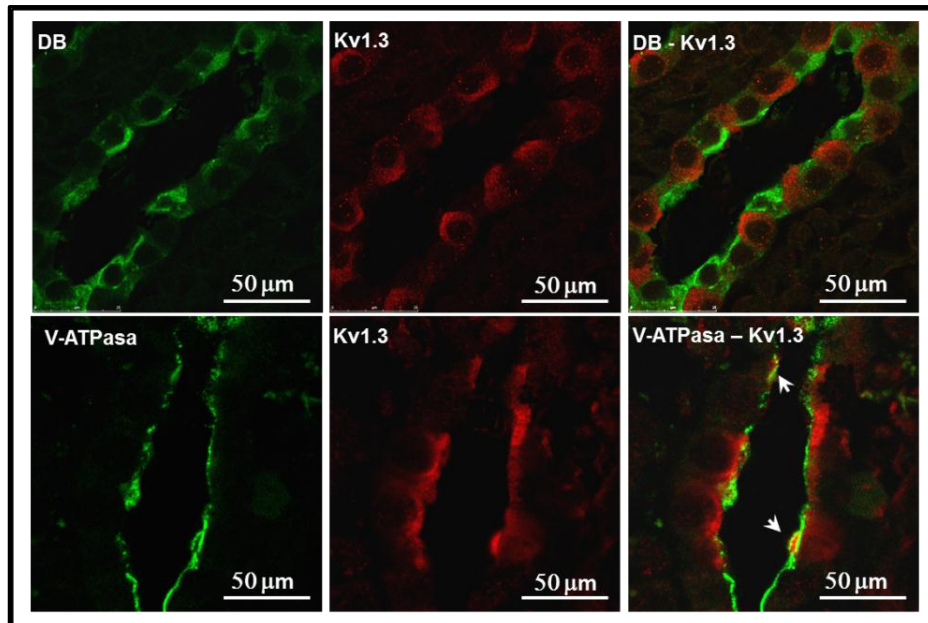


**Figura 8.26. Efecto de la dieta AK sobre la distribución de los canales Kv1.1, Kv1.3, Kv1.6 y Kv11.1 en el epitelio renal.** Micrografías Obtenidas con un objetivo 40X. El recuadro izquierdo que parece en los paneles CK en la columna izquierda, corresponden al control negativo de la inmunoperoxidasa para cada canal, donde se preincubó el anticuerpo primario con su correspondiente péptido control.

Solo los canales Kv1.1 y Kv1.3 presentaron un cambio en la distribución subcelular, en respuesta a una dieta con alto contenido en  $K^+$ . El canal Kv1.1 cambió parcialmente de una distribución perinuclear a una citoplásmica y el canal Kv1.3 de una distribución citoplásmica se localizó apical y subapical en algunas células (Figura 8.26).

### Expresión diferencial del canal Kv1.3 con la dieta con alto contenido en K.

El canal Kv1.3, localizado en el CC, mostró un cambio significativo en su distribución subcelular, como respuesta a una dieta con alto contenido en  $K^+$ . En condiciones de una dieta control de  $K^+$ , el canal Kv1.3 se localizó en las membranas citoplasmáticas a lo largo de todo el CC, pero en condiciones de una dieta con alto contenido en  $K^+$  se redistribuyó hacia las membranas apicales y subapicales de algunas células del CC, tanto en la corteza como en la médula renal. Para determinar el tipo celular donde se presentó el fenómeno de relocalización, se realizó un comarcaje para el canal Kv1.3 con lectina de *Dolichus biflorus* acoplada a fluoresceína, la cual marca las membranas apicales de las células principales, y un comarcaje del canal Kv1.3 con la V-ATPasa de  $H^+$ , que se expresa exclusivamente en las células intercaladas secretoras de ácido del CC. Se determinó la localización del canal Kv1.3 en las membranas apicales de las células intercaladas ácido-secretoras, en condiciones de dieta AK.

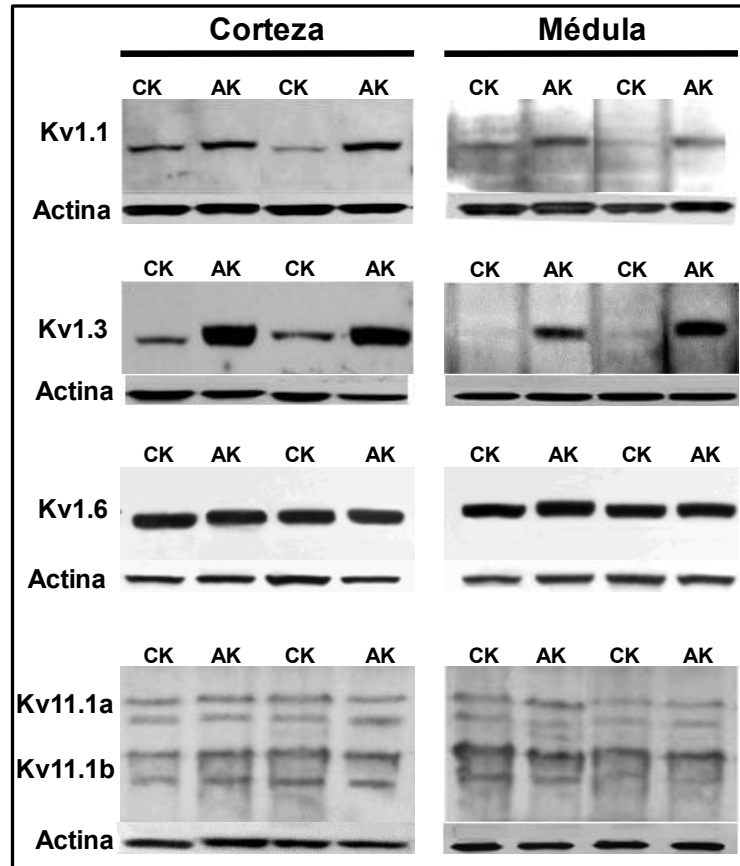


**Figura 8.27. Localización diferencial del canal Kv1.3 en las células intercaladas.** El canal Kv1.3 fue inmunoteñido en color rojo con anticuerpos anti Kv1.3 y A594 (paneles centrales). Las células principales se marcaron con lectina de *Dolichus biflorus* (DB) acoplada a fluoresceína, en color verde (panel superior izquierdo). En otro corte las células intercaladas secretoras de ácido fueron marcadas con anticuerpos anti V-ATPasa y A488 (verde, panel inferior izquierdo). En el panel superior derecho se demuestra la ausencia del canal Kv1.3 en las células principales y en el panel inferior derecho, la localización del canal Kv1.3 y la V-ATPasa en la membrana apical de las células intercaladas (flechas).



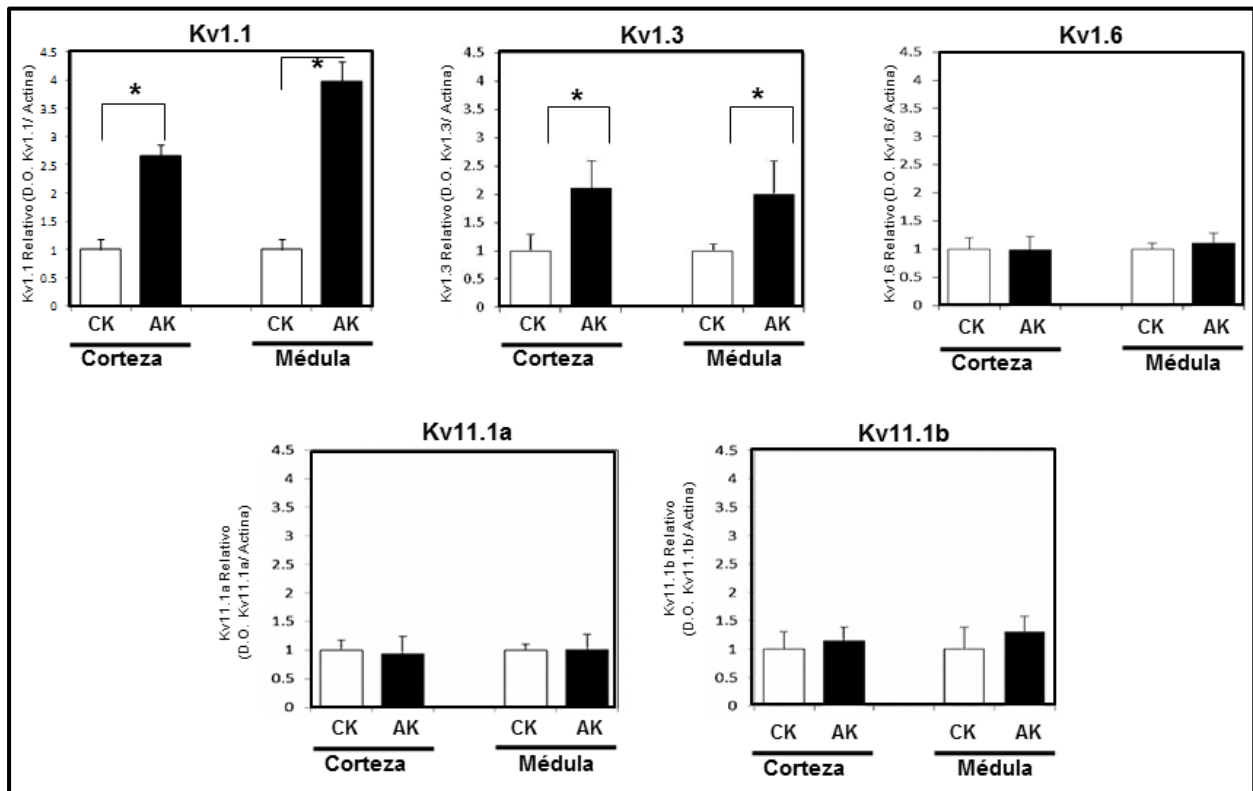
## Efecto de la dieta sobre la expresión de los canales Kv en las membranas plasmáticas.

Se compararon los niveles de expresión de los canales Kv en los extractos enriquecidos con membranas plasmáticas, de la corteza y de la médula renal, entre los grupos CK y AK.



**Figura 8.28. Efecto de una dieta con alto contenido en  $K^+$  sobre la expresión de los canales Kv1.1, Kv1.3, Kv1.6 y Kv11.1a y Kv11.1b en las membranas plasmáticas.** Western blot comparativo de la expresión de las proteínas de los canales Kv en la corteza y en la médula renal, a partir de extractos de membranas plasmáticas, entre los dos grupos. CK: grupo control (1.2% de  $K^+$  en la dieta); AK: grupo experimental (10% de  $K^+$  en la dieta).

El análisis densitométrico demostró un incremento, estadísticamente significativo, del doble de proteína del canal Kv1.1 en las membranas plasmáticas en respuesta a una dieta AK, tanto en extractos de corteza como de médula renal. El canal Kv1.3 también mostró un incremento significativo de 2.5 veces en la corteza renal y 4 veces en la médula renal. Los canales Kv1.6 y las dos isoformas del canal Kv11.1, no mostraron cambios significativos en respuesta a una dieta AK (Figura 8.29).

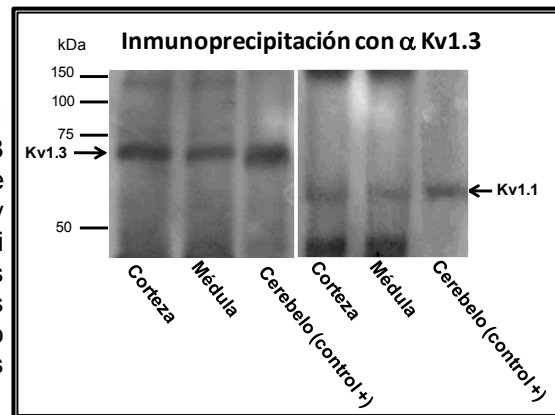


**Figura 8.29. Análisis densitométrico de los niveles de proteínas de los canales Kv1.1, Kv1.3, Kv1.6 y Kv11.1a y Kv11.1b inmunodetectados por Western blot a partir de los extractos de membranas plasmáticas de la corteza y de la médula renal, en dietas CK y AK. Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar de las unidades densitométricas relativas de AK con respecto a CK. n = 6/grupo dieta. \*: p < 0.05**

## ¿Los canales Kv1.1 y Kv1.3 son homo o heteromultímeros?

Los canales Kv1.1 y Kv1.3 incrementaron su expresión en las membranas plasmáticas de la corteza y de la médula renal con dietas de alto contenido de  $K^+$  (AK). Las proteínas Kv1 pueden asociarse como heterotetrámeros y forman canales funcionales en los tejidos excitables (Coleman et al., 1999; Shamotienko et al., 1999; Albarwani et al., 2003; Fergus et al., 2003). Para determinar si los canales Kv1.1 y Kv1.3 están asociados, se hicieron ensayos de coimmunoprecipitación. Los extractos de membranas plasmáticas de la corteza y de la médula renal, de ratas sometidas a dieta AK, se incubaron con el anticuerpo de conejo anti Kv1.3, y se precipitaron con perlas de agarosa A. Se realizaron ensayos de inmunoblot y se detectaron ambas proteínas: Kv1.3 y Kv1.1. Estos resultados indican una asociación heterotetramérica entre los canales Kv1.1 y Kv1.3 en las membranas plasmáticas en dietas de AK.

**Figura 8.30. Las subunidades Kv1.3 y Kv1.1 coimmunoprecipitan con el anticuerpo anti Kv1.3 en la corteza y en la médula renal.** El canal fue inmunoprecipitado con el anticuerpo para el Kv1.3 y revelado con anti Kv1.3 (panel izquierdo) y anti Kv1.1 (panel derecho). Se aprecian las bandas correspondientes a las proteínas de ambas subunidades. Se usaron extractos de cerebelo como control positivo para la inmunodetección de los canales Kv1.1 y Kv1.3.

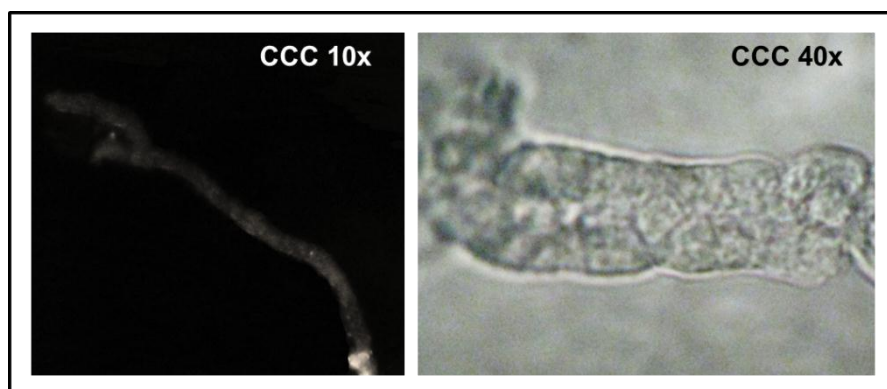


### 8.4. Los canales Kv1.1 y Kv1.3 secretan $K^+$ en el conducto colector cortical en las ratas sometidas a dietas con alto contenido en $K^+$ .

Las proteínas de los canales Kv1.1 y Kv1.3 se localizaron en el conducto colector del riñón de rata y mostraron cambios significativos en su distribución subcelular hacia las membranas plasmáticas (Kv1.1 y Kv1.3) apicales (Kv1.3) en dietas con alto contenido en  $K^+$ . Además los canales Kv1.1 y Kv1.3 coimmunoprecipitaron a partir de extractos de membranas plasmáticas de corteza y de médula renal de las ratas sometidas a dietas con AK, lo cual sugiere la formación de canales heterotetrámeros Kv1.1-Kv1.3. Estos canales podrían participar en la

secreción de  $K^+$ , como una respuesta renal adaptativa a una ingesta de  $K^+$  elevada, tal y como se demostró con los canales de  $K^+$  ROMK y MaxiK (Wald et al., 1998; Palmer y Frindt, 1999; Frindt y Palmer, 2004; Najjar et al, 2005). Para probar esta hipótesis, se examinó la contribución de los canales Kv1.1 y Kv1.3 a la secreción renal de  $K^+$ , mediante la técnica de microperfusión de CCC *in vitro* y el uso de Margatoxina (MgTx) que bloquea de forma específica a los canales Kv1.1 y Kv1.3 (Gutman et al., 2005).

**Figura 8. 31. Conducto colector cortical aislado.** Panel derecho: micrografía de un CCC disectado con microscopio estereoscópico, objetivo 10X. Panel izquierdo: micrografía de un CCC aislado y canulado para perfusión, con microscopio invertido y objetivo 40X.



Los resultados obtenidos del transporte de  $K^+$  y de  $Na^+$  en los CCC aislados se resumen en la tabla siguiente:

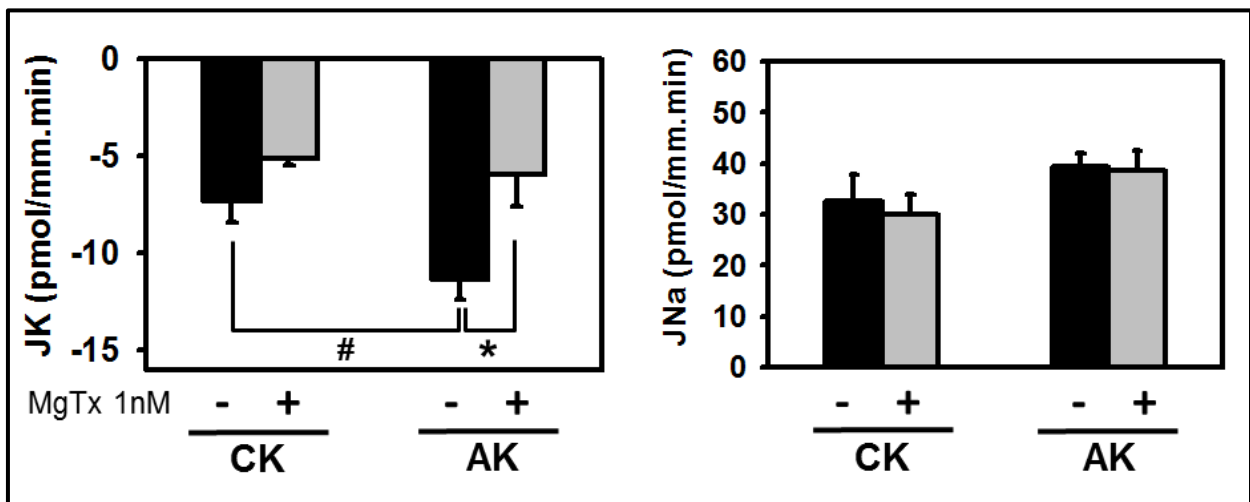
**Tabla 8.4. Efecto del contenido de  $K^+$  en la dieta sobre el transporte de  $Na^+$  y  $K^+$  en los CCC.**

| Dieta | n |           | Longitud del Tubulo (mm) | Sin Margatoxina |                    |                   | Con Margatoxina [1nM] |                    |                   |
|-------|---|-----------|--------------------------|-----------------|--------------------|-------------------|-----------------------|--------------------|-------------------|
|       |   |           |                          | V (nl/min.mm)   | J Na (pmol/mm.min) | J K (pmol/mm.min) | V (nl/min.mm)         | J Na (pmol/mm.min) | J K (pmol/mm.min) |
| CK    | 4 | $\bar{X}$ | 0.58                     | 2.70            | 32.60              | -7.35             | 2.68                  | 29.90              | -5.18             |
|       |   | ES        | 0.11                     | 0.31            | 5.26               | 1.08              | 0.28                  | 4.04               | 0.33              |
| AK    | 4 | $\bar{X}$ | 0.49                     | 3.67            | 39.27              | -11.37            | 3.67                  | 38.70              | -5.97             |
|       |   | ES        | 0.07                     | 0.52            | 2.68               | 1.04              | 0.46                  | 3.82               | 1.63              |

CK: dieta control de  $K^+$  (1.2 %  $w/w$ ), AK: dieta con alto  $K^+$  (10%  $w/w$ );  $\bar{X}$ : media; ES: error estándar; V: flujo tubular; JNa: transporte de  $Na^+$ ; JK: transporte de  $K^+$ .

La secreción de  $K^+$  en los CCC de ratas con dieta CK, fue de  $7.35 \pm 1.08$  pmol.min<sup>-1</sup>.mm<sup>-1</sup> y no se afectó por la adición luminal de Margatoxina (bloqueador de los canales Kv1.1 y Kv1.3; Grissmer et al., 1994). En las ratas alimentadas con dieta AK, la secreción de  $K^+$  en los CCC

fue de  $11.37 \pm 1.04 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mm}^{-1}$ , 54.69 % más de  $\text{K}^+$  con respecto a las ratas CK. Este incremento de la secreción de  $\text{K}^+$  en las ratas AK, se inhibió al adicionar Margatoxina al fluido luminal y la secreción de  $\text{K}^+$  descendió a valores de  $5.97 \pm 1.63 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mm}^{-1}$ , que son similares a los valores de transporte de  $\text{K}^+$  en los CCC de las ratas CK. Como era de esperarse no se observaron cambios significativos en la reabsorción de  $\text{Na}^+$  en los CCC entre las ratas CK y AK, ni antes ni después de la adición de MgTx. Estos resultados demuestran la participación de los canales Kv1.1 y Kv1.3 en la secreción de  $\text{K}^+$  en los CCC de ratas alimentadas con una dieta AK.



**Figura 8.32. La Margatoxina reduce la secreción de  $\text{K}^+$  en los CCC aislados de ratas alimentadas con dieta AK.** Transporte de  $\text{K}^+$  (JK) y transporte de  $\text{Na}^+$  (JNa) en los CCC aislados de ratas alimentadas con dieta CK (1.2 %  $w/w$  de  $\text{K}^+$ ) y dieta AK (10%  $w/w$  de  $\text{K}^+$ ); antes y después de la adición de MgTx [1nm], en la solución de perfusión. #:  $p < 0.05$  comparada con CK MgTx (-); \*:  $p < 0.05$  comparada con AK MgTx(-).

## 9. DISCUSIÓN.

Los canales de potasio Kv son proteínas de membrana que se asocian para formar homo o heterotetrámeros; facilitan la difusión selectiva de iones  $K^+$  en favor de su gradiente electroquímico, en respuesta a la despolarización de la membrana plasmática. Se ha estudiado ampliamente la expresión funcional y distribución de los canales Kv en las células excitables como son las neuronas, el músculo estriado, en las células del músculo liso, en las células del páncreas (Mühlbauer et al., 2007), y en las células del sistema inmune (Deutsch y Lee, 1989; Deutsch y Chen, 1993). Hay menos información sobre la expresión de los canales Kv en los epitelios así como de su papel funcional en los mismos. Siempre se propone que los canales Kv participan en el mantenimiento de los potenciales de membrana en los epitelios, en los que se presentan flujos transepiteliales de sodio (Hebert et al., 2005).

Se ha identificado una gran cantidad de genes que codifican canales Kv en el riñón de mamíferos, sin embargo la información de su expresión y localización celular en los diferentes segmentos de las nefronas es escasa (Hebert et al., 2005). Por otro lado, se han registrado por patch clamp un sin número de corrientes de  $K^+$  en los epitelios renales, cuyas identidades moleculares no se han dilucidado, con la excepción de algunos canales como el ROMK (Kir 1.1, KCNJ1) en TAL, TCD, CCC y el MaxiK (KCNMA1) en TCN y CCC (Hebert et al., 2005; Wang y Giebisch, 2009). Nuestro grupo reportó la expresión de los canales Kv1.1, Kv1.3 y Kv1.6 en los CC de la médula interna (Escobar et al., 2004). Se sabe que el Kv1.1 se expresa también en los TCD (Glaudemans et al., 2009).

### **Expresión del canal Kv11.1 en el túbulo proximal.**

En este trabajo se realizó un estudio sistemático de la expresión, distribución y regulación de los canales Kv a lo largo de la nefrona. Se identificaron las proteínas correspondientes a las subunidades  $\alpha$  (formadoras del poro) de los canales Kv1.1, Kv1.3, Kv1.6 y Kv11.1a y Kv11.1b por Western blot. Se demostró la presencia de las proteínas correspondientes en la corteza, médula externa y médula interna del riñón de la rata. Los ensayos de inmunofluorescencia indirecta revelaron una distribución heterogénea de los canales Kv en los diferentes segmentos tubulares de la nefrona; por lo tanto se realizó un estudio de comarcaje inmunofluorescente de los canales Kv con diferentes marcadores de los segmentos tubulares de la nefrona implicados en el transporte de  $K^+$ .

En el túbulo proximal, identificado con anticuerpos para el canal de agua, la AQP1, se localizó al canal ERG1 (o Kv11.1) en el citoplasma. Debido a que el anticuerpo anti ERG1 está diseñado contra un epítipo localizado en la porción carboxilo terminal del canal, el cual se

conserva en las dos isoformas Kv11.1a y Kv11.1b, no fue posible diferenciar entre una y otra isoforma (Jones et al., 2004). El túbulo proximal es el sitio donde se lleva a cabo la reabsorción del 60 al 80 % de los solutos filtrados en el glomérulo. La reabsorción de una gran variedad de solutos como son la glucosa, los aminoácidos y los fosfatos, esta acoplada con la reabsorción de  $\text{Na}^+$  a través de los transportadores en la membrana apical: SGLT1, SGLT2, SLC1A1, SLC6A18-20, NaPi-IIa. Los transportadores usan el gradiente electroquímico del  $\text{Na}^+$  en la dirección lumen-citoplasma como fuerza electromotriz para el transporte de los solutos. La secreción de protones en el túbulo proximal también esta acoplada a la reabsorción de  $\text{Na}^+$  a través del intercambiador NHE3 (Boron y Boulpaep, 2005). La reabsorción de  $\text{Na}^+$  acoplada a todos estos mecanismos de transporte de solutos, provoca una despolarización suficiente para activar a los canales Kv, lo cual favorece la repolarización de las membranas plasmáticas.

La reabsorción apical de  $\text{Na}^+$  incrementa la actividad de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  presente en la membrana basolateral. Al aumentar la actividad ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  también se incrementa la captación basolateral de  $\text{K}^+$ . En consecuencia, los canales de  $\text{K}^+$  en la membrana basolateral participan en el reciclaje de  $\text{K}^+$  (Hurst et al., 1993). En el túbulo proximal se han localizado los canales Kv1.8 (KCNA10 o Kv1.10) (Yao et al., 2002) y el complejo KCNE1/KCNQ1 correspondiente al canal Kv7.1 (KCNQ1), asociado con la subunidad MinK (KCNE1) (Vallon et al., 2001; Vallon et al., 2005), que regula positivamente su tráfico hacia la membrana plasmática (Ohyama et al., 2001). A este complejo se le atribuye un papel importante en el reciclaje del  $\text{K}^+$ , acoplado a la reabsorción de  $\text{Na}^+$ . Sin embargo en los ratones knockout de KCNQ1 se mantienen los niveles de absorción normal de  $\text{Na}^+$  y de glucosa, lo cual sugiere que la subunidad MinK podría estar asociada con otro canal de  $\text{K}^+$  en el túbulo proximal (Vallon et al., 2001). No descartamos que KCNE1 se asocie con el canal ERG1 en este segmento tubular (Carrisoza-Gaytán et al., 2010).

### **Expresión del canal Kv1.6 en a porción gruesa ascendente del asa de Henle.**

En la porción gruesa ascendente del asa de Henle (GAH) se identificó al canal Kv1.6. Este segmento de la nefrona es otro sitio de gran relevancia fisiológica para el transporte de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . Los canales ROMK y Maxi K en las membranas apicales de las células epiteliales de GAH, tienen un papel importante en el reciclamiento del  $\text{K}^+$ , esencial para el funcionamiento del cotransportador NKCC2 en las membranas apicales (Ecelbarger et al., 2001). El canal Kv1.6 se observó en el citoplasma con perfil basolateral en las células de la GAH, TCD, TCN, CCC y CCM. Se ha reportado que el transporte de  $\text{K}^+$  basolateral en GAH es a través de canales de  $\text{K}^+$  con una conductancia unitaria de  $\sim 10$  pS y cuya identidad molecular no ha sido dilucidada (Paulais et al., 2002). La reabsorción de  $\text{K}^+$  en el GAH a través de un canal Kv estaría acoplada



al cotransportador basolateral KCC4 y a la reabsorción de potasio en la membrana apical por el cotransportador NKCC2. De manera interesante, la conductancia unitaria del canal Kv1.6 es de ~9 pS (Gutman et al., 2005), esto sugiere que podría ser el canal de K<sup>+</sup> que participa en el reciclamiento basolateral de K<sup>+</sup> acoplado a la actividad de la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, a lo largo de todos los segmentos tubulares donde fue detectado.

### **Expresión de los canales Kv1.1, Kv1.6 y Kv11.1 en el túbulo contorneado distal.**

En el TCD la localización de los canales fue heterogénea: Kv1.1 perinuclear, Kv1.6 en el citoplasma y Kv11.1 apical. En el TCD la reabsorción de Na<sup>+</sup> es a través del intercambiador de NaCl sensible a tiazidas (NCC o TSC) y esta acoplada con la secreción de K<sup>+</sup> a través de los canales ROMK. Es probable que también participen canales Kv en la secreción de K<sup>+</sup> en este segmento tubular, en particular el canal Kv11.1 el que observamos se expresa en la membrana apical en condiciones de ingesta normal de K<sup>+</sup> (1.2% de K<sup>+</sup> <sup>w/w</sup>). También se sabe que el canal Kv1.1 está presente en la membrana apical en el TCD (Glaudemans et al., 2009), y su función esta acoplada a la reabsorción de Mg<sup>2+</sup> por los canales TRPM6 en la membrana apical de las células del TCD del riñón murino. Es probable que el canal Kv11.1 también coadyuve a la reabsorción de Mg<sup>2+</sup>.

### **Expresión de los canales Kv1.1, Kv1.3, Kv1.6 y Kv11.1 en el túbulo conector y en el conducto colector.**

El TCN y el CCC son las porciones distales de la nefrona donde la secreción de K<sup>+</sup> está regulada por hormonas, como una medida adaptativa del riñón para el mantenimiento de los niveles de K<sup>+</sup> sérico. En el TCN localizamos a los canales Kv1.1 perinuclear, Kv1.3 apical, Kv1.6 en el citoplasma con perfil basolateral y Kv11.1 apical. En el CCC se localizó al canal Kv1.1 perinuclear, Kv1.3 en el citoplasma y al Kv1.6 en el citoplasma con tendencia basolateral; el Kv11.1 no fue detectado en este segmento tubular. Es probable que en algunas condiciones metabólicas los canales Kv1 se agreguen como heteromultímeros (Manganas et al., 2000, Zhu et al., 2003a). Los canales que presentaron un perfil apical en el TCN: Kv1.3 y Kv11.1, y en el CCC: Kv1.6, podrían contribuir en la secreción basal de K<sup>+</sup>, en tanto que los canales Kv1.6 con perfil basolateral al reciclamiento basolateral del K<sup>+</sup>.

El TCN como el CCC son estructuras tubulares heterogéneas, y están conformadas por dos poblaciones de células distintas tanto en su morfología como en su función. La dirección y magnitud del transporte de K<sup>+</sup> neto en este segmento tubular, es el producto del balance de la secreción y la reabsorción de K<sup>+</sup>, mediados respectivamente por las células principales y las células intercaladas (Najjar et al., 2005). Los canales ROMK se localizan en las células

principales y han sido reconocidos como los canales responsables de la secreción basal de  $K^+$  (Palmer et al., 1997; Hebert et al., 2005). Su expresión en las membranas apicales se regula positivamente durante ingestas altas de  $K^+$ , con lo cual aumenta la secreción urinaria de  $K^+$  y se mantienen los niveles séricos de  $K^+$  en los rangos fisiológicos normales. En contraste, los canales MaxiK se expresan en las células principales y en las células intercaladas (Najjar et al., 2005; Palmer y Frindt, 2007). Originalmente se publicó la contribución del canal MaxiK en condiciones de aumento del flujo del volumen urinario (Woda et al., 2001; Najjar et al., 2005). Además, estudios recientes han demostrado el tráfico de los canales MaxiK hacia las membranas apicales y su contribución en la secreción de  $K^+$  en condiciones de ingesta con alto contenido de  $K^+$  (Hebert et al., 2005; Najjar et al., 2005; Wang, 2004).

### **Efecto de una dieta con alto contenido en $K^+$ sobre la expresión de los canales Kv.**

La distribución subcelular diferencial de los canales Kv1.1, Kv1.3, Kv1.6 y Kv11.1 en el TCN y el CCC, sugiere una contribución heterogénea de los canales a los mecanismos de transporte transepitelial de  $K^+$ . En este trabajo el efecto de una dieta con alto contenido en  $K^+$  (AK: 10 % de  $K^+ w/w$ ) y su comparación con el de una dieta control (CK: 1.2% de  $K^+ w/w$ ), permitió identificar los niveles de expresión y la distribución de los canales Kv1.1, Kv1.3, Kv1.6 y Kv11.1, en las porciones distales de la nefrona. Para verificar la respuesta de las ratas al modelo de ingesta con alto contenido en  $K^+$ , se analizaron los niveles de  $Na^+$  y de  $K^+$  urinarios y séricos así como los niveles de aldosterona sérica en ambos grupos de ratas: AK y CK. Como se esperaba, la excreción urinaria de  $K^+$  así como los niveles de aldosterona sérica se incrementaron cinco veces en el grupo AK con respecto los valores del grupo CK. Los niveles séricos de  $Na^+$  y de  $K^+$  se mantuvieron sin cambios significativos entre los dos grupos así como los niveles urinarios de  $Na^+$  (Tabla 8.3). Estos resultados son indicativos de que las ratas con una dieta AK tuvieron una respuesta adaptativa renal.

El análisis del nivel de expresión de los canales Kv1.1, Kv1.3, Kv1.6 y Kv11.1 en la corteza y en la médula renal así como su distribución en los epitelios renales en respuesta a la dieta AK, nos llevaron a intuir la participación de algunos de estos canales en la secreción de  $K^+$  en la orina. No se observaron cambios significativos en el nivel de proteínas totales para ningún canal estudiado, y estos resultados son congruentes con lo reportado para los canales ROMK y MaxiK (Wald et al., 1988; Najjar et al., 2005). El incremento de cerca del doble de la expresión de los canales Kv1.1 y Kv1.3 en las membranas plasmáticas, tanto en la corteza como en la médula renal y su redistribución subcelular en los túbulos conectores y los conductos colectores, sugirió su participación como canales secretores. En AK la inmunoreactividad para el canal Kv1.1 se vio disminuida en el espacio perinuclear e incrementada en el citoplasma de

las células principales e intercaladas, mientras que el canal Kv1.3 se localizó en las membranas apicales y subapicales de las células intercaladas en estas condiciones metabólicas. Los estudios de microperfusión de túbulos confirmaron que el canal Kv1.3 es un canal secretor de K<sup>+</sup> (Carrisoza-Gaytán et al., 2010). En este trabajo sugerimos que la Margatoxina, es capaz de bloquear tanto homotetrámeros del canal Kv1.3 como heterotetrámeros del canal Kv1.3 con algún otro Kv1, por lo que continuamos el estudio de la agregación del canal Kv1.1/Kv1.3. Los ensayos de coimmunoprecipitación confirmaron que el canal secretor es un heteromultímero de Kv1.1/Kv1.3 (manuscrito en proceso). Se detectó la expresión de los canales Kv1.1 y Kv1.3 en las membranas plasmáticas en dietas AK. La agregación multimérica de los canales Kv1 determina su tráfico en las células excitables (Manganas y Trimmer, 2000). Por ejemplo, se sabe que el Kv1.1 se distribuye predominantemente en el retículo endoplásmico. La asociación heterotetramérica del canal Kv1.1 con el Kv1.2 o el Kv1.4, incrementa la localización del canal Kv1.1 en las membranas plasmáticas (Manganas y Trimmer, 2000; 2001; Zhu et al., 2003b).

Una dieta con alto contenido en K estimula la expresión apical de canales de K<sup>+</sup> en el CCC por una vía dependiente de la aldosterona y por una vía independiente de la aldosterona (Muto et al., 1988; Wald et al., 1998). Existe evidencia de que la cinasa SGK1 media el efecto de la aldosterona en la secreción renal de K<sup>+</sup> (Wang y Giebisch, 2009). El estudio con ratones manipulados genéticamente demostró que el fenotipo de los ratones con depleción de SGK1 es similar al de los ratones con depleción del receptor de mineralocorticoides, los cuales presentan una secreción ineficiente de K<sup>+</sup> en respuesta a una ingesta elevada de K<sup>+</sup> (Huang et al., 2004). SGK1 y una PKA estimulan la secreción renal de K<sup>+</sup> al promover el tráfico del canal ROMK del retículo endoplásmico hacia las membranas plasmáticas (Yoo et al., 2003). A su vez SGK1 inhibe a la cinasa WNK4 cuya actividad inhibe a los canales ROMK (Huang et al., 2004; Ring et al., 2007).

El tetrámero Kv1.1/Kv1.3 podría tener una regulación similar al del ROMK en dietas AK. De hecho se sabe que la ubiquitinación de los canales Kv1.3 y Kv1.5 restringe su expresión en las membranas plasmáticas: la ubiquitinasa Nedd4-2 es la encargada de esta regulación negativa. Nedd4-2 se fosforila y se modula negativamente por SGK1, la que a su vez regula positivamente la expresión del Kv1.3 en las membranas plasmáticas de las neuronas piramidales (Henke et al., 2004). Las interrogantes sobre si estos mecanismos se conservan y regulan la expresión de los canales Kv1.1/Kv1.3 en las membranas apicales de las células intercaladas en condiciones de AK quedan como perspectivas de este proyecto de investigación.

### **El heterotetramero Kv11.1/Kv1.3 contribuye a la secreción renal de K<sup>+</sup>.**

Para probar si los canales Kv contribuyen a la secreción renal de K<sup>+</sup> se realizaron ensayos de microperfusión *in vitro* de los CCC de ratas neonatos. Los ensayos de microperfusión demostraron que la secreción de K<sup>+</sup> se incrementó cerca del 55 % en CCC aislados de ratas AK con respecto a las ratas CK. La adición de la Margatoxina al fluido de perfusión provocó una disminución del 48% del transporte de K<sup>+</sup> hacia el lumen en los CCC de ratas AK, mientras que en dietas control (CK) no presentó un efecto significativo. Por consiguiente, la inhibición de los canales Kv sensibles a Margatoxina, abate la secreción de K<sup>+</sup>. Ensayos de microperfusión de CCC de ratas, con estimulación de la secreción de K por flujo (mecanismo de activación de los canales MaxiK) no evidenciaron sensibilidad a la Iberiotoxina, una toxina bloqueadora específica del canal MaxiK (Liu et al., 2009). Nuestros resultados demostraron que el incremento en la secreción de K<sup>+</sup> en ratas con dietas AK, es debido a la regulación de la expresión de los canales Kv1 en el CCC pero no por el MaxiK descrito en ratón (Bailey et al., 2006). Sería necesario realizar los mismos ensayos de microperfusión en CCC de ratas sometidas a dietas AK y con un bloqueador específico para ROMK, el 2,2'-oxibis(metileno)bis(5-nitro-1H-benzo-[d]imidazol) (VU591), de reciente desarrollo (Gautman et al., 2011). También será importante trabajar con ratones manipulados genéticamente con depleción de los canales ROMK y el uso de Iberiotoxina, para inhibir la contribución del canal MaxiK y poder diseccionar así la contribución exclusiva de los canales Kv a la secreción de K<sup>+</sup> en los segmentos de CCC en el modelo del ratón.

