



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DE LA ACIDOSIS METABÓLICA EN LA
EXPRESIÓN DEL CANAL DE POTASIO *ROMK***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

HÉCTOR ARMANDO MACÍAS ROMO



MÉXICO, D.F.

AÑO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** **PENICHE VILLALPANDO LAURA**

VOCAL: **Profesor:** **JIMENEZ PARDO MARTHA LETICIA**

SECRETARIO: **Profesor:** **ESCOBAR PÉREZ LEONILA IRMA LAURA**

1er. SUPLENTE: **Profesor:** **COELLO COUTIÑO MARTHA PATRICIA**

2° SUPLENTE: **Profesor:** **FERNADEZ SALGADO MA. BENITA LEONOR**


SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 510 DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ASESOR DEL TEMA:

DRA. LEONILA IRMA LAURA ESCOBAR PÉREZ

SUPERVISOR TÉCNICO:



ROLANDO GARRISOZA GAYTÁN

SUSTENTANTE:

HÉCTOR ARMANDO MACIAS ROMO

INDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	2
FISIOLOGÍA DEL IÓN POTASIO	2
FISIOLOGÍA RENAL	4
CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DEL RIÑÓN	5
TRANSPORTE DE POTASIO EN EL RIÑÓN	6
REGULACIÓN DE LA EXCRECIÓN DE POTASIO	8
CANALES IÓNICOS	9
CANALES DE POTASIO	10
FISIOLOGÍA ACIDO BASE	16
REGULACIÓN RENAL DEL EQUILIBRIO ACIDO BASE	17
ACIDOSIS METÁBOLICA	17
JUSTIFICACIÓN	21
HIPÓTESIS	22
OBJETIVOS	22
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS PARTICULARES	22
METODOLOGÍA	23
MODELO ANIMAL	24
WESTERN BLOT	25
FUNDAMENTO	25
MÉTODO	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
CONCLUSIONES	42
PERSPECTIVAS	43
REFERENCIAS	VIII
APÉNDICE	XI
SOLUCIONES Y REACTIVOS	XI
TÉCNICAS EXPERIMENTALES	XII

INTRODUCCIÓN

El potasio es el catión más abundante en el organismo, principalmente se distribuye de manera intracelular. Ante esto, participa en diversas funciones fisiológicas, tales como, señalización, transporte, ciclo celular, actividad eléctrica celular, entre otras.

La dieta es la principal fuente para la entrada de potasio al organismo, sin embargo los niveles de potasio en el cuerpo humano deben de mantenerse dentro de ciertos límites para así poder evitar efectos perjudiciales. Por esto mismo, los niveles del ión potasio están sujetos a una compleja regulación. Los riñones son esenciales en la regulación del catión ya que llevan a cabo el 90% de su excreción, la cual es ajustable a las distintas condiciones fisiológicas.

La acidosis metabólica es una fisiopatología en la que se presenta una reducción primaria de la concentración sérica de bicarbonato y de manera secundaria una reducción de la presión parcial de dióxido de carbono y del pH sanguíneo. La acidosis metabólica del tipo anión gap normal hiperclorémica, suele cursar con hipocaliemia debido a que ocasiona un aumento de la excreción renal de potasio. El principal mecanismo renal implicado en la excreción de potasio es la secreción, la cual se da a nivel de nefrona distal, y esta mediada por canales iónicos a nivel de la membrana plasmática luminal de las células epiteliales.

Los canales de potasio sospechosos de participar en la secreción de potasio en la acidosis metabólica son el ROMK, el Kv1.3 y el MaxiK. El presente estudio se realizó con el fin de elucidar la participación del canal ROMK en este hecho. Para esto se estudió la variación de la expresión del canal ROMK en ratas con acidosis metabólica. La técnica experimental utilizada fue la de Western Blot y se trabajó con estados de acidosis metabólica, el agudo (1 día bajo condiciones acidogénicas) y el crónico (5 días bajo condiciones acidogénicas). De manera diferencial, se estudió la región cortical y medular del riñón, así como la expresión tanto a nivel de membranas totales (como referente de la síntesis de nuevo canal) y a nivel de membranas plasmáticas (como referente del tráfico del canal a la membrana plasmática).

ANTECEDENTES

FISIOLOGÍA DEL IÓN POTASIO

El potasio, en su forma catiónica, juega un papel trascendental en el organismo por las razones siguientes: el K^+ es el catión más abundante en el cuerpo humano; se mantiene en concentraciones de 50-55 mEq por Kg de peso del organismo; presenta una distribución diferencial, en la que el 98% esta en el espacio intracelular, con concentraciones de 140 mM, y el 2% esta extracelularmente con concentraciones plasmáticas de 3.5 mM a 5.0 mM (Boron & Boulpaep, 2008).