En conclusión, demostramos la expresión diferencial de los canales Kv1.1, Kv1.3, Kv1.6 y Kv11.1 en los epitelios renales involucrados en el transporte de K<sup>+</sup>. El canal Kv11.1 (ERG1) se detectó en el túbulo proximal, donde puede contribuir al reciclamiento basolateral de K<sup>+</sup> acoplado con la actividad de la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> y/o al mantenimiento del potencial de membrana apical durante los procesos de reabsorción de Na<sup>+</sup>. El canal Kv1.6 se detectó con distribución citoplásmica y basolateral en las porciones distales de la nefrona a partir de la porción gruesa ascendente del asa de Henle, hasta los conductos colectores de la médula interna, donde podría tener una participación en el reciclamiento de K<sup>+</sup> acoplado a la actividad de la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>. El canal Kv11.1 (ERG1) también se detectó en las membranas apicales del TCD y del TCN, donde podría participar en la secreción basal de K<sup>+</sup> (Figura 9.1). Los canales Kv1.1 y Kv1.3 se detectaron en el TCN y CC, fueron los únicos que mostraron una regulación de su tráfico en respuesta a una dieta con AK: del espacio perinuclear (Kv1.1) y del citoplasma (Kv1.3), a las membranas apicales. Los ensayos de microperfusión *in vitro* de los CCC permitieron establecer la participación de estos canales en la secreción renal de K<sup>+</sup> en

condiciones de una ingesta alta de  $K^+$ . El canal secretor de  $K^+$  en estas condiciones metabólicas es el heteromultímero Kv1.1/Kv1.3 (Figura 9.2).

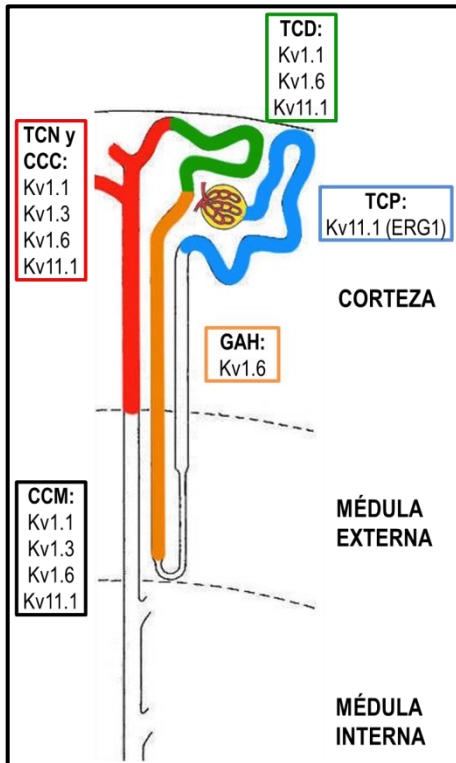


Figura 9.1. Distribución de los canales Kv1.1, Kv1.3, Kv1.6 y Kv11.1 en los segmentos tubulares de la nefrona.

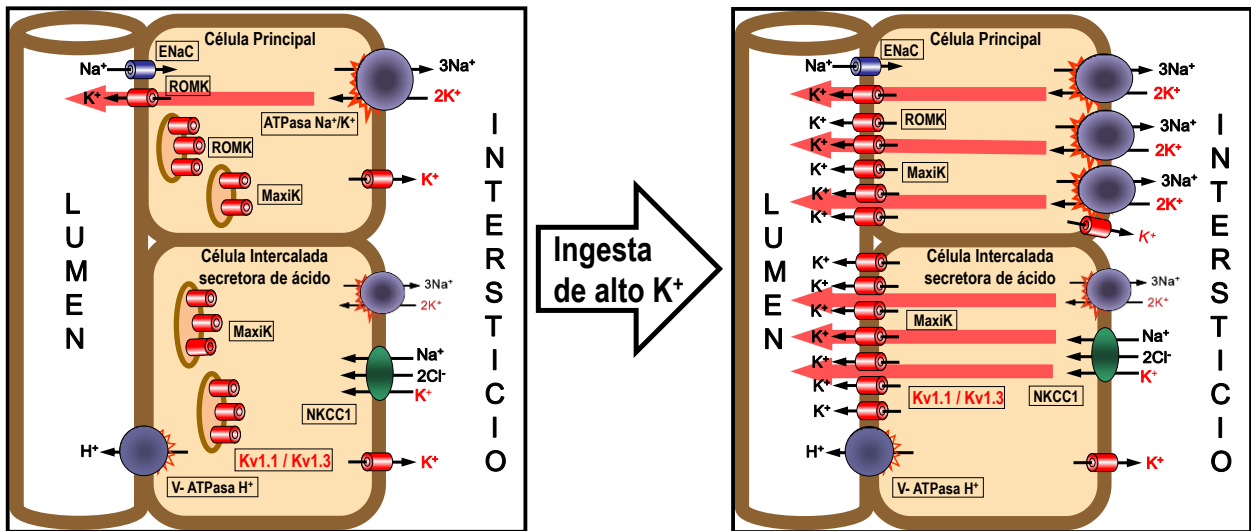


Figura 9.2. Secreción de  $K^+$  en el CCC a través de los canales ROMK, MaxiK y Kv1.1/Kv1.3 en condiciones control (panel izquierdo) y en respuesta a una ingesta elevada de  $K^+$  (panel derecho).

## 10. REFERENCIAS.

- Albarwani S., Nemetz L. T., Madden J. A., Tobin A. A., England S. K., Pratt P. F., Rusch N. J. 2003 "Voltage-gated K<sup>+</sup> channels in rat small cerebral arteries: molecular identity of the functional channels" *J Physiol* **551**: 751-763.
- Amirlak I., Dawson K. P. 2003. "Bartter syndrome: an overview" *Q J Med* **93**: 207-215.
- Bachmann S., Koeppen-Hagmann I., Kriz W. 1985. "Ultrastructural localization of Tamm-Horsfall glycoprotein (THP) in rat kidney as revealed by protein A-gold immunocytochemistry". *Histochemistry* **83** (6): 531-538.
- Bailey M.A., Cantone A., Yan Q., MacGregor G. G., Leng Q., Amorim J. B. O., Wang T., Hebert S. C., Giebisch G., Malnic G. 2006. "Maxi-K channels contribute to urinary potassium excretion in the ROMK-deficient mouse model of Type II Bartter's syndrome and in adaptation to a high-K diet". *Kidney Int* **70** (1): 51-59.
- Brown D., Sabolic I., Gluck S. 1992. "Polarized targeting of V-ATPase in the kidney epithelial cells". *J Exp Biol* **172**: 231-243.
- Boron W. F., Boulpaep E. L. "Medical physiology a cellular and molecular approach". 2<sup>a</sup> ed. Saunders, USA, 2005, pags. 749-865.
- Campean V., Kricke J., Ellison D., Luft F. C., Bachmann S. 2001. "Localization of thiazide-sensitive Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransport and associated gene products in mouse DCT". *Am J Physiol Renal Physiol* **281**:F1028-F1035.
- Carrisoza-Gaytán R., Salvador C., Satlin L.M., Liu W., Zamilowicz B., Bobadilla N. A., Trujillo J., Escobar L. I. 2010. "Potassium secretion by a voltage-gated potassium channel Kv1.3 in the rat kidney". *Am J Physiol Renal Physiol* **299**: F255-F264.
- Choe S. 2002. "Potassium channel structures". *Nature reviews/Neuroscience* **3**: 115-121.
- Cho J.T., Guay-Woodford L.M. 2003. "Heterozygous mutations of the gene for Kir1.1 (ROMK) in antenatal Bartter syndrome presenting with transient hyperkalemia, evolving to a benign course". *J Korean Med Sci* **18**:65-68.
- Chung Y., Shin C., Kim M., Lee B., Cha C. 2001. "Immunohistochemical study on the distribution of six members of the Kv1 channel subunits in the rat cerebellum". *Brain Res* **895**: 173-177.
- Clark E., Fanguy J., Henry C. 2001. "High throughput multi-analyte screening for renal disease using capillary electrophoresis". *J Pharma Biomed Analysis* **25**: 795-801.

- Coetzee W. A., Amarillo Y., Chiu J., Chow A., Lau D., McCormack T., Moreno H., Nadal M. S., Ozaita A., Pountney D., Saganich M., Vega-Saenz de Miera E., Rudy B. 1999. "Molecular Diversity of K<sup>+</sup> channels". *Annals N Y Acad Sci* **868**: 233-285.
- Coleman S. K., Newcobe J., Pryke., Dolly O. 1999. "Subunit composition of Kv1 in Human CNS". *J Neurochem* **73** (2): 849-858.
- Covarrubias M., Wei A., Salkoff, L. 1991. "Shaker, Shal, Shab and Shaw express independent K<sup>+</sup> channel current systems". *Neuron* **7**: 763-773.
- Desir G.V., Hamlin H.A, Puente E., Reilly R.F, Hildebrandt F., Igarashi P. 1992. "Isolation of putative voltage-gated epithelial K-channel isoforms from rabbit kidney and LLC-PK1 cells". *Am J Physiol* **262**: F151-F157.
- Deutsch C., Chen L. Q. 1993. "Heterologous expression of specific K<sup>+</sup> channels in T lymphocytes: functional consequences for volume regulation". *Proc Natl Acad Sci USA* **90** (21): 10036-10040.
- Deutsch C., Lee S.C. 1989. "Modulation of K currents in human lymphocytes by pH". *J Physiol* **413**:399-413.
- Escobar L. I., Martinez J. C., Salas M., Castilla S. A., Carrisoza R., Tapia D., Vazquez M., Bargas J., Bolivar J. J., 2004. "A voltage-gated K<sup>+</sup> current in renal inner medullary collecting duct cells". *Am J Physiol Cell Physiol* **286**: C965-C974.
- Ecelbarger C., Kim G. H., Knepper M. A., Liu J., Tate M., Welling P. A., Wade J. B. 2001. "Regulation of potassium channel Kir 1.1 (ROMK) abundance in the thick ascending limb of Henle's Loop". *J Am Soc Nephrol* **12**: 10-18.
- Fergus D. J., Martens J. R., England S. K. 2003. "Kv channel subunits that contribute to voltage-gated K<sup>+</sup> current in renal vascular smooth muscle". *Pflugers Arch* **445** (6): 697-704.
- Finer G., Shalev H., Birk O. S., Galron D., Jeck N., Sinai-Treimn L., Landau D. 2003. "Transient neonatal hyperkalemia in the antenatal (ROMK defective) Bartter syndrome". *J Pediatr* **142**:318-323.
- Fraser, S. P., Grimes, J. A., Diss, J. K., Stewart, D., Dolly, J. O., & Djamgoz, M. B. 2003. "Predominant expression of Kv1.3 voltage-gated K<sup>+</sup> channel subunit in rat prostate cancer cell lines: Electrophysiological, pharmacological and molecular characterization". *Pflugers Arch* **446**: 559-571.
- Frindt G., Palmer L. G. 2004. "Apical potassium channels in the rat connecting tubule". *Am J Physiol Renal Physiol* **287**: F1030-1037.
- Furgeson S. B., Linas S. 2010. "Mechanisms of type I and type II Pseudohypoaldosteronism" *J Am Soc Nephrol* **21**: 1842-1845.



- García-Villegas R., Escamilla J., Fiorentino R., Cerejido M. 2007. "Potassium channels lost during harvesting of epithelial cells are restored with a kinetics that depends on channel species". *Cell Physiol Biochem* **20** (5):405-16.
- Garzón-Muvdi T., Pacheco-Alvarez D., Gagnon KB., Vázquez N., Ponce-Coria J., Moreno E., Delpire E., Gamba G. 2007. "WNK4 kinase is a negative regulator of K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporters". *Am J Physiol Renal Physiol* **292** (4):F1197-207.
- Gautman B., Chauder B. A., Liu W., Dawson E. S., Kadakia R., Nguyen T. T., Lewis L. M., Meiler J., Weaver C. D., Satlin L. M., Lindsey C. W., Denton J. S. 2011. "Development of a selective small-molecule inhibitor of Kir1.1, the renal outer medullary potassium channel". *Mol Pharmacol* **79** (1): 42-50.
- Geneser F. "Histología sobre bases moleculares". 3<sup>a</sup> ed. Editorial médica panamericana, Argentina, 2002, pags. 42-45 y 555-578.
- Giebisch G. 1998. "Renal potassium transport: mechanisms and regulation". *Am J Physiol Renal Physiol* **274**: F817-F833.
- Giebisch G, Wang W. 1996. "Potassium transport: from clearance to channels and pumps". *Kidney Int* **49** (6):1624-31.
- Glaudemans B., Van der Wijst J., Scola R. H., Lorenzoni P. J., Heister A., Van der Kemp A. W., Knoers N. V., Hoenderop J. G., Bindels R. J. 2009. "A missense mutation in the Kv1.1 voltage gated potassium channel–encoding gene KCNA1 is linked to human autosomal dominant hypomagnesemia" *J Clin Invest* **119**: 936-942.
- Graziani G., Fedeli C., Moroni L., Cosmai L., Badalamenti S., Ponticelli C. 2010. "Gitelman syndrome: pathophysiological and clinical aspects" *Q J Med* **103**: 741-748.
- Grissmer S, Nguyen A. N., Aiyar J., Hanson D. C., Mather R. J., Gutman G. A., Karmilowicz M. J., Auperin D.D., and Chandy K. G. 1994. "Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines". *Mol Pharmacol* **45**:1227-1234.
- Grunnet M., Rasmussen H., Schmidt A., Klaerke D. 2003. "The voltage-gated potassium channel subunit, Kv1.3, is expressed in epithelia" *Biochim Biophys Acta* **1616**: 85-94.
- Gutman G. A., Chandy K. G., Adelman J.P., Aiyar J., Bayliss D. A., Clapham D. E., Covarrubias M., Desir G. V., Furuichi K., Ganetzky B., Garcia M. L., Grissmer S., Jan L. Y., Karschin A., Kim D., Kuperschmidt S., Kurachi Y., Lazdunski M., Lesage F., Lester H. A., McKinnon D., Nichols C. G., O'Kelly I., Robbins J., Robertson G. A., Rudy B., Sanguinetti M., Seino S., Stuehmer W., Tamkun M. M., Vandenberg C. A., Wei A., Wulff H., Wymore R.

- S. 2003. "International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: Potassium channels". *Pharmacol Rev* **55**: 583-586.
- Gutman G. A. Chandy K. G., Grissmer S., Lazdunski M., McKinnon D., Pardo L. A., Robertson G. A., Rudy B., Sanguinetti M. C., Stühmer W., Wang X. 2005. "International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels". *Pharmacol Rev* **57**: 473-508.
  - Guyton A., May J. E. "Tratado de fisiología médica" 10<sup>a</sup> ed. Mc Graw-Hill Interamericana, México, 2001, pags. 339-347.
  - Hebert S. C., Desir G., Giebisch G., Wang W. 2005. "Molecular diversity and regulation of renal potassium channels". *Physiol Rev* **85**: 319-371.
  - Henke G., Maier G., Wallisch S., Boehmer C., Lang F. 2004. "Regulation of the voltage gated K<sup>+</sup> channel Kv1.3 by the ubiquitin ligase Nedd4-2 and the serum and glucocorticoid inducible kinase SGK1". *J Cell Physiol* **199**: 194-199.
  - Hille B. "Ionic channels of excitable membranes". 2<sup>a</sup> ed. Sinauer associates Inc. USA, 1992, pags. 1-6.
  - Houssay A. B., Clingolany H. E. "Fisiología humana". 1<sup>a</sup> ed. Editorial el Ateneo, Argentina, 2000, pags. 445-448.
  - Huang D. Y., Wulff P., Völkl H., Loffing J., Richter K., Kuhl D., Lang F., Vallon V. 2004. "Impaired regulation of renal K elimination in the sgk1- knockout mouse". *J Am Soc Nephrol* **15**: 885-891.
  - Hurst A. M., Beck J. S, Laprade R., Lapointe J. Y. 1993. "Na<sup>+</sup> pump inhibition downregulates an ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in rabbit proximal convoluted tubule". *Am J Physiol Renal Physiol* **264**: F760-F764.
  - Jiang B., Sun X., Cao K., Wang R. 2002. "Endogenous Kv channels in human embryonic kidney (HEK-293) cells". *Mol Cell Biochem* **238** (1-2):69-79.
  - Jones E. M. C., Roti Roti E. C., Wang J., Delfosse S. A., Robertson G. A. 2004. "Cardiac IKr channels minimally comprise hERG 1a and 1b subunits". *J Biol Chem* **279** (43): 44694-44694.
  - Kamb A., Tseng-Crank J., Tanouye M. A. "Multiple products of the Drosophila Shaker gene may contribute to potassium channel diversity". *Neuron* **1**: 421-430, 1988.
  - Kleta R., Bockenhauer D. 2006. "Bartter syndromes and other sat-losing tubulopathies" *Nephron Physiol* **104**: 73-80.
  - Koeppen B. M., Stanton B. A. "Renal physiology". 3<sup>a</sup> ed. Mosby. USA, 2001, pags. 117-131.

- Kriz W., Kaisslin B. "Structural organization of the mammalian kidney". En: Seldin and Giebisch's the kidney physiology and pathophysiology, vol 1, sec II Structural and functional organization of the kidney. R. J. Alpen and S. C. Hebert (editors). 4<sup>a</sup> ed. Academic Press. USA, 2008, pags. 479-563.
- Kriz W., Bankir L. 1988. "A standard nomenclature for structures of the kidney" *Kidney Int* **33**: 1-7.
- Lee S. Y., Maniak P. J., Ingbar D. H., O'Grady S. M. 2003. "Adult alveolar epithelial cells express multiple subtypes of voltage-gated K<sup>+</sup> channels that are located in apical membrane". *Am J Physiol Cell Physiol* **284**: C1614-C1624.
- Liu W., Zamilowicz B., Wanderling S., Levy I. D., Satlin L. M. Wei Y. 2009. "A novel and functional Na<sup>+</sup>-activated K channel is present in distal nephron of rat kidney" (Abstract). *J Am Soc Nephrol* **20**: 127A.
- Lu J., Robinson M. J., Edwards D., Deutsch C. 2001. "T1 – T1 Interactions occur in ER membranes while nascent Kv peptides are still attached to ribosomes". *Biochem* **40**: 10934-10946.
- Magen D., Berger L., Coady M. J., Ilivitzki A., Mllitianu D., Tieder M., Selig S., Lapointe J. Y., Zelikovic I., Skorecki K. 2010. "A loss-of-function mutation in NaPi-IIa and renal Fanconi's Syndrome" *N Engl J Med* **362**: 1102-1109.
- Malnic G., Muto S., Giebisch. "Regulation of potassium excretion". En: Seldin and Giebisch's the kidney physiology and pathophysiology, vol 1, sec III Fluid and electrolyte regulation and dysregulation. R. J. Alpen and S. C. Hebert (editors). 4<sup>a</sup> ed. Academic Press. USA, 2008, pags. 1301-1347.
- Manganas L. N., Wang Q., Scannevin R. H., Antonucci D. E., Rhodes K. J., Trimmer J. S. 2001. "Identification of a trafficking determinant localized to the Kv1 potassium channel pore". *Proc Natl Acad Sci USA* **98** (24): 14055-1059.
- Manganas L. N., Trimmer J. S. 2000. "Subunit composition determines Kv1 potassium channel surface". *J Biol Chem* **275** (38): 29685- 29693.
- Mühlbauer E., Bazwinsky I., Wolgast S., Klemenz A., Peschke E. 2007. "Circadian changes of ether-a-go-go-related-gene (Erg) potassium channel transcripts in the rat pancreas and b-cell". *Cell Mol Life Sci* **64**: 768-780.
- Muth T. R., Caplan M. J. 2003. "Transport protein trafficking in polarized cells". *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**: 333-366.
- Muto S. 2001. "Potassium transport in the mammalian collecting duct". *Physiol Rev* **81**: 85-116.

- Muto S., Sansom S., Giebisch G. 1988. "Effects of a high potassium diet on electrical properties of cortical collecting duct from adrenalectomized rabbits". *J Clin Invest* **81**: 376-380.
- Nagaya N., Papazian D. M. 1997. "Potassium channel  $\alpha$  and  $\beta$  subunits assemble in the endoplasmic reticulum". *J Biol Chem* **272** (5): 3022-3027.
- Najjar F., Zhou H., Morimoto T., Bruns J., Li H-S., Liu W., Kleyman T. R., Satlin L.M. 2005. "Dietary K<sup>+</sup> regulates apical membrane expression of maxi K channels in rabbit cortical collecting duct". *Am J Physiol Renal Physiol* **289**: F922-F932.
- Nielsen S., DiGiovanni S. R., Christensen E. I., Knepper M. A., Harris H. W. 1993. "Cellular and subcellular immunolocalization of vasopressin-regulated water channel in rat kidney". *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:11663-11667.
- Nielsen S., Frokiaer J., Marples D., Kwon T. H., Agre P, Knepper M. A. 2002. "Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine" *Physiol Rev* **82** (1): 205-244.
- O'Grady S. M., Lee S. Y. 2005. "Molecular diversity and function of voltage-gated (Kv) potassium channels in epithelial cells". *Int J Biochem Cell Biol* **37**: 1578-1594.
- Ohyama H., Kajita H., Omori K., Takumi T., Hiramoto N., Iwasaka T., Matsuda H. 2001. "Inhibition of cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> currents by an antisense oligodeoxynucleotide against IsK (mink) and over-expression of IsK mutant D77N in neonatal mouse hearts". *Pflügers Arch – Eur J Physiol* **442**: 329-335.
- Ousingsawat J., Spitzner M., Puntheeranurak S., Terracciano L., Tornillo L., Bubendorf L., Kunzelmann K., Schreiber R. 2007. "Expression of voltage-gated potassium channels in human and mouse colonic carcinoma". *Clin Cancer Res* **13**(3):824-31.
- Palmer L., Frindt G. 1999. "Regulation of apical K channels in rat cortical collecting tubule during changes in dietary K intake". *Am J Physiol Renal Physiol* **277**: F805-F812.
- Palmer L. G., Choe H., Frindt G. 1997. "Is the secretory K channel in the rat CCT ROMK?". *Am J Physiol Renal Physiol* **273**: F404-F410.
- Palmer L. G., Frindt. G. 2007. "High-conductance K channels in intercalated cells of the distal nephron" *Am J Physiol Renal Physiol* **292**: F966-F973.
- Papazian D. M., Schwarz T. L., Tempel B. L., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. 1987. "Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*". *Science* **237**: 749-753.
- Paulais M., Lourdel S., Teulon J. 2002. "Properties of an inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel in the basolateral membrane of mouse TAL". *Am J Physiol Renal Physiol* **282**: F866-F876.

- Peters M., Jeck N., Reinalter S., Leonhardt A., Tönshoff B., Klaus G. G., Konrad M., Seyberth H. W. 2002. "Clinical presentation of genetically defined patients with hypokalemic salt-losing tubulopathies". *Am J Med* **112** (3): 183-190.
- Pongs O. 1999. "Voltage-gated potassium channels: from hyperexcitability to excitement". *FEBS Lett* **452**: 31-35.
- Pongs O., Kecskemethy N., Mueller R., Krah-Jentzens I., Baumann A., Kiltz H. H., Canal I., Llamazmres S., Ferrus A. 1988. "Shaker encodes a family of putative potassium channel proteins in the nervous system of *Drosophila*". *EMBO Journal* **7**: 1087-1096.
- Rao J. N., Platoshyn O., Li L., Guo X., Golovina V. A., Yuan J. X., Wang J. Y. 2002. "Activation of K<sup>+</sup> channels and increased migration of differentiated intestinal epithelial cells after wounding". *Am J Physiol Cell Physiol* **282**: C885-C898.
- Ring A. M., Leng Q., Rinehart J., Wilson F. H., Kahle K. T., Hebert S. C., Lifton R. P. 2007. "An SGK1 site in WNK4 regulates Na<sup>+</sup> channel and K<sup>+</sup> channel activity and has implications for aldosterone signaling and K<sup>+</sup> homeostasis" *Proc Natl Acad Sci USA* **104** (10): 4025-4029.
- Schwarz, T. L., Tempel B. L., Papazian D. M., Jan, Y. N., Jan L. Y. 1988. "Multiple potassium channel components are produced by alternative splicing at the Shaker locus in *Drosophila*". *Nature* **33**: 137-142.
- Shamotienko O., Sidera C., Meunier F. A., Ink B., Malcolm W. Dolly O. 1999. "Recreation of neuronal Kv1 channel oligomers by expression in mammalian cells using semliki forest virus". *Biochem* **38**: 16766-16776.
- Shieh C., Coghlan M., Sullivan J., Gopalakrishnan M. 2000. "Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities". *Pharmacol Rev* **52**: 557-593.
- Speake T., Kibble J. D., Brown P. D. 2004. "Kv1.1 and Kv1.3 channels contribute to the delayed-rectifying K<sup>+</sup> conductance in rat choroid plexus epithelial cells". *Am J Physiol Cell Physiol* **286**: C611-C620.
- Stanton B. A., Giebisch G. 1982. "Potassium transport by the renal distal tubule: effects of potassium loading". *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* **243**: F487-F493.
- Stanton B. A., Giebisch G. "Renal potassium transport". En: Handbook of physiology, sec. 8: Renal physiology. E.E. Windhager (editor), Oxford University Press. USA, 1992, pags. 813-836.
- Tempel B. L., Papazian D. M., Schwarz T. L., Jan Y. N., Jan, L. Y. 1987. "Sequence of a probable potassium channel component encoded at the Shaker locus of *Drosophila*". *Science* **237**: 770-775.

- Timpe L. C., Schwarz T. L., Tempel B. L., Papazian D. M., Jan Y. N., Jan L. Y. 1988. "Expression of functional potassium channels from Shaker cDNA in *Xenopus oocytes*". *Nature Lond.* **331**: 143-145.
- Vallon V., Grahammer F., Richter K., Bleich M., Lang F., Barhanin J., Völkl H., Warth R. 2001. "Role of KCNE1-dependent K<sup>+</sup> fluxes in mouse proximal tubule". *J Am Soc Nephrol* **12**: 2003-2011.
- Vallon V., Grahammer .F, Volkl H., Sandu C. D., Richter K., Rexhepaj R., Gerlach U., Rong Q., Pfeifer K., Lang F. 2005. "KCNQ1-dependent transport in renal and gastrointestinal epithelia". *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 17864-17869.
- Velázquez H, Silva T. 2003. "Cloning and localization of KCC4 in rabbit kidney: expression in distal convoluted tubule". *Am J Physiol Renal Physiol* **285**(1): F49-F58.
- Wagner C. A., Loffing-Cueni D., Yan Q., Schulz N., Fakitsas P., Carrel M., Wang T., Verrey F., Geibel J. P., Giebisch G., Hebert S. C., Loffing J. 2008. "Mouse model of type II Bartter's syndrome. II. Altered expression of renal sodium- and water-transportin proteins". *Am J Physiol Real Physiol* **294**: F1373-F1380.
- Wald H., Garty H., Palmer G., Popovtzer M. M. 1988 "Diferential regulation of ROMK expression in kidney cortex and medulla by aldosterone and potassium". *Am J Physiol Renal Physiol* **275**: 239-245.
- Wang W. H. 2004. "Regulation of renal K transport by dietary K intake". *Annu Rev Physiol* **66**: 547-569.
- Wang W. H., Giebisch G. 2009. "Regulation of potassium (K) handling in the renal collecting duct". *Pflugers Arch – Eur J Physiol* **458**: 157-168.
- Warth R. 2003. "Potassium channels in epithelial transport". *Pflugers Arch Eur J Physiol* **446**: 505-513.
- Woda C. B., Bragin A., Kleyman T. R., Satlin L. M. 2001. "Flow-dependent K<sup>+</sup> secretion in the cortical collecting duct is mediated by a maxi-K channel." *Am J Physiol Renal Physiol* **280**: F786-93.
- Wright F.S., Strieder N., Fowler N.B., Giebisch G. 1971. "Potassium secretion by distal tubule after potassium adaptation". *Am J Physiol* **221**: 437-448.
- Wu W. K. K., Li G. R., Wong H. P. S., Hui M. K. C., Tai E. K. K., Lam E. K. Y., Shin V. Y., Ye Y. N., Li P., Yang Y. H., Luo J. C., Cho C. H. 2006. "Involvement of Kv1.1 and Nav1.5 in proliferation of gastric epithelial cells". *J Cell Physiol* **207**: 437-444.

- Yao X., Chang A., Boulpaep E., Segal A., Desir G. 1996. "Molecular cloning of a glibenclamide-sensitive, voltage-gated potassium, channel expressed in rabbit kidney". *J Clin Invest* **97**: 2525-2533.
- Yao X., Tian S., Chan H., Bimesderfer D., Desir G. 2002. "Expression of KCNA10, a voltage-gated K channel, in the glomerular endothelium and at the apical membrane of the renal proximal tubule". *J Am Soc Nephrol* **13**: 2831-2839.
- Yellen G. 2002. "The voltage-gated potassium channels and their relatives". *Nature* **419**: 35-42.
- Yoo D., Kim B. Y., Campo C., Nance L., King A., Maouyo D., Welling P. A. 2003. "Cell surface expression of the ROMK (Kir 1.1) channel is regulated by the aldosterone-induced kinase, SGK-1 and protein kinase A". *J Biol Chem* **278** (25): 23066-23075.
- Zelikovic I. 2003. "Hypokalaemic salt-losing tubulopathies: an evolving story". *Nephrol Dial Transplant* **18**: 1696-1700.
- Zhu J., Watanabe I., Gomez B., Thornhill W. B. 2003a. "Heteromeric Kv1 potassium channel expression: amino acid determinants involved in processing and trafficking to the cell surface.". *J Biol Chem* **278** (28): 25558-25567.
- Zhu J., Watanabe I., Gomez B., Thornhill W. B. 2003b. "Trafficking of Kv1.4 potassium channels: interdependence of a pore region determinant and a cytoplasmic C-terminal VXXSL determinant in regulating cell-surface trafficking". *Biochem J* **375**: 761-768.

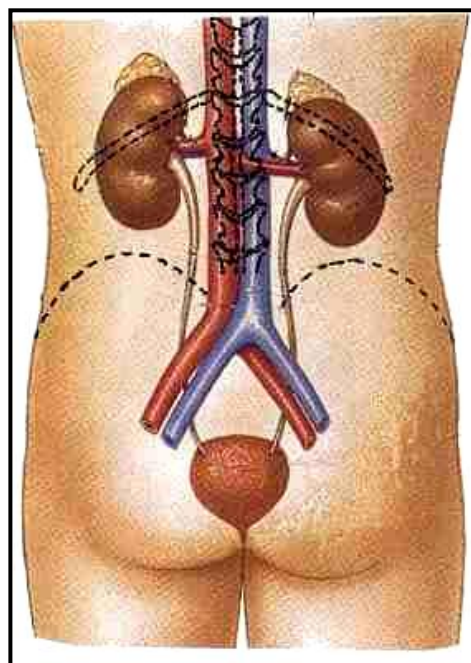


## APÉNDICE A: ANATOMIA Y FISILOGIA RENAL.

Los riñones, junto con la vejiga, uréteres y uretra, constituyen el aparato urinario. Desempeñan un papel vital en el mantenimiento de un ambiente químico estable para el cuerpo. En los riñones se llevan a cabo importantes mecanismos de transporte de los iones ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ , etc.), son los responsables de filtrar las impurezas de la sangre al drenar los productos metabólicos de desecho del cuerpo, xenobióticos y fármacos, así como de mantener el balance en el líquido corporal, el equilibrio electrolítico y ácido base (Clark et al., 2001).

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

Los riñones son órganos en par, situados en el espacio retroperitoneal, bajo el diafragma, en la pared abdominal posterior, a ambos lados de la columna vertebral. El borde superior de los riñones se encuentra a nivel de la doceava vértebra torácica y el borde inferior a nivel de la tercera vértebra lumbar (Figura A1). En el humano adulto cada riñón pesa en promedio entre 140 y 150 g y mide 10 cm de largo por 5 cm de ancho. La superficie externa del riñón es lisa y presenta depresiones lineales superficiales que marcan los límites de los segmentos que conforman el órgano. Cada riñón tiene dos polos, superior e inferior, y dos caras, anterior y posterior, un borde externo convexo y uno interno cóncavo. El borde interno presenta una hendidura longitudinal llamada *hilio renal*,



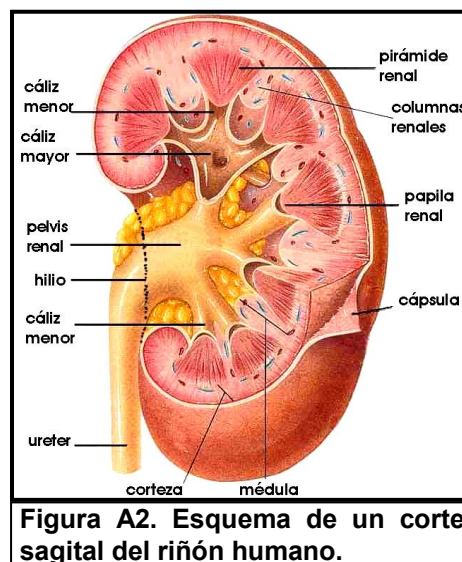
**Figura A1. Localización anatómica del aparato urinario.**

por donde pasan la arteria y la vena renal, los vasos linfáticos, los nervios y el uréter; llevando a una cavidad en cuyo interior se encuentran los vasos renales y la pelvis renal (Figura A2; Guyton y May, 2001).

Los riñones están cubiertos por una capa delgada de tejido conectivo, denominada cápsula renal. En un corte sagital del riñón se distinguen dos regiones, la corteza y la médula renal. La corteza es la región más externa del parénquima renal y es de color marrón y aspecto granuloso, en tanto que la médula renal (región interna del riñón) es de color más pálido y de aspecto estriado debido a la disposición de las estructuras tubulares en dirección radial a la pelvis renal.

En la corteza se distinguen dos regiones histo-topográficas: el laberinto y los rayos medulares. En el laberinto cortical se localizan los ejes vasculares, conformados por una arteria, una vena y un conducto linfático en disposición cortico-radial. Alrededor de cada eje vascular se localizan los corpúsculos renales y sus correspondientes túbulos contorneados proximales y distales. Los rayos medulares están conformados por los túbulos rectos proximales, la porción gruesa ascendente de asas de Henle y los conductos colectores de las nefronas.

La médula se divide en médula externa, que es la porción más cortical de la médula, y la médula interna. La médula externa se subdivide a su vez en dos porciones, la capa externa y la capa interna. La capa externa contiene paquetes de haces vasculares que sustituyen a los ejes vasculares de la corteza, porciones rectas del túbulo proximal (segmento S3) y del túbulo distal (porción gruesa ascendente del asa de Henle), así como conductos colectores. La capa interna está compuesta por haces vasculares completamente desarrollados (vasa recta), porciones delgada descendente y gruesa ascendente del asa de Henle y conductos colectores. La médula interna presenta una reducción del parénquima debido a que solo está conformada por conductos colectores, porciones delgadas del asa de Henle de nefronas yuxtamedulares y algunas porciones de vasa recta. (Houssay y Clingolany, 2000, Guyton y May, 2001; Kriz y Kaisslin, 2008).



**Figura A2. Esquema de un corte sagital del riñón humano.**

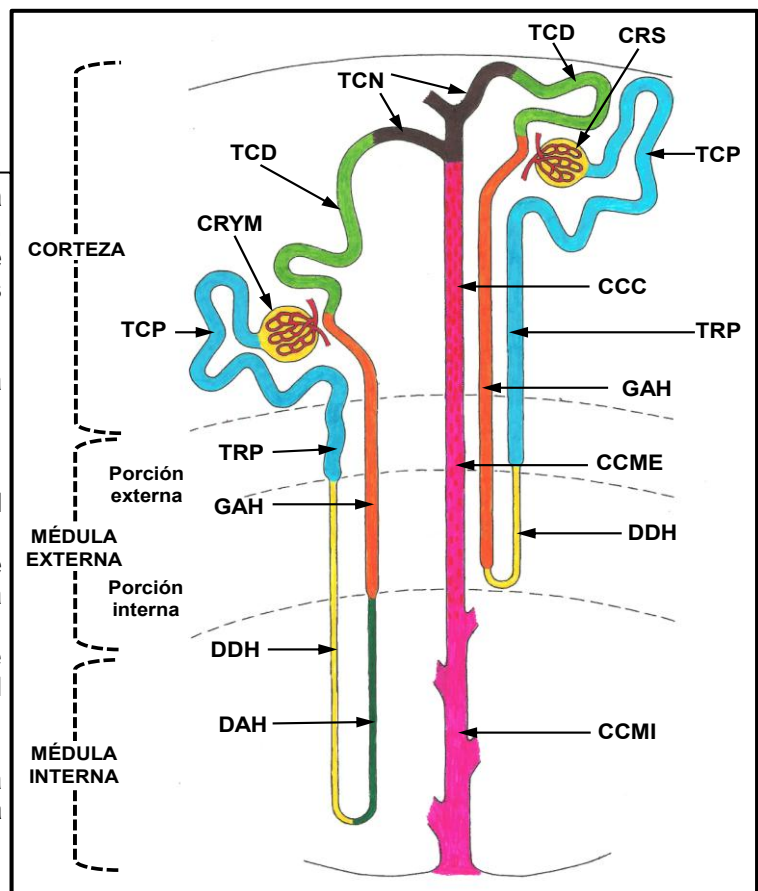
## La nefrona.

La nefrona es la unidad anatómica funcional del riñón. Es un sistema tubular continuo donde se forma la orina, a través de los siguientes mecanismos: **la filtración glomerular, la reabsorción y la secreción tubular**. Se estima que cada riñón humano contiene un millón de nefronas (Guyton y May, 2001; Boron y Boulpaep, 2005). Cada nefrona está formada por el corpúsculo renal y una porción tubular, que consta de varios segmentos sucesivos con estructuras y funciones particulares: un proximal y uno distal, conectados por el asa de Henle, que se proyecta radialmente en dirección medular.

La posición del corpúsculo renal en la corteza permite clasificar a las nefronas en superficiales, media-corticales y profundas (yuxtamedulares) (Figura A3). La longitud de las asas de Henle permite catalogar nefronas con asas cortas que se localizan en la corteza renal (nefronas corticales) o que penetran hasta la médula externa (nefronas de asas cortas) y nefronas con asas que penetran hasta la médula interna a diferente profundidad (nefronas de asas largas), estas últimas participan de forma activa en la concentración de la orina.

La posición de los corpúsculos renales no siempre coincide con la longitud de las asas, y tanto las nefronas superficiales como las yuxtamedulares, pueden tener asas cortas o asas largas de forma indistinta. (Kriz y Bankir 1988, Boron y Boulpaep, 2005; Geneser, 2002).

**Figura A3. Esquema de una nefrona cortical y una nefrona yuxtamedular.** Distribución de los segmentos que conforman a las nefronas en las diferentes capas del tejido renal: Corteza, porción externa y porción interna de la médula externa y médula interna.  
Corpúsculo renal superficial (CRS); Corpúsculo renal yuxtamedular: (CRYM); Túbulo contorneado proximal (TCP); Túbulo recto proximal (TRP); Porción delgada descendente del asa de Henle (DDH); Porción delgada ascendente del asa de Henle (DAH); Porción gruesa ascendente del asa de Henle (GAH); Túbulo contorneado distal (TCD); Túbulo conector (TCN); Conducto colector cortical (CCC); Conducto colector de la médula externa (CCME); Conducto colector de la médula interna: (CCMI). (Modificado de Kriz, 1988).



## Corpúsculo renal.

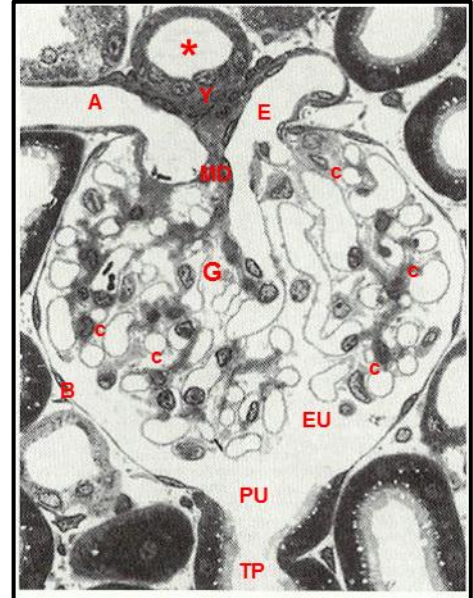
El corpúsculo renal es la primera porción de la nefrona, de estructura redondeada que mide aproximadamente 200  $\mu\text{m}$  de diámetro. Se ubica en la corteza y está formado por el glomérulo y la cápsula de Bowman.

El glomérulo es un penacho de capilares ramificados que se anastomosan entre sí. Se agrupan en 8 a 10 lobulillos dispuestos en forma helicoidal alrededor de un eje, correspondiente a la porción interna del mesangio (Figura A4).

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

El proceso de filtración produce un ultrafiltrado de la sangre. Tiene lugar desde los capilares del glomérulo, a través de fenestraciones de sus células endoteliales, una membrana basal triple de laminina y la capa de epitelio visceral, hasta el espacio urinario capsular, quedando retenidos eritrocitos y sustancias con un diámetro mayor a 80 Å. El ultrafiltrado del espacio urinario, pasa al túbulo proximal a través del polo urinario.

Opuesto al polo urinario se encuentra el polo vascular, por el que ingresa una arteriola aferente (que da origen al penacho de capilares del corpúsculo) y egresa una arteriola eferente que recibe la sangre que regresa del penacho de capilares (Geneser, 2003).

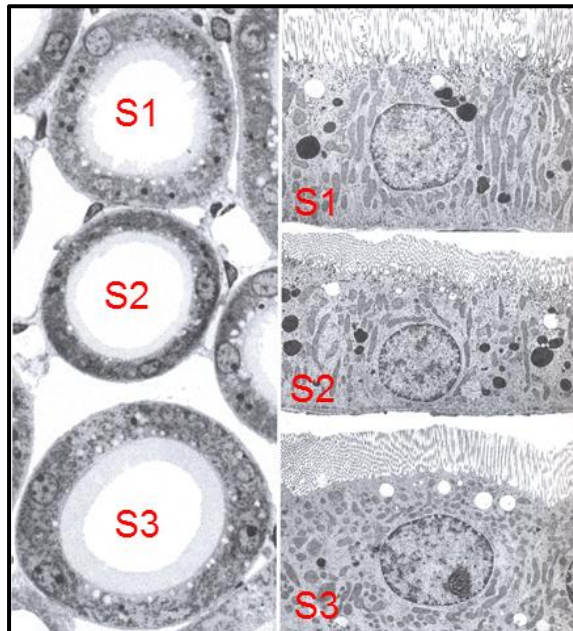


**Figura A4. Micrografía electrónica de un corpúsculo renal.** Aparato yuxttaglomerular (Y); Arteriola aferente (A); Arteriola eferente (E); Mácula densa (MD); Glomérulo (G); Cápsula de Bowman (B); Capilares (c); Espacio urinario (EU); Polo urinario (PU); Túbulo proximal (TP). Transición de asa de Henle a túbulo distal (\*).



### Túbulo proximal.

El túbulo proximal es el primer componente tubular de la nefrona, comienza en el polo urinario del corpúsculo renal y termina en la transición a porción delgada descendente del asa de Henle. El túbulo proximal se conforma de dos porciones: el túbulo contorneado proximal (TCP) y el túbulo recto proximal (TRP). Estas porciones se constituyen de tres segmentos: S1, S2 y S3. El segmento S1, comienza en el corpúsculo renal y comprende la primera porción del TCP. El segmento S2 inicia en la segunda mitad del TCP y termina en la primera mitad del TRP, en los rayos medulares. El segmento S3 incluye la mitad distal del TRP que se extiende al interior de la médula. Las células que conforman estos segmentos tubulares, presentan membranas lumbales con numerosas microvellosidades



**Figura A5. Micrografía electrónica de tubulos contorneados proximales.** Corte transversal de los segmentos S1, S2 y S3 (a); Micrografía electrónica de células de los segmentos S1, S2 y S3 (b). Tomada de Kriz y Kaisslin, 2008.

llamadas borde de cepillo, un aparato vacuolar subapical (abajo del borde de cepillo) rico en membranas, correlacionado con el aparato endocítico, y poseen membranas basolaterales con numerosas interdigitaciones, que son invaginaciones pronunciadas y profundas de la membrana plasmática. Las uniones estrechas son superficiales, constituidas principalmente por un filamento simple.

En el túbulo proximal ocurre la reabsorción de gran parte del filtrado glomerular (60 – 70%), principalmente por vía paracelular, diversos compuestos orgánicos son secretados hacia el lumen tubular, y se recuperan las proteínas filtradas por el glomérulo, a través de la endocitosis mediada por receptores. Las células del TP presentan una gran variedad de proteínas transportadoras en la membrana plasmática, que acoplan la reabsorción del  $\text{Na}^+$  en dirección de su gradiente, con la reabsorción aminoácidos y glucosa (simporte) y con la secreción de protones (antiporte). También ocurre la reabsorción transcelular de agua a través del canal de agua Acuaporina 1 (AQP1), localizada en las membranas apicales y basolaterales.

## Asa de Henle.

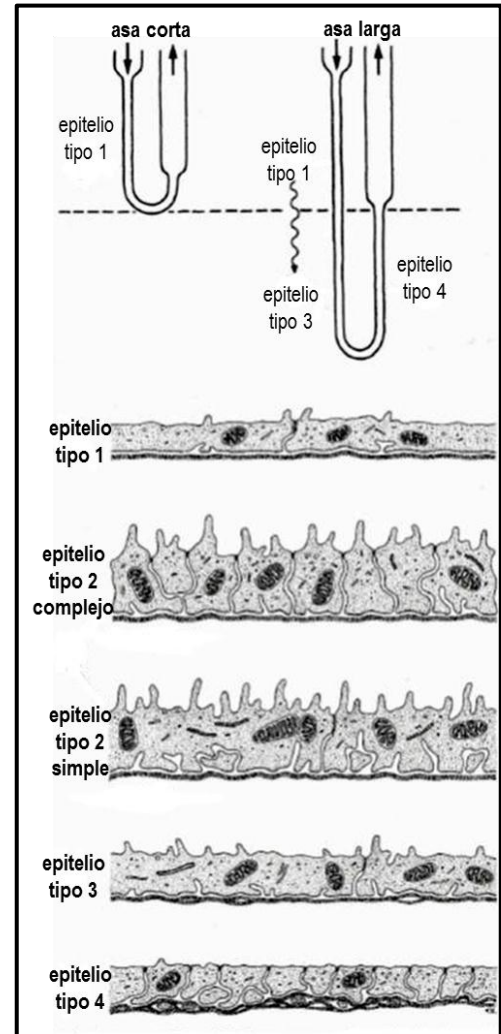
El asa de Henle es la siguiente porción tubular a partir del segmento S3 del túbulo proximal es el asa de Henle. Está conformada por tres segmentos, una porción delgada descendente (DDH), una porción delgada ascendente (DAH) y una porción gruesa ascendente (GAH).

En la asas de Henle cortas, la DDH está constituida por células planas sin interdigitaciones (*epithelium tipo 1*).

En las asas de Henle largas, la DDH presenta un diámetro mayor y un epitelio más grueso que el de las asas de Henle cortas. Las células de este epitelio son heterogéneas, sus características estructurales cambian gradualmente conforme descienden en la médula interna, a estructuras más simples; por lo tanto esta porción se subdivide en:

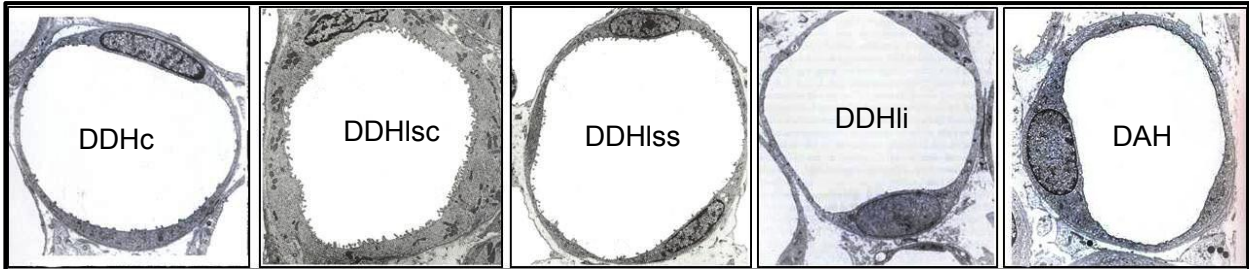
- La porción superior DDH largas (*epithelium tipo 2*). El epitelio que la conforma puede ser complejo (en unas especies) o simple en otras. el primero está constituido por células con un alto grado de interdigitaciones (prolongaciones de la membrana plasmática), las uniones estrechas son muy poco profundas (superficiales), conformadas por una línea de unión. Estas características estructurales facilitan una vía de transporte paracelular; La forma de epitelio simple no presenta interdigitaciones y las uniones estrechas son más profundas y están conformadas por varias líneas de unión. Las características de este epitelio son la gran cantidad de microvellosidades luminales, así como una alta densidad de partículas submembranales ensambladas en las membranas apical y basolateral.

- La porción inferior DDH largas (*epithelium tipo 3*). Consta de células planas, carentes de interdigitaciones, las uniones estrechas están a una profundidad apicobasal intermedia, compuestas por varias líneas de unión, con menor viabilidad para el transporte paracelular, presentan menor cantidad de microvellosidades luminales, y de partículas submembranales.



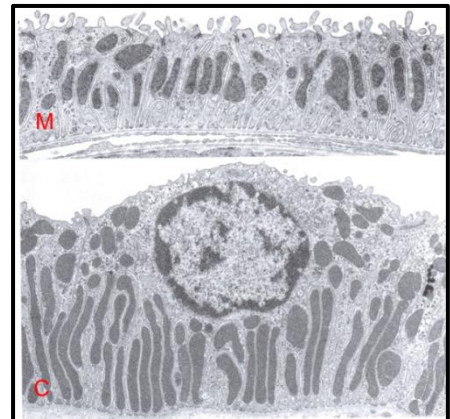
**Figura A6. Esquema de los diferentes epitelios que conforman a la porción delgada de las asas de Henle (Kriz y Kaisslin, 2008).**

La porción DAH está presente solo en las asas largas (*epithelium tipo 4*), e inicia antes de la curva de retorno del asa, por lo que funcionalmente, la curva del asa se considera parte de la DAAH. Las células en este segmento son planas, con una gran cantidad de interdigitaciones, unidas por uniones estrechas superficiales conformadas por una sola línea de unión. Esta organización, apta para la vía de transporte paracelular, corresponde con la alta permeabilidad a los iones reportada en este segmento (Boron y Boulpaep, 2005).



**Figura A7. Micrografías electrónicas de la porción delgada del asa de Henle.** Porción delgada descendente de asa corta (DDHc); Porción delgada descendente de asa larga, parte superior, epitelio complejo (DDHsc); Porción delgada descendente de asa larga, parte superior, epitelio simple (DDHss); Porción delgada descendente de asa larga, parte inferior (DDHli); Porción delgada ascendente (DAH), (Kriz y Kaisslin, 2008).

La porción GAH, asciende a través de la médula externa y los rayos medulares, se extiende por el laberinto cortical hasta la mácula densa. Las células de esta porción tubular poseen núcleos de gran tamaño, presentan interdigitaciones basolaterales con mitocondrias de gran tamaño, microvellos cortos y gruesos en la membrana apical, que bordean a las uniones estrechas y se encuentran a una profundidad apicobasal de intermedia a baja. Estas características morfológicas pueden contribuir a la baja permeabilidad del agua por vía paracelular en este segmento y a la vez una permeabilidad selectiva a los iones  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$ . El NaCl es absorbido activamente del fluido tubular, por vía transcelular, a través del cotransportador de Na, K, 2Cl (NKCC2), en la membrana apical de estas células (inhibido por los diuréticos de asa como la Furosemida y Bumetanida), y la alta densidad de ATPasa  $Na^+-K^+$  en la membrana basolaterales. Por lo tanto el papel principal de estas células es la generación de un medio hiperosmótico en el intersticio de la médula renal.

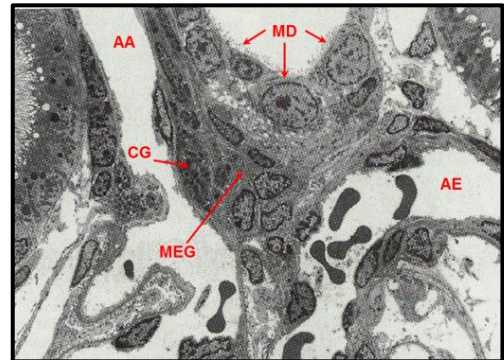


**Figura A8. Porción gruesa ascendente del asa de Henle.** Células de la capa interna de la médula externa (M); célula de la porción cortical (C) (Kriz y Kaisslin, 2008).



### Mácula densa (MD).

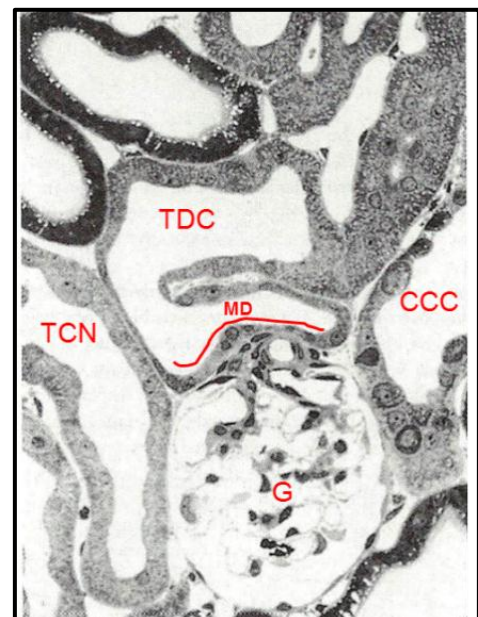
La mácula densa es una región de células especializadas que entra en contacto con las arteriolas aferente y eferente del glomérulo. Por otro lado, las células de la pared de la arteriola aferente que están en contacto con las células de la mácula densa, son células musculares lisas especializadas en la producción de renina. Estas células, junto con la mácula densa y la matriz extraglomerular conforman el aparato yuxtaglomerular. Este es el sitio donde se secreta la renina (Boron y Boulpaep, 2005).



**Figura A9. Mácula densa (MD).** Arteriola aferente (A); Célula granular (CG); Mesangio extraglomerular (MEG); Arteriola eferente (AE) (Kriz y Kaisslin, 2008).

### Túbulo contorneado distal (TCD).

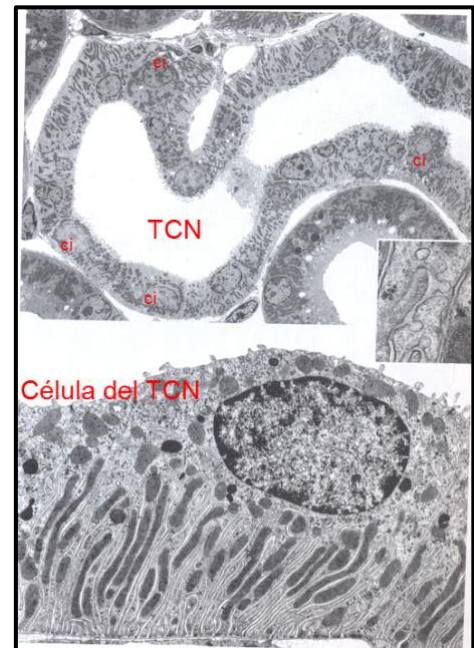
El TCD, comienza al final del segmento tubular que conforma la mácula densa y se extiende hasta la transición con el túbulo conector, esta subdividido en dos segmentos estructurales el TCD1 y el TCD2; La transición de GAH a TCD está marcada por un incremento abrupto en la altura de sus células epiteliales. Este cambio estructural coincide con el remplazo del cotransportador NKCC2 (exclusivo en GAH) por el cotransportador de NaCl sensible a tiazida (NCC), responsable de la absorción transepitelial de Na<sup>+</sup>. Las células que conforman al TCD son similares a las de la GAH, con alta densidad de interdigitaciones basolaterales. También presentan microvellosidades gruesas en las membranas apicales. El segmento del TCD2 (segmento transicional), presenta menos interdigitaciones laterales y más pliegues en la membrana basal, este cambio estructural sutil viene acompañado con la expresión de los canales epiteliales de Na<sup>+</sup> sensibles a la Amilorida (ENaC) y de canales de Ca<sup>2+</sup> (TRPV5 ó ECaC), en las membranas apicales; así como la aparición de células intercaladas (descritas más adelante).



**Figura A10. Segmentos distales de la nefrona.** Túbulo contorneado distal (TDC); Túbulo conector (TCN); Conducto colector cortical (CCC). Mácula densa (MD); Glomérulo (G). (Kriz y Kaisslin, 2008).

### Túbulo conector (TCN).

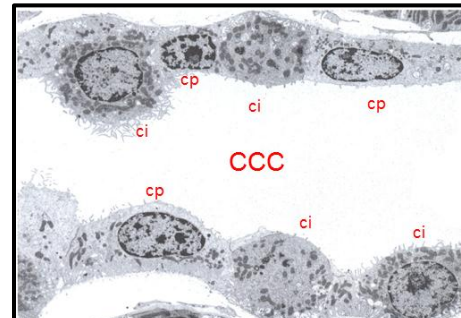
El TCN es la siguiente porción a partir del TCD2, y es el intermediario entre el TCD (con células interdigitadas) y el conducto colector (con células no interdigitadas) conformado por dos tipos de células, las células del túbulo conector y las células intercaladas (ci). La organización de las uniones estrechas cambia, de bandas paralelas, a redes complejas anastomosadas. Las interdigitaciones son sustituidas por pliegues profundos e irregulares en la membrana basal; y Las microvellosidades en las membranas apicales se vuelven delgadas. Las células del TCN expresan en su membrana apical al ENaC, así como al canal de potasio Kir1.1 (ROMK: Rat Outer Medulla potassium channel), esto indica que la reabsorción transcelular de  $\text{Na}^+$  está acoplada a la secreción de  $\text{K}^+$ . La expresión del canal TRPV5 en la membrana apical está asociada con la expresión de Calbindina D28k (CBD) en el citoplasma y con la expresión del intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX: sodium calcium exchanger) y de la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ , en la membrana basolateral. Lo cual indica que se lleva a cabo la reabsorción transcelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en este segmento. La membrana basolateral se caracteriza por la expresión del canal de agua Acuaporina 2 (AQP2). El TCN se caracteriza funcionalmente por la regulación de la absorción de  $\text{Na}^+$  y la secreción de  $\text{K}^+$ .



**Figura A11. Túbulo conector (TCN).** Panel superior: micrografía de un segmento de TCN con células intercaladas en su epitelio (ci); panel inferior: micrografía de una célula del TCN con interdigitaciones en su membrana basolateral (Kriz y Kaisslin, 2008).

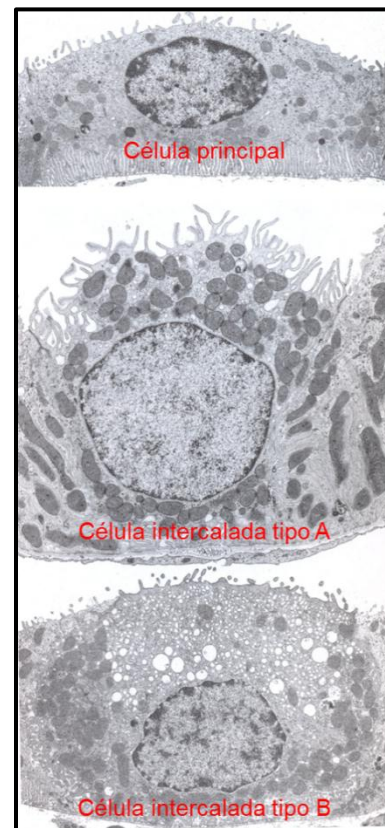
### Conducto colector (CC).

El conducto colector es un segmento tubular que penetra las tres capas del parénquima renal, corteza, médula externa y médula interna. Colecta el fluido tubular de aproximadamente 10 nefronas y lo conduce hasta la papila renal donde descarga en el cáliz renal. Algunos autores describen el conducto colector inicial (CCI), que se presenta a partir del TCN y hasta la primera confluencia con otra nefrona. A partir de esta convergencia se denomina conducto colector cortical (CCC). Ambas porciones son idénticas y están conformadas por dos tipos de células, las células principales (cp) y las células intercaladas (ci).



**Figura A12. Conducto colector cortical (CCC).** Panel superior: micrografía de un segmento del CCC conformado por células principales (cp) y células intercaladas (ci). (Kriz y Kaisslin, 2008).

Las células principales constituyen el 70% de la población celular de estos túbulos y presentan invaginaciones basolaterales poco desarrolladas. Funcionalmente son las responsables de la reabsorción de  $\text{Na}^+$  a través del ENaC acoplada a la secreción de  $\text{K}^+$  a través del canal ROMK al igual que las células del TCN. Las células intercaladas son iguales a las presentes en el TCN y se distribuyen en dos subpoblaciones: las células intercaladas tipo A (ciA) y las células intercaladas tipo B (ciB). Las ciA secretan  $\text{H}^+$ , a través de la ATPasa vacuolar de  $\text{H}^+$  (V-ATPasa) y de a ATPasa  $\text{H}^+/\text{K}^+$ , que se expresan en la membrana apical. La V-ATPasa funciona en serie con un intercambiador de bicarbonato/cloro ( $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ ), localizado en la membrana basolateral, denominado AE1 o Banda 3. La ATPasa  $\text{H}^+/\text{K}^+$  se expresa solo en condiciones de hipopotasemia o baja ingesta de  $\text{K}^+$  e intercambia  $\text{K}^+$  luminal por  $\text{H}^+$ . Las ciA se localizan desde la porción distal del TCD hasta las porciones medulares del CC, constituyen la minoría de la población de ci en el CCC y la población total de ci en el en la porción medular del CC. Las ciB secretan  $\text{HCO}_3^-$  a través del intercambiador



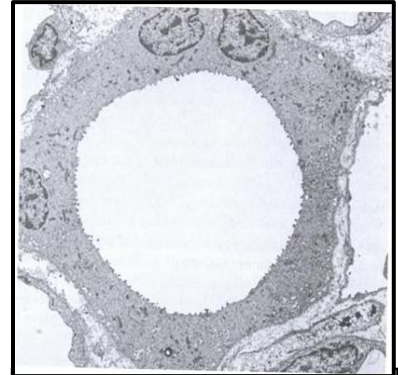
**Figura A13. Células del Conducto colector cortical** (Kriz y Kaisslin, 2008).

aniónico de  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ , denominado Pendrina, en su membrana apical. El intercambio aniónico apical de las ciB funciona en serie con la V-ATPasa localizada en la membrana basolateral,

donde bombea protones al intersticio. Las ciB se distribuyen exclusivamente en la corteza renal desde el TCN hasta el CCC, segmento donde constituyen la mayor parte de la población de ci (Muto, 2001; Boron y Boulpaep, 2005; Kriz y Kaisslin, 2008).

El conducto colector medular (CCM) es la porción tubular que recibe el fluido de diferentes nefronas, que confluyen en el CCC (aproximadamente 10 nefronas por conducto colector). Éste se subdivide en conducto colector de la médula externa (CCME) y Conducto colector de la médula interna (CCMI), El número de células intercaladas disminuye a lo largo del conducto a medida que se penetra en la médula predominando las células principales como única población celular, denominadas células del conducto colector de la médula interna.

El trayecto tubular, encuentra su porción final en la papila renal con el Conducto de Bellini, cuyas células son de mayor tamaño que las descritas en los segmentos anteriores (Muto, 2001; Boron y Boulpaep, 2005; Kriz y Kaisslin, 2008).

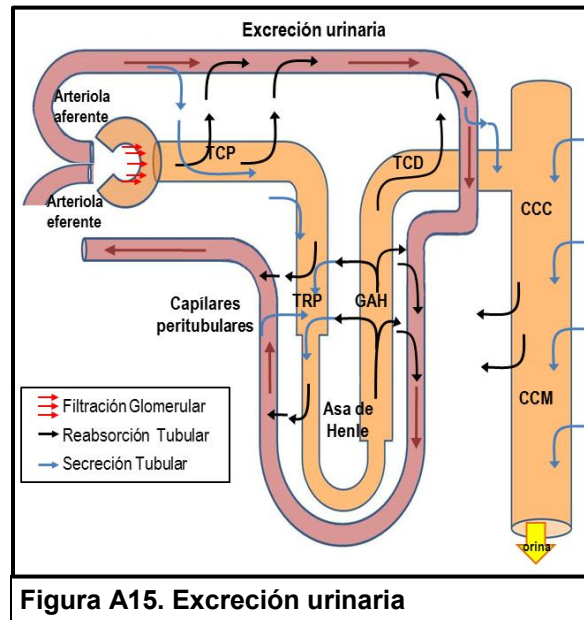


**Figura A14. Corte transversal del Conducto colector de la médula interna (CCMI).** El epitelio en este segmento tubular es homogéneo (Kriz y Kaisslin, 2008).



## Excreción urinaria

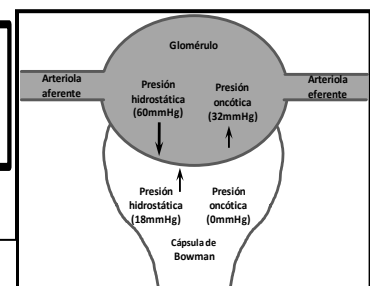
La excreción urinaria es el resultado de tres procesos de transporte de agua y solutos a través de los epitelios renales: la filtración glomerular, la reabsorción tubular y la secreción tubular. La filtración glomerular está dada por procesos físicos hidrostáticos, la reabsorción y la secreción tubular se llevan a través de procesos de transporte transepitelial: transcelular y paracelular.



## Filtración glomerular.

El proceso de filtración tiene lugar desde los capilares del glomérulo, hasta el espacio urinario capsular. La presión neta de filtración glomerular está dada por la suma de las fuerzas que favorecen y las fuerzas que se oponen a la ultrafiltración; las primeras son la presión hidrostática en los capilares glomerulares y la presión oncótica del espacio urinario; las segundas son la presión hidrostática del espacio urinario y la presión oncótica de los capilares glomerulares.

|                                      |   |   |   |   |   |                                       |
|--------------------------------------|---|---|---|---|---|---------------------------------------|
| Presión de Filtración Neta (10 mmHg) | = | Presión Hidrostática Glomerular (60 mmHg) | - | Presión de la Cápsula de Bowman (18 mmHg) | - | Presión Oncótica Glomerular (32 mmHg) |
|--------------------------------------|---|---|---|---|---|---------------------------------------|



**Figura A16. Filtración glomerular** (Guyton y May, 2001).

Los riñones reciben un flujo sanguíneo de 1200 mL/min, aproximadamente el 25% del gasto cardiaco, a través de la arteria renal. La tasa de filtración glomerular es de 125 mL/min y es determinada por la presión neta de filtración, la permeabilidad hidráulica y el área de filtración.

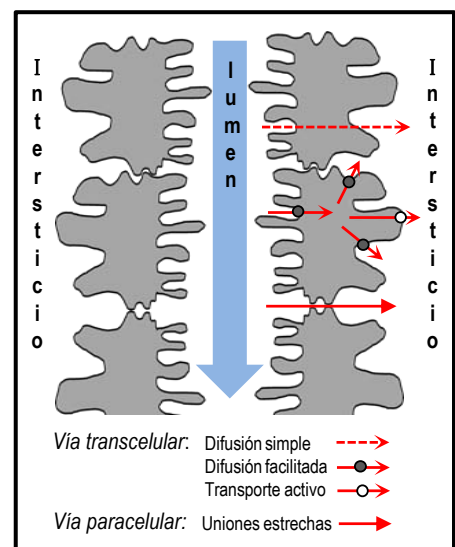
En total se producen 180 litros de filtrado glomerular al día, los cuales se reducen a 1 L/día de orina debido a la función tubular (reabsorción y secreción) (Guyton y Nay, 2001; Boron y Boulpaep, 2005).

### Reabsorción tubular.

La reabsorción tubular es el proceso de transporte transepitelial de agua y solutos (que se filtraron en el corpúsculo renal) del fluido tubular al torrente sanguíneo a través de los epitelios. La reabsorción tubular involucra dos etapas: primero, el transporte de sustancias desde el fluido tubular hacia el intersticio renal y después el transporte de sustancias desde el intersticio hacia el torrente sanguíneo.

El transporte transepitelial de las sustancias ocurre a favor de su gradiente electroquímico transepitelial, en dirección lumen-intersticio y se lleva a cabo por las vías transcelular y paracelular. La vía transcelular implica a los mecanismos de transporte transmembranal como son: la difusión simple (las moléculas liposolubles atraviesan la bicapa lipídica libremente), la difusión facilitada (transporte pasivo de moléculas polares o iones, a través de canales y transportadores) y el transporte activo (en dirección opuesta al gradiente de los solutos, e involucra la hidrólisis de ATP). En la vía paracelular las sustancias difunden a través de las uniones estrechas y los espacios intercelulares.

Algunas hormonas, promueven y estabilizan la expresión de proteínas que facilitan la difusión (canales, transportadores o las bombas ATPasas) en los epitelios renales; por ejemplo: La aldosterona, estimula la reabsorción activa de sodio a nivel distal al estabilizar la expresión apical del canal de  $\text{Na}^+$  epitelial y estimular la actividad de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  basolateral. La vasopresina estimula la reabsorción de agua, al promover la expresión apical y basolateral de canales de agua (acuaporinas) en los conductos colectores, también estimula la reabsorción de urea a nivel distal a través de los transportadores UT1. La angiotensina II y adrenalina estimulan la reabsorción de  $\text{Na}^+$  en los túbulos proximales al estimular al cotransportador  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  apical y a la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  basolateral (Guyton y May, 2001; Boron y Boulpaep, 2005).



**Figura A17. Mecanismos de transporte transepitelial.**

## Secreción tubular.

La secreción tubular es el proceso de transporte transepitelial, en el que los desechos y las sustancias en exceso, que no fueron filtrados inicialmente en los glomérulos o que fueron reabsorbidas, son transportados desde el torrente circulatorio hacia los túbulos, para su excreción. La secreción tubular, también involucra a los mecanismos de transporte activo y transporte pasivo a través de las membranas de los epitelios tubulares, en dirección intersticio-lumen.

Las células epiteliales que conforman los diferentes segmentos tubulares presentan una gran variedad morfológica y funcional así como de transportadores y canales iónicos en sus membranas apicales y basolaterales. La distribución y la modulación de la expresión de estas proteínas de membrana determina si el transporte será a favor de la secreción o la absorción de los solutos (Muth y Caplan, 2003).

En el cuadro siguiente se resumen los diferentes procesos de transporte de agua y los diferentes solutos involucrados a lo largo del componente tubular de la nefrona.

**Tabla A1. Procesos de transporte a lo largo de la nefrona** (Guyton y May, 2001; Boron y Boulpaep, 2005).

| SEGMENTO TUBULAR                                    | TIPO CELULAR                        | TRANSPORTE.  |
|---|-------------------------------------|--|
| Túbulo contorneado proximal (TCP).                  | S1<br>S2                            | <u>Reabsorción:</u> $\text{Na}^+$ , $\text{Cl}^-$ , $\text{K}^+$ , $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{H}_2\text{O}$ , fosfato, sulfato, glucosa, aminoácidos, mono y dicarboxilatos, urea, $\text{HCO}_3^-$ .<br><u>Secreción:</u> $\text{H}^+$ y $\text{NH}_3$ y urato. |
| Túbulo recto proximal (TRP).                        | S3                                  | <u>Reabsorción:</u> $\text{Na}^+$ , $\text{Cl}^-$ , glucosa, urato.<br><u>Secreción:</u> $\text{K}^+$ .  |
| Porción delgada descendente del asa de Henle (DDH). | Células DDH                         | <u>Reabsorción:</u> $\text{Na}^+$ .<br><u>Secreción:</u> $\text{K}^+$ , urea y $\text{NH}_4^+$ .   |
| Porción delgada ascendente del asa de Henle (DAH).  | Células DAH                         | <u>Reabsorción:</u> $\text{Na}^+$ , $\text{Cl}^-$ , $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{K}^+$ , $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{NH}_4^+$ , $\text{HCO}_3^-$ .  |
| Porción gruesa ascendente del asa de Henle (GAH).   | Células GAH                         | <u>Reabsorción:</u> $\text{Na}^+$ , $\text{Cl}^-$ , $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{H}_2\text{O}$ , fosfato, $\text{HCO}_3^-$ .   |
| Túbulo contorneado distal (TCD).                    | TCD                                 | <u>Reabsorción:</u> $\text{Na}^+$ , $\text{Cl}^-$ , $\text{Mg}^{2+}$ .<br><u>Secreción:</u> $\text{K}^+$   |
| Túbulo conector (TCN).                              | Células TCN<br>Células Intercaladas | <u>Reabsorción:</u> $\text{Na}^+$ , $\text{Cl}^-$ .<br><u>Secreción:</u> $\text{K}^+$  |
| Conducto colector cortical (CCC, incluye al CCI).   | Células Principales                 | <u>Reabsorción:</u> $\text{Na}^+$ . <u>Secreción:</u> $\text{K}^+$ .   |
|   | Células Intercaladas                | ( $\alpha$ ) <u>Reabsorción:</u> $\text{K}^+$ . <u>Secreción:</u> $\text{H}^+$ .<br>( $\beta$ ) <u>Reabsorción:</u> $\text{Na}^+$ , $\text{Cl}^-$ . <u>Secreción:</u> $\text{HCO}_3^-$   |
| Conducto colector de la médula externa (CCME).      | Células principales                 | <u>Reabsorción:</u> $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{HCO}_3^-$ . <u>Secreción:</u> $\text{NH}_4^+$  |
| Conducto colector de la médula interna (CCMI).      | Células CCMI                        | <u>Reabsorción:</u> $\text{K}^+$ , Urea, $\text{HCO}_3^-$ . <u>Secreción:</u> $\text{H}^+$   |



## APENDICE B: GLOSARIO.

**Acidosis:** Término clínico que indica un trastorno hidroelectrolítico que puede conducir a acidemia, y se define por un pH sanguíneo inferior a 7.35. La acidosis puede ser metabólica o respiratoria.

**Acidosis metabólica:** Trastorno del equilibrio ácido-base, caracterizado por un incremento en la acidez del plasma sanguíneo y es, por lo general, una manifestación de trastornos metabólicos en el organismo.

**Alcalosis metabólica:** Trastornos del equilibrio ácido-base en que una concentración baja de hidrógeno circulante y el consecuente aumento de la concentración de bicarbonato, eleva el pH del plasma sanguíneo por encima del rango normal (7.35-7.45). En la alcalosis metabólica se halla un pH arterial  $>7,45$  y un bicarbonato plasmático  $>25$  mmol/L como alteración primaria y un aumento de la  $pCO_2$ , por hipoventilación compensatoria.

**Alcalosis:** Término clínico que indica un trastorno hidroelectrolítico en el que hay un aumento en la alcalinidad (o basicidad) de los fluidos del cuerpo, es decir, un exceso de base (álcali) en los líquidos corporales.

**Autosómico dominante:** Patrón de herencia clásico o mendeliano que se caracteriza por presentar el fenómeno de dominancia genética para un determinado alelo de un gen cuyo locus se encuentra ubicado en alguno de los autosomas o cromosomas no determinantes del sexo.

**Autosómico recesivo:** Patrón de herencia clásico o mendeliano y se caracteriza por presentar el fenómeno de dominancia genética. En este patrón de herencia el fenotipo que caracteriza al alelo recesivo se encuentra codificado en un gen cuyo locus se encuentra ubicado en alguno de los autosomas o cromosomas no determinantes del sexo. Este alelo recesivo no se manifiesta si se encuentra acompañado por un alelo dominante.

**Calambre:** Contracción espasmódica, involuntaria, dolorosa y poco durable de ciertos músculos, particularmente de los de la pantorrilla.

**Constipación:** Dificultad para el paso de las heces o paso incompleto o infrecuente de heces compactas debida a una inhibición del peristaltismo producida por una enfermedad del tracto digestivo.

**Fibrilación ventricular:** Trastorno del ritmo cardiaco que presenta un ritmo ventricular rápido ( $>250$  latidos por minuto), irregular, de morfología caótica y que lleva irremediamente a la pérdida total de la contracción cardíaca, con una falta total del bombeo sanguíneo y por tanto a la muerte del paciente.

**Fosfaturia:** Pérdida excesiva de fosfatos en la orina; su eliminación normal es de 800 a 1.300 mg/día.

**Glucosuria:** Presencia de glucosa en la orina a niveles elevados. Intervalo normal de glucosa en la orina: 0 - 0.8 mmol/L (0 - 15 mg/dL). La glucosa se reabsorbe en su totalidad a nivel de las nefronas. La glucosuria renal es la consecuencia de un defecto hereditario de reabsorción

de glucosa en el túbulo renal, y viene definida por los siguientes criterios: glucosuria constante, niveles normales de glucosa en sangre, utilización normal de hidratos de carbono y ausencia de otras anomalías tubulares.

**Hiperaldosteronismo:** Trastorno metabólico caracterizado por una sobreproducción y secreción de la hormona aldosterona por parte de las glándulas suprarrenales, lo cual conlleva a niveles disminuidos de potasio en el plasma sanguíneo y, en muchos casos a hipertensión arterial.

**Hiperaminoaciduria:** Excreción aumentada de aminoácidos en la orina. La aminoaciduria normal es de 300 a 900 miligramos/día.

**Hipercalcemia:** Trastorno hidroelectrolítico que consiste en la elevación de los niveles de calcio plasmático por encima de 10.5 mg/dL. La hipercalcemia puede producir trastornos del ritmo cardíaco, así como un aumento en la producción de gastrina y úlceras pépticas. Los valores normales de calcio sérico van de 8.5 a 10.2 mg/dL.

**Hiper calciuria:** Es la presencia de un exceso de calcio en la orina. Los valores normales de calcio en la orina van de 100 a 300 mg/día, cuando se consume una dieta normal de calcio; sin embargo cuando se consume una dieta baja en calcio, la cantidad de éste en la orina será de 50 a 150 mg/día.

**Hipercalemia (Hiperpotasemia, Hiperkalemia):** Trastorno hidroelectrolítico que se define como un nivel elevado de potasio plasmático, por encima de 5.5 mmol/L. Sus causas pueden ser debido a un aumento del aporte, redistribución o disminución de la excreción renal. Niveles muy altos de potasio constituyen una urgencia médica debido al riesgo de arritmias cardíacas.

**Hipermagnesiuria:** Aumento de la tasa de excreción de magnesio en la orina. La eliminación urinaria del magnesio es normalmente de 200 mg/día.

**Hipernatremia:** Trastorno hidroelectrolítico que consiste en un elevado nivel de sodio en la sangre. Los valores normales de sodio en la sangre son de: 135 - 145 miliequivalentes por litro (mEq/L).

**Hipernatriuria (hipernatriuresis):** Aumento en la tasa de excreción de sodio en la orina. Los valores normales de sodio en la orina son de 40 a 220 miliequivalentes por litro por día (mEq/L/día), dependiendo del consumo de líquido y sal del individuo.

**Hiperpotasiuria (hipercaliuria, hiperkaliuria):** Aumento en la tasa de excreción de potasio en la orina. El rango normal para una persona que lleva una dieta regular es de 25 a 125 miliequivalentes por litro al día (mEq/L/día). Sin embargo, se pueden dar niveles urinarios más altos o más bajos, dependiendo de la cantidad de potasio en la dieta y en el cuerpo.

**Hiperreninemia:** Tasa anormalmente elevada de renina en sangre. Los valores normales van de 0.2 a 3.3 ng/mL/ hora. Actividad renina:  $1,1 \pm 0.92$  ng/mL/h.

**Hipocalcemia:** Es el trastorno hidroelectrolítico consistente en un nivel sérico de calcio total menor de 2.1 mmol/L u 8.5 mg/dL en seres humanos, y presenta efectos fisiopatológicos. Los valores normales de calcio sérico van de 8.5 a 10.2 mg/dL.

**Hipocalciuria:** Disminución de la cantidad de calcio contenido en la orina. Se observa particularmente en las osteomalacias, las insuficiencias paratiroideas y las insuficiencias renales glomerulares. Los valores normales de calcio en la orina van de 100 a 300 mg/día, cuando se consume una dieta normal de calcio; sin embargo cuando se consume una dieta alta en calcio, la cantidad de éste en la orina será de 50 a 150 mg/día.