La formación de un gradiente electroquímico a través de las membranas plasmáticas de la células es necesario para mantener un potencial de membrana hiperpolarizante en todas las células. De esta manera se regulan mecanismos como procesos de señalización, transporte, secreción y equilibrio osmótico en todas las células (Voet, Voet, & Pratt, 2007). En el caso de las células excitables, como son las musculares, nerviosas y cardiacas, el potencial de membrana regula la generación de señales eléctricas de excitación.

El ión potasio también interviene en distintos procesos celulares, enlistados en el Cuadro 1, por lo que la fluctuación de los niveles de potasio fuera de los niveles fisiológicos puede conducir a estados fisiopatológicos con efectos catastróficos.

Cuando la concentración plasmática de K^+ es inferior a 3.5 mmol/L se habla de un estado de hipocaliemia; de manera opuesta, si la concentración plasmática de K^+ es superior a 5.5 mmol/L (Avendaño & Hernando, 2009) se habla de hipercaliemia. Ambos desordenes tiene efectos importantes a nivel de los sistemas cardiovascular y muscular principalmente, tal como se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Funciones fisiológicas dependientes de K^+ y el efecto que la alteración de la homeostasis del catión tiene sobre estas. (Modificado Boron & Boulpaep, 2008)

Compartimento	Función	Alteración	Efecto
Intracelular	Regular el volumen celular	Pérdida de K^+	Disminución del tamaño celular
		Aumento de K^+	Hinchamiento celular
	Regular el pH intracelular	Perdida de K^+	Acidosis celular
		Aumento de K^+	Alcalosis celular
Funciones enzimáticas	Actividad de enzimas dependientes del K^+ (ATPasas deshidrogenasas)		

Transmembranal	Síntesis de DNA/proteínas y crecimiento	Pérdida K^+	Inhibición de la síntesis proteica y del ciclo celular
	Potencial de membrana en reposo	$[K^+]_i/[K^+]_o$ disminuido	Despolarización de la membrana
		$[K^+]_i/[K^+]_o$ aumentado	Hiperpolarización de la membrana
	Actividad neuromuscular	Bajo K^+ plasmático	Debilidad muscular, parálisis, distensión intestinal, falla respiratoria
		Alto K^+ plasmático	Alta excitabilidad muscular y posterior debilidad muscular.
	Actividad Cardíaca	Bajo K^+ plasmático	Baja conductividad, arritmias
		Alto K^+ plasmático	Arritmias ventriculares y fibrilación ventricular
	Resistencia vascular	Bajo K^+ plasmático	Vasoconstricción
		Alto K^+ plasmático	Vasodilatación

La homeostasis del K^+ en el humano depende de la:

- a) Absorción gastrointestinal
- b) Excreción renal y extra renal
- c) Distribución entre los compartimentos extracelulares (LEC) e intracelulares (LIC)

La Figura 1 representa el acoplamiento de estos procesos; los dos primeros intervienen en el balance externo, es decir en la entrada y salida de K^+ en el cuerpo, mientras que el último se ocupa del balance interno o distribución tisular.

El mecanismo principal de la excreción de K^+ es el renal, ya que lleva a cabo la excreción del 90 al 95% del K^+ ingerido, del 5 al 10% restante es excretado por el colon. Sin embargo, al no ser la excreción una respuesta inmediata a la ingesta, el cuerpo se vale del balance interno para evitar una hipercalemia fatal. Inicialmente las células (principalmente musculares y en menor medida hepáticas, óseas y sanguíneas), en respuesta a estimulaciones endocrinas, captan alrededor de cuatro quintas partes del potasio ingerido, mediante la ATPasa sodio potasio y el cotransportador NKCC2 (Levy, Koepfen, & Stanton, 2006), así sólo se observa un aumento modesto del K^+ plasmático. Posteriormente los riñones comienzan a excretar el potasio excedente, dando lugar a una gradual liberación del potasio intracelular sobrante que también se excretará.