**Hipocalemia (hipopotasemia, hipokalemia):** Trastorno en el equilibrio hidroelectrolítico del cuerpo, que se caracteriza por un descenso en los niveles del ion potasio (K) en el plasma, con niveles por debajo de 3.5 mmol/L.

**Hipocloremia:** Disminución de la cantidad de cloro (cloruro) contenido en el plasma sanguíneo. Con frecuencia obedece a una pérdida de cloro por vía digestiva (vómitos o diarrea profusa) o a una insuficiencia renal. Valores normales de cloruro en plasma: 96 -106 miliequivalentes por litro (mEq/L).

**Hipofosfatemia:** Es un trastorno electrolítico en el cual existe niveles anormalmente bajos de fósforo en la sangre. Los valores normales van de 2.4 a 4.1 miligramos por decilitro (mg/dL).

**Hipomagnesemia:** Niveles bajos de magnesio en la sangre. Los valores normales de magnesio en el suero son de 1.7 a 2.2 mg/dL.

**Hiponatremia:** Trastorno hidroelectrolítico definido como una concentración de sodio en sangre por debajo de 135 mmol/L.

**Hiponatremia:** Trastorno hidroelectrolítico que consiste un bajo nivel de sodio en la sangre. Los valores normales de sodio en la sangre son de 135 a 145 miliequivalentes por litro (mEq/L).

**Hipoparatiroidismo:** Trastorno causado por la función disminuida de las glándulas paratiroideas, caracterizada por una muy baja concentración de la hormona paratiroidea (PTH), de calcio y un aumento en la concentración de fósforo sanguíneo. Los valores normales de la PTH son de 10 a 55 picogramos por mililitro (pg/mL).

**Hipostenuria:** Eliminación de orina poco concentrada. Las causas pueden proceder de las diversas enfermedades renales que incapacitan al riñón para concentrar la orina, a causa de una diabetes insípida, o por una ingesta excesiva de líquidos.

**Hipotensión:** Condición anormal en la que la presión sanguínea de una persona es mucho más baja de lo usual, lo que puede provocar síntomas como vértigo o mareo. Los valores para un ser humano adulto, sano, en reposo, son aproximadamente 120 mmHg (16 kPa) para la presión sistólica y 80 mmHg (11 kPa) para la presión diastólica.

**Hipotonía:** Disminución del tono muscular o flacidez.

**Isostenuria:** Estado de insuficiencia renal en la que se genera de forma constante una orina de baja densidad. La densidad de la orina de un individuo sano es de 1010 a 1020 (peso específico: 1.010 - 1.030 g/L).

**Nefrocalcinosis:** Es un trastorno en el cual hay demasiado calcio depositado en los riñones. Esta afección es común en los bebés prematuros. Puede ser provocada por hiperparatiroidismo, acidosis hiperclorémica idiopática, infecciones renales, etc.

**Osteomalacia (raquitismo):** Es una enfermedad producida por un defecto nutricional, caracterizada por deformidades esqueléticas. Es causado por un descenso de la mineralización de los huesos y cartílagos debido a niveles bajos de calcio y fósforo en la sangre.

**Parénquima:** En histología animal, se denomina parénquima a aquel tejido que hace del órgano algo funcional.

**Parestesia:** Sensación anormal de los sentidos o de la sensibilidad general que se traduce por una sensación de hormigueo, adormecimiento, producida por una patología en cualquier sector de las estructuras del sistema nervioso central o periférico.

**Polidipsia:** denominación médica que se le da al aumento anormal de la sed y que puede llevar al paciente a ingerir grandes cantidades de fluidos, habitualmente agua.

**Polihidramnios:** Es un término médico que se refiere a la presencia excesiva o aumento de líquido amniótico (por lo general mayor a los 2 L o un índice de líquido amniótico >18 mm) alrededor del feto antes de que nazca. La alteración puede ocurrir cuando el feto no puede tragar la cantidad normal o suficiente de líquido amniótico o debido a diversos problemas gastrointestinales, cerebrales o del sistema nervioso (neurológicos) o de otro tipo de causas relacionadas con el aumento en la producción de líquido como cierto trastorno pulmonar del feto.

**Poliuria (gasto urinario excesivo):** Es un síntoma médico que consiste en una emisión de un volumen de orina superior al esperado. Se define como un volumen superior a 2,5 L en 24 horas para adultos y superior a 2.0 - 2,5 litros/24 horas para niños.

**Presión oncótica (coloidosmótica):** Es la presión osmótica debida a las proteínas plasmáticas que aparece entre el compartimento vascular e intersticial.

**Proteinuria:** Es la presencia de proteína en la orina en cuantía superior a 150 mg en la orina de 24 horas, esta puede ser transitoria, permanente o de sobrecarga.

**Renina:** Es una proteína (enzima) segregada por las células yuxtaglomerulares del riñón. Suele secretarse en casos de hipotensión arterial y de baja volemia. La renina también juega un papel en la secreción de aldosterona, una hormona que ayuda a controlar el equilibrio hídrico y de sales del cuerpo. La renina activa el sistema renina-angiotensina-aldosterona al catalizar la hidrólisis de la molécula de angiotensinógeno (producida por el hígado) produciendo angiotensina I. La rotura se produce en un residuo de aminoácido leucina específico.

**Tetania:** Espasmos en la musculatura estriada (contracciones dolorosas de los músculos de las extremidades) provocados por hipocalcemia, hipomagnesemia o por alcalosis tanto metabólica como respiratoria.

**Tono muscular:** Grado de contracción que siempre tienen los músculos aunque estén en reposo.

## APENDICE C: PUBLICACIONES.

Histochem Cell Biol (2010) 133:189–199  
DOI 10.1007/s00418-009-0658-1

ORIGINAL PAPER

### Expression and immunolocalization of ERG1 potassium channels in the rat kidney

Rolando Carrisoza · Carolina Salvador ·  
Norma A. Bobadilla · Joyce Trujillo · Laura I. Escobar

*Am J Physiol Renal Physiol* 299: F255–F264, 2010.  
First published April 28, 2010; doi:10.1152/ajprenal.00697.2009.

### Potassium secretion by voltage-gated potassium channel Kv1.3 in the rat kidney

Rolando Carrisoza-Gaytán,<sup>1</sup> Carolina Salvador,<sup>1</sup> Lisa M. Satlin,<sup>2</sup> Wen Liu,<sup>2</sup> Beth Zavidowitz,<sup>2</sup>  
Norma A. Bobadilla,<sup>3</sup> Joyce Trujillo,<sup>3</sup> and Laura I. Escobar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City; <sup>2</sup>Department of Pediatrics, Mount Sinai School of Medicine, New York, New York; and <sup>3</sup>Unidad de Fisiología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México e Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Mexico City, México

Submitted 7 December 2009; accepted in final form 27 April 2010

*Kidney International* (2011) **80**, 832–840

original article

<http://www.kidney-international.org>

© 2011 International Society of Nephrology

### The hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated HCN2 channel transports ammonium in the distal nephron

Rolando Carrisoza-Gaytán<sup>1</sup>, Claudia Rangel<sup>1</sup>, Carolina Salvador<sup>1</sup>, Ricardo Saldaña-Meyer<sup>1</sup>,  
Christian Escalona<sup>1</sup>, Lisa M. Satlin<sup>2</sup>, Wen Liu<sup>2</sup>, Beth Zavidowitz<sup>2</sup>, Joyce Trujillo<sup>3</sup>, Norma A. Bobadilla<sup>3</sup>  
and Laura I. Escobar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, México; <sup>2</sup>Department of Pediatrics, Mount Sinai School of Medicine, New York, New York, USA and <sup>3</sup>Unidad de Fisiología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, México DF, México

# Expression and immunolocalization of ERG1 potassium channels in the rat kidney

Rolando Carrisoza · Carolina Salvador ·  
Norma A. Bobadilla · Joyce Trujillo · Laura I. Escobar

Accepted: 23 October 2009 / Published online: 17 November 2009  
© Springer-Verlag 2009

**Abstract** Potassium ( $K^+$ ) channels participate in  $K^+$  secretion,  $K^+$  recycling, and cell volume regulation and help to maintain the resting potential in mammalian kidneys. Previously, we identified a set of voltage-gated  $K^+$  channels (Kv1) in the inner medullary collecting duct of the rat kidney. In the present work, we identified the voltage-gated  $K^+$  channel ether-à-go-go-related gene (*ERG*) in the rat kidney. mRNAs of *ERG1a* and its N-terminal splice-variant *ERG1b* were detected. Immunoblots of the cortex and medulla revealed two molecular mass proteins of 135 and 80 kDa, consistent in size with the nonglycosylated ERG1a and ERG1b isoforms, respectively. However, bands of 155 and 95 kDa, corresponding to mature glycosylated ERG1a and ERG1b, respectively, were also observed. In our immunohistochemical experiments, we could not differentiate the ERG1 isoforms because we used an antibody against a carboxy-terminal epitope. ERG1 was differentially localized in specific nephron segments: its localization was intracellular in the proximal tubule and medullary collecting ducts and in the apical membranes in the distal convoluted and connecting tubules. ERG1 was also

abundant in glomerular arterioles and renal vessels. In summary, ERG1 displays a heterogeneous distribution in the rat kidney.

**Keywords** ERG potassium channel · Proximal tubule · Connecting tubule · Collecting duct · Renal vessel · Kidney

## Introduction

$K^+$  channels participate in the maintenance of a negative resting membrane potential in all cell types and in the repolarization of the membrane potential during an action potential in excitable cells.

Ether-à-go-go-related gene (*ERG*)  $K^+$  channels belong to the superfamily of voltage-gated  $K^+$  channels (Kv). The best-known function of an ERG current is its contribution to the repolarization of the heart action potential. The human ERG channel (HERG) carries the delayed rectifier  $K^+$  current IKr in cardiac myocytes (Sanguinetti et al. 1995). IKr allows a rapid repolarization during phase III of the cardiac action potential. IKr suppression can occur either by loss of function mutations in the *HERG* gene (Curran et al. 1995; Roden and Balser 1999) or by diverse pharmaceutical agents, such as the gastrointestinal prokinetic agent Cisapride (Propulsid), the class III antiarrhythmic dofetilide and the antihistamine terfenadine (Rampe et al. 1997), provoking a QT interval prolongation (long QT syndrome) and a subsequent longer-lasting action potential, which may lead to heart arrhythmia and sudden death. Therefore, ERG channels are crucial determinants of membrane excitability and maintenance of the cardiac resting potential (Barros et al. 1997; Bauer 1998; Bauer et al. 1999). ERG channels also contribute to muscle contraction, oxygen sensing, and hormone secretion (Schwarz and

R. Carrisoza · C. Salvador · L. I. Escobar (✉)  
Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina,  
Universidad Nacional Autónoma de México,  
04510 Mexico, DF, Mexico  
e-mail: laurae@servidor.unam.mx

R. Carrisoza  
e-mail: rolandocarrisoza@yahoo.com.mx

N. A. Bobadilla · J. Trujillo  
Unidad de Fisiología Molecular,  
Instituto de Investigaciones Biomédicas,  
Universidad Nacional Autónoma de México  
e Instituto Nacional de Ciencias Médicas y  
Nutrición, Mexico, DF, Mexico

Bauer 2004), as well as to establishing the resting membrane potential in opossum esophageal smooth muscle (Akbarali et al. 1999), rat stomach (Ohya et al. 2002a), mouse and guinea pig gallbladders (Parr et al. 2003), human and equine jejunum (Farrelly et al. 2003; Lillich et al. 2003), and murine hepatic portal veins (Ohya et al. 2002b).

The opening of  $K^+$  channels in several tubule cells of the kidney allows to recover the cell resting membrane potential, during the transepithelial  $Na^+$  transport by  $Na^+$ -dependent carriers and the amiloride-sensitive sodium channel (ENaC; Hebert et al. 2005). In addition,  $K^+$  channels work as cell osmoregulators, avoiding the cell swelling induced during  $Na^+$  influx to epithelial cells. Importantly,  $K^+$  recycling in nephrons is carried out by the weak inwardly rectifying ROMK channel and is a mechanism used to retain  $Na^+$  and avoid  $K^+$  depletion during a restricted  $K^+$  dietary intake (Wang et al. 2000). Finally, ROMK and the calcium and voltage-dependent maxi- $K^+$  channels participate in  $K^+$  secretion into the urine in the distal nephron (Hebert et al. 2005).

In a previous study, we recorded an outward  $K^+$  selective conductance in a primary cell culture of the rat inner medullary collecting duct. The immunodetectable voltage-gated potassium channels Kv1.1, Kv1.3 and Kv1.6 were identified in the cytoplasm; Kv1.3 was also detected along the basolateral membrane (Escobar et al. 2004).

In the present work, we report the novel finding of ERG1 channels in the rat kidney. Immunolocalization of ERG1 showed a heterogeneous and differential expression in renal epithelia: intracellular in the proximal tubule (PT) and medullary collecting duct (MCD), apical in the distal convoluted tubule (DCT) and connecting tubule (CNT). An abundant expression of ERG1 was detected in vessels and glomerular arterioles. ERG1a and ERG1b isoforms were identified by RT-PCR and immunoblots.

## Materials and methods

### RNA purification and RT-PCR assays

Male Wistar rats (200–250 g) were anesthetized by intraperitoneal administration of pentobarbital sodium. Brain and kidneys were aseptically removed. Total RNA was extracted with Trizol reagent (Invitrogen life technologies, CA, USA) as previously reported (Escobar et al. 2004). RNA (5  $\mu$ g) from each sample was converted to cDNA using the random primer p(dN)6 (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland) and reverse transcribed with MLV reverse transcriptase (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. Contaminating DNA was removed with DNase I (Ambion, Texas, USA). Two forward primers (Invitrogen) were designed with the following nucleotide sequence for ERG1a (GenBank Z96106): 5'-CAT

*CGT CGA CAT GCC GGT GCG GAG GGG CCA CGT C-3'* (sense) and ERG1b (GenBank AY669863): 5'-CAT *CGT CGA CAT GGC GAT TCC AGC CGG GAA GGA G-3'* (sense). A Sal I restriction site (shown in italics) was added to subclone the amino end. The reverse primer had the same nucleotide sequence for both ERG1 isoforms: 5'-TTC ATG TCG ATG CCG TT-3' (antisense). Fragments were amplified by PCR with Taq DNA polymerase (Invitrogen) and electrophoretically visualized in 1% agarose gel. D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) cDNA was amplified as a positive control of the PCR reaction. The primer sequences were as follows: 5'- CCT GCA CCA CCA ACT GC-3' (sense) and 5'- CAA TGC CAG CCC CAG CA- 3' (antisense). The GAPDH expected weight was 453 bp. The molecular weight marker (MWM, Invitrogen) was a mixture of  $\Phi$  X174 RF/Hae III and  $\lambda$  DNA/Hind III fragment (1  $\mu$ g).

### Immunoblots

Brain and renal tissues were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Kidney tissue was sectioned into cortex (Cx) and medulla (M) and homogenized in a solution containing 250 mM sucrose, 1 mM EDTA, and 10 mM Tris HCl buffer, pH 7.6 and Protease Cocktail Inhibitor Complete Mini (Roche Diagnostics). Large tissue debris and nuclear fragments were removed by two low-speed spins (1000 g, 10 min each). Protein concentration was measured with the Bio-Rad D C protein assay (Bio-Rad, CA, USA). Samples containing 100  $\mu$ g of protein were denatured in Laemmli sample buffer (Bio-Rad) and 5%  $\beta$ -mercaptoethanol, electrophoretically separated in 10% SDS-PAGE and electroblotted to a nylon membrane (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany). The membrane was blocked with 5% nonfat dry milk (Bio-Rad) in Tris-buffered saline pH 7.6 (TBS) at  $4^{\circ}\text{C}$  overnight, incubated with rabbit anti-ERG1 (1:300, Alomone, Jerusalem, Israel) designed against a carboxy-terminal epitope common to both ERG1a and ERG1b isoforms, diluted 1:300 in 0.1% Tween 20 in TBS at  $4^{\circ}\text{C}$  overnight, and incubated with the secondary antibody, donkey anti-rabbit IgG coupled to horseradish peroxidase (1:5,000; Amersham Biosciences) at room temperature for 1 h. Blots were revealed with ECL Plus western blot detection reagents (Amersham Biosciences). A brain sample was the positive control. Primary antibodies preincubated with their antigen control (Alomone) served as negative controls.

### Glomeruli dissection

Glomeruli were microdissected from renal cortex slices in cold dissection buffer (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1.2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , and 5.5% glucose) supplied with 1% BSA and protease cocktail



inhibitor. A pool of 50 glomeruli attached to their afferent and efferent arterioles were transferred into Eppendorf tubes, dissolved in Laemmli sample buffer (Bio-Rad) and  $\beta$ -mercaptoethanol (5%) at 95°C for 5 min and immunoblotted with 8% SDS-PAGE.

Antibody evaluation with human ERG (HERG) isoforms expressed in oocytes

*HERG1a* and *HERG1b* in pGH19 plasmids were provided by Dr. Gail Robertson from the University of Wisconsin. *Xenopus laevis* (Nasco, Wisconsin, USA) oocytes were obtained and microinjected with 20 ng of *HERG1a* or *HERG1b* cRNAs according to Salvador et al. (2001). Oocytes ( $n = 5$ ) were homogenized after incubation for 4 days in ND96 solution (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, and 2.5 mM pyruvate), pH 7.4 and 0.05 mg/ml gentamycin. Membrane extracts were immunoblotted as described above. A brain sample was used as the positive control.

Glycosidase assay

A brain sample (100  $\mu$ g) was denatured in 0.05 M PBS, pH 7.4, 0.05 M EDTA, 0.5% SDS, and 1%  $\beta$ -mercaptoethanol at 95°C for 5 min; the mixture was allowed to cool and Triton X-100 was added to a final concentration of 1%. Samples (50  $\mu$ g) were treated with 2 U of N-Glycosidase F (Roche Diagnostics), incubated at 37°C for 18 h and immunoblotted with 6% SDS-PAGE.

Immunofluorescence and confocal imaging

Rat kidneys were fixed by retrograde perfusion via the aorta with 4% paraformaldehyde in PBS. Kidneys were removed and fixed overnight. After fixation, tissues were cryoprotected with 30% sucrose in the paraformaldehyde solution and frozen (−30°C). Sagittal sections (10  $\mu$ m) were cut in a cryostat (Leica, CM1100), hydrated in PBS and incubated for 30 min in 10 mM citrate buffer pH 9 at 80°C for antigen retrieval. Samples were then permeabilized with 0.3% Triton X-100 (10 min) in PBS and blocked with 1% BSA, 5% fetal bovine serum, 5% donkey serum, and 0.1% Triton X-100 in PBS for 1 h. Samples were then incubated with rabbit anti-ERG1 antibody (1:100; Alomone) in the same solution for 24 h at 4°C. After three washes with 0.1% Triton X-100 in PBS (PBS-T), sections were incubated with secondary antibodies coupled to Alexa 488 (donkey anti-rabbit, 1:200; Molecular Probes, OR, USA) for 1 h. Samples were washed three times with PBS-T. The negative control was performed by preincubating the antibody with the control peptide. Double-immunofluorescence staining of the same sections was performed using the

following antibodies: goat anti-Tamm-Horsfall glycoprotein (TH, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), for thick ascending limb (TAL), goat anti-calbindin-D<sub>28k</sub> (Santa Cruz Biotechnology) for DCT and CNT, goat anti-AQP2 (Santa Cruz Biotechnology) for apical membranes of principal cells in CNT and CD (all 1:100; Santa Cruz Biotechnology) or mouse anti- $\alpha_1$ -Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase subunit (1:50; Sigma, Toluca, Mexico) for basolateral membranes of distal segments. The secondary antibodies were as follows: donkey anti-goat coupled Alexa 594 (1:500; Molecular Probes) and horse anti-mouse coupled Texas Red (1:1000; Vector, CA, USA). Finally, tissues were mounted on microscope slides with Vectashield (Vector). Slides were examined and images were captured with oil immersion 40 $\times$  and 63 $\times$  objectives mounted on a confocal inverted microscope (Leica TCS-SP5). Image analysis was performed with the Leica Application Suite Advance Fluorescence Lite program.

## Results

Identification of ERG1a and ERG1b isoforms

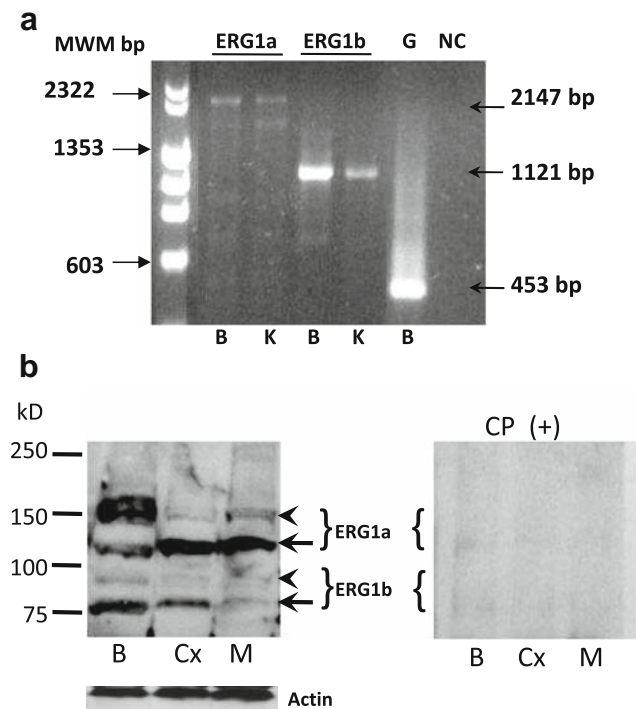
*ERG1a* and *ERG1b* mRNA expression was detected in rat kidney tissue. The expected amplification products for *ERG1a* (2,147 bp) and *ERG1b* (1,121 bp) transcripts were observed in the kidney samples (Fig. 1a).

ERG1 protein expression

ERG1 antibodies recognized four bands for ERG1 in the brain, renal cortex, and medulla immunoblots, corresponding to the expected bands for rat ERG1a and ERG1b glycosylated and nonglycosylated proteins (Fig. 1b). The molecular mass bands were consistent in size with maturely glycosylated (155 kDa) and nonglycosylated (135 kDa) ERG1a (Pond et al. 2000; Jones et al. 2004), while the 95-kDa (mature) and 80-kDa (nonglycosylated) bands corresponded to the ERG1b isoform (Zhou et al. 1998; Pond et al. 2000; Jones et al. 2004). The mature glycosylated ERG1a isoform is less abundant than the nonglycosylated channel in kidney tissue compared to brain tissue, whereas expression of the glycosylated ERG1b isoform is lower than the nonglycosylated form in brain and kidney tissues. Antibody adsorption was performed with the blocking peptide as the negative control (Fig. 1b CP (+)).

Evaluation of the antibody against ERG1 isoforms

To test the efficiency of the ERG1 antibody in recognizing ERG1a and ERG1b subunits, we carried out an immunoblot assay with the recombinant human HERG1a and HERG1b channels expressed in oocytes. Bands of 155 and 135 kDa,

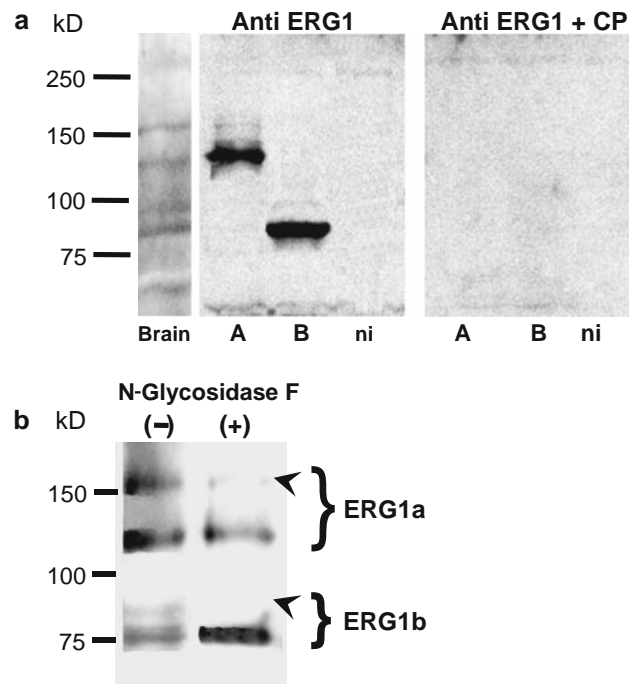


**Fig. 1** Identification of *ERG1a* and *ERG1b* mRNA in rat kidney tissue. **a** Reverse transcription/polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification of *ERG1a* (2,147 bp) and *ERG1b* (1,121 bp) splice variants from rat brain (b) and kidney (K) tissue. Molecular weight markers are (MWM)  $\Phi$  X174 RF/Hae III and  $\lambda$  DNA/Hind III fragment (1  $\mu$ g). GAPDH cDNA (453 bp; G) was the positive control; no cDNA (NC) was the negative control. **b** Immunoblot analysis of rat kidney tissue. Double-immunoreactive bands corresponding to ERG1a (approximately 155 and 135 kDa) and ERG1b (approximately 95 and 80 kDa) glycosylated (arrowhead) and unglycosylated (arrow) proteins, recognized by ERG1 antibody in membrane protein extracts of kidney tissue. Brain (b), renal cortex (Cx) and medulla (M). No immunoreactive bands are recognized when ERG1 antibodies are preadsorbed with the control peptide (CP +)

which corresponded to HERG1a (lane A), and the 95- and 80-kDa bands that were expected for HERG1b (lane B) were observed (Fig. 2a). HERG1a and HERG1b appeared nonglycosylated for the most part, although glycosylated proteins were also observed. In this assay, brain membranes were used as a positive control. Furthermore, to confirm that the 155- and 95-kDa bands corresponded to maturely glycosylated ERG1a and ERG1b, respectively, enzymatic deglycosylation was carried out in brain samples. Accordingly, both bands disappeared in the immunoblot assay after incubation with glycosidase F (Fig. 2b). These results clearly demonstrated that the antibody effectively recognized ERG1a and ERG1b glycosylated and nonglycosylated isoforms.

#### Immunolocalization of ERG1 in cortical and medullary tubules

ERG1 immunoreactivity was clearly observed in some tubules in the renal cortex and in medullary collecting ducts



**Fig. 2** ERG1 antibody recognizes both ERG1a and ERG1b isoforms. ERG1a and ERG1b share a common epitope at the COOH terminus recognized by the ERG1 antibody. Immunoblot of ERG1 from **a** brain samples and recombinant HERG1a (lane A) and HERG1b (lane B) expressed in *Xenopus laevis* oocytes. Negative control: non-injected oocytes (ni) or control peptide assay (CP). **b** N-Glycosidase F assay in brain samples: the 155 kDa HERG1a and 95 kDa HERG1b glycosylated protein bands (arrowheads, lane N-Glycosidase F-) disappear after overnight incubation with the enzyme, leaving the 135 and 80-kDa nonglycosylated HERG1a and HERG1b, respectively (lane N-Glycosidase F +)

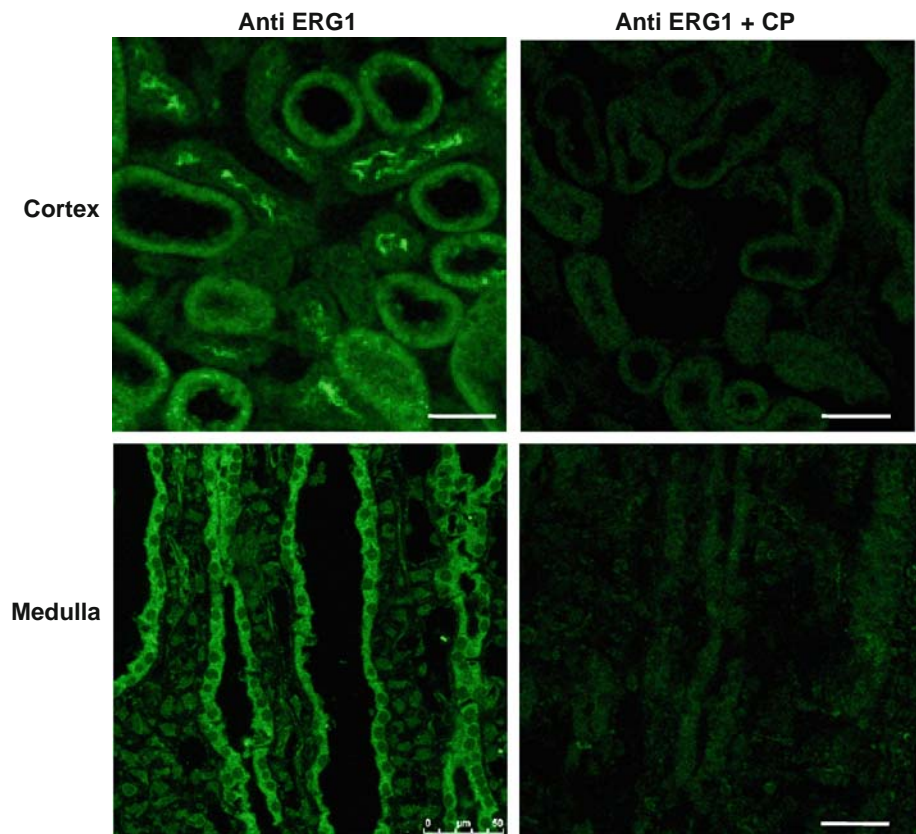
(MCD) (Fig. 3). A negative control was performed with ERG1 antibodies preincubated with the control peptide.

#### Localization of ERG1 in proximal tubules and distal nephron

Since membrane proteins display differential localizations along the nephron, we used antibodies against AQP2 or the  $\alpha$ 1-Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase subunit to determine the localization of ERG1 in the renal cortex. Differential expression of basolateral  $\alpha$ 1-Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase occurs along the nephron; it is weak in proximal and strong in distal segments (Wetzel and Sweadner 2001). Accordingly, two expression patterns for ERG1 are observed in the cortex; cytoplasmic in PT, morphologically identified by their large brush border cells, and at luminal membranes in some distal tubules (Fig. 4c).

Vasopressin regulates the insertion of AQP2 water channels into the apical plasma membrane of principal cells (PCs) of the renal CNT (Kishore et al. 1996) and CD (Nielsen et al. 1995); therefore, AQP2 serves as a marker of CNT (Coleman et al. 2000) and CCD (Nielsen et al. 1993). AQP2 is weakly expressed in CNT cells compared to PCs

**Fig. 3** Cortical and medullary expressions of ERG1 in the rat kidney. Kidney sections display positive immunoreactivity for ERG1 in some cortical tubules and in all medullary collecting ducts. Suppression of immunoreactivity is observed when the antibodies are preincubated with an excess of control peptide (CP) 1 h before the overnight incubation. Scale bars = 50  $\mu$ m



of CCDs (Coleman et al. 2000). In this regard, heterogeneous apical localization of ERG1 was observed in both AQP2-positive (arrows) and negative tubules (arrowheads), as shown in Fig. 4f. The circular profile of an AQP2-positive tubule suggests that ERG1 is expressed in CNT cells (Zolotnitskaya and Satlin 1999). CCDs with a longitudinal profile (positive for AQP2) lack ERG1 (open arrows).

An important nephron segment of  $K^+$  recycling is TAL, the previous tubule segment of the distal nephron, where the Tamm-Horsfall glycoprotein (TH) is produced. Therefore, we also explored the presence of ERG1 in this segment. Co-labeling of ERG1 and TH allows us to discard ERG1 expression in TAL as well as in the macula densa (Fig. 5).

Since distal nephron comprises DCT, CNT and CCD, to determine the tubule-specific ERG1 expression, we carried out double immunofluorescence of ERG1 and calbindin- $D_{28k}$ , a marker of DCT and CNT (Campean et al. 2001) or AQP2, which stains CNT (circular profile). We observed ERG1 in DCT and CNT (Fig. 6). Micrographs captured at a higher resolution ( $63\times$ ) for ERG1 and AQP2 or ERG1 and  $\alpha 1\text{-Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$  immunolabeling allowed the observation of apical and subapical localization of ERG1 (Fig. 7).

ERG1 expression in glomerular arterioles and renal vessels

ERG1 protein expression was observed in both afferent and efferent glomerular arterioles (Fig. 8a). Interestingly, the immunoblot from glomeruli together with their arterioles was positive only for the ERG1a isoform (Fig. 8c). Renal vessels displayed a high expression of ERG1 in the smooth muscle cells (Fig. 8d, f).

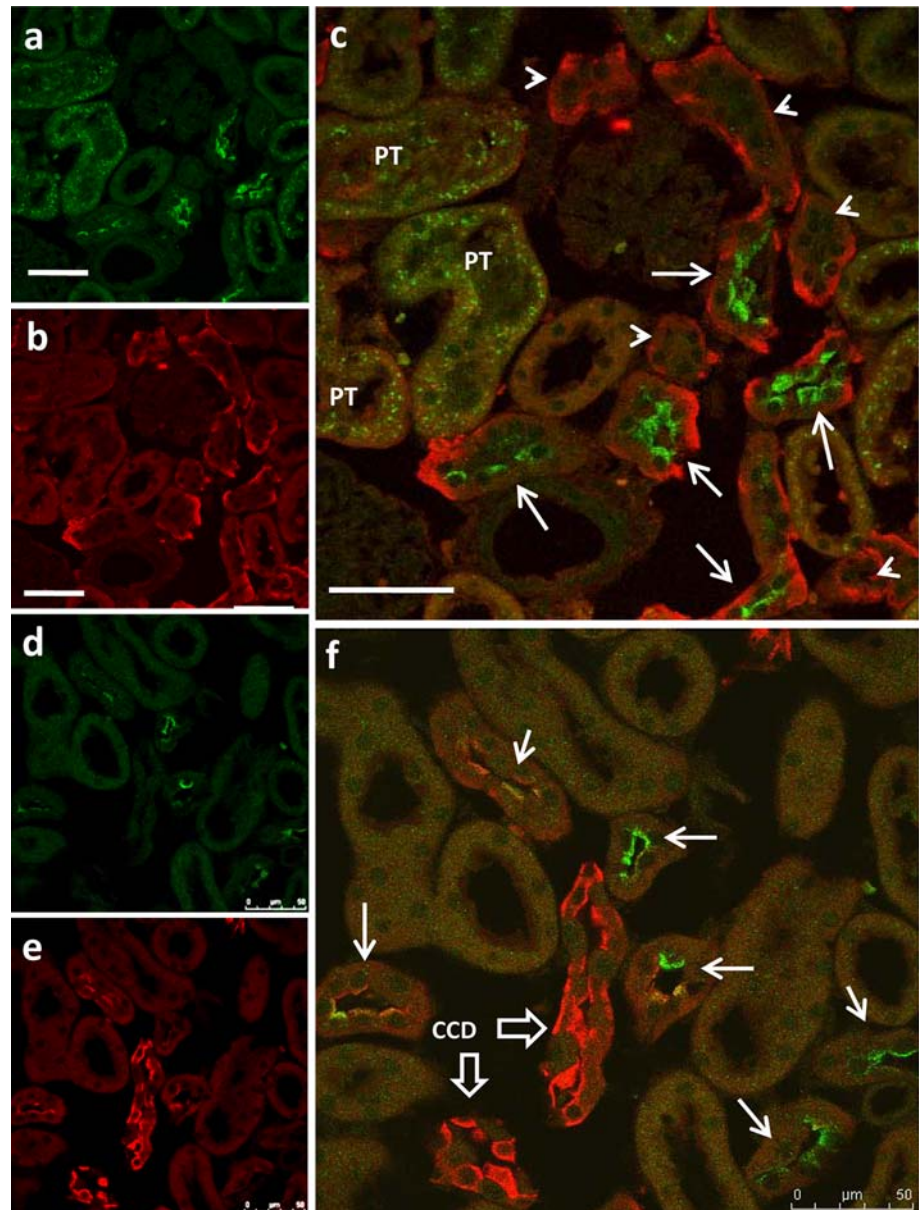
## Discussion

We identified, for the first time, transcription and protein expression of the two ERG1 isoforms (ERG1a and ERG1b) in the rat kidney. Since the ERG1 antibody recognized a C-terminal epitope, the segment-specific distribution and functionality for each of the ERG1 isoforms in kidney tissue remains to be defined.

Although we found higher expression of the nonglycosylated ERG1a and ERG1b isoforms than the glycosylated isoforms in the cortex and medulla (Fig. 1b), it has been reported that nonglycosylated ERG1 channels are functional and that glycosylation serves to control the membrane turnover of the channels (Gong et al. 2002).



**Fig. 4** Immunolocalization of ERG1 in proximal (PT) and distal tubules in the renal cortex. Double-immunofluorescence labeling for ERG1 (green **a, d**) and the basolateral  $\alpha 1$ -Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (red **b**) and AQP2 (red **e**) in sagittal sections of the renal cortex. Merged image (**c**) shows faint and cytoplasmic immunoreactivity for ERG1 in PT, identified for the large brush border cells and weak  $\alpha 1$ -Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase staining. Some distal tubules show strong basolateral  $\alpha 1$ -Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase labeling with apical ERG1 labeling (*arrows*). ERG1 is present in apical membrane domains of AQP2-positive tubules (*arrows*; **f**) in a transversal profile, which might be CNT. By contrast, ERG1 is absent in CCD, defined by its strong AQP2 immunoreactivity (*empty arrows*; **f**). Scale bars = 50  $\mu$ m

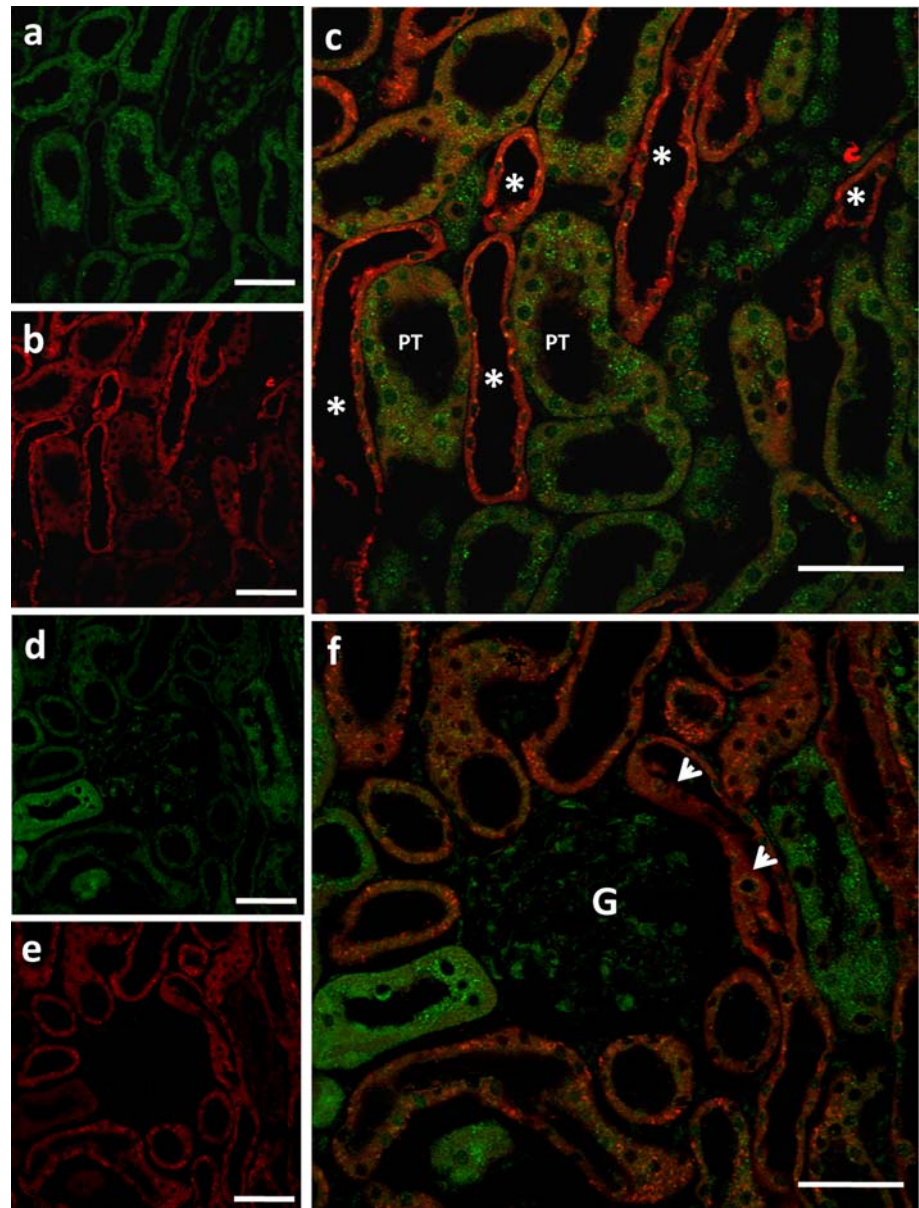


Therefore, nonglycosylated channels are expected to be functional in the kidney.

We found ERG1 channels in the cytoplasm of PT cells. Reabsorption of glucose and amino acids is coupled to Na<sup>+</sup> influx in PT, thereby depolarizing the luminal membrane. This depolarization is known to activate the KCNQ1 potassium channel (Lang et al. 1986; Lang and Rehwald 1992), which is crucial to keep the electrical driving force for Na<sup>+</sup> reabsorption. The  $\beta$ -subunit KCNE1 or MinK-related peptide (MiRP) associates with KCNQ1 (formerly KvLQT1) in the heart (Barhanin et al. 1996; Sanguinetti et al. 1996) as well as in the luminal membrane of rat and mouse PT (Vallon et al. 2005; Sugimoto et al. 1990). However, mice lacking the KCNQ1 potassium channel subunit maintain normal Na<sup>+</sup> and glucose

absorption, suggesting that the  $\beta$ -subunit KCNE1 interacts with another K<sup>+</sup> channel in PT (Vallon et al. 2001). Although we found ERG1 channels in the cytoplasm of PT cells, we can speculate that surface membrane trafficking of ERG1 subunits with KCNE1 (MinK) or another unidentified KCNE isoform in PT tubules occurs in some metabolic conditions (McDonald et al. 1997; Finley et al. 2002). In fact, both HERG and KCNQ1 in human ventricular myocardium are differently modulated by MiRP isoforms (Abbott and Goldstein 2001). For example, membrane expression of KCNQ1 is strongly suppressed by MiRP3 (KCNE4; Grunnet et al. 2005) but not by MiRP4 (KCNE5; Angelo et al. 2002). A different trafficking rate between KCNE1/ERG and KCNE1/KCNQ1 in PT cells may also occur (Um and McDonald 2007). Thus, it

**Fig. 5** ERG1 is not present in the thick ascending limb (TAL) or the macula densa. Double immunofluorescence of ERG1 (green **a, d**) with the Tamm-Horsfall glycoprotein (red **b, e**) in the cortex. Merge images (**c**) show cytoplasmic localization of ERG1 in proximal tubules (PT) but no expression in TAL (\*) or macula densa (**f**, arrowheads). Glomerulus (G). Scale bars = 50  $\mu$ m



will be helpful to determine if KCNE1 also has the ability to control ERG1 trafficking.

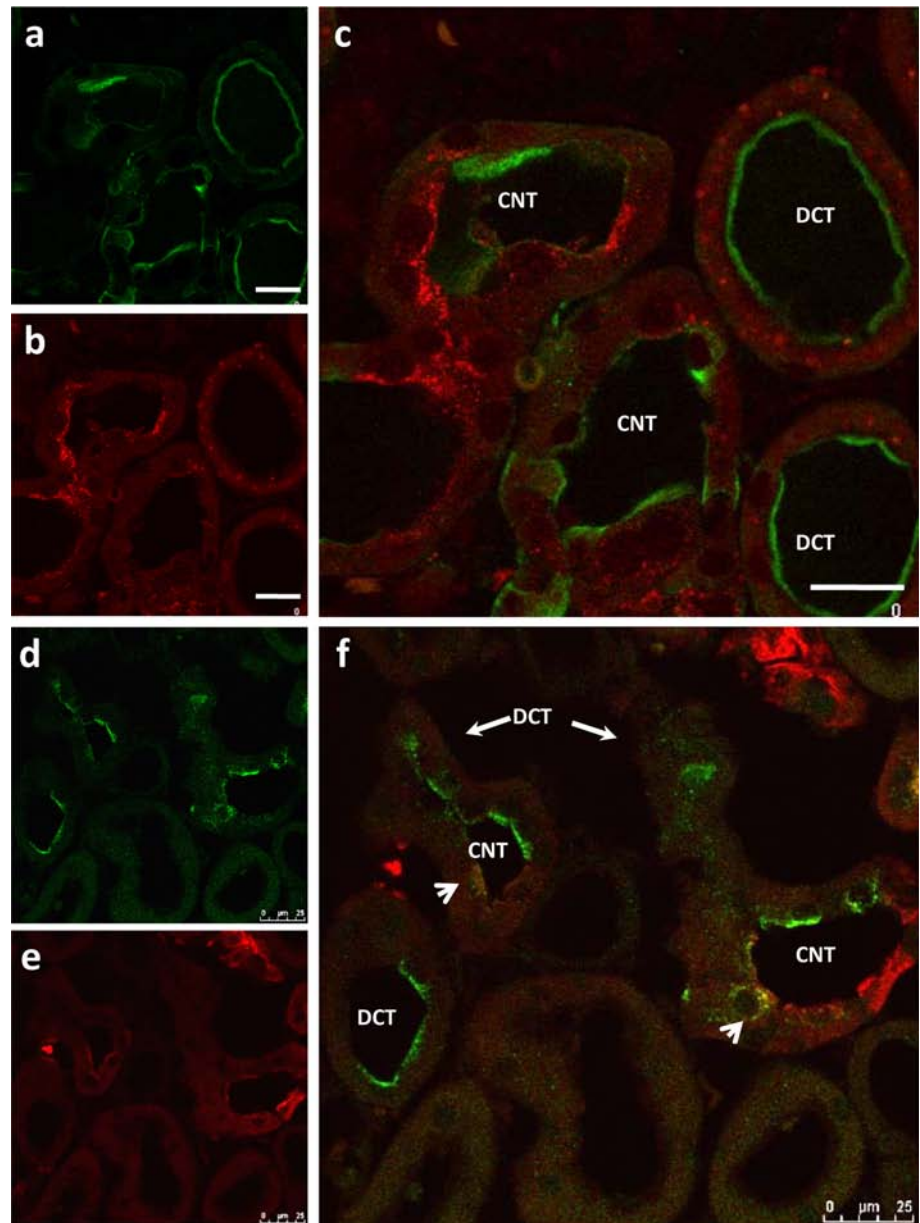
In contrast to PT and MCD, ERG1 channels display an apical profile in the distal segments DCT and CNT, the main sites involved in  $K^+$  secretion. Many patch-clamp studies of ROMK and maxi-K channels in collecting tubules have been reported (Wang et al. 1990; Wang et al. 2000; Palmer and Frindt 2007). ROMK forms the main secretory channel in the distal nephron (Palmer et al. 1997), while the maxi-K channel has been proposed to mediate  $K^+$  secretion in the absence of ROMK in patients with Bartter's syndrome (Bailey et al. 2006; Lorenz et al. 2002; Lu et al. 2002; Najjar et al. 2005). The low apparent abundance of apical ERG1 channels and the presence of outwardly non-inactivating potassium currents of ROMK channels in PCs

(Palmer et al. 1994) might explain why ERG1 channels have not yet been functionally identified by patch-clamp experiments. Additionally, ERG1 is blocked by the same nonspecific blockers of ROMK and maxi-K channels, which are commonly used in patch-clamp recordings of  $K^+$  channels from distal tubules (Trudeau et al. 1995; Smith et al. 1996; Frindt and Palmer 2004; Palmer and Frindt 2007). Therefore, functional assays with specific blockers for ERG1 will be necessary to determine its role in the distal nephron.

ERG1 was localized in the cytoplasm of MCD cells. Since MCD reabsorbs only 3% of the filtered  $Na^+$  load, it is likely that a very low expression of  $K^+$  channels in apical membranes of this segment is sufficient to maintain a negative resting membrane potential.



**Fig. 6** Immunolocalization of ERG1 in the distal nephron segments DCT and CNT. ERG1 immunoreactivity (green **a, d**) co-labeled with calbindin- $D_{28k}$  (red **b**) or AQP2 (red **e**). ERG1 channels are localized on apical membranes of DCT and CNT positive for calbindin- $D_{28k}$  (**c**) or in CNT cells positive for AQP2 (**f**, *arrowhead*). Note that in the same figure, the tubular transition from DCT to CNT lacks AQP2 but expresses ERG1 (*arrows*). Scale bars = 25  $\mu$ m

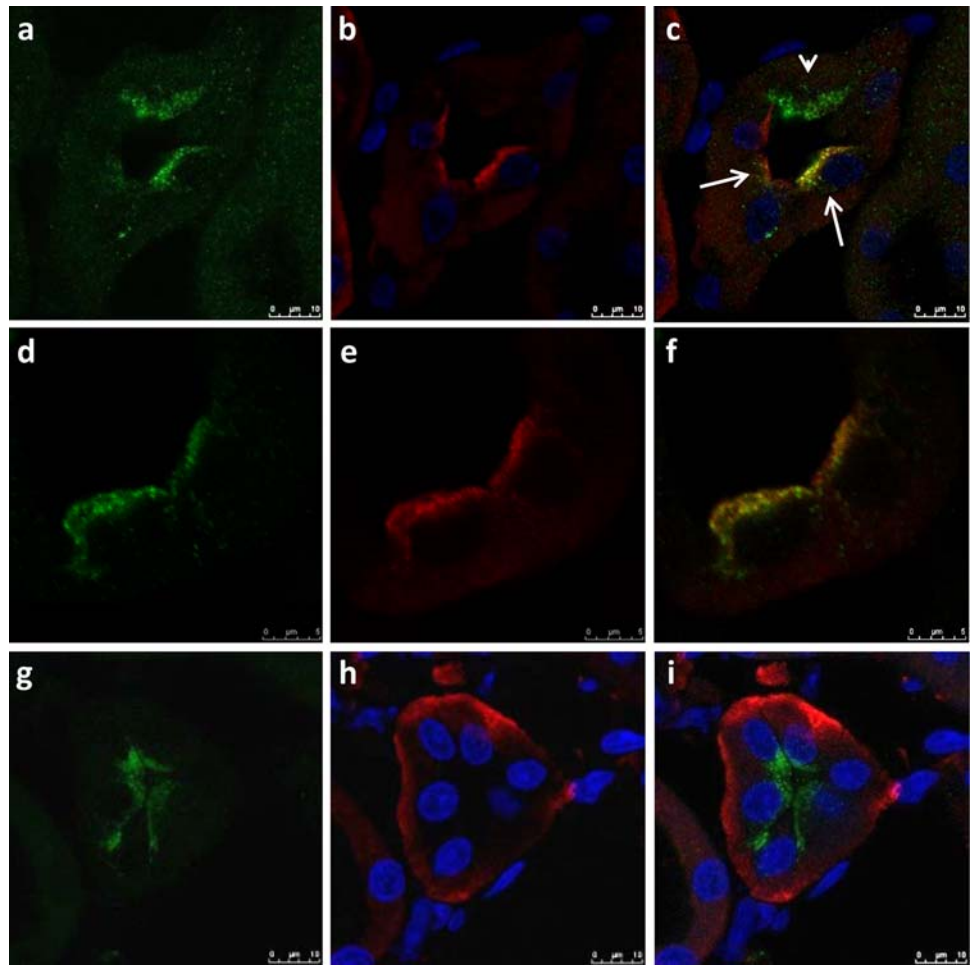


Although only the ERG1a isoform was detected in glomerular arterioles, the presence of heteromultimers of ERG1a/ERG1b in renal tubules cannot be excluded because coexpression of ERG1a and ERG1b has been observed in several tissues (Guasti et al. 2005; Hirdes et al. 2005; London et al. 1997; Ohya et al. 2002b; Mewe et al. 2008) and in different tumor cells (Crociani et al. 2003). Functional differences exist between ERG1a and ERG1b homo- and heteromultimers. For example, ERG1b homomultimers exhibit a faster deactivation rate and less steady-state inactivation than ERG1a. In addition, ERG1b presents half-maximal activation at more positive potentials (10 mV). Furthermore, ERG1a and ERG1b heteromultimers produce  $K^+$  currents with intermediate values for deactivation kinetics; whereas ERG1a determines the voltage

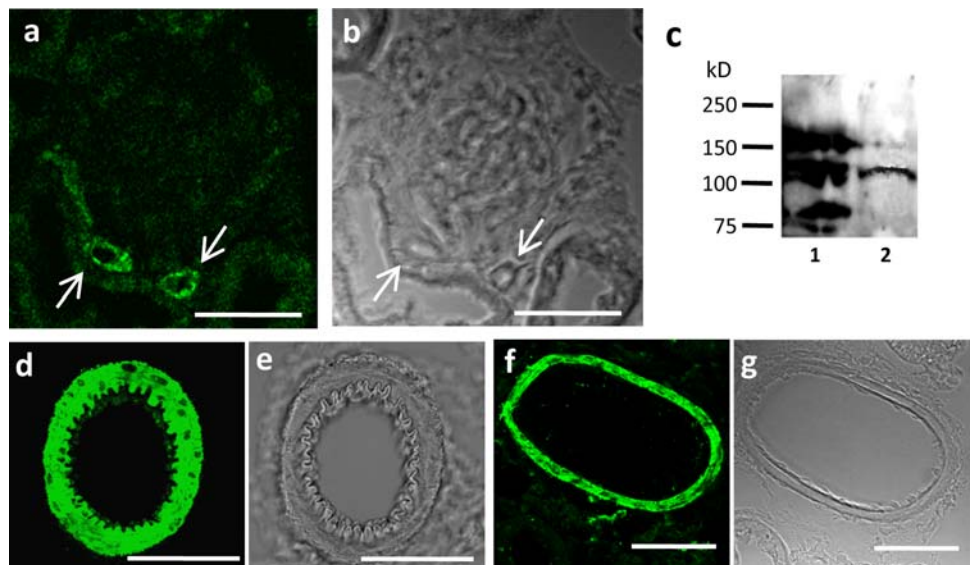
dependence of activation, ERG1b influences the steady-state inactivation (Kirchberger et al. 2006).

Interestingly, epoxyeicosatrienoic acids (EETs), metabolites of arachidonic acid produced by renal microvessels (Zou et al. 1994), are potent dilators of renal arteries due to activation of  $K_v$  channels (Zou et al. 1996). Accordingly,  $K^+$  channels in smooth muscle cells of renal arterioles contribute not only to maintaining the resting potential but also have an important role in modulating renal blood flow. Consequently, activation of  $K^+$  channels produces vasodilator effects on renal vessels (Hebert et al. 2005; Martens and Gelband 1996; Prior et al. 1998). In particular, ERG1 regulates the contractile activity of portal veins (Ohya et al. 2002b) and epididymal ducts (Mewe et al. 2008). Although further studies are needed to determine the role of ERG1 in

**Fig. 7** Double immunofluorescence of ERG1 (green **a, d, g**), and AQP2 (red **b, e**) or  $\alpha 1$ -Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (red **h**) in a transverse profile of single tubules. Merged images (**c, f, i**) show positive (arrow) and negative (arrowhead) cells for AQP2 expressing ERG1 at the apical membrane (**c**). Higher magnification of two cells with apical and subapical ERG1 and AQP2 colocalization (**f**). Apical ERG1, basolateral  $\alpha 1$ -Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (**i**). Nuclei are stained with DAPI (blue). Scale bars: 10  $\mu$ m (**c, i**) and 5  $\mu$ m (**f**)



**Fig. 8** Localization of ERG1 in rat kidney vessels. ERG1 is observed in glomerular afferent and efferent arterioles (**a, arrows**). Transmission light microscopy shows arterioles (**b, arrows**). ERG1 immunoblots (**c**) from brain (lane 1) and glomeruli dissected with attached arterioles (lane 2). Only the ERG1a isoform (155 kDa glycosylated and 135 kDa nonglycosylated) is detected in kidney vessels. Transverse view of single vessels with high ERG1 immunoreactivity in smooth muscle cells (**d, f**). Light transmission images (**b, e, g**). Scale bar = 50  $\mu$ m



renal arterioles and vessels, we can expect that activation of ERG1 channels will have a vasodilator effect.

In conclusion, we identified ERG1 potassium channels in the rat kidney in PT, DCT, CNT and vessels. At this

stage, we could not identify the segment-specific expression of ERG1a and/or ERG1b isoforms, but only ERG1a was identified in vessels. The presence of ERG1 in tubular segments suggests its participation in membrane potential



repolarization during Na<sup>+</sup> absorption, whereas ERG1a in glomerular arterioles and vessels may play a role in vasodilation.

**Acknowledgments** We are grateful to Gail Robertson from the Department of Physiology at the University of Wisconsin for providing the *hERG1a* and *hERG1b* cDNAs. We would also like to thank Facultad de Medicina, PhD program (Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM), MVZ Silvia Reyes Maya and QFB Carmen Guadalupe Mondragón Huerta for their technical assistance with the confocal microscope (Macroproyecto “Nuevas estrategias epidemiológicas, genómicas y proteómicas en Salud Pública, SDI-PTID.05.01).

This work was supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) under its research program (PAPIIT IN224406, Dr Escobar) at the Universidad Nacional Autónoma de México. Rolando Carrisoza-Gaytán and Joyce Trujillo are PhD students supported by fellowships grants from Conacyt.

**Conflict of interest statement** None.

## References

- Abbott GW, Goldstein SA (2001) Potassium channel subunits encoded by the KCNE gene family: physiology and pathophysiology of the MinK-related peptides (MiRPs). *Mol Interv* 1(2):95–107
- Akbarali HI, Thatté H, He XD, Giles WR, Goyal RK (1999) Role of HERG-like K(+) currents in opossum esophageal circular smooth muscle. *Am J Physiol* 277:C1284–C1290
- Angelo K, Jespersen T, Grunnet M, Nielsen MS, Klaerke DA, Olesen SP (2002) KCNE5 induces time- and voltage-dependent modulation of the KCNQ1 current. *Biophys J* 83:1997–2006
- Bailey MA, Cantone A, Yan Q, MacGregor GG, Leng Q, Amorim JBO, Wang T, Hebert SC, Giebisch G, Malnic G (2006) Maxi-K channels contribute to urinary potassium excretion in the ROMK-deficient mouse model of type II Bartter’s syndrome and in adaptation to a high-K diet. *Kidney Int* 70:51–59
- Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M, Romey G (1996) K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature* 384:78–80
- Barros F, del Camino D, Pardo LA, Palomero T, Giráldez T, de la Peña P (1997) Demonstration of an inwardly rectifying K<sup>+</sup> current component modulated by thyrotropin-releasing hormone and caffeine in GH3 rat anterior pituitary cells. *Pflugers Arch* 435:119–129
- Bauer CK (1998) The erg inwardly rectifying K<sup>+</sup> current and its modulation by thyrotrophin-releasing hormone in giant clonal rat anterior pituitary cells. *J Physiol* 510:63–70
- Bauer CK, Schäfer R, Schiemann D, Reid G, Hanganu I, Schwarz JR (1999) A functional role of the erg-like inward-rectifying K<sup>+</sup> current in prolactin secretion from rat lactotrophs. *Mol Cell Endocrinol* 148:37–45
- Campean V, Kricke J, Ellison D, Luft FC, Bachmann S (2001) Localization of thiazide-sensitive Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransport and associated gene products in mouse DCT. *Am J Physiol Renal Physiol* 281:F1028–F1035
- Coleman RA, Wu DC, Liu J, Wade JB (2000) Expression of aquaporins in the renal connecting tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 279:F874–F883
- Crociani O, Guasti L, Balzi M, Becchetti A, Wanke E, Olivotto M, Wymore RS, Arcangeli A (2003) Cell cycle-dependent expression of HERG1 and HERG1B isoforms in tumor cells. *J Biol Chem* 278:2947–2955
- Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED, Keating MT (1995) A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* 80:795–803
- Escobar LI, Martínez-Téllez JC, Salas M, Castilla SA, Carrisoza R, Tapia D, Vázquez M, Bargas J, Bolívar JJ (2004) A voltage-gated K(+) current in renal inner medullary collecting duct cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:965–974
- Farrelly AM, Ro S, Callaghan BP, Khoi MA, Fleming N, Horowitz B, Sanders KM, Keef KD (2003) Expression and function of KCNH2 (HERG) in the human jejunum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284:G883–G895
- Finley MR, Li Y, Hua F, Lillich J, Mitchell KE, Ganta S, Gilmour RF Jr, Freeman LC (2002) Expression and coassociation of ERG1, KCNQ1, and KCNE1 potassium channel proteins in horse heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:H126–H138
- Frindt G, Palmer LG (2004) Apical potassium channels in the rat connecting tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 287:F1030–F1037
- Gong Q, Anderson CL, January CT, Zhou Z (2002) Role of glycosylation in cell surface expression and stability of HERG potassium channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:H77–H84
- Grunnet M, Olesen SP, Klaerke DA, Jespersen T (2005) hKCNE4 inhibits the hKCNQ1 potassium current without affecting the activation kinetics. *Biochem Biophys Res Commun* 328:1146–1153
- Guasti L, Cilia E, Crociani O, Hofmann G, Polvani S, Becchetti A, Wanke E, Tempia F, Arcangeli A (2005) Expression pattern of the ether-a-go-go-related (ERG) family proteins in the adult mouse central nervous system: evidence for coassembly of different subunits. *J Comp Neurol* 491:157–174
- Hebert SC, Desir G, Giebisch G, Wang W (2005) Molecular diversity and regulation of renal potassium channels. *Physiol Rev* 85:319–371
- Hirdes W, Schweizer M, Schuricht KS, Guddat SS, Wulfsen I, Bauer CK, Schwarz JR (2005) Fast erg K<sup>+</sup> currents in rat embryonic serotonergic neurones. *J Physiol* 564:33–49
- Jones EMC, Roti Roti EC, Wang J, Delfosse SA, Robertson GA (2004) Cardiac IKr channels minimally comprise HERG 1a and 1b subunits. *J Biol Chem* 279:44690–44694
- Kirchberger NM, Wulfsen I, Schwarz JR, Bauer CK (2006) Effects of TRH on heteromeric rat erg1a/1b K<sup>+</sup> channels are dominated by the rerg1b subunit. *J Physiol* 571:27–42
- Kishore BK, Mandon B, Oza NB, DiGiovanni SR, Coleman RA, Wade JB, Knepper MA (1996) Rat renal arcade segment expresses vasopressin-regulated water channel and vasopressin V2 receptor. *J Clin Invest* 97:2763–2771
- Lang F, Rechwald W (1992) Potassium channels in renal epithelial transport regulation. *Physiol Rev* 72:1–32
- Lang F, Oberleithner H, Giebisch G (1986) Electrophysiological heterogeneity of proximal convoluted tubules in Amphiuma kidney. *Am J Physiol* 251:F1063–F1072
- Lillich JD, Rakestraw PC, Roussel AJ, Finley MR, Ganta S, Freeman LC (2003) Expression of the ether-a-go-go (ERG) potassium channel in smooth muscle of the equine gastrointestinal tract and influence on activity of jejunal smooth muscle. *Am J Vet Res* 64:267–272
- London B, Trudeau MC, Newton KP, Beyer AK, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Satler CA, Robertson GA (1997) Two isoforms of the mouse ether-ago-go-related gene coassemble to form channels with properties similar to the rapidly activating component of the cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> current. *Circ Res* 81:870–878
- Lorenz JN, Baird NR, Judd LM, Noonan WT, Andringa A, Doetschman T, Manning PA, Liu LH, Miller ML, Shull GE (2002) Impaired renal NaCl absorption in mice lacking the ROMK potassium channel, a model for type II Bartter’s Syndrome. *J Biol Chem* 277:37871–37880

- Lu M, Wang T, Yan Q, Dong K, Knepper MA, Wang W, Giebisch G, Schull GE, Hebert SC (2002) Absence of small conductance K<sup>+</sup> channel (SK) activity in apical membranes of thick ascending limb and cortical collecting duct in ROMK (Bartter's) knockout mice. *J Biol Chem* 277:37881–37887
- Martens JR, Gelband CH (1996) Alterations in rat interlobar artery membrane potential and K<sup>+</sup> channels in genetic and nongenetic hypertension. *Circ Res* 79:295–301
- McDonald TV, Yu Z, Ming Z, Palma E, Meyers MB, Wang KW, Goldstein SA, Fishman GI (1997) A minKHERG complex regulates the cardiac potassium current I(Kr). *Nature* 388:289–292
- Mewe M, Wulfen I, Schuster AME, Middendorff R, Glassmeier G, Schwartz JR, Bauer CK (2008) Erg K<sub>v</sub> channels modulate contractile activity in the bovine epididymal duct. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294:R895–R904
- Najjar F, Zhou H, Morimoto T, Bruns JB, Li HS, Liu W, Kleyman TR, Satlin LM (2005) Dietary K<sup>+</sup> regulates apical membrane expression of maxi-K channels in rabbit cortical collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 289:F922–F932
- Nielsen S, DiGiovanni SR, Christensen EI, Knepper MA, Harris HW (1993) Cellular and subcellular immunolocalization of vasopressin-regulated water channel in rat kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:11663–11667
- Nielsen S, Chou CL, Marples D, Christensen EI, Kishore BK, Knepper MA (1995) Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-cd water channels to plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:1013–1017
- Ohya S, Asakura K, Muraki K, Watanabe M, Imaizumi Y (2002a) Molecular and functional characterization of ERG, KCNQ, and KCNE subtypes in rat stomach smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282:G277–G287
- Ohya S, Horowitz B, Greenwood IA (2002b) Functional and molecular identification of ERG channels in murine portal vein myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 283:C866–C877
- Palmer LG, Antonian L, Frindt G (1994) Regulation of apical K and Na channels and Na/K pumps in rat cortical collecting tubule by dietary K. *J Gen Physiol* 104:693–710
- Palmer LG, Choe H, Frindt G (1997) Is the secretory K channel in the rat CCT ROMK? *Am J Physiol* 273:F404–F410
- Palmer LG, Frindt G (2007) High conductance K channels in intercalated cells of the rat distal nephron. *Am J Physiol Renal Physiol* 292:F966–F973
- Parr E, Pozo MJ, Horowitz B, Nelson MT, Mawe GM (2003) ERG K<sup>+</sup> channels modulate the electrical and contractile activities of gallbladder smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284:G392–G398
- Pond AL, Scheve BK, Benedict AT, Petrecca K, Van Wagoner DR, Shrier A, Nerbonne JM (2000) Expression of distinct ERG proteins in rat, mouse, and human heart. Relation to functional I(Kr) channels. *J Biol Chem* 275:5997–6006
- Prior HM, Yates MS, Beech DJ (1998) Function of large conductance Ca-activated (BKCa), delayed rectifier (K<sub>v</sub>) and background K channels in the control of membrane potential in rabbit renal arcuate artery. *J Physiol* 15:159–169
- Rampe D, Roy ML, Dennis A, Brown AM (1997) A mechanism for the proarrhythmic effects of cisapride (Propulsid): high affinity blockade of the human cardiac potassium channel HERG. *FEBS Lett* 417:28–32
- Roden DM, Balser JR (1999) A plethora of mechanisms in the HERG-related long QT syndrome. Genetics meets electrophysiology. *Cardiovasc Res* 44:242–246
- Salvador C, Martinez M, Mora SI, Egido W, Farias JM, Gamba G, Escobar LI (2001) Functional properties of a truncated recombinant GIRK5 potassium channel. *Biochim Biophys Acta* 1512:135–147
- Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME, Keating MT (1995) A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. *Cell* 8:299–307
- Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A, Shen J, Spector PS, Atkinson DL, Keating MT (1996) Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature* 384:80–83
- Schwarz JR, Bauer CK (2004) Functions of erg K<sup>+</sup> channels in excitable cells. *J Cell Mol Med* 8:22–30
- Smith PL, Baukowitz T, Yellen G (1996) The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature* 379:833–836
- Sugimoto T, Tanabe Y, Shigemoto R, Iwai M, Takumi T, Ohkubo H, Nakanishi S (1990) Immunohistochemical study of a rat membrane protein which induces a selective potassium permeation: its localization in the apical membrane portion of epithelial cells. *J Membr Biol* 113:39–47
- Trudeau MC, Warmke JW, Ganetzky B, Robertson GA (1995) HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family. *Science* 269:92–95
- Um SY, McDonald TV (2007) Differential association between HERG and KCNE1 or KCNE2. *PLoS One* 2:e933:1–11
- Vallon V, Grahmmer F, Richter K, Bleich M, Lang F, Barhanin J, Völkl H, Warth R (2001) Role of KCNE1-dependent K<sup>+</sup> fluxes in mouse proximal tubule. *J Am Soc Nephrol* 12:2003–2011
- Vallon V, Grahmmer F, Volkl H, Sandu CD, Richter K, Rexhepaj R, Gerlach U, Rong Q, Pfeifer K, Lang F (2005) KCNQ1-dependent transport in renal and gastrointestinal epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:17864–17869
- Wang WH, Schwab A, Giebisch G (1990) Regulation of small-conductance K<sup>+</sup> channel in apical membrane of rat cortical collecting tubule. *Am J Physiol* 259:F494–F502
- Wang W, Lerea KM, Chan M, Giebisch G (2000) Protein tyrosine kinase regulates the number of renal secretory K channels. *Am J Physiol Renal Physiol* 278:F165–F171
- Wetzel RK, Sweadner KJ (2001) Immunocytochemical localization of Na-K-ATPase alpha- and gamma-subunits in rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 281:F531–F545
- Zhou Z, Gong Q, Ye B, Fan Z, Makielski JC, Robertson GA, January CT (1998) Properties of HERG channels stably expressed in HEK 293 cells studied at physiological temperature. *Biophys J* 74:230–241
- Zolotnitskaya A, Satlin LM (1999) Developmental expression of ROMK in rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 276:F825–F836
- Zou AP, Imig JD, Kaldunski M, Ortiz de Montellano PR, Sui Z, Roman RJ (1994) Inhibition of renal vascular 20-HETE production impairs autoregulation of renal blood flow. *Am J Physiol* 266:F275–F282
- Zou AP, Fleming JT, Falck JR, Jacobs ER, Gebremedhin D, Harder DR, Roman RJ (1996) Stereospecific effects of epoxyeicosatrienoic acids on renal vascular tone and K(+) channel activity. *Am J Physiol* 270:F822–F832

Copyright of Histochemistry & Cell Biology is the property of Springer Science & Business Media B.V. and its content may not be copied or emailed to multiple sites or posted to a listserv without the copyright holder's express written permission. However, users may print, download, or email articles for individual use.

**Rolando Carrisoza-Gaytán, Carolina Salvador, Lisa M. Satlin, Wen Liu, Beth Zavidowitz, Norma A. Bobadilla, Joyce Trujillo and Laura I. Escobar**  
*Am J Physiol Renal Physiol* 299:255-264, 2010. First published Apr 28, 2010;  
doi:10.1152/ajprenal.00697.2009

**You might find this additional information useful...**

---

This article cites 81 articles, 55 of which you can access free at:

<http://ajprenal.physiology.org/cgi/content/full/299/1/F255#BIBL>

Updated information and services including high-resolution figures, can be found at:

<http://ajprenal.physiology.org/cgi/content/full/299/1/F255>

Additional material and information about *AJP - Renal Physiology* can be found at:

<http://www.the-aps.org/publications/ajprenal>

---

This information is current as of September 21, 2010 .

## Potassium secretion by voltage-gated potassium channel Kv1.3 in the rat kidney

Rolando Carrisoza-Gaytán,<sup>1</sup> Carolina Salvador,<sup>1</sup> Lisa M. Satlin,<sup>2</sup> Wen Liu,<sup>2</sup> Beth Zvilowitz,<sup>2</sup> Norma A. Bobadilla,<sup>3</sup> Joyce Trujillo,<sup>3</sup> and Laura I. Escobar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City; <sup>2</sup>Department of Pediatrics, Mount Sinai School of Medicine, New York, New York; and <sup>3</sup>Unidad de Fisiología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México e Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Mexico City, México

Submitted 7 December 2009; accepted in final form 27 April 2010

**Carrisoza-Gaytán R, Salvador C, Satlin LM, Liu W, Zvilowitz B, Bobadilla NA, Trujillo J, Escobar LI.** Potassium secretion by voltage-gated potassium channel Kv1.3 in the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 299: F255–F264, 2010. First published April 28, 2010; doi:10.1152/ajprenal.00697.2009.—The fine regulation of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transport takes place in the cortical distal nephron. It is well established that K<sup>+</sup> secretion occurs through apical K<sup>+</sup> channels: the ROMK and the Ca<sup>2+</sup>- and voltage-dependent maxi-K. Previously, we identified the voltage-gated Kv1.3 channel in the inner medulla of the rat kidney (Escobar LI, Martínez-Téllez JC, Salas M, Castilla SA, Carrisoza R, Tapia D, Vázquez M, Bargas J, Bolívar JJ. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C965–C974, 2004). To examine the role of Kv1.3 in the renal regulation of K<sup>+</sup> homeostasis, we characterized the effect of dietary K<sup>+</sup> on the molecular and functional expression of this channel. We performed real-time-PCR and immunoblot assays in kidneys from rats fed a control (CK; 1.2% wt/wt) or high-K<sup>+</sup> (HK; 10% wt/wt) diet for 5–15 days. Kv1.3 mRNA and protein expression did not change with HK in the whole kidney. However, dietary K<sup>+</sup> loading provoked a change in the cellular distribution of Kv1.3 from the cytoplasm to apical membranes. Immunolocalization of Kv1.3 detected the channel exclusively in the intercalated cells. We investigated whether Kv1.3 mediated K<sup>+</sup> transport in microperfused cortical collecting ducts (CCDs). The HK diet led to an increase in net K<sup>+</sup> transport from 7.4 ± 1.1 (CK) to 11.4 ± 1.0 (HK) pmol·min<sup>-1</sup>·mm<sup>-1</sup>. Luminal margatoxin, a specific blocker of Kv1.3, decreased net K<sup>+</sup> secretion in HK CCDs to 6.0 ± 1.6 pmol·min<sup>-1</sup>·mm<sup>-1</sup>. Our data provide the first evidence that Kv1.3 channels participate in K<sup>+</sup> secretion and that apical membrane localization of Kv1.3 is enhanced in the intercalated cells by dietary K<sup>+</sup> loading.

potassium diet; potassium transport; distal nephron; intercalated cell; rat kidney; urine pH

KV1.3 IS A VOLTAGE-GATED POTASSIUM channel (Kv), and its activation results in outward K<sup>+</sup> currents that suppress excitability in neurons. Kv1.3 is widely distributed in diverse cell types: lymphocytes (7, 9), neurons (63), kidney (11, 84), liver, skeletal muscle, testis, spermatozoa (29), and osteoclasts (3). Kv1.3 participates in the stabilization of the cell resting membrane potential in nonexcitable cells. In addition, Kv1.3 participates in several cell functions that range from apoptosis (64), cell volume regulation (9), to T cell stimulation (50). Kv1.3 activity is regulated by phosphorylation: PKC enhances Kv1.3 channel activity by shifting its voltage dependence in human lymphocytes (8), while tyrosine phosphorylation at

multiple sites in the amino and carboxyl terminus of Kv1.3 channel suppresses channel activity (13, 14). Kv1.3 contributes also to glucose homeostasis: the Kv1.3-deficient mice (Kv1.3<sup>-/-</sup>) weigh less than control littermates and are protected from diet-induced obesity (82). Furthermore, inhibition of Kv1.3 channel activity improves insulin sensitivity by upregulation of the glucose transporter GLUT4 at the plasma membrane (83). Finally, Kv1.3 activity is upregulated by the serum-glucocorticoid-activated kinase (SGK), one of the main mediators of aldosterone's action at the renal distal tubule (77).

K<sup>+</sup> channels fulfill a critical role in K<sup>+</sup> recycling and K<sup>+</sup> secretion in the kidney. The mechanisms underlying and regulation of renal K<sup>+</sup> secretion have been studied mainly in the mammalian cortical collecting duct (CCD), a segment that can be isolated for patch-clamp analysis and in vitro microperfusion (2, 4, 10, 12, 16, 19, 21, 42, 56, 57, 62, 65, 66, 79). A high-K<sup>+</sup> diet (HK) for days to weeks stimulates net K<sup>+</sup> secretion in the CCD (39, 41, 42, 61). The K<sup>+</sup> adaptation exhibited by the distal tubule in response to chronic dietary K<sup>+</sup> loading is due in part to an increase of the basolateral Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity (39), and to an upregulation of the apical ROMK (19) and maxi-K (42) channels in CDs.

It is well established that the ROMK inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel corresponds to the low-conductance or secretory K<sup>+</sup> channel (SK) of the CCD (46). Due to its voltage independence and weak inward rectification, ROMK allows K<sup>+</sup> ions to exit the cell at voltages above the potassium equilibrium potential. ROMK has been recognized as the major route for K<sup>+</sup> secretion in the distal nephron under baseline conditions (75). Intriguingly, patients with Bartter's syndrome due to loss of function of ROMK (59) and ROMK knockout mice (37, 38) still show net K<sup>+</sup> secretion in the urine, without the hyperkalemia expected from the absence of ROMK. The maxi-K channel has been proposed to mediate K<sup>+</sup> secretion in the absence of ROMK (3, 37, 38, 42); however, iberiotoxin, a specific inhibitor of the former channel, fails to completely inhibit urinary K<sup>+</sup> excretion in ROMK knockout mice (4). These observations suggest the presence of other K<sup>+</sup>-secretory pathways in the kidney.

In a previous study, we recorded an outward K<sup>+</sup>-selective conductance in a primary cell culture of the rat inner medullary collecting duct. We identified three members of the Kv1 subfamily, i.e., Kv1.1, Kv1.3, and Kv1.6, by immunofluorescence and immunoblot assays (11). In the present study, we examined the expression of Kv1.3 in cortical and medullary CDs of kidneys from rats fed CK and HK diets.

Address for reprint requests and other correspondence: L. I. Escobar, Edificio A, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Mexico City, México 04510 (e-mail: laurae@servidor.unam.mx).

## METHODS

**Animals.** Male Wistar rats (200 g) were used for all studies. Animals were anesthetized by intraperitoneal administration of pentobarbital sodium and killed by cervical dislocation. The animal protocol for microperfusion studies was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at the Mount Sinai School of Medicine.

**Membrane protein extraction from rat kidney.** Brain and kidney [cortex (Cx); outer (OM) and inner (IM) medulla] were homogenized (0.1 g tissue/1 ml) in a buffer solution containing 250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6, and a protease cocktail inhibitor complete mini 1 tablet/10 ml (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland). Large tissue debris and nuclear fragments were removed by two low-speed spins (1,000 g, 10 min, 4°C). The supernatant (crude membranes) was collected and centrifuged (17,000 g, 20 min, 4°C). The pellet enriched in plasma membranes was resuspended in buffer solution (300  $\mu$ l). The protein concentration was measured with the Bio-Rad D C protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA).

**Immunoblotting.** Crude or plasma membrane samples (50  $\mu$ g) were electrophoretically separated in 6% SDS-PAGE and electroblotted to a nylon membrane (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany). Nonfat dry milk (5%, Bio-Rad) in TBS-T (20 mM Tris-HCl, 136 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.6) was added for 1 h. The nylon membrane was incubated overnight with rabbit polyclonal antibodies against Kv1.3 (1:300, Alomone, Jerusalem, Israel) diluted in TBS-T at 4°C. The membrane was rinsed three times (10 min each) with TBS-T and incubated with the secondary antibody donkey anti-rabbit IgG coupled to horseradish peroxidase (1:5,000; Amersham Biosciences) in TBS-T for 1 h at room temperature (RT). Immunoblots were detected using ECL plus detection reagents (Amersham Biosciences) and exposed to autoradiographic film for 1 min (Kodak). A brain sample and the primary antibody preincubated with its antigen control served as the positive and negative control, respectively (6).