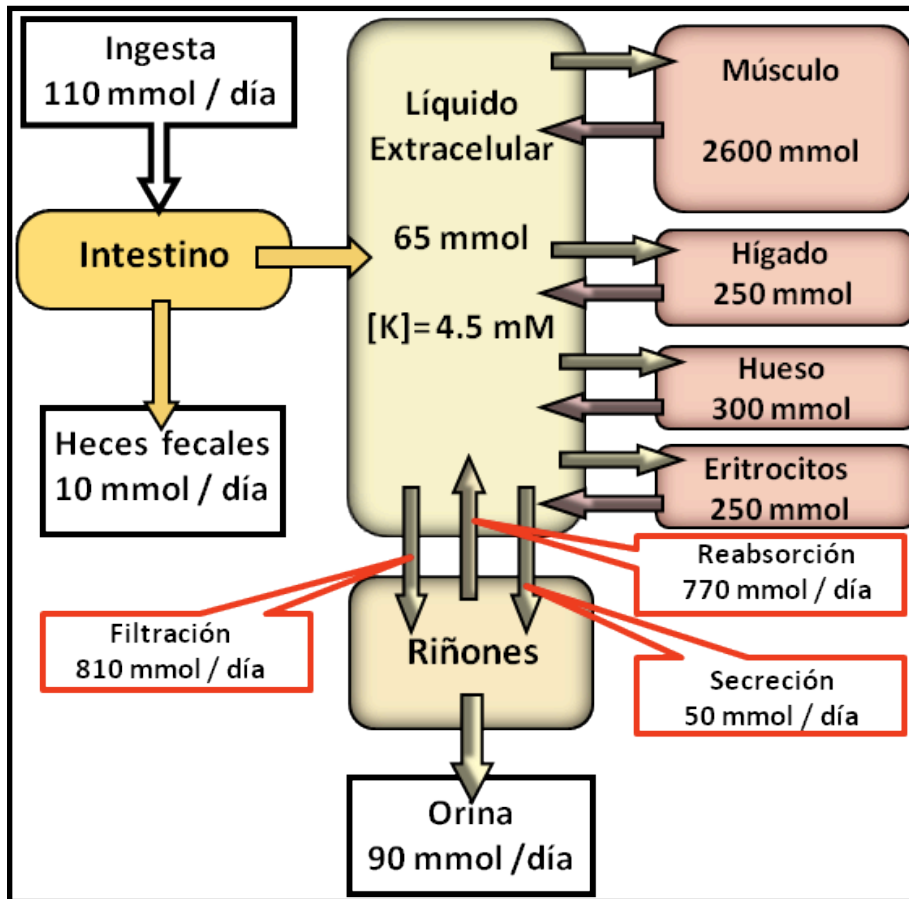


Figura 1 Procesos implicados en la distribución y balance del K^+ en el cuerpo y cantidades estimadas de potasio involucradas en tales procesos (Carrisoza Gaytán, 2012).

Sin embargo, la cantidad de K^+ ingerido suele variar día con día, por lo que la excreción renal se ajusta a las necesidades orgánicas. Esto es posible gracias a la complejidad estructural y funcional de los riñones.

FISIOLOGÍA RENAL

Los riñones son un par de órganos que desempeñan funciones vitales entre las que podemos mencionar:

- Regulación del volumen y osmolaridad del fluido corporal.
- Regulación del balance electrolítico.
- Regulación del balance ácido base.

- d) Excreción de productos metabólicos y sustancias exógenas.
- e) Producción, activación y secreción de hormonas (Costanzo, 2000).

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DEL RIÑÓN

Habitualmente los riñones se asocian con la forma de un frijol, se encuentran situados en la cavidad retroperitoneal, cada uno a cada lado de la columna vertebral. A través del hilio el riñón se conecta con los sistemas nervioso, vascular, linfático y urinario.