**Real-time RT-PCR.** Cx and medulla sections were isolated from both kidneys and snap frozen in liquid nitrogen. Total RNA was isolated from each kidney following the TRIzol method (Invitrogen, Carlsbad, CA) as previously reported (11). To avoid DNA contamination, all total RNA samples were treated with DNAase I (Invitrogen). Reverse transcription (RT) was carried out with 2.5  $\mu$ g of total RNA using 200 U of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen). Kv1.3 mRNA was quantified by real-time RT-PCR on the ABI Prism 7300 Sequence Detection System (TaqMan, Applied Biosystems ABI, Foster City, CA). Primers and probes were ordered as kits: Rn01521807\_s1 (Assays-on-Demand, ABI). Eukaryotic 18S rRNA (predesigned assay reagent Applied by ABI, external run) was used as an endogenous control. Relative quantification of the Kv1.3 expression was performed using the comparative CT method (36).

**K diet and functional parameters.** Male Wistar rats (200–250 g) were fed a HK (10%) or CK (1.2%) diet (Harlan-Teklad, Madison, WI) for 15 days ( $n = 6$ /group), and sterile distilled water was made freely available. At the end of the study, rats were placed in metabolic cages and urine spontaneously voided during 24 h was collected. Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> concentrations were measured in plasma and urine samples with a NOVA4 electrolyte analyzer (NOVA Biomedical). Absolute and fractional rates of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> excretion were calculated. In addition, serum aldosterone levels were quantitatively determined by radioimmunoassay (DiaSorin). Rats were anesthetized, and kidneys were removed and processed as above. Thirty micrograms of protein from Cx, OM, and IM were assayed for Western blot analysis.

**Urinary pH and Pco<sub>2</sub>.** Twenty-four hours before death, rats were housed individually in metabolic cages with free access to tap water. Individual 12-h urine samples were collected under mineral oil. Urinary pH was measured immediately using a pH microelectrode connected to an Orion 410A pH meter (Orion Research), whereas

urinary Pco<sub>2</sub> concentrations were measured with a gas analyzer (model 5395, Roche Diagnostics).

**Immunohistochemistry.** Tissues were retrograde perfused via the aorta with ice-cold PBS (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4 buffer, 149 mM NaCl, 2 mM KCl) for 5 min and then with 4% paraformaldehyde in PBS (PFAS) for 5 min. Kidneys were removed and fixed overnight. After fixation, tissues were cryoprotected with 30% sucrose in PFAS. Sagittal sections ( $\mu$ m) were cut in a cryostat (CM1100, Leica), collected on slides, and hydrated in PBS. Antigen retrieval was performed incubating the slides in 10 mM sodium citrate buffer, pH 6, for 30 min at 80°C. The samples were preincubated for 1 h at RT with 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS and permeabilized with 0.3% Triton X-100 (USB, Cleveland, OH) in PBS (10 min). Blocking was performed with 1% BSA, 5% fetal bovine serum, 5% donkey serum, and 0.1% Triton X-100 in PBS for 1 h at RT. The samples were then incubated with rabbit anti-Kv1.3 antibody (1:100; Alomone) in the same solution for 24 h at 4°C. Incubation without anti-Kv1.3 antibody or preincubation of the antibody with the control peptide served as a negative control. After three washes with 0.1% Triton X-100 in PBS (PBS-TX), sections were incubated with the secondary antibody coupled to horseradish peroxidase (donkey anti-rabbit, 1:200 Amersham) for 1 h at RT. Samples were then washed with PBS-TX for 10 min, three times and incubated with 0.03% diaminobenzidine (Sigma), 0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, in PBS during 5 min. The samples were washed for 10 min in PBS, dehydrated in an ethanol-xytol train, i.e., 30% EtOH (in tap water); 70% EtOH; 90% EtOH; 100% EtOH; 100% EtOH; 50% EtOH-50% xytol; 100% xytol, 100% xytol (5 min each), and mounted on coverslips with Permout mounting media (Electron Microscopy Sciences). Slides were observed under  $\times 20$  and  $\times 40$  objectives with a bright light Nikon eclipse 80i microscope, and images were captured with a Coolpix-4300 Nikon digital camera with four megapixels of resolution.

**Immunofluorescence.** Tissues were processed as described above but without preincubation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> after the antigen retrieval. To identify specific cell types in CDs, double-immunofluorescence staining was performed using rabbit anti-Kv1.3 (1:100), a secondary antibody coupled to Alexa 594 (goat anti-rabbit, 1:200; Molecular Probes, Eugene, OR), and the specific CD principal cell marker *Dolichus biflorus* agglutinin (DBA), coupled to 5  $\mu$ g/ml fluorescein (DBA-F; Sigma), or cells were immunostained with the goat anti-B1-H-VATPase (1:200, Santa Cruz Biotechnology) as a marker of acid-secreting intercalated cells in DBA-positive segments, and donkey anti-goat secondary antibodies coupled to Alexa 488 (1:500; Molecular Probes). Tissues were mounted on microscope coverslips with Vectashield (Vector Laboratories). Slides were examined and images were obtained with a  $\times 40$  oil-immersion objective mounted on a confocal inverted microscope (Leica TCS-SP5). Image analysis was performed with the Leica Application Suite Advance Fluorescence Lite program.

**In vitro microperfusion assays.** Kidneys from CK and HK rats were removed via a midline incision, and single CCDs were dissected freehand in cold (4°C) Ringer solution containing (in mM) 135 NaCl, 2.5 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.0 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 MgSO<sub>4</sub>, 4.0 lactate, 6.0 L-alanine, 5.0 HEPES, and 5.5 D-glucose, pH 7.4, 290  $\pm$  2 mosmol/kgH<sub>2</sub>O. A single tubule was studied from each animal. Isolated CCDs were microperfused in vitro as previously described (42, 56, 80). Briefly, each isolated tubule was immediately transferred to a temperature- and O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-controlled specimen chamber, mounted on concentric glass pipettes, and perfused and bathed at 37°C with Burg's perfusate containing (in mM) 120 NaCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 2.5 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.0 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 MgSO<sub>4</sub>, 4.0 Na lactate, 1.0 Na<sub>3</sub> citrate, 6.0 L-alanine, and 5.5 D-glucose, pH 7.4, 290  $\pm$  2 mosmol/kgH<sub>2</sub>O. During the 30-min equilibration period and thereafter, the perfusion chamber was continuously suffused with a gas mixture of 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> to maintain the pH of Burg's solution at 7.4 at 37°C. The bathing solution was continuously exchanged at a rate of 10 ml/h using a syringe pump (Razel, Stamford, CT).



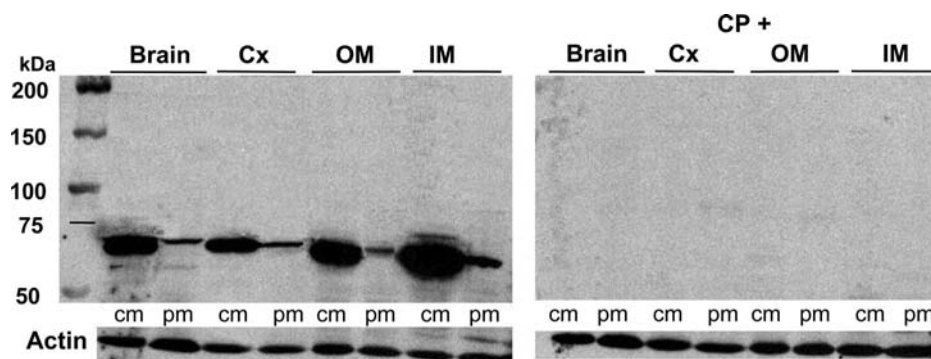


Fig. 1. Immunoblot analysis of Kv1.3 protein in rat kidney. Immunoreactive bands corresponding to Kv1.3 protein were detected at ~70 kDa in crude membranes (cm) and plasma membranes (pm). Samples were obtained from brain, renal cortex (Cx), outer (OM), and inner (IM) medulla. Bands disappeared when primary antibodies were preincubated with their control peptide (CP+).

Transport measurements were performed in the absence of trans-epithelial osmotic gradients, and thus water transport was assumed to be zero. Three to four samples of tubular fluid were collected under water-saturated light mineral oil by timed filling of a calibrated ~15-nl volumetric constriction pipette before and at least 20–30 min after addition and in the continued presence of margatoxin (MgTX; 1 nM) in the luminal perfusate. CCDs were perfused at a rate of ~2.5 nl·min<sup>-1</sup>·mm<sup>-1</sup>; the flow rate was maintained by adjusting the height of the perfusate reservoir. To determine the concentration of K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> delivered to the tubular lumen, ouabain (200 μM) was added to the bath at the conclusion of each experiment to inhibit active transport, and an additional three to four samples of tubular fluid were obtained for analysis. The cation concentrations of perfusate and collected tubular fluid were determined by helium glow photometry, and the rates of net transport ( $J_x$ ; in pmol·min<sup>-1</sup>·mm tubular length<sup>-1</sup>) were calculated using standard flux equations (56, 80). The calculated ion fluxes were averaged to obtain a single mean rate of ion transport for the CCD under each condition.

**Statistics.** The commercially available SigmaStat 3.5 program was used for statistical analysis. All values were expressed as means ± SE and evaluated to determine a normal distribution. Statistical comparisons of differences were performed using one-way ANOVA combined with the Bonferroni test.  $P < 0.05$  was considered for statistical significance. In each analysis,  $n$  refers to the number of animals in each group.

## RESULTS

**Expression of Kv1.3 in rat kidney Cx and medulla.** Immunoblotting analysis of Kv1.3 in crude and plasma membrane samples from rat brain, kidney Cx, OM, and IM revealed a band at ~70 kDa (Fig. 1). The amount of Kv1.3 protein in plasma membranes was lower than in crude membranes from the three renal sections. Therefore, Kv1.3 is expressed predominantly in the cytoplasm of the Cx and medulla, according to our previous observations in the rat IM collecting duct (11).

**Effect of high K<sup>+</sup> load on serum and urine electrolytes.** It is well established that an increase in dietary K<sup>+</sup> enhances the rate of K<sup>+</sup> secretion in the distal nephron (39, 41, 42, 61). We fed rats a HK (10%) or CK (1.2%) diet for 15 days. A summary of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> concentrations in plasma and urine as well as that of serum aldosterone in rats adapted to the above diets is shown in

Table 1. As expected, serum Na<sup>+</sup> concentration was not affected by dietary K<sup>+</sup>, although a kaliuretic effect of HK was observed. The urinary K<sup>+</sup> concentration was fivefold greater ( $0.277 \pm 0.02$  meq K<sup>+</sup>/ml) in HK compared with CK rats ( $0.055 \pm 0.005$  meq K<sup>+</sup>/ml). Plasma K<sup>+</sup> was similar in HK and CK rats ( $4.3 \pm 0.3$  and  $4.2 \pm 0.2$  meq/l, respectively), consistent with renal K<sup>+</sup> adaptation (81). The serum aldosterone concentration in CK ( $213.8 \pm 20$ ) rats was significantly less than that measured in HK ( $1,097.0 \pm 200.1$  pg/ml) rats, in accordance with other reports (34, 48, 61).

**Effect of HK diet on Kv1.3 mRNA and protein expression in rat kidney.** First, we quantified the effect of the HK diet on Kv1.3 mRNA expression in the whole kidney by real-time RT-PCR. The steady-state abundance of the Kv1.3 transcript in rats fed a HK diet for 15 days was similar to control animals (Fig. 2A). We acknowledge that analysis of steady-state mRNA expression after 15 days of a HK diet, once adaptation has occurred, may have missed an earlier increase, as has been described for genes regulated during metabolic acidosis (43). Therefore, we proceeded to determine whether a HK diet modified the channel protein expression. The relative amount of Kv1.3 protein in crude membranes from the kidney sections was not changed by the HK (Fig. 2B). In contrast, immunoblot analysis of plasma membranes showed that Kv1.3 was significantly increased in all kidney sections by the HK diet (Fig. 3A). Specifically, quantification of Kv1.3 protein in plasma membranes identified increases of 2.5-fold in Cx, 4-fold in OM, and 2-fold in IM (Fig. 3B) in response to dietary K<sup>+</sup> loading. Therefore, we conclude that the HK diet upregulated Kv1.3 protein in plasma membranes.

**Kv1.3 is localized in intercalated cells.** Immunohistochemistry for Kv1.3 revealed significant changes in channel distribution after the HK diet. Kv1.3 staining of CDs was intracellular under the CK diet (Fig. 4, A and C). Remarkably, the HK diet provoked the trafficking of Kv1.3 to the apical membranes of CDs (Fig. 4, B and D). This finding suggested that to enhance urinary excretion of the dietary K<sup>+</sup> load, Kv1.3 is directed to luminal membranes of CDs to accomplish, at least in part, this task. CDs include both principal and intercalated cells (25). Coincident double-labeling of tissue sections with

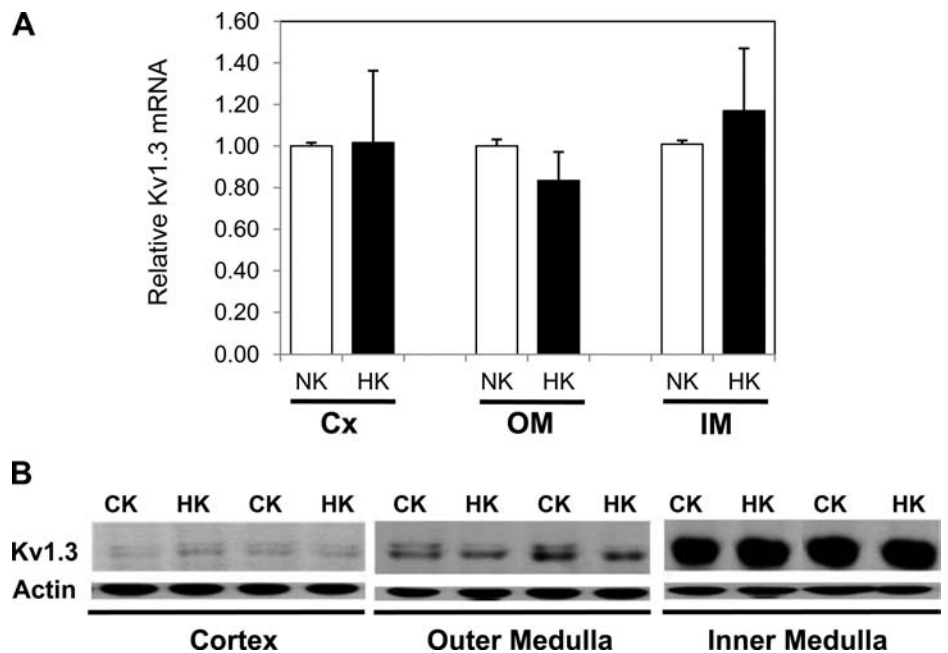
Table 1. Effect of a high-K<sup>+</sup> diet on electrolytes and aldosterone levels

| Diet                   | $n$ | Serum Na, meq/l | Serum K, meq/l | Urinary Na, meq/ml | Urinary K, meq/ml | Serum Aldosterone, pg/ml |
|------------------------|-----|-----------------|----------------|--------------------|-------------------|--------------------------|
| Control K <sup>+</sup> | 4   | 147.0 ± 0.6     | 4.3 ± 0.3      | 0.022 ± 0.001      | 0.055 ± 0.005     | 213.8 ± 20               |
| High K <sup>+</sup>    | 6   | 145.6 ± 0.8     | 4.2 ± 0.2      | 0.014 ± 0.003      | 0.277 ± 0.02*     | 1,097.0 ± 200.1*         |

Values are means ± SE;  $n$  = no. of rats. Rats were fed for 15 days. \* $P < 0.05$  vs. control K<sup>+</sup>.



Fig. 2. Dietary  $K^+$  intake has no effect on Kv1.3 channel transcript and protein expression. *A*: real-time PCR assays were performed to detect the relative abundance of Kv1.3 transcript in Cx, OM, and IM from rats fed control  $K^+$  (CK) and high- $K^+$  (HK) diets. There was no significant difference in the Kv1.3 mRNA expression in any region between the CK and HK groups ( $n = 6$ ). *B*: representative Western blot showing Kv1.3 in crude membranes from Cx, OM, and IM from rats CK and HK diets. Crude protein (30  $\mu$ g) was loaded on each lane. No differences were observed in Kv1.3 protein expression between the CK and HK groups.



anti-Kv1.3 and DBA for principal cells or B1-H-VATPase for intercalated cells revealed localization of Kv1.3 exclusively in intercalated cells (Fig. 5).

*Kv1.3 is a secretory channel during high dietary  $K^+$ .* The observations of apical localization of Kv1.3 in intercalated

cells and its upregulation in the plasma membrane by HK strongly suggested that Kv1.3 participates in  $K^+$  secretion under HK conditions. To test this possibility, we examined the contribution of Kv1.3 to net  $K^+$  secretion in isolated, microperfused CCDs. Net  $K^+$  secretion was  $7.4 \pm 1.1$  pmol $\cdot$ min $^{-1}\cdot$ mm $^{-1}$

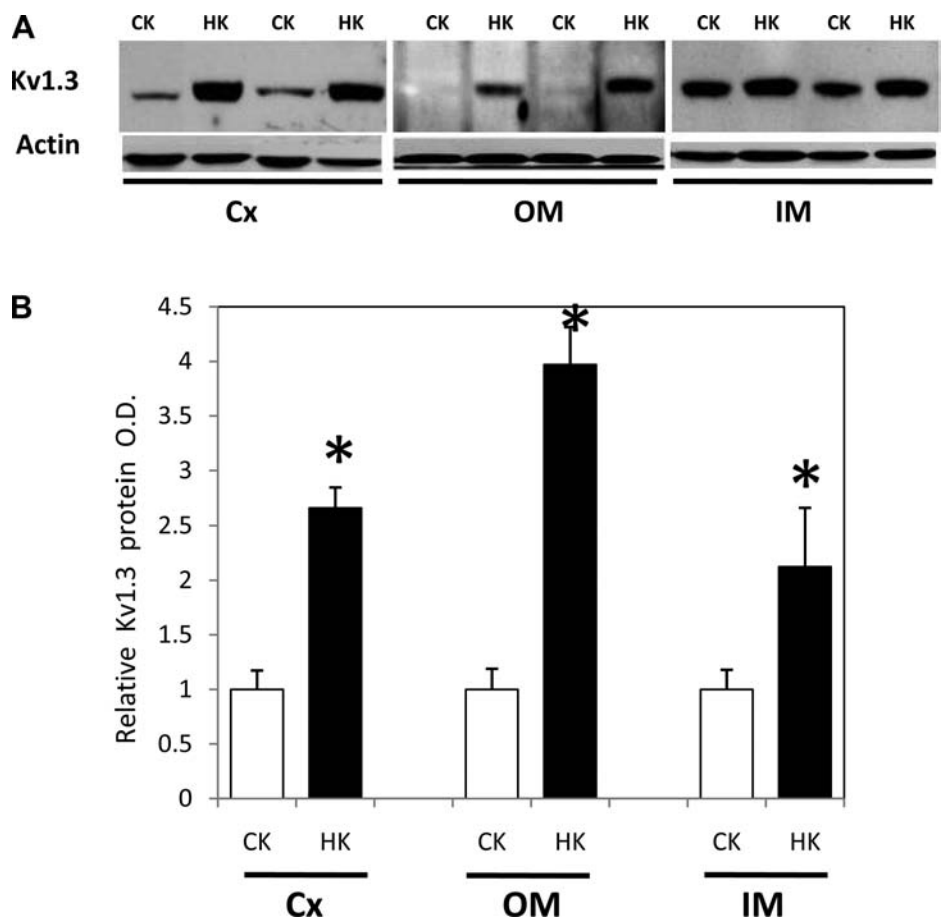


Fig. 3. Effect of dietary  $K^+$  intake on Kv1.3 expression in plasma membranes. *A*: representative immunoblot of Kv1.3 in plasma membranes from Cx, OM, and IM of rats fed CK and HK diets. Thirty micrograms of protein was loaded on each lane. *B*: significant relative increase was detected in the 3 regions of kidney studied in response to dietary  $K^+$  loading, suggesting increased trafficking or stability of Kv1.3 protein to/on plasma membranes. Values are mean  $\pm$  SE;  $n = 6$ /dietary group. \* $P < 0.05$ .

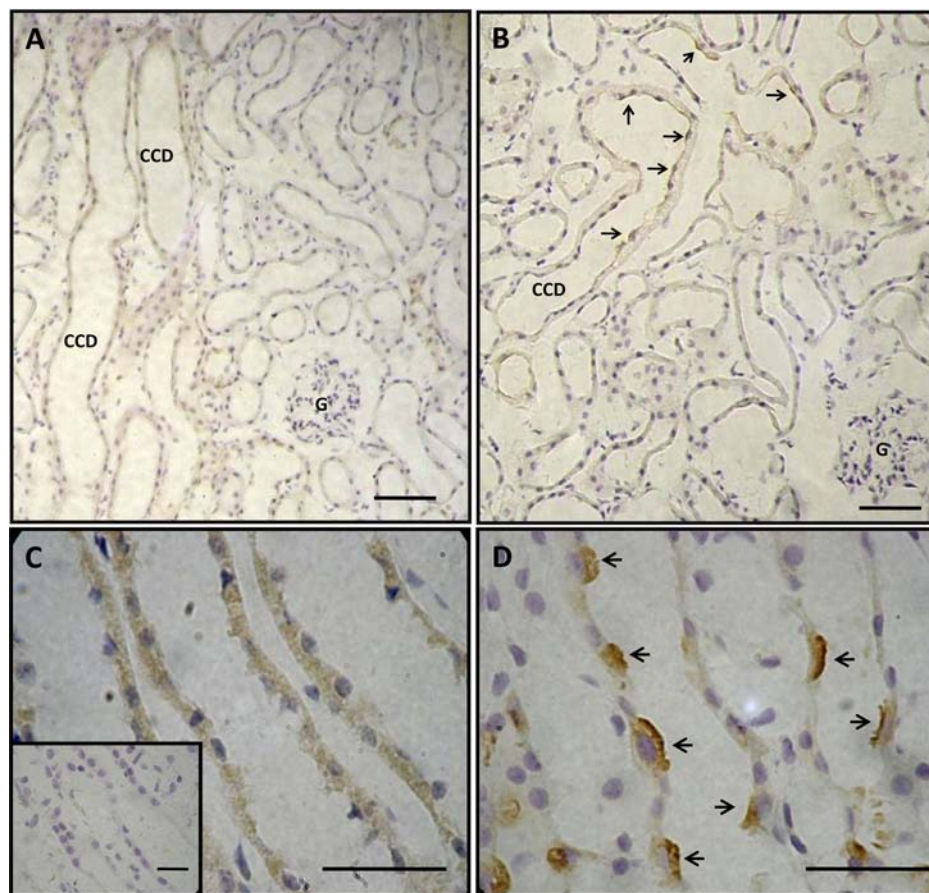


Fig. 4. Immunohistochemistry of Kv1.3 in the kidney Cx in rats fed CK (A) and HK diets (B). Cortical collecting ducts (CCDs) are observed with positive cytoplasmic (A) and polarized (B, arrows) immunoreactivity. Higher magnification shows a cytoplasmic distribution in all CCD cells of Kv1.3 in CK rats (C); the inset at the bottom left shows a negative control (preincubation of the anti-Kv1.3 antibody with the control peptide). The HK diet enhances apical expression of Kv1.3 in a few cells (D, arrows). Bars = 50  $\mu\text{m}$ .

in CK CCDs and was not affected by luminal MgTX, a specific Kv1.3 blocker (18) (Fig. 6A). In rats fed a HK diet, net  $\text{K}^+$  secretion was 54% greater than that measured in CK tubules, averaging  $11.4 \pm 1.0 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ . This  $\text{K}^+$ -secretory flux was significantly inhibited to  $6.0 \pm 1.6 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$  by luminal addition of MgTX (Fig. 6A). Net  $\text{Na}^+$  absorption was similar in the absence and presence of MgTX in both CK and HK CCDs.

*Urinary alkalization is produced by chronic HK loading.* An increase in Kv1.3 activity at the apical membrane would tend to hyperpolarize the intercalated cell, which could affect the activity of the H-ATPase pump. A more positive lumen membrane voltage would decrease the electrochemical driving force for  $\text{H}^+$  secretion. To our knowledge, measurements of total  $\text{CO}_2$  concentration and/or urine pH and  $\text{Pco}_2$  have not been reported in rats fed a HK diet. Therefore, we measured urine pH and  $\text{Pco}_2$  at 3, 7, and 10 days of HK. Remarkably, urine pH and  $\text{Pco}_2$  changed significantly with HK (Table 2). Urine pH increased from  $6.27 \pm 0.05$  (CK) to  $7.55 \pm 0.14$  (10 days of HK) and  $\text{Pco}_2$  (mmHg) quadrupled from  $33.96 \pm 3.3$  (CK) to  $131.6 \pm 7.5$  (10 days of HK). This HK-induced alkalization of the urine is consistent with either enhanced net  $\text{HCO}_3^-$  secretion or net inhibition of  $\text{HCO}_3^-$  absorption in the rat CD by dietary  $\text{K}^+$  loading, possibilities that remain to be examined.

## DISCUSSION

In this work we explored the regulation of Kv1.3 channels in cortical and medullary CDs. Kv1.3 was localized mostly in the

cytoplasm under basal metabolic conditions. Kv1.3 protein abundance is higher in the  $\text{IM} > \text{OM} > \text{Cx}$ .

ROMK and maxi-K channels are also localized in the cytoplasm, and their trafficking to apical membranes in distal tubules is regulated by dietary  $\text{K}^+$  (26, 42, 76). Thus, for example, the density of apical ROMK, estimated by patch-clamp recordings, and apical maxi-K channels, assessed as ibertoxin-sensitive flow-stimulated net  $\text{K}^+$  secretion, increases in the CCD in response to a HK diet (16, 42, 45, 48, 71, 72, 73). Based on these reports, we examined the effect of dietary  $\text{K}^+$  loading on Kv1.3 mRNA and protein expression in the whole kidney, as well as its cellular localization. As expected, chronic  $\text{K}^+$  loading led to enhanced  $\text{K}^+$  urinary excretion and an increase in plasma aldosterone levels, thereby maintaining the physiological  $\text{K}^+$  levels in plasma (Table 1) (34, 48, 61, 81). Kv1.3 mRNA abundance in kidneys of animals adapted to a HK diet was similar to that in CK rats; whether an increase in transcript abundance occurred within the first week of dietary  $\text{K}^+$  loading was not examined. It should be noted that abundance of the maxi-K  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunit mRNAs and maxi-K  $\alpha$ -subunit protein (42), as well as ROMK mRNA (16) and protein (78), is not modified in the rabbit and rat whole kidney, respectively; this may reflect the analysis of an admixture of multiple nephron segments and cells, "diluting" a response that might be localized to a single tubule. However, upregulation of maxi-K  $\alpha$ - and  $\beta_{2-4}$ -subunit mRNAs by HK diet has been detected in single CCDs (42).

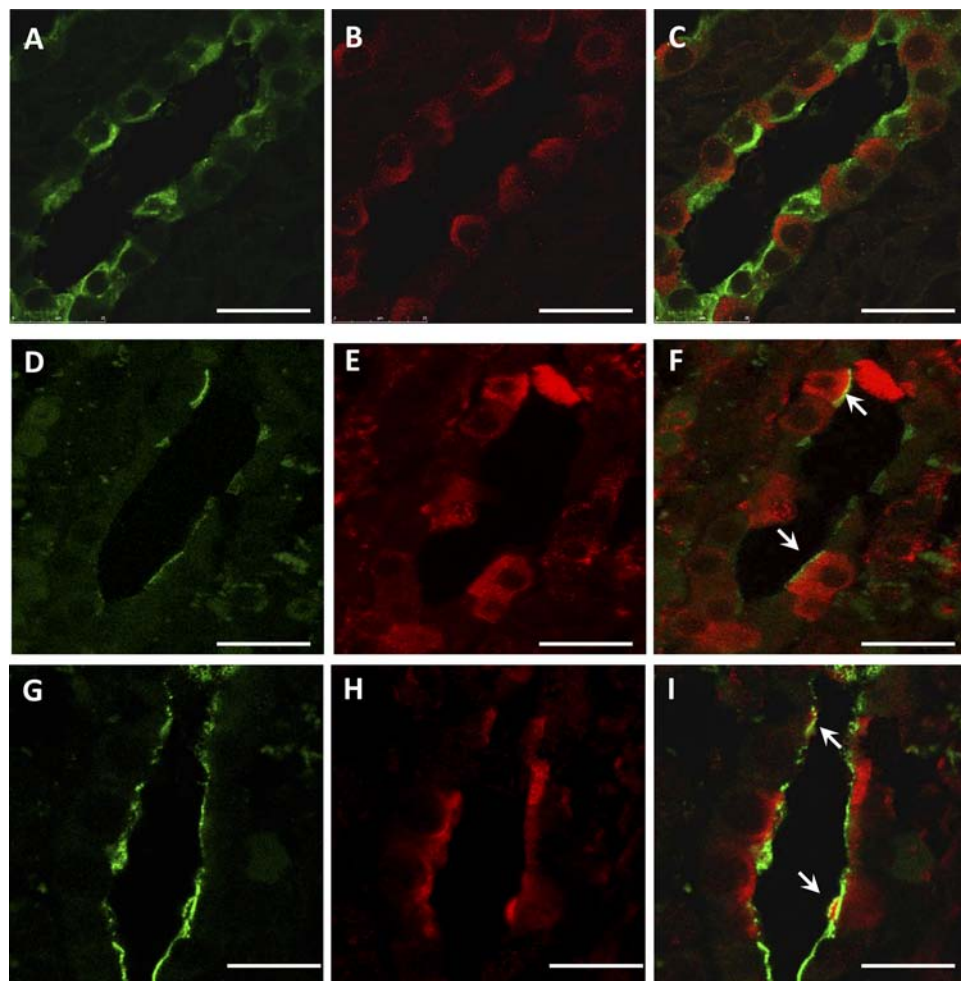


Fig. 5. Kv1.3 expression in collecting duct intercalated cells from kidneys of HK-fed rats. Shown is detection of principal cells with *Dolichus biflorus* agglutinin coupled to fluorescein (DBA-F; A; green), intercalated cells with goat-anti-B1-H-VATPase antibody (D and G; green), and Kv1.3 with an anti-Kv1.3 antibody (B, E, and H; red) in collecting ducts of HK-fed rats by indirect immunofluorescence confocal microscopy. Note that Kv1.3 is localized only to cells lacking DBA-F staining (C; merged) and in presumably intercalated cells expressing apical H<sup>+</sup>-VATPase (F and I; merged). Arrows point to apical Kv1.3-H<sup>+</sup>-VATPase colocalization (yellow). Bars = 25  $\mu$ m.

Kv1.3 protein was upregulated in plasma membrane fractions from Cx, OM, and IM by HK diet. Importantly, HK loading led to a change in immunodetectable channel cellular localization from cytoplasmic to apical plasma membranes of CDs. We concluded at this stage that an intracellular pool of Kv1.3 exists under normal metabolic conditions and that K<sup>+</sup> loading stimulates the trafficking of Kv1.3 in the CDs to the apical membrane, as has been reported for ROMK and maxi-K channels.

Kv1.3 trafficking has been explored in other cell types such as pyramidal neurons, where the T1 domain of Kv1.3 mediates targeting of the channel to the axonal surface (52). The cellular distribution of Kv1.3 is also determined by different Kv1  $\alpha$ -subunit associations to form a heterotetramer. Since Kv1.3 may associate with caveolin, heteromeric Kv1.3/Kv1.x channels target to distinct surface microdomains (67). To complicate the picture further, Kv1.3 trafficking, targeting and activity are also altered by the presence of the  $\beta$ -subunit KCNE4. KCNE4 associates with Kv1.3 in the endoplasmic reticulum (ER) and reduces the number of Kv1.3 channels at the cell surface (60). KCNE4 mRNA is abundant in the kidney (24), but its protein localization in the distal nephron has not as yet been explored. Finally, HK loading stimulates the expression of apical K<sup>+</sup> channels in rat CCD by aldosterone-dependent and -independent signaling pathways. An HK diet suppresses the inhibitory action of WNK4 on ROMK channels through a

SGK1 pathway (28). SGK1 and PKA stimulate renal K<sup>+</sup> secretion by promoting the export of ROMK channels from the ER (85). Signaling pathways involved in the activation of Kv1.3 include the phosphatidylinositol-3 (PI3) protein kinase, 3-phosphoinositide-dependent protein kinase PDK1, and SGK1 (17, 77). In addition, Kv1.3 is a target of the ubiquitin ligase Nedd4-2, which leads to downregulation of the channel (27). Experiments aimed at testing whether similar pathways regulate Kv1.3 activity in intercalated cells, while important, remain beyond the scope of this paper.

Double-immunofluorescence labeling experiments with DBA-F and anti-B1-V-H-ATPase antibodies revealed apical membrane localization of Kv1.3 in acid-secretory intercalated cells. Morphological studies of intercalated cells in animals subjected to different experimental conditions have been interpreted as pointing to a role for these cells not in K<sup>+</sup> secretion but rather in K<sup>+</sup> reabsorption and in H<sup>+</sup> or NH<sub>4</sub><sup>+</sup> secretion (30). Our detection of MgTX-sensitive and thus Kv1.3-mediated net K<sup>+</sup> secretion in microperfused CCDs isolated from HK, but not CK rats, provides strong evidence that Kv1.3 is present in the apical membrane of rat CD and participates in K<sup>+</sup> secretion during HK.

Although MgTX is relatively specific for Kv1.3 homomultimers, a related issue is the possible existence of other Kv1 homomultimers and/or Kv1.3/Kv1.x heteromultimers in the distal nephron. First, MgTX IC<sub>50</sub> for homomultimers of



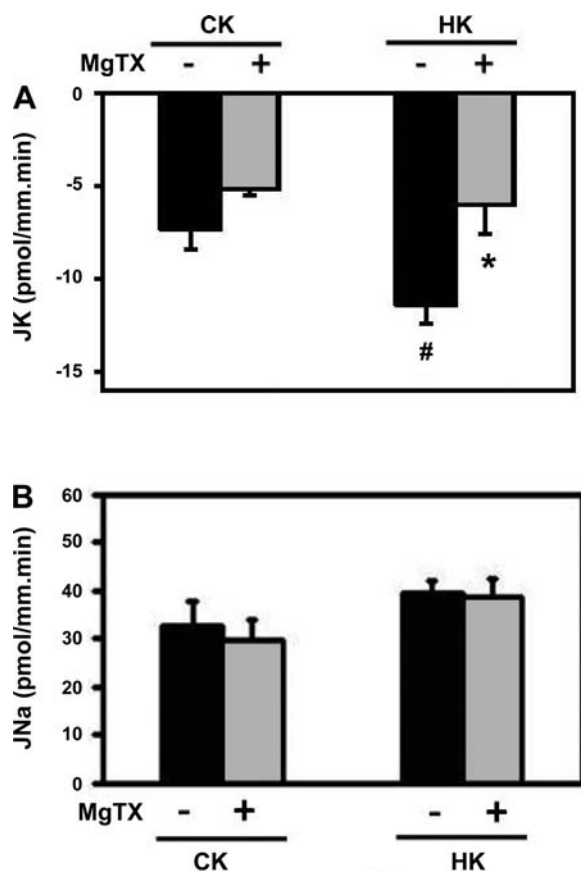


Fig. 6. Margatoxin (MgTX) reduces net K<sup>+</sup> secretion in CCDs isolated from HK-fed rats. Net transport of K<sup>+</sup> ( $J_K$ ; A) and Na<sup>+</sup> ( $J_{Na}$ ; B) in single CCDs from CK ( $n = 4$ ) and HK ( $n = 3$ ; 5 days) rats is shown before and after 1 nM MgTX is added to the luminal perfusate. In CK rats, MgTX failed to have any significant effect on net K<sup>+</sup> secretion. K<sup>+</sup> secretion, significantly increased in response to dietary K<sup>+</sup> loading, was inhibited by MgTX. Na<sup>+</sup> absorption was not affected by MgTX. # $P < 0.05$  compared with CK diet tubule. \* $P < 0.05$  compared with HK tubules perfused without MgTX.

Kv1.1, Kv1.2, and Kv1.3 is 144, 675, and 230 pM, respectively (32), and Kv1.3/Kv1.x heteromultimers have less inhibitor sensitivity. Therefore, 1 nM MgTX in the luminal perfusate solution will block apical homo- and/or heteromultimeric Kv1.1, Kv1.2, and Kv1.3 channels. Whether these channel combinations participate is still an open question. In any case, it will mean that we are underestimating the contribution of Kv1 channels to K<sup>+</sup> secretion in dietary HK. Therefore, the data presented in this paper indicate the important role of Kv1 channels in K<sup>+</sup> secretion during HK loading. Furthermore, since the Kv1.3 knockout mice do not develop obesity and no kidney failure has been reported so far, we can speculate that K<sup>+</sup> secretion in HK diets is compensated not only by the upregulation of ROMK and maxi-K channels, but in addition by other homo- and/or heteromultimeric Kv1 channels (Kv1.1–Kv1.7) in the distal tubule. In addition, the fact that ROMK knockout mice secrete K<sup>+</sup> and that K<sup>+</sup> secretion in these animals is not completely eliminated by iberiotoxin, a specific inhibitor of Ca<sup>2+</sup>-activated maxi-K channels (37, 38), suggests now that Kv1.3 is an alternative pathway to accomplish this task.

Many patch-clamp studies have clearly identified conducting ROMK and maxi-K channels in distal tubules (45, 46, 47, 71,

74). An immediate question is why Kv1.3 channels have not as yet been functionally identified in these segments. While few electrophysiological analyses of intercalated cells have been performed, maxi-K channels have been characterized in intercalated cells (44), where their single-channel conductance ( $\gamma = 100\text{--}200$  pS) (15, 44) is an order of magnitude higher than the corresponding Kv1.3 conductance ( $\gamma = 7\text{--}14$  pS) (3, 84). Since both Kv channels activate in the same voltage range, we believe that large maxi-K currents mask the corresponding Kv1.3 currents in intercalated cells. Furthermore, Kv1.3 is blocked also by the nonspecific blockers Ba<sup>2+</sup> and TEA, commonly used in electrophysiological assays of maxi-K currents in distal tubules (44, 45, 49, 79).

Another unresolved question is how intercalated cells could mediate net K<sup>+</sup> secretion. It is well established that the driving force for K<sup>+</sup> secretion through ROMK channels in principal cells is determined by electrogenic Na<sup>+</sup> absorption through apical Na<sup>+</sup> channels (ENaC) and enhanced basolateral Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity. Intercalated cells are generally considered to lack significant basolateral pump activity. However, immunocytochemical studies in the rat kidney performed with monoclonal antibodies directed against the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ -subunit and an antigen-retrieval technique revealed little labeling in intercalated cells of the CCD and outer medullary collecting duct (54). Although ouabain-sensitive currents were not detected in intercalated cells in rat connecting tubule and CCD (49), functional measurements of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase pump activity have been reported (5).

It is now accepted that maxi-K channel-mediated, flow-stimulated net K<sup>+</sup> secretion in the CCD is mainly due through intercalated cells, as the density of conducting (33, 44, 49, 57) and immunodetectable (12, 22, 23, 42, 51) channels in these cells is greater than that in principal cells. So how do intercalated cells take up K<sup>+</sup> at their basolateral membranes to sustain K<sup>+</sup> secretion? Immunodetectable NKCC1 is found along the basolateral membrane of type A H<sup>+</sup>-secreting intercalated cells (but not principal cells) in the rat outer medullary collecting duct (20), where it participates in the transepithelial transport of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, and Cl<sup>-</sup> (68, 69). Mice with genetic disruption of NKCC1 exhibit increased plasma renin (but not aldosterone) and a higher serum K<sup>+</sup> concentration, with inappropriately low urinary K<sup>+</sup> excretion compared with wild-type mice (40, 70). The sensitivity of maxi-K channel-mediated, flow-stimulated but not basal  $J_K$  to basolateral bumetanide (35), measured in microperfused rabbit CCDs and without an effect on flow-stimulated net Na<sup>+</sup> absorption ( $J_{Na}$ ), suggests that basolateral NKCC1 may participate in K<sup>+</sup> uptake into intercalated cells to sustain K<sup>+</sup> secretion. In addition, we now have evidence that a cationic nonselective HCN channel (activated by cAMP and hyperpolarization) is present in intercalated cells that can mediate basolateral Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> uptake (Escobar LI, unpublished observations). HCN channels in intercalated cells will

Table 2. Effect of a high-K<sup>+</sup> diet on urine pH and Pco<sub>2</sub> levels

|                         | Day 0       | Day 3        | Day 7        | Day 10       |
|-------------------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| pH                      | 6.27 ± 0.05 | 7.03 ± 0.23  | 7.66 ± 0.15  | 7.55 ± 0.14  |
| Pco <sub>2</sub> , mmHg | 33.96 ± 3.3 | 67.04 ± 9.3* | 107.7 ± 9.1* | 131.6 ± 7.5* |

Values are means ± SE. Rats were fed for 15 days. \* $P < 0.05$  vs. control K<sup>+</sup>.

allow  $\text{Na}^+$  (basal conditions) or  $\text{K}^+$  (in HK load) uptake. Passive  $\text{Na}^+$  uptake by HCN channels will explain basal  $J_{\text{K}}$  by  $\text{K}^+$  channels present in the luminal membrane of intercalated cells. In fact, a recent preliminary patch-clamp study identified a  $\text{Na}^+$ -activated high-conductance K channel in intercalated cells in the rat CCD, which notably expresses mRNA encoding Slo2  $\text{K}^+$  channels (35). Remarkably, in microperfused rat CCDs, flow-stimulated  $\text{K}^+$  secretion was IBX insensitive (35), suggesting that  $\text{K}^+$ -secretory pathways other than those mediated by ROMK and the maxi-K channel exist in the rat CCD. In conclusion, NKCC1 and HCN2 channels may allow  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  influx into intercalated cells, thereby providing a means of continuous substrate ( $\text{K}^+$ ) to be secreted into the urinary fluid. We propose that ROMK and Kv1.3 channels mediate net  $\text{K}^+$  secretion in rat CCD under basal and HK dietary conditions, respectively, in rat CCD.

$\text{HCO}_3^-$  secretion in the CCD of both rats and rabbits is mediated by apical  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchange (58). The apical anion exchanger pendrin is involved in  $\text{HCO}_3^-$  secretion in type B intercalated cells (53). However, pendrin is also present in type non-A-non-B intercalated cells (31). The majority of filtered  $\text{HCO}_3^-$  is reabsorbed by the proximal tubule. Consistent with this, high rates of urinary  $\text{HCO}_3^-$  excretion during alkali loading or in response to metabolic alkalosis have largely been attributed to inhibition of  $\text{HCO}_3^-$  reabsorption in the proximal tubule (1). However, the final regulation of urine acidification takes place in the collecting duct, which is a site of both reabsorption and secretion of  $\text{HCO}_3^-$ . Based in our results, alkalinization of the urine during HK load may result from inhibition of either  $\text{HCO}_3^-$  reabsorption in the distal nephron and/or a metabolic alkalosis promoted by suppressed vacuolar H-ATPase activity in CCD. We speculate that in the CCD, in which a lumen negative potential is generated by  $\text{Na}^+$  transport, total  $\text{CO}_2$  flux is altered when the potential is altered: absorption of  $\text{CO}_2$  in the CCD will fall in parallel with a fall in lumen negative transepithelial potential, with increased  $\text{K}^+$  secretion. Therefore, our results suggest that  $\text{K}^+$  secretion during a HK diet produces alkalinization of the urine due to inhibition of the H-V-ATPase pump. However, the possibility that HK regulates acid-base homeostasis at the level of the intercalated cell in the distal nephron remains to be further explored.

In conclusion, our findings contribute importantly to the understanding of kidney  $\text{K}^+$  homeostasis and reveal that Kv1.3 is a novel  $\text{K}^+$ -secretory channel in the rat kidney.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the Facultad de Medicina, PhD program "Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas," Universidad Nacional Autónoma de México.

#### GRANTS

This work was supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) under its research program (PAPIIT IN224406 and IN201110 to L. I. Escobar) at the Universidad Nacional Autónoma de México, Conacyt, Grant 48483 (to N. A. Bobadilla), and the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Grants DK-038470 (to L. M. Satlin) and P30 DK079307 (The Pittsburgh Center for Kidney Research). Rolando Carrisoza-Gaytán and Joyce Trujillo are PhD students supported by fellowships grants from Conacyt.

#### DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

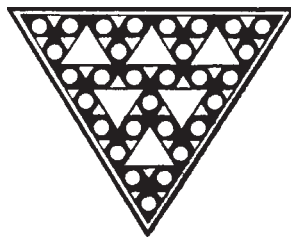
#### REFERENCES

1. **Alpern RJ.** Renal acidification mechanisms. In: *The Kidney*, edited by Brenner BM. Philadelphia, PA: Saunders, 2000, p. 455–519.
2. **Amorim JB, Musa-Aziz R, Mello-Aires M, Malnic G.** Signaling path of the action of AVP on distal  $\text{K}^+$  secretion. *Kidney Int* 66: 696–704, 2004.
3. **Arkett SA, Dixon J, Yang JN, Sakai DD, Minkin C, Sims SM.** Mammalian osteoclasts express a transient potassium channel with properties of Kv1.3 *Receptors Channels* 2: 281–293, 1994.
4. **Bailey MA, Cantone A, Yan Q, MacGregor GG, Leng Q, Amorim JBO, Wang T, Hebert SC, Giebisch G, Malnic G.** Maxi-K channels contribute to urinary potassium excretion in the ROMK-deficient mouse model of type II Bartter's syndrome and in adaptation to a high-K diet. *Kidney Int* 70: 51–59, 2006.
5. **Beck FX, Dorge A, Blummer E, Giebisch G, Thureau K.** Cell rubidium uptake: a method for studying functional heterogeneity in the nephron. *Kidney Int* 33: 642–651, 1988.
6. **Carrisoza R, Salvador C, Bobadilla NA, Trujillo J, Escobar LI.** Expression and immunolocalization of ERG1 potassium channels in the rat kidney. *Histochem Cell Biol* 133: 189–199, 2010.
7. **Chandy KG, Wulff H, Beeton C, Pennington M, Gutman GA, Cahalan MD.**  $\text{K}^+$  channels as targets for specific immunomodulation. *Trends Pharmacol Sci* 25: 280–289, 2004.
8. **Chung I, Schlichter LC.** Native Kv1.3 channels are upregulated by protein kinase C. *J Membr Biol* 156: 73–85, 1997.
9. **Deutsch C, Chen LQ.** Heterologous expression of specific  $\text{K}^+$  channels in T lymphocytes: functional consequences for volume regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10036–10040, 1993.
10. **Engbretson BG, Stoner LC.** Flow-dependent potassium secretion by rabbit cortical collecting tubule in vitro. *Am J Physiol Renal Physiol* 253: F896–F903, 1987.
11. **Escobar LI, Martínez-Téllez JC, Salas M, Castilla SA, Carrisoza R, Tapia D, Vázquez M, Vargas J, Bolívar JJ.** A voltage-gated  $\text{K}^+$  current in renal inner medullary collecting duct cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C965–C974, 2004.
12. **Estilo G, Liu W, Pastor-Soler N, Mitchell P, Carattino MD, Kleyman TR, Satlin LM.** Effect of aldosterone on BK channel expression in mammalian cortical collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 295: F780–F788, 2008.
13. **Fadool DA, Levitan IB.** Modulation of olfactory bulb neuron potassium current by tyrosine phosphorylation. *J Neurosci* 18: 6126–6137, 1998.
14. **Fadool DA, Tucker K, Phillips JJ, Simmen JA.** Brain insulin receptor causes activity-dependent current suppression in the olfactory bulb through multiple phosphorylation of Kv1.3. *J Neurophysiol* 83: 2332–2348, 2000.
15. **Frindt G, Palmer LG.** Ca-activated K channels in apical membrane of mammalian CCT, and their role in K secretion. *Am J Physiol Renal Physiol* 252: F458–F467, 1987.
16. **Frindt G, Zhou H, Sackin H, Palmer LG.** Dissociation of K channel density and ROMK mRNA in rat cortical collecting tubule during K adaptation. *Am J Physiol Renal Physiol* 274: F525–F531, 1998.
17. **Gamper N, Fillon S, Feng Y, Friedrich B, Lang PA, Henke G, Huber SM, Kobayashi T, Cohen P, Lang F.**  $\text{K}^+$  channel activation by all three isoforms of serum- and glucocorticoid-dependent protein kinase SGK. *Pflügers Arch* 445: 60–66, 2002.
18. **García-Calvo M, Leonard RJ, Novick J, Stevens SP, Schmalhofer W, Kaczowski GJ, García ML.** Purification, characterization, and biosynthesis of margatoxin, a component of *Centruroides margaritatus* venom that selectively inhibits voltage-dependent potassium channels. *J Biol Chem* 268: 18866–18874, 1993.
19. **Giebisch G.** Renal potassium transport: mechanisms and regulation. *Am J Physiol Renal Physiol* 274: F817–F833, 1998.
20. **Ginns SM, Knepper MA, Ecelbarger CA, Terris J, He X, Coleman RA, Wade JB.** Immunolocalization of the secretory isoform of Na-K-Cl cotransporter in rat renal intercalated cells. *J Am Soc Nephrol* 7: 2533–2542, 1996.
21. **Grantham JJ, Burg MB, Orloff J.** The nature of transtubular Na and K transport in isolated rabbit renal collecting tubules. *J Clin Invest* 49: 1815–1826, 1970.
22. **Grimm PR, Foutz RM, Brenner R, Sansom SC.** Identification and localization of BK- $\beta$  subunits in the distal nephron of the mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 293: F350–F359, 2007.

23. Grimm PR, Irsik DL, Liu L, Holtzclaw JD, Sansom SC. Role of BK $\beta$ 1 in Na<sup>+</sup> reabsorption by cortical collecting ducts of Na<sup>+</sup>-deprived mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 297: F420–F428, 2009.
24. Grunnet M, Rasmussen HB, Hay-Schmidt A, Rosenstjerne M, Klaerke DA, Olesen SP, Jespersen T. KCNE4 is an inhibitory subunit to Kv1.1 and Kv13 potassium channels. *Biophys J* 85: 1525–1537, 2003.
25. Hamm LL, Alpern RJ, Preisig PA. Cellular mechanisms of renal tubular acidification. In: *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*, edited by Alpern RJ and Hebert SC. Amsterdam: Elsevier, 2008, p. 1539–1585.
26. Hebert SC, Desir G, Giebisch G, Wang W. Molecular diversity and regulation of renal potassium channels. *Physiol Rev* 85: 319–371, 2005.
27. Henke G, Maier G, Wallisch S, Boehmer C, Lang F. Regulation of the voltage gated K<sup>+</sup> channel Kv1.3 by the ubiquitin ligase Nedd4–2 and the serum and glucocorticoid inducible kinase SGK1. *J Cell Physiol* 199: 194–199, 2004.
28. Huang DY, Wulff P, Völkl H, Loffing J, Richter K, Kuhl D, Lang F, Vallon V. Impaired regulation of renal K<sup>+</sup> elimination in the sgk1-knockout mouse. *J Am Soc Nephrol* 15: 885–891, 2004.
29. Jacob A, Hurley IR, Goodwin LO, Cooper GW, Benoff S. Molecular characterization of a voltage-gated potassium channel expressed in rat testis. *Mol Hum Reprod* 6: 303–313, 2000.
30. Kaissling B. Structural aspects of adaptive changes in renal electrolyte excretion. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 243: F211–F226, 1982.
31. Kim YH, Kwon TH, Frische S, Kim J, Tisher CC, Madsen KM, Nielsen S. Immunocytochemical localization of pendrin in intercalated cell subtypes in rat and mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 283: F744–F754, 2002.
32. Koschak A, Bugianesi RM, Mitterdorfer J, Kaczorowski GJ, Garcia ML, Knaus HG. Subunit composition of brain voltage-gated potassium channels determined by hongotoxin-1, a novel peptide derived from *Centruroides limbatus* venom. *J Biol Chem* 273: 2639–2644, 1998.
33. Li D, Wang Z, Sun P, Jin Y, Lin DH, Hebert SC, Giebisch G, Wang WH. Inhibition of MAPK stimulates the Ca<sup>2+</sup>-dependent big-conductance K channels in cortical collecting duct. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 19569–19574, 2006.
34. Linas SL, Peterson LN, Anderson RJ, Aisenbrey GA, Simon FR, Berl T. Mechanism of renal potassium conservation in the rat. *Kidney Int* 15: 601–611, 1979.
35. Liu W, Zavilowitz B, Wanderling S, Levy DI, Satlin LM, Wei Y. A novel and functional Na<sup>+</sup>-activated K channel is present in distal nephron of rat kidney (Abstract). *J Am Soc Nephrol* 20: 127A, 2009.
36. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-delta delta C(T)</sup> method. *Methods* 25: 402–408, 2001.
37. Lorenz JN, Baird NR, Judd LM, Noonan WT, Andringa A, Doetschman T, Manning PA, Liu LH, Miller ML, Shull GE. Impaired renal NaCl absorption in mice lacking the ROMK potassium channel, a model for type II Bartter's syndrome. *J Biol Chem* 277: 37871–37880, 2002.
38. Lu M, Wang T, Yan Q, Dong K, Knepper MA, Wang W, Giebisch G, Schull GE, Hebert SC. Absence of small conductance K<sup>+</sup> channel (SK) activity in apical membranes of thick ascending limb and cortical collecting duct in ROMK (Bartter's) knockout mice. *J Biol Chem* 277: 37881–37887, 2002.
39. Malnic G, Muto S, Giebisch G. Regulation of potassium secretion. In: *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*, edited by Alpern RJ and Hebert SC. Amsterdam: Elsevier, 2008, p. 1301–1347.
40. Meyer JW, Flagella M, Sutliff RL, Lorenz JN, Nieman ML, Weber CS, Paul RJ, Shull GE. Decreased blood pressure and vascular smooth muscle tone in mice lacking basolateral Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporter. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H1846–H1855, 2002.
41. Muto S. Potassium transport in the mammalian collecting duct. *Physiol Rev* 81: 85–114, 2001.
42. Najjar F, Zhou H, Morimoto T, Bruns JB, Li HS, Liu W, Kleymann TR, Satlin LM. Dietary K<sup>+</sup> regulates apical membrane expression of maxi-K channels in rabbit cortical collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F922–F932, 2005.
43. Nowik M, Lecca MR, Velic A, Rehrauer H, Brändli AW, Wagner CA. Genome-wide gene expression profiling reveals renal genes regulated during metabolic acidosis. *Physiol Genomics* 32: 322–334, 2008.
44. Pácha J, Frindt G, Sackin H, Palmer LG. Apical maxi K channels in intercalated cells of CCT. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 261: F696–F705, 1991.
45. Palmer LG, Antonian L, Frindt G. Regulation of apical K and Na channels and Na/K pumps in rat cortical collecting tubule by dietary K. *J Gen Physiol* 104: 693–710, 1994.
46. Palmer LG, Choe H, Frindt G. Is the secretory K channel in the rat CCT ROMK? *Am J Physiol Renal Physiol* 273: F404–F410, 1997.
47. Palmer LG, Frindt G. Regulation of apical K channels in rat cortical collecting tubule during changes in dietary K intake. *Am J Physiol Renal Physiol* 277: F805–F812, 1999.
48. Palmer LG, Frindt G. Aldosterone and potassium secretion by the cortical collecting duct. *Kidney Int* 57: 1324–1328, 2000.
49. Palmer LG, Frindt G. High-conductance K channels in intercalated cells of the rat distal nephron. *Am J Physiol Renal Physiol* 292: F966–F973, 2007.
50. Panyi G, Varga Z, Gáspár R. Ion channels and lymphocyte activation. *Immunol Lett* 92: 55–66, 2004.
51. Pluznick JL, Wei P, Grimm PR, Sansom SC. BK- $\beta$ 1 subunit: immunolocalization in the mammalian connecting tubule and its role in the kaliuretic response to volume expansion. *Am J Physiol Renal Physiol* 288: F846–F854, 2005.
52. Rivera JF, Chu PJ, Arnold DB. The T1 domain of Kv1.3 mediates intracellular targeting to axons. *Eur J Neurosci* 22: 1853–1862, 2005.
53. Royaux IE, Wall SM, Karniski LP, Everett LA, Suzuki K, Knepper MA, Green ED. Pendrin, encoded by the Pendred syndrome gene, resides in the apical region of renal intercalated cells and mediates bicarbonate secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 4221–4226, 2001.
54. Sabolic I, Herak-Kramberger CM, Breton S, Brown D. Na/K-ATPase in intercalated cells along the rat nephron revealed by antigen retrieval. *J Am Soc Nephrol* 10: 913–922, 1999.
55. Sampaio MS, Bezerra IP, Peçanha FL, Fonseca PH, Capella MA, Lopes AG. Lack of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase expression in intercalated cells may be compensated by Na<sup>+</sup>-ATPase: a study on MDCK-C11 cells. *Cell Mol Life Sci* 65: 3093–3099, 2008.
56. Satlin LM. Postnatal maturation of potassium transport in rabbit cortical collecting duct. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 266: F57–F65, 1994.
57. Satlin LM, Palmer LG. Apical Na<sup>+</sup> conductance in maturing rabbit principal cell. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 270: F391–F397, 1996.
58. Schuster VL. Function and regulation of collecting duct intercalated cells. *Annu Rev Physiol* 55: 267–288, 1993.
59. Simon DB, Karet FE, Rodriguez-Soriano J, Hamdan JH, DiPietro A, Trachtman H, Sanjad SA, Lifton RP. Genetic heterogeneity of Bartter's syndrome revealed by mutations in the K<sup>+</sup> channel, ROMK. *Nat Genet* 14: 152–156, 1996.
60. Solé L, Roura-Ferrer M, Pérez-Verdaguer M, Oliveras A, Calvo M, Fernández-Fernández JM, Felipe A. KCNE4 suppresses Kv1.3 currents by modulating trafficking, surface expression and channel gating. *J Cell Sci* 122: 3738–3748, 2009.
61. Stanton BA, Giebisch G. Potassium transport by the renal distal tubule: effects of potassium loading. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 243: F487–F493, 1982.
62. Stokes JB. Ion transport by the collecting duct. *Semin Nephrol* 13: 202–212, 1993.
63. Stühmer W, Ruppertsberg JP, Schröter KH, Sakmann B, Stocker M, Giese KP, Perschke A, Baumann A, Pongs O. Molecular basis of functional diversity of voltage-gated potassium channels in mammalian brain. *EMBO J* 8: 3235–3244, 1989.
64. Szabó I, Bock J, Grassmé H, Soddemann M, Wilker B, Lang F, Zoratti M, Gulbins E. Mitochondrial potassium channel Kv1.3 mediates Bax-induced apoptosis in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 14861–14866, 2008.
65. Tabei K, Muto S, Furuya H, Sakairi Y, Ando Y, Asano Y. Potassium secretion is inhibited by metabolic acidosis in rabbit cortical collecting ducts in vitro. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 268: F490–F495, 1995.
66. Taniguchi J, Tsuruoka S, Mizuno A, Sato J, Fujimura A, Suzuki M. TRPV4 as a flow sensor in flow-dependent K<sup>+</sup> secretion from the cortical collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 292: F667–F673, 2007.
67. Vicente R, Villalonga N, Calvo M, Escalada A, Solsona C, Soler C, Tamkun MM, Felipe A. Kv1.5 association modifies Kv1.3 traffic and membrane localization. *J Biol Chem* 283: 8756–8764, 2008.



68. **Wall SM, Fischer MP, Mehta P, Hassell KA, Park SJ.** Contribution of the  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  cotransporter NKCC1 to  $\text{Cl}^-$  secretion in rat OMCD. *Am J Physiol Renal Physiol* 280: F913–F921, 2001.
69. **Wall SM, Fischer MP.** Contribution of the  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  cotransporter (NKCC1) to transepithelial transport of  $\text{H}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ , and  $\text{Na}^+$  in rat outer medullary collecting duct. *J Am Soc Nephrol* 13: 827–835, 2002.
70. **Wall SM, Knepper MA, Hassell KA, Fischer MP, Shodeinde A, Shin W, Pham TD, Meyer JW, Lorenz JN, Beierwaltes WH, Dietz JR, Shull GE, Kim YH.** Hypotension in NKCC1 null mice: role of the kidneys. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F409–F416, 2006.
71. **Wang WH, Schwab A, Giebisch G.** Regulation of small-conductance  $\text{K}^+$  channel in apical membrane of rat cortical collecting tubule. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 259: F494–F502, 1990.
72. **Wang W, Lerea KM, Chan M, Giebisch G.** Protein tyrosine kinase regulates the number of renal secretory K channels. *Am J Physiol Renal Physiol* 278: F165–F171, 2000.
73. **Wang W.** Regulation of renal K transport by dietary K intake. *Annu Rev Physiol* 66: 547–569, 2004.
74. **Wang WH.** Regulation of ROMK (Kir1.1) channels: new mechanisms and aspects. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F14–F19, 2006.
75. **Wang W, Hebert SC.** The molecular biology of renal potassium channels in: *Seldin and Giebisch's the Kidney: Physiology and Pathophysiology* (4th ed.), edited by Alpern RJ and Hebert SC. Amsterdam: Elsevier, 2008, p. 1249–1267.
76. **Wang W, Giebisch G.** Regulation of potassium (K) handling in the renal collecting duct. *Pflügers Arch* 458: 157–168, 2009.
77. **Wärntges S, Friedrich B, Henke G, Duranton C, Lang PA, Waldegger S, Meyermann R, Kuhl D, Speckmann EJ, Obermüller N, Witzgall R, Mack AF, Wagner HJ, Wagner A, Bröer S, Lang F.** Cerebral localization and regulation of the cell volume-sensitive serum- and glucocorticoid-dependent kinase SGK1. *Pflügers Arch* 443: 617–624, 2002.
78. **Wei Y, Bloom P, Lin D, Gu R, Wang WH.** Effect of dietary K intake on apical small-conductance K channel in CCD: role of protein kinase. *Am J Physiol Renal Physiol* 281: F206–F212, 2001.
79. **Woda CB, Bragin A, Kleyman TR, Satlin LM.** Flow-dependent K secretion in the cortical collecting duct is mediated by a maxi-K channel. *Am J Physiol Renal Physiol* 280: F786–F793, 2001.
80. **Woda CB, Miyawaki N, Ramalakshmi S, Ramkumar M, Rojas R, Zamilowitz B, Kleyman TR, Satlin LM.** Ontogeny of flow-stimulated potassium secretion in rabbit cortical collecting duct: functional and molecular aspects. *Am J Physiol Renal Physiol* 285: F629–F639, 2003.
81. **Wright FS, Strieder N, Fowler NB, Giebisch G.** Potassium secretion by distal tubule after potassium adaptation. *Am J Physiol* 221: 437–448, 1971.
82. **Xu J, Koni PA, Wang P, Li G, Kaczmarek L, Wu Y, Li Y, Flavell RA, Desir GV.** The voltage-gated potassium channel Kv1.3 regulates energy homeostasis and body weight. *Hum Mol Genet* 12: 551–559, 2003.
83. **Xu J, Wang P, Li Y, Li G, Kaczmarek LK, Wu Y, Koni PA, Flavell RA, Desir GV.** The voltage-gated potassium channel Kv1.3 regulates peripheral insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 3112–3117, 2004.
84. **Yao X, Chang AY, Boulpaep EL, Segal AS, Desir GV.** Molecular cloning of a glibenclamide-sensitive, voltage-gated potassium channel expressed in rabbit kidney. *J Clin Invest* 97: 2525–2533, 1996.
85. **Yoo D, Kim BY, Campo C, Nance L, King A, Maouyo D, Welling PA.** Cell surface expression of the ROMK (Kir 1.1) channel is regulated by the aldosterone-induced kinase, SGK-1 and protein kinase A. *J Biol Chem* 278: 23066–23075, 2003.



# The hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated HCN2 channel transports ammonium in the distal nephron

Rolando Carrisoza-Gaytán<sup>1</sup>, Claudia Rangel<sup>1</sup>, Carolina Salvador<sup>1</sup>, Ricardo Saldaña-Meyer<sup>1</sup>, Christian Escalona<sup>1</sup>, Lisa M. Satlin<sup>2</sup>, Wen Liu<sup>2</sup>, Beth Zavilowitz<sup>2</sup>, Joyce Trujillo<sup>3</sup>, Norma A. Bobadilla<sup>3</sup> and Laura I. Escobar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, México; <sup>2</sup>Department of Pediatrics, Mount Sinai School of Medicine, New York, New York, USA and <sup>3</sup>Unidad de Fisiología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, México DF, México

Recent studies have identified Rhesus proteins as important molecules for ammonia transport in acid-secreting intercalated cells in the distal nephron. Here, we provide evidence for an additional molecule that can mediate NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub> excretion, the subtype 2 of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel family (HCN2), in collecting ducts in rat renal cortex and medulla. Chronic metabolic acidosis in rats did not alter HCN2 protein expression but downregulated the relative abundance of HCN2 mRNA. Its cDNA was identical to the homolog from the brain and the protein was post-translationally modified by N-type glycosylation. Electrophysiological recordings in *Xenopus* oocytes injected with HCN2 cRNA found that potassium was transported better than ammonium, each of which was transported significantly better than sodium, criteria that are compatible with a role for HCN2 in ammonium transport. In microperfused rat outer medullary collecting duct segments, the initial rate of acidification, upon exposure to a basolateral ammonium chloride pulse, was higher in intercalated than in principal cells. A specific inhibitor of HCN2 (ZD7288) decreased acidification only in intercalated cells from control rats. In rats with chronic metabolic acidosis, the rate of acidification doubled in both intercalated and principal cells; however, ZD7288 had no significant inhibitory effect. Thus, HCN2 is a basolateral ammonium transport pathway of intercalated cells and may contribute to the renal regulation of body pH under basal conditions.

*Kidney International* (2011) **80**, 832–840; doi:10.1038/ki.2011.230; published online 27 July 2011

KEYWORDS: acid-base homeostasis; ammonium; collecting duct; hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel; intercalated cell

**Correspondence:** Laura I. Escobar, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, México 04510. E-mail: laurae@servidor.unam.mx

Received 2 August 2010; revised 27 April 2011; accepted 24 May 2011; published online 27 July 2011

The family of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cationic non-selective (HCN) channels has been widely characterized in excitable tissues, where it regulates pacemaker activity.<sup>1–4</sup> Transcripts of HCN isoforms have been found in non-excitabile tissues including the liver<sup>3,4</sup> and kidney,<sup>5,6</sup> whereas protein expression of the four HCN isoforms (HCN1–HCN4) has been detected in ovary<sup>7</sup> and pancreatic cells,<sup>8,9</sup> and only HCN2 has been detected in the renal inner medulla.<sup>5</sup> Although it has been accepted that the HCN3 channel has a fundamental role in coordinating peristalsis of the upper urinary tract,<sup>10</sup> the physiological role of HCN channels in non-excitabile cells is still uncertain.

Maintenance of salt, water, and acid–base homeostasis is accomplished in the kidney. The proximal tubule reabsorbs 80% of the bicarbonate (HCO<sub>3</sub><sup>−</sup>) and 60% of the Na<sup>+</sup> filtered at the glomerulus. Most of the transcellular NaHCO<sub>3</sub> reabsorption in the proximal tubule is mediated by the apical Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE3, which at the same time contributes to most of the NaCl reabsorption.<sup>11</sup> The regulation of plasma HCO<sub>3</sub><sup>−</sup> concentration and systemic arterial pH depends critically on the ability of the kidney to produce and secrete ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>).<sup>12</sup> The proximal tubule is the principal site of renal NH<sub>4</sub><sup>+</sup> production,<sup>13</sup> as well as an important site of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> secretion.<sup>14</sup> Approximately 25% of the filtered Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>−</sup>, and HCO<sub>3</sub><sup>−</sup> (ref. 15) and 40–80% of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (ref. 16) delivered out of the proximal tubule are reabsorbed in the thick ascending limb of the loop of Henle and concentrated in the interstitium. Finally, the distal nephron reabsorbs about 5% of the filtered NaHCO<sub>3</sub><sup>−</sup> and also excretes NH<sub>4</sub><sup>+</sup> into the urine to maintain the total body acid–base homeostasis. Within the distal nephron, Na<sup>+</sup> absorption is mediated by principal cells, whereas the acid-secreting intercalated cells regulate acid–base homeostasis by contributing to NH<sub>4</sub><sup>+</sup> excretion.<sup>17,18</sup> The acid-secreting intercalated cells secrete H<sup>+</sup> via the luminal vacuolar-type H-ATPase<sup>19</sup> and the H-K-ATPase.<sup>20</sup>

The Rhesus glycoproteins Rhbg and Rhcg were the first ammonia (NH<sub>3</sub>) transporters reported in mammals.<sup>21</sup>

However, Rh glycoproteins operate as gas channels and thus transport  $\text{NH}_3$  but not  $\text{NH}_4^+$ .<sup>22,23</sup> Rhbg and Rhcg are found in principal cells and in acid-secreting intercalated cells in distal segments of the nephron.<sup>24</sup> Mice with Rhbg deletion display normal acid–base parameters and basal  $\text{NH}_3$  excretion.<sup>25</sup> In contrast, in mice with genetic ablation of Rhcg, urinary  $\text{NH}_4^+$  excretion is reduced by 40%.<sup>26</sup> Furthermore, chronic metabolic acidosis (CMA) upregulates Rhcg expression in intercalated cells in the medulla but not in the cortex.<sup>27</sup>

In this work, we identified an immunodetectable HCN2 channel in the rat renal cortex and medulla. To unravel the physiological role of HCN2, we applied different experimental strategies. We examined the effect of CMA on channel expression, isolated complementary DNA and conducted functional studies of HCN2 heterologously expressed in *Xenopus* oocytes, and examined basolateral  $\text{NH}_4^+$  uptake (using a fluorescent pH indicator dye) in individually identified cells, in microperfused outer medullary collecting ducts (OMCDs) isolated from control and acidotic animals, in the absence and presence of a specific HCN channel blocker.

## RESULTS

### HCN2 in the rat kidney

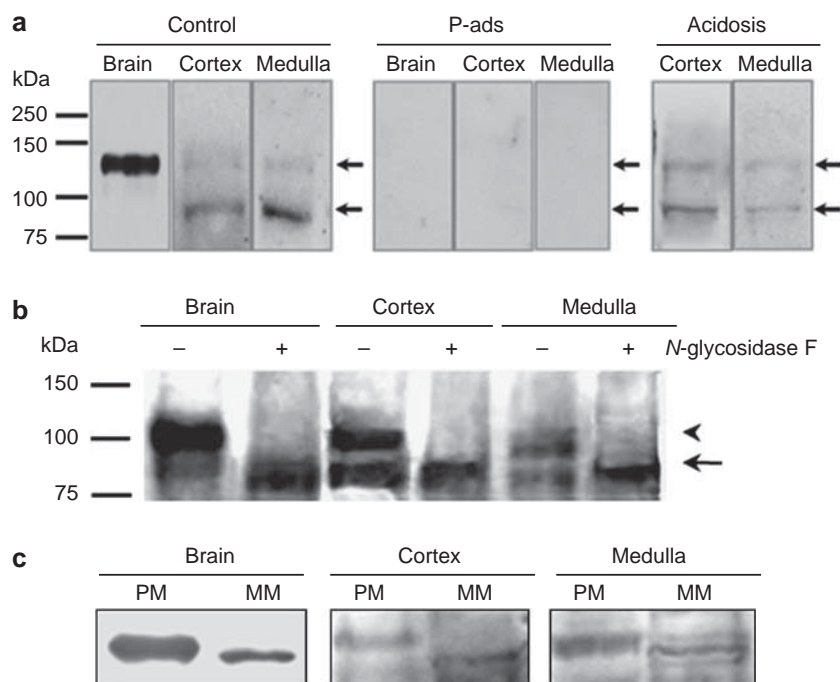
HCN2 was detected by immunoblotting in the rat renal cortex and medulla. Antibodies against HCN2 produced immunoreactive bands corresponding to immature (90 kDa)

and *N*-glycosylated (120 kDa) proteins (Figure 1a) as expected, based on previous studies conducted on the brain.<sup>6,28–30</sup> We performed a glycosidase assay to confirm that HCN2 is also glycosylated in the kidney (Figure 1b). HCN2 expression was higher in plasma compared with microsomal membranes isolated from both the cortex and medulla (Figure 1c).

Immunofluorescence analysis also confirmed the presence of HCN2 in the cortex and medulla of rat kidney (Figure 2). To determine the segment and cell type to which the anti-HCN2 antibody bound, double-immunofluorescence assays were performed. Aquaporin 1 antibody was used as a specific marker for proximal tubules. Expression of aquaporin 2 was observed in connecting tubule, cortical collecting duct, OMCD, and inner medullary collecting duct cells (Figure 3, red).<sup>31</sup> HCN2-positive immunoreactivity was detected in connecting tubule and along the collecting ducts. Therefore, we proceeded to stain with antibodies against the H-ATPase B1-subunit, a specific marker of acid-secreting intercalated cells.<sup>17</sup> We found that HCN2 localized to the basolateral membranes of both acid-secreting intercalated and principal cells in the cortex and medulla (Figure 4).

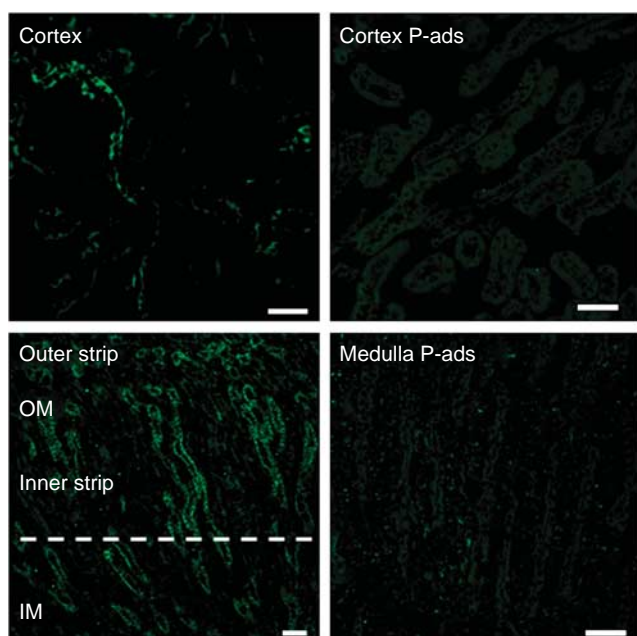
### Renal HCN2 complementary DNA

Kidney HCN2 was compared with its homolog the *HCN2* gene in the brain. A conventional PCR strategy was followed to obtain and amplify kidney HCN2. We partially sequenced the  $\text{NH}_2$  terminus from glutamate E165 to the proximal S6



**Figure 1 | Subtype 2 of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cationic non-selective (HCN2) protein expression.**

(a) Immunoblotting detection of HCN2 protein in plasma membrane fractions from whole-rat brain, renal cortex, and medulla from control rats (left) and from rats subjected to 5 days of dietary acid loading (right). No immunoreactivity was detected after adsorption of HCN2 antibodies with their corresponding antigens (P-ads). (b) HCN2 antibody identified ~120 kDa (glycosylated) and ~90 kDa (unglycosylated) bands (arrowhead and arrow, respectively) in control samples. Only the 90 kDa band was detected when samples (100 µg) were incubated with glycosidase (5 U). (c) HCN2 immunoblotting was performed with 100 µg of plasma membranes (PMs) and microsomes (MMs). P-ads, peptide adsorption.



**Figure 2 | Immunofluorescence detection of subtype 2 of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cationic non-selective (HCN2) channels.** Sagittal sections display positive immunoreactivity for HCN2 in the cortex and in the outer (OM) and inner medulla (IM). Suppression of immunoreactivity is shown when antibodies are preincubated with an excess of control peptide (P-ads) 1 h before the overnight incubation. Bar = 50  $\mu\text{m}$ .

segment, corresponding to 50% of the CNBD-binding domain, up to phenylalanine F580. This amplified kidney HCN2 complementary DNA encodes a protein of 415 amino acids with a 100% identity to brain HCN2 (not shown).

#### Effect of metabolic acidosis on HCN2 expression

Consumption of an acid load leads to an adaptive increase in renal acid excretion that demands activation and/or regulation of various acid–base transport pathways. These include increased ammoniogenesis, excretion of titratable acids, generation of  $\text{HCO}_3^-$ , and  $\text{H}^+$  secretion. Adaptation is also associated with changes in electrolyte and water handling and with extensive remodeling of the nephron.<sup>14–17</sup> In this context, we examined the effect of chronic  $\text{NH}_4\text{Cl}$  intake (that is, acid loading) on the expression of HCN2. As shown in Table 1, CMA led to an increase in blood urea nitrogen and serum chloride concentration and in a significant fall in serum  $\text{HCO}_3^-$  concentration as expected.<sup>32</sup> CMA was also associated with a significant reduction ( $\sim 60\%$ ,  $P < 0.0006$ ) in the relative mRNA abundance of HCN2 in the cortex; in contrast, no changes were detected in the medulla (Figure 5b). However, CMA did not elicit changes in HCN2 protein expression in total membranes from the cortex (Supplementary Figure S1 online), neither in microsomes nor in plasma membranes from the cortex and medulla (Figure 5c). Immunolabeling studies of kidneys harvested from animals subjected to CMA did not show changes in the cellular distribution of HCN2 in collecting ducts but revealed

diffuse labeling along the thin descending limbs in the medulla (Supplementary Figure S2 online).

#### HCN2 channels transport $\text{NH}_4^+$ ions

Acid-secreting intercalated cells participate in the renal regulation of acid–base homeostasis and constitute the exclusive site where transepithelial transport allows for  $\text{NH}_4^+$  excretion into the urine.<sup>17</sup> As HCN2 was localized to the basolateral membrane (Figure 4), suggesting a role in transepithelial transport, we sought to conduct functional studies of HCN2 expressed in *Xenopus laevis* oocytes. We measured the ionic currents of the heterologously expressed channel and found that HCN2 transported  $\text{K}^+ > \text{NH}_4^+ \gg \text{Na}^+$  (Figure 6a). The following relative current ionic ratios were estimated:  $\text{K}/\text{NH}_4 = 1.95 \pm 0.096$ ,  $\text{K}/\text{Na} = 7.28 \pm 0.54$ , and  $\text{NH}_4/\text{Na} = 3.75 \pm 0.37$  (Figure 6b). The amplitude of  $\text{NH}_4^+$  currents increased with  $\text{NH}_4\text{Cl}$  concentration, and their inhibition by ZD7298, a specific HCN channel blocker,<sup>33</sup> depended on the external  $[\text{NH}_4^+]$  (Supplementary Figure S3 online). Also,  $\text{Ba}^{2+}$  inhibited  $\text{NH}_4^+$  currents (Supplementary Figure S4 online), a result similar to that reported previously for native and cloned hyperpolarization-activated HCN channels.<sup>34</sup>

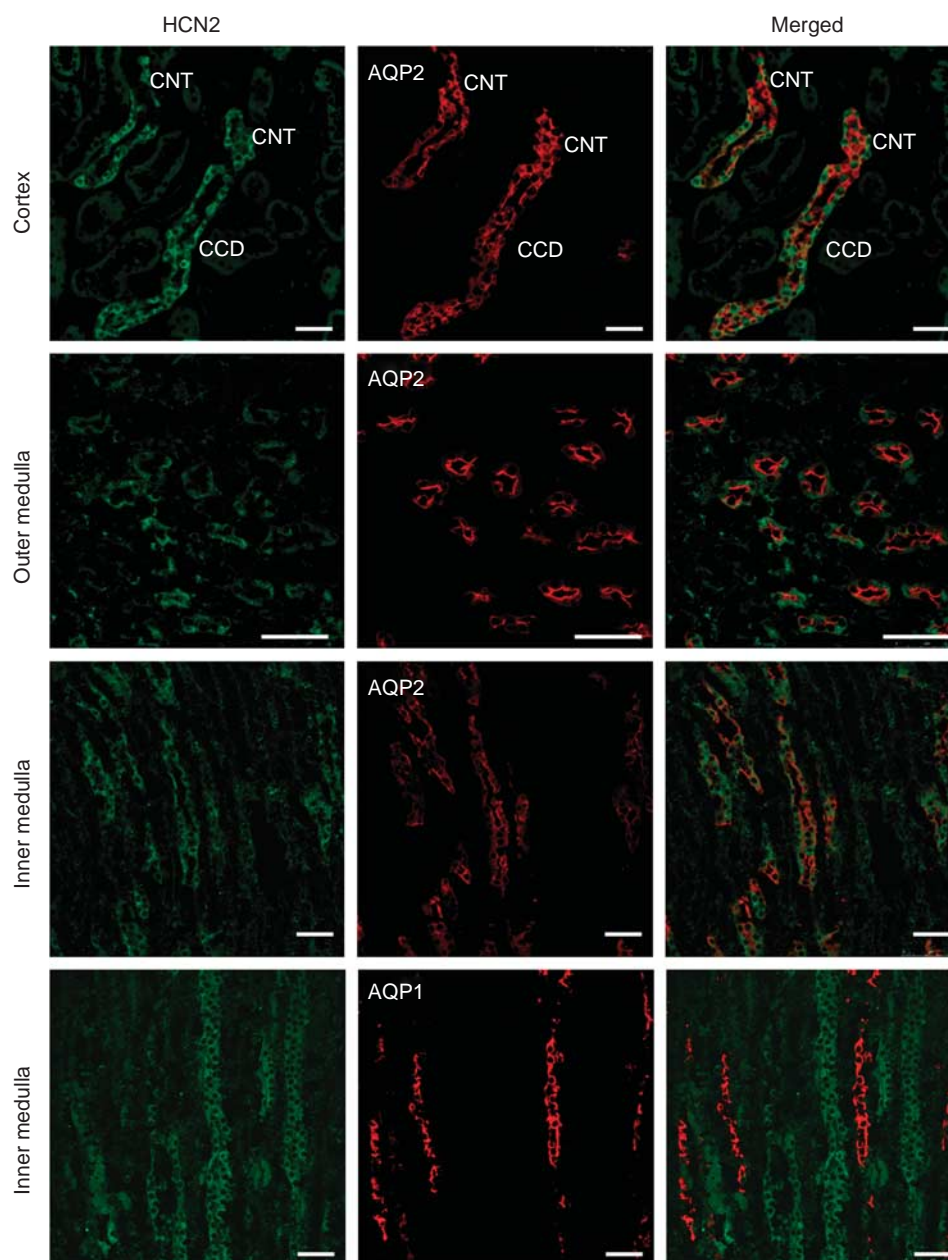
#### $\text{NH}_4^+$ uptake by HCN2 in isolated tubules from OMCD

To test whether HCN2 also conducts  $\text{NH}_4^+$  in the native OMCD, we applied the  $\text{NH}_4\text{Cl}$  pulse technique to microperfused control rat OMCDs loaded with 15  $\mu\text{M}$  of the acetoxymethyl ester of 2'/7'-bis(-2-carboxyethyl)-5-(and 6)-carboxyfluorescein (BCECF) (Invitrogen, Carlsbad, CA) to examine the sensitivity of basolateral  $\text{NH}_4^+$  uptake to ZD7298. The initial slope of acidification (the 490/440 nm fluorescence intensity ratio/1000 s) in acid-secreting intercalated cells in ZD7288-treated OMCDs exposed to bath  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $1.47 \pm 0.49$ ;  $n = 6$ ) was significantly less than that observed in untreated cells ( $2.89 \pm 0.47$ ;  $n = 6$ ;  $P < 0.05$ ; Figure 7). The inhibitor was without effect on the slope of acidification measured in principal cells in the same tubules (Figure 7). OMCDs isolated from acid-loaded rats showed a twofold higher rate of acidification in acid-secreting intercalated cells and in principal cells. However, the rate of acidification was not affected by 10  $\mu\text{M}$  ZD7298 in either cell type in tubules isolated from CMA rats.

#### DISCUSSION

Our data show that HCN2 is localized to cells in the distal nephron of the cortex and medulla. HCN channels are cation selective but only weakly selective for  $\text{K}^+$  over  $\text{Na}^+$ , with variable permeability ratios of about 5:1 (refs 4,35,36). Because  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{K}^+$  have an identical hydrodynamic radius,<sup>37</sup> it is not surprising that  $\text{NH}_4^+$  permeates HCN channels. In fact,  $\text{NH}_4^+$  can produce HCN pacemaker currents in photoreceptors.<sup>38</sup> Despite the HCN channel preference for conducting  $\text{K}^+$ , under physiological conditions, native inward currents will be carried predominantly by  $\text{Na}^+$  because of its greater electrochemical gradient. However, metabolic conditions are expected to influence the





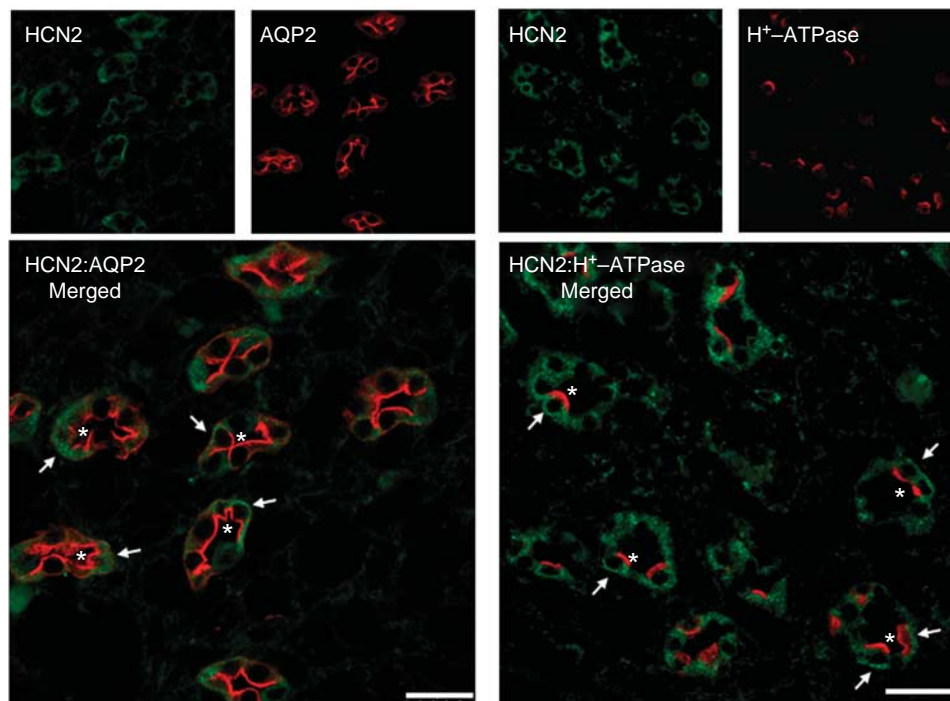
**Figure 3 | Subtype 2 of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cationic non-selective (HCN2) channels is localized to distal nephron segments in the rat cortex and in the outer and inner medulla.** Sections were colabeled with antibodies directed against HCN2 and aquaporin 2 (AQP2) or aquaporin 1 (AQP1), visualized with secondary antibodies conjugated to Alexa 488 (green) and Alexa 594 (red (Invitrogen, Carlsbad, CA)). HCN2 is expressed exclusively in the connecting and collecting ducts (merged). Bar = 50  $\mu$ m. CCD, cortical collecting duct; CNT, connecting tubule.

cation selectivity of HCN2 channels in the distal nephron in order to maintain electrolyte and acid–base homeostasis.

The renal response to metabolic acidosis includes increased expression of various ion transport proteins that contribute to increased synthesis and excretion of  $\text{NH}_4^+$  and the net production and absorption of  $\text{HCO}_3^-$ . This adaptation allows the kidney to enhance ammoniagenesis and gluconeogenesis from plasma glutamine to recover acid–base balance.  $\text{NH}_4^+$  accumulates in the renal medulla during acidosis, provoking counter-current multiplication and energy-dependent recycling between

the ascending (tALH) and descending thin limbs (tDLH)<sup>39</sup> and the thick ascending limb of Henle's loop.<sup>17</sup> Approximately 80% of  $\text{NH}_4^+$  excreted in the urine is translocated across the acid-secreting intercalated cells of the collecting duct.<sup>40</sup>

HCN2 protein expression was not regulated by CMA in plasma membranes from the cortex and medulla, and therefore HCN2 appears to be a constitutive membrane protein in the distal nephron. In contrast, in CMA, protein upregulation of HCN2 in tDLH (Supplementary Figure S2 online) suggests that HCN2 serves as an  $\text{NH}_4^+$  entry pathway that



**Figure 4 | Immunolocalization of subtype 2 of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cationic non-selective (HCN2) channels in principal and acid-secreting cells in the outer medullary collecting duct.** Double-immunofluorescence labeling with antibodies directed against HCN2 (secondary: Alexa 488; green) and aquaporin 2 (AQP2; secondary: Alexa 594; red) or the H-ATPase B1-subunit (secondary: Alexa 594; red). Cells that express both HCN2 and AQP2 or H-ATPase are shown in the bottom panels (merged). AQP2 and H-ATPase are observed in apical membranes (\*), whereas HCN2 is in the basolateral membranes (arrows). Bar = 25  $\mu$ m.

**Table 1 | Blood composition and urine pH from control and acidotic rats**

| Group                  | BW (g)    | pH urine   | Cl <sup>-</sup> (meq/l) | Na <sup>+</sup> (meq/l) | K <sup>+</sup> (meq/l) | CO <sub>2</sub> (meq/l) | BUN (meq/dl) | SCr (mg/dl) |
|------------------------|-----------|------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|--------------|-------------|
| Control, n=7           | 215 ± 0.8 | 6.7 ± 0.07 | 122 ± 4.7               | 149 ± 1.3               | 3.8 ± 0.3              | 19.2 ± 1.6              | 22.9 ± 1.5   | 0.48 ± 0.1  |
| Acidosis (5 days), n=5 | 209 ± 6   | 5.9 ± 0.01 | 136 ± 2                 | 149 ± 1.1               | 2.8 ± 0.3              | 11.2 ± 0.8              | 31.8 ± 3.4   | 0.36 ± 0.04 |
| P-value                | NS        | 0.000003   | 0.03                    | NS                      | NS                     | 0.002                   | 0.02         | 0.02        |

Abbreviations: BUN, blood urea nitrogen; BW, body weight; Cr, creatinine; NS, not significant; SCr, serum Cr.

Serum electrolytes, total CO<sub>2</sub>, Cr, and BUN levels were measured in control rats (water; n=7) or in those subjected to metabolic acidosis (280 mM NH<sub>4</sub>Cl intake for 5 days; n=5). Values are means ± s.e.

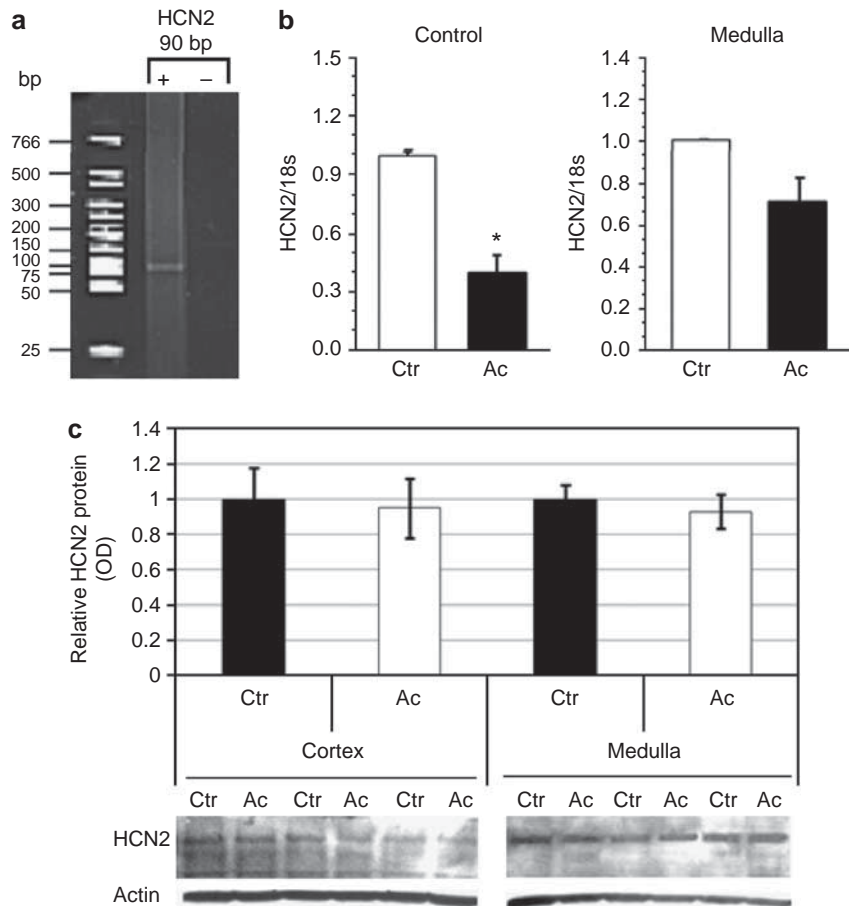
facilitates the passive secretion of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and then the counter-current multiplication of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> in the rat renal medulla.

Control experiments in oocytes show that block by ZD7288 decreases when [NH<sub>4</sub><sup>+</sup>]<sub>o</sub> is elevated (Supplementary Figure S3 online), as suggested by Cheng *et al.*<sup>41</sup> ZD7288-induced block of HCN2 is voltage dependent and modulated by [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub>. This voltage-dependent block seems to be caused by an increased influx of permeant ions (K<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, and Na<sup>+</sup>) that relieves channel block, similar to the [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub>-dependent clearing of tetraethylammonium from the inner pore of delayed rectifier K<sup>+</sup> channels in squid axon.<sup>42</sup>

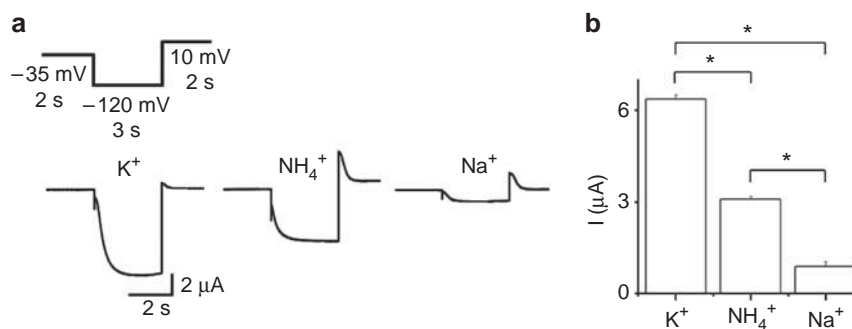
We detected a strong expression of immunodetectable HCN2 channel in both acid-secreting intercalated cells and principal cells. However, the activity of the channel, measured as inhibitor-specific intracellular acidification following exposure to basolateral NH<sub>4</sub>Cl, was detected only in acid-secreting intercalated cells under basal conditions (control,

Figure 7b). Our inability to detect robust HCN2 activity in principal cells does not support the hypothesis that HCN2 participates in pH homeostasis. What can be the function of HCN2 channels in principal cells then? Our findings predict that Na<sup>+</sup> can enter principal cells by HCN2 and favor K<sup>+</sup> secretion by potassium channels. In fact, urinary K<sup>+</sup> secretion in the cortical collecting duct depends on both apical and basolateral Na<sup>+</sup> entry.<sup>43</sup> Na<sup>+</sup> entry via HCN2 channels in principal cells might be an alternative pathway for providing substrate for and stimulating Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity in the absence of luminal Na<sup>+</sup> entry, as has also been proposed for the basolateral Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger.<sup>43</sup> Furthermore, Na<sup>+</sup> might also enter acid-secreting intercalated cells by HCN2 channels and favor K<sup>+</sup> secretion by Kv1.3 channels in animals fed a high K<sup>+</sup> diet, as we described recently.<sup>44</sup> In conclusion, the function of cation-non-selective HCN2 channels in responding to variations in renal metabolism





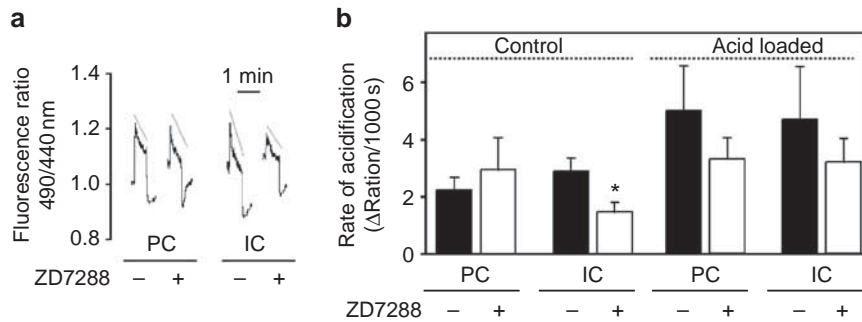
**Figure 5 | Effect of chronic acidosis on subtype 2 of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cationic non-selective (HCN2) expression.** (a) Polyacrylamide gel showing HCN2 amplification from renal cortex total RNA in the presence (+) or absence (–) of reverse transcriptase by using real-time PCR probes after 32 cycles of amplification. The reverse transcription-PCR yielded the expected size product of 90 bp for HCN2. No genomic DNA amplification was observed. (b) The relative mRNA expression of HCN2 in control (white bars) and acid-loaded (black bars) rats is shown in the cortex and medulla ( $n = 5$ ).  $*P < 0.05$  versus the control group. (c) Representative immunoblots of HCN2 in plasma membranes from the renal cortex and medulla of rats adapted to chronic acidosis. No changes in HCN2 expression were observed. Protein (100  $\mu\text{g}$ ) was loaded on each lane. Values are mean  $\pm$  s.e.;  $n = 10$  in each dietary group. Ac, acidosis; Ctr, control; OD, optical density.



**Figure 6 | Subtype 2 of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cationic non-selective (HCN2) channels transport ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ).** (a) Currents were activated from a holding potential of  $-35$  mV for 2 s; voltage was clamped at  $-120$  mV for 3 s, followed by a  $+10$  mV step for 2 s.<sup>41</sup> (b) Results are presented as mean  $\pm$  s.e. Statistical analysis was performed using Student's two-sample paired  $t$ -tests. Differences were considered significant at  $P < 0.01$  (\*);  $n = 4$ .

is likely determined by the repertoire of ion transporters expressed in principal cells and in acid-secreting intercalated cells.

HCN channels are half-maximally activated ( $V_{0.5}$ ) in the voltage range from  $-60$  to  $-100$  mV;<sup>45</sup> however,  $V_{0.5}$  can be displaced toward depolarizing values depending on the cell



**Figure 7 | (Ammonium)  $\text{NH}_4^+$  uptake by subtype 2 of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cationic non-selective (HCN2) channels in microperfused rat outer medullary collecting ducts (OMCDs).** (a) Effect of the HCN2 inhibitor ZD7288 ( $10 \mu\text{M}$ ) on the response of OMCD principal (PC) and acid-secreting intercalated (IC) cells to an  $\text{NH}_4\text{Cl}$  pulse. OMCDs were loaded with  $15 \mu\text{M}$  of the acetoxymethyl ester of 2'7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and 6)-carboxyfluorescein (BCECF) (Supplementary Material online). The fluorescence ratio intensities (FIRs; 490/440 nm) were measured over time in individually identified cells in untreated and inhibitor-treated OMCDs. The mechanisms accounting for the three phases of the response (initial alkalinization, slow acidification, and then rapid acidification) are discussed in Supplementary Material online. The slopes of the slow acidification (measured over the initial 60 s and normalized to 1000 s) were calculated by exponential curve fitting of the fall in FIR from the peak value. (b) Sensitivity of basolateral  $\text{NH}_4^+$  uptake into OMCD intercalated and principal cells to  $10 \mu\text{M}$  ZD7288, an inhibitor of HCN2. In microperfused control rat OMCDs, ZD7288 led to a statistically significant reduction in the slope of acidification (over the first minute; presumably reflecting  $\text{NH}_4^+$  entry across the basolateral membrane;  $*P < 0.05$ ) in acid-secreting intercalated but not principal cells. In OMCDs isolated from rats adapted to chronic acidosis, ZD7288 did not produce a significant effect.

environment. Acid-secreting intercalated cells in the rat connecting tubule and cortical collecting duct are characterized by a low membrane potential ( $-36 \text{ mV}$ ).<sup>46</sup> Therefore, HCN2 channels to be activated must be modulated by extra- and/or intracellular factors. In fact, HCN2 voltage activation is profoundly shifted to more positive potentials by cyclic AMP,<sup>45</sup> endogenous phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate,<sup>47,48</sup> and by activation of P38 mitogen-activated protein kinase.<sup>49</sup> In addition, bicarbonate has also a stimulatory effect on the generation of cyclic AMP by a soluble adenylyl cyclase in acid-secreting intercalated cells.<sup>50</sup> Furthermore, currents carried by HCN2 show strong  $\text{Cl}^-$  dependence.<sup>51</sup>

Our inability to detect a significant effect of ZD7288 on the acidification rate in acid-secreting intercalated cells in OMCDs isolated from acidotic rats was unexpected. Similar to native HCN, HCN2 is modulated by cytosolic pH and is not sensitive to changes in external pH. Intracellular acidification induces a downregulation of the current by shifting the activation curve to the left and also slows down the speed of activation. In contrast, alkalinization enhances the current by shifting the activation curve to more depolarized voltages and, in addition, accelerates opening kinetics.<sup>52</sup> As the resting pHi in acid-secreting intercalated cells (namely,  $\sim 7.2$ ) is unaltered during CMA, presumably because of adaptation of the efficient  $\text{H}^+$  extrusion pathways and intracellular buffering,<sup>53</sup> one cannot attribute the loss of inhibitor sensitivity to a CMA-induced change in pHi. Clearly, further studies will be necessary to unravel the role of HCN2 in CMA.

OMCDs isolated from acid-loaded rats showed a twofold higher rate of acidification in acid-secreting intercalated cells and in principal cells than was detected under control conditions. These results suggest that the increased rate of acidification in microperfused tubules from animals

subjected to CMA may be due to enhanced apical and/or basolateral expression of other  $\text{NH}_3$  transport pathways, including the  $\text{NH}_3$  transporter family member Rhcg in principal cells and in acid-secreting intercalated cells.<sup>54</sup>

Although one may argue that the most precise evidence supporting a physiological role of HCN2 in the renal regulation of acid-base homeostasis would be to study mice with targeted deletion of HCN2 in acid-secreting intercalated cells, adaptation of the animals to the loss of the gene product by upregulation of alternate pathways for  $\text{NH}_4^+$  excretion may impact expression of a phenotype. Therefore, future studies should be directed to generating conditional knockouts of HCN2 in the unique cell populations comprising the collecting duct.

There has been extensive investigation focused on identifying the specific transport proteins in acid-secreting intercalated cells responsible for basolateral  $\text{NH}_4^+$  uptake, a necessary step in urinary acidification. The Na/K/2Cl cotransporter NKCC1 is expressed in the basolateral membrane of acid-secreting intercalated cells in the OMCD and inner medullary collecting duct.<sup>55</sup> However, NKCC1 does not seem to participate in  $\text{NH}_4^+$  transport in acid-secreting intercalated cells.<sup>56</sup>  $\text{NH}_4^+$  uptake by Na-K-ATPase is an important determinant of pHi and net acid secretion but only in the rat terminal inner medullary collecting duct.<sup>57</sup>

Importantly, Rhcg found in principal cells and in acid-secreting intercalated cells appears to account partially for basal  $\text{NH}_3$  excretion and to contribute to increased  $\text{NH}_3$  excretion with CMA.<sup>26,58</sup>

In summary, our findings demonstrate that basolateral HCN2 is a pathway for  $\text{NH}_4^+$  uptake in acid-secreting intercalated cells under basal conditions, suggesting its participation in  $\text{NH}_4^+$  transepithelial transport and, in turn, in urinary  $\text{NH}_4^+$  excretion in the distal nephron of the

mammalian kidney. Future experiments must be performed to elucidate the role of HCN2 in CMA in the distal nephron.

## MATERIALS AND METHODS

### Care and handling of animals

See Supplementary Material online.

### RNA purification and reverse transcription-PCR

Total RNA was isolated as described by Carrisoza-Gaytán.<sup>44</sup> Complementary DNA was synthesized from 5 µg of cortex RNA using the random primer p(dN)6 (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland) and reverse transcribed with MLV reverse transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. A set of primers were designed, derived from the exon sequences of rat HCN2 (NM\_053684). Exons 2–4 were amplified with degenerate primers 5'-TGCTG CAGCCCKGGSGTCAACAARTTCTCCCT-3' (sense) and 5'-CATGTAC TGCTCCACYTGCTTGTACTTCTC-3' (antisense); exons 5 and 6 were amplified with primers 5'-TACAAGCAAGTGGAGCAG-3' (sense) and 5'-CCCCAAAATAGGAGCCAT-3' (antisense). DNA fragments were amplified, purified, and sequenced as reported by Carrisoza-Gaytán.<sup>44</sup>

### Real-time reverse transcription-PCR

Reverse transcription was carried out with 2.5 µg of total RNA using 200 U of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen). The mRNA levels of HCN2 were quantified using the ABI Prism 7300 Sequence Detection System (*TaqMan*, Applied Biosystems, ABI, Foster City, CA). Primers and probes were ordered as Rn01408575\_gH (Assays-on-Demand, ABI). As an endogenous control, we used eukaryotic 18S rRNA (predesigned assay reagent applied by ABI, external run). The relative quantification of gene expression was performed using the comparative Connecticut method.<sup>59</sup>

### Western blot analysis

Membrane sample extraction was performed as previously described.<sup>44,60</sup> Plasma membranes were obtained by centrifugation at 17,000 g for 20 min and microsomes at 150,000 g for 1 h at 4 °C. Immunoblots were performed with a rabbit anti-HCN2 antibody from Alomone (Jerusalem, Israel) (1:200) following procedures previously established.<sup>44,60</sup> Membrane samples (100 µg) were electrophoretically separated in 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and electroblotted to a nylon membrane. Non-fat dry milk (5%) (Bio-Rad, Hercules, CA) in TBS-T (20 mM Tris-HCl, 136 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.6) was added for 1 h. Each blot was first incubated with an anti-HCN2 antibody at 4 °C overnight and then with donkey anti-rabbit IgG coupled to horseradish peroxidase (1:5000; Amersham Biosciences, Freiburg, Germany), the secondary antibody, for 1 h. Immunoblots were detected using ECL plus detection reagents (Amersham Biosciences).

### Glycosidase assay

The procedure is described in Supplementary Material online.

### Immunofluorescence assays

Procedures are described in detail in Supplementary Material online.

### HCN2 expression and electrophysiological assays in *Xenopus laevis* oocytes

Procedures are described in Supplementary Material online.<sup>61</sup>

### NH<sub>4</sub><sup>+</sup> uptake assay in microperfused rat OMCD

The methodology is described in detail in Supplementary Material online.<sup>62–66</sup>

## DISCLOSURE

All the authors declared no competing interests.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Michael Sanguinetti and Steven Siegelbaum for the mouse brain HCN2 cDNA and Maria Jose Gomora for assistance with the confocal microscope (Grant SDI-PTID.05.01) and the PhD program (Ciencias Biomédicas, UNAM). This work was supported by DGAPA Grants IN224406 and IN202110-3 (LIE) at the UNAM; by Conacyt Grant 48483 (NAB); by scholarships from Conacyt (RCG, CR, RSM, and JT); and by National Institutes of Health Grants DK051391 and P30 DK079307 (The Pittsburgh Center for Kidney Research; LMS).

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

**Figure S1.** Effect of chronic metabolic acidosis on subtype 2 of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cationic non-selective (HCN2) channel expression.

**Figure S2.** Immunolocalization of subtype 2 of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cationic non-selective (HCN2) channel in the inner medullary collecting duct and papilla from rats adapted to CMA.

**Figure S3.** HCN2 current traces as a function of NH<sub>4</sub>Cl concentrations and inhibition of the whole-cell hyperpolarization activated current by ZD7288.

**Figure S4.** Block of the whole-cell hyperpolarization activated I<sub>HCN2</sub> current by Ba<sup>2+</sup>.

Supplementary material is linked to the online version of the paper at <http://www.nature.com/ki>

## REFERENCES

- DiFrancesco D. Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu Rev Physiol* 1993; **55**: 455–472.
- Luthi A, McCormick DA. H-current: properties of a neuronal and network pacemaker. *Neuron* 1998; **21**: 9–12.
- Santoro B, Liu DT, Yao H *et al.* Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell* 1998; **93**: 717–729.
- Santoro B, Tibbs GR. The HCN gene family: molecular basis of the hyperpolarization-activated pacemaker channels. *Ann N Y Acad Sci* 1999; **868**: 741–764.
- Bolivar JJ, Tapia D, Arenas G *et al.* A hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated, (I<sub>h</sub>-like) cationic current and HCN genes expression in renal inner medullary collecting duct cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; **294**: C893–C906.
- Uawithya P, Pisitkun T, Ruttenberg BE *et al.* Transcriptional profiling of native inner medullary collecting duct cells from rat kidney. *Physiol Genomics* 2008; **32**: 229–253.
- Yeh J, Kim BS, Gaines L *et al.* The expression of hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated (HCN) channels in the rat ovary are dependent on the type of cell and the reproductive age of the animal: a laboratory investigation. *Reprod Biol Endocrinol* 2008; **6**: 35.
- El-Kholy W, MacDonald PE, Fox JM *et al.* Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels in pancreatic beta-cells. *Mol Endocrinol* 2007; **21**: 753–764.
- Zhang Y, Zhang N, Gyulkhanyan AV *et al.* Presence of functional hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels in clonal alpha cell lines and rat islet alpha cells. *Diabetologia* 2008; **51**: 2290–2298.
- Hurtado R, Bub G, Herzlinger D. The pelvis-kidney junction contains HCN3, a hyperpolarization-activated cation channel that triggers ureter peristalsis. *Kidney Int* 2003; **77**: 500–508.
- Aronson PS, Giebisch G. Mechanism of chloride transport in the proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 1997; **273**: F179–F192.
- Halperin ML, Goldstein MS, Steinbaugh BJ *et al.* Biochemistry and physiology of ammonium excretion. In: Seldin DW, Giebisch G (eds). *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*. Raven Press Company: New York, 1985, pp 1471–1490.
- Good DW, Burg MB. Ammonia production by individual segments of the rat nephron. *J Clin Invest* 1984; **73**: 602–610.
- Good DW, DuBose TD. Ammonia transport by early and late proximal convoluted tubule of the rat. *J Clin Invest* 1987; **79**: 684–691.

15. Good DW. Regulation of bicarbonate and ammonium absorption in the thick ascending limb of the rat. *Kidney Int* 1991; **40**: S36–S42.
16. Attmane-Elakeb A, Amlal H, Bichara M. Ammonium carriers in medullary thick ascending limb. *Am J Physiol* 2001; **280**: F1–F9.
17. Hamm LL, Alpern RJ, Preisig PA. Cellular mechanisms of renal tubular acidification. In: Alpern RJ, Hebert SC (eds). *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*. Elsevier Company: Amsterdam, 2008, pp 1539–1585.
18. Schuster VL. Bicarbonate reabsorption and secretion in the cortical and outer medullary collecting tubule. *Semin Nephrol* 1990; **10**: 139–147.
19. Brown D, Paunescu TG, Breton S et al. Regulation of the V-ATPase in kidney epithelial cells: dual role in acid-base homeostasis and vesicle trafficking. *J Exp Biol* 2009; **212**: 1762–1772.
20. Wingo CS, Smolka AJ. Function and structure of H-K-ATPase in the kidney. *Am J Physiol* 1995; **269**: F1–F16.
21. Marini AM, Matassi G, Raynal V et al. The human Rhesus-associated RhAG protein and a kidney homologue promote ammonium transport in yeast. *Nat Genet* 2000; **26**: 341–344.
22. Khademi S, O'Connell III J, Remis J et al. Mechanism of ammonia transport by Amt/MEP/Rh: structure of AmtB at 1.35 Å. *Science* 2004; **305**: 1587–1594.
23. Zheng L, Kostrewa D, Berneche S et al. The crystal structure of AmtB of *E. coli* suggests a mechanism for ammonia transport. *Proc Natl Acad Sci* 2004; **101**: 17090–17095.
24. Quentin F, Eladari D, Cheval L et al. RhBG and RhCG, the putative ammonia transporters, are expressed in the same cells in the distal nephron. *J Am Soc Nephrol* 2003; **14**: 545–554.
25. Chambrey R, Goossens D, Bourgeois S et al. Genetic ablation of Rhbg in the mouse does not impair renal ammonium excretion. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; **289**: F1281–F1290.
26. Biver S, Belge H, Bourgeois S et al. A role for Rhesus factor Rhcg in renal ammonium excretion and male fertility. *Nature* 2008; **456**: 339–343.
27. Seshadri RM, Klein JD, Kozlowski S et al. Changes in subcellular distribution of the ammonia transporter, Rhcg, in response to chronic metabolic acidosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; **290**: F1443–F1452.
28. Bakondi G, Pór A, Kovács I et al. Hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated, cation non-selective channel subunit expression pattern of guinea-pig spiral ganglion cells. *Neuroscience* 2009; **158**: 1469–1477.
29. Brewster AL, Chen Y, Bender RA et al. Quantitative analysis and subcellular distribution of mRNA and protein expression of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels throughout development in rat hippocampus. *Cereb Cortex* 2007; **17**: 702–712.
30. Mistrík P, Mader R, Michalakis S et al. The murine HCN3 gene encodes a hyperpolarization-activated cation channel with slow kinetics and unique response to cyclic nucleotides. *J Biol Chem* 2005; **280**: 27056–27061.
31. Coleman RA, Wu DC, Liu J et al. Expression of aquaporins in the renal connecting tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; **279**: F874–F883.
32. Farouqi S, Sheriff S, Amlal H. Metabolic acidosis has dual effects on sodium handling by rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; **291**: F322–F331.
33. Zagotta WN, Siegelbaum SA. Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Annu Rev Neurosci* 1996; **19**: 235–263.
34. van Welie I, Wadman WJ, van Hooft JA. Low affinity block of native and cloned hyperpolarization-activated Ih channels by Ba<sup>2+</sup> ions. *Eur J Pharmacol* 2005; **507**: 15–20.
35. Ludwig A, Zong X, Hofmann F et al. Structure and function of cardiac pacemaker channels. *Cell Physiol Biochem* 1999; **9**: 179–186.
36. Biel M, Wahl-Schott C, Michalakis S et al. Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiol Rev* 2009; **89**: 847–885.
37. Atkins PW. Molecules in motion: ion transport and molecular diffusion. In: Atkins PW (ed). *Physical Chemistry*. Oxford University Press: Oxford, 1978, pp 893–897.
38. Wollmuth LP, Hille B. Ionic selectivity of Ih channels of rod photoreceptors in tiger salamanders. *J Gen Physiol* 1992; **100**: 749–765.
39. Flessner MF, Mejia R, Knepper MA. Ammonium and bicarbonate transport in isolated perfused rodent long-loop thin descending limbs. *Am J Physiol* 1993; **264**: F388–F396.
40. Ibrahim H, Lee YJ, Curthoys NP. Renal response to metabolic acidosis: role of mRNA stabilization. *Kidney Int* 2008; **73**: 11–18.
41. Cheng L, Kinard K, Rajamani R et al. Molecular mapping of the binding site for a blocker of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-modulated pacemaker channels. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; **322**: 931–939.
42. Armstrong CM. Interaction of tetraethylammonium ion derivatives with the potassium channels of giant axons. *J Gen Physiol* 1971; **58**: 413–437.
43. Muto S, Tsuruoka S, Miyata Y et al. Basolateral Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange maintains potassium secretion during diminished sodium transport in the rabbit cortical collecting duct. *Kidney Int* 2009; **75**: 25–30.
44. Carrisoza-Gaytán R, Salvador C, Satlin LM et al. Potassium secretion by the voltage gated potassium channel Kv1.3 in the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; **299**: F255–F264.
45. Robinson RB, Siegelbaum SA. Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function. *Annu Rev Physiol* 2003; **65**: 453–480.
46. Palmer LG, Frindt G. High conductance K channels in intercalated cells of the rat distal nephron. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; **292**: F966–F973.
47. Zolles G, Klöcker N, Wenzel D et al. Pacemaking by HCN channels requires interaction with phosphoinositides. *Neuron* 2006; **52**: 1027–1036.
48. Pian P, Bucchi A, Robinson RB et al. Regulation of gating and rundown of HCN hyperpolarization-activated channels by exogenous and endogenous PIP2. *J Gen Physiol* 2006; **128**: 593–604.
49. Poolos NP, Bullis JB, Roth MK. Modulation of h-channels in hippocampal pyramidal neurons by p38mitogen-activated protein kinase. *J Neurosci* 2006; **26**: 7995–8003.
50. Pastor-Soler N, Beaulieu V, Litvin TN et al. Bicarbonate-regulated adenylyl cyclase (sAC) is a sensor that regulates pH-dependent V-ATPase recycling. *J Biol Chem* 2003; **278**: 49523–49529.
51. Wahl-Schott C, Baumann L, Zong X et al. An arginine residue in the pore region is a key determinant of chloride dependence in cardiac pacemaker channels. *J Biol Chem* 2005; **280**: 13694–13700.
52. Zong X, Stieber J, Ludwig A et al. A single histidine residue determines the pH sensitivity of the pacemaker channel HCN2. *J Biol Chem* 2001; **276**: 6313–6319.
53. Silver RB, Mennitt PA, Satlin LM. Stimulation of apical H-K-ATPase in intercalated cells of cortical collecting duct with chronic metabolic acidosis. *Am J Physiol* 1996; **270**: F539–F547.
54. Seshadri RM, Klein JD, Smith T et al. Changes in subcellular distribution of the ammonia transporter, Rhcg, in response to chronic metabolic acidosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; **290**: F1443–F1452.
55. Ginns SM, Knepper MA, Ecelbarger CA et al. Immunolocalization of the secretory isoform of Na-K-Cl cotransporter in rat renal intercalated cells. *J Am Soc Nephrol* 1996; **7**: 2533–2542.
56. Wall SM, Fischer MP. Contribution of the Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter (NKCC1) to transepithelial transport of H(+), NH(4)(+), K(+), and Na(+) in rat outer medullary collecting duct. *J Am Soc Nephrol* 2002; **13**: 827–835.
57. Wall SM. Ouabain reduces net acid secretion and increases pHi by inhibiting NH4<sup>+</sup> uptake on rat t1mCD Na(+)-K(+)-ATPase. *Am J Physiol* 1997; **273**: F857–F868.
58. Weiner ID, Verlander JW. Role of NH3 and NH4<sup>+</sup> transporters in renal acid-base transport. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011; **300**: F11–F23.
59. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) Method. *Methods* 2001; **25**: 402–408.
60. Carrisoza-Gaytán R, Salvador C, Bobadilla N et al. Expression and immunolocalization of ERG1 potassium channels in the rat kidney. *Histochem Cell Biol* 2010; **133**: 189–199.
61. Salvador C, Martínez M, Mora I et al. Functional properties of a truncated recombinant GIRK5 potassium channel. *Biochim Biophys Acta* 2001; **1512**: 135–147.
62. Constantinescu A, Silver R, Satlin LM. H-K-ATPase activity in PNA-binding intercalated cells of newborn rabbit cortical collecting duct. *Am J Physiol* 1997; **272**: F167–F177.
63. Liu W, Wei Y, Sun P et al. Mechanoregulation of BK channel activity in the mammalian cortical collecting duct (CCD): role of protein kinases A and C. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; **297**: F904–F915.
64. Roos A, Boron WF. Intracellular pH. *Physiol Rev* 1981; **61**: 296–434.
65. Heitzmann D, Warth R, Bleich M et al. Regulation of the Na+2Cl-K+ cotransporter in isolated rat colon crypts. *Pflügers Arch* 2000; **439**: 378–384.
66. Boyarsky G, Hanssen C, Clyne LA. Superiority of *in vitro* over *in vivo* calibrations of BCECF in vascular smooth muscle cells. *FASEB J* 1996; **10**: 1205–1212.