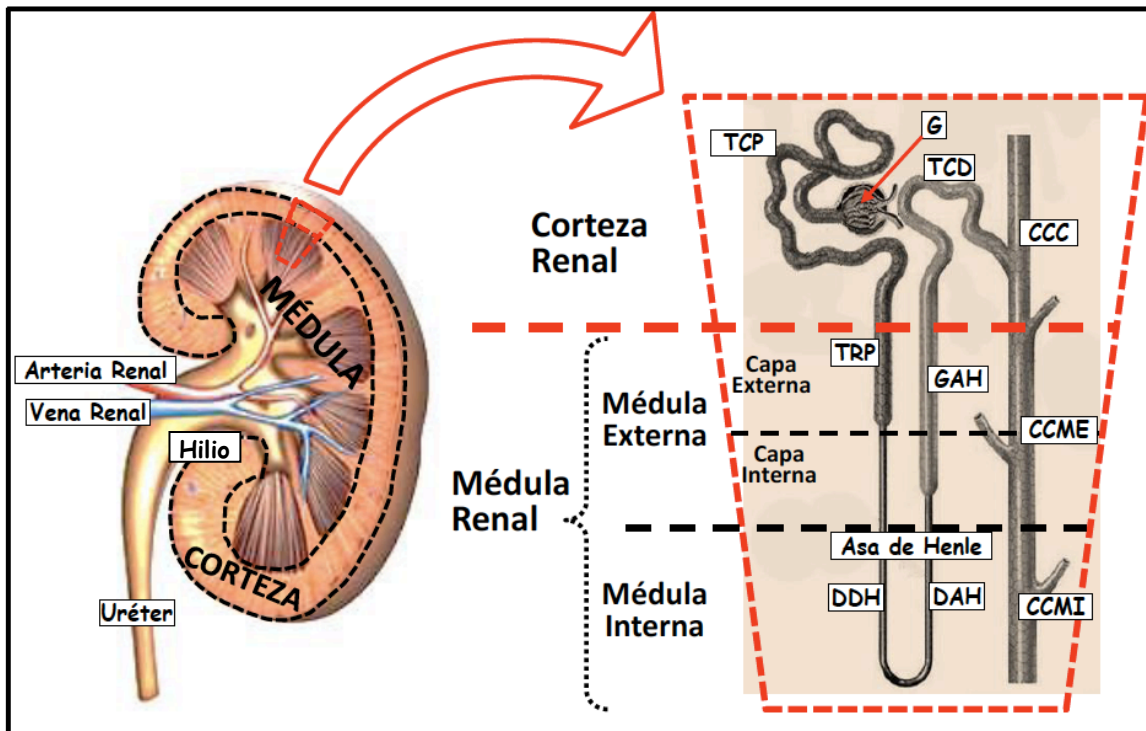


Figura 2 Izquierda, estructura macroscópica renal. Derecha, estructura de una nefrona, la unidad funcional del riñón. (Carrisoza Gaytán, 2012)

Con un previo corte sagital (Figura 2, izq.), es posible distinguir en los riñones dos regiones principales, la corteza, que se caracteriza por un aspecto granular debido a la presencia de glomérulos, capilares y estructuras tubulares; y la médula, carente de glomérulos, y compuesta por arreglos paralelos de túbulos y pequeños vasos sanguíneos, la médula a su vez se subdivide en médula externa e interna (Figura 2, der.).

ESTRUCTURA DE LA NEFRONA

La nefrona es la unidad funcional del riñón, cada riñón contiene entre 800,000 y 1,200,000 de nefronas (en ratas 30,000). La nefrona (Figura 2, der.) está compuesta por un glomérulo (G), que consiste en un agrupamiento de capilares, y por un túbulo, que es una estructura epitelial dividida en varios segmentos, cápsula de Bowman, túbulo contorneado proximal (TCP), túbulo recto proximal (TRP) asa delgada de Henle descendente (DDH) y ascendente (DAH), asa gruesa ascendente de Henle (GAH), túbulo contorneado distal (TCD), túbulo conector (TC), conducto colector cortical (CCC) y los conductos colectores medulares externo (CCME) e interno (CCMI) (Boron & Boulpaep, 2008). Cada segmento tiene diferencias estructurales debido a las distintas funciones que realizan.

El glomérulo y el túbulo convergen en la cápsula de Bowman, la cual rodea a los capilares glomerulares y recibe el ultrafiltrado en lo que se conoce como espacio de Bowman. El ultrafiltrado fluye a través de la luz del túbulo o lumen, donde se llevan a cabo procesos de reabsorción y secreción tubular que dan lugar a la formación de la orina.

La nefrona puede clasificarse según su posición en el riñón en:

- Superficiales: aquellas localizadas en la sección cortical superior, normalmente son de asa corta.
- Yuxtamedulares: localizadas en la sección mas interna, cercanas a la médula, tienen asa larga.

TRANSPORTE DE POTASIO EN EL RIÑÓN

La excreción renal de K^+ incluye los tres procesos mencionados anteriormente: filtración glomerular, reabsorción y secreción tubular.

Inicialmente el K^+ se filtra en su totalidad en el glomérulo (100%), en el túbulo proximal se reabsorbe aproximadamente el 80%, y en el asa de Henle se reabsorbe alrededor del 10% del K^+ filtrado. La nefrona distal, compuesta por el túbulo contorneado distal, el túbulo conector, el conducto colector cortical y medular, lleva a cabo procesos tanto de reabsorción como de secreción; el grado en que se da uno u otro depende de lo que requiera el organismo (Figura 3). Sin embargo no se puede reabsorber la totalidad del K^+ , por lo que invariablemente siempre existe una pérdida de K^+ .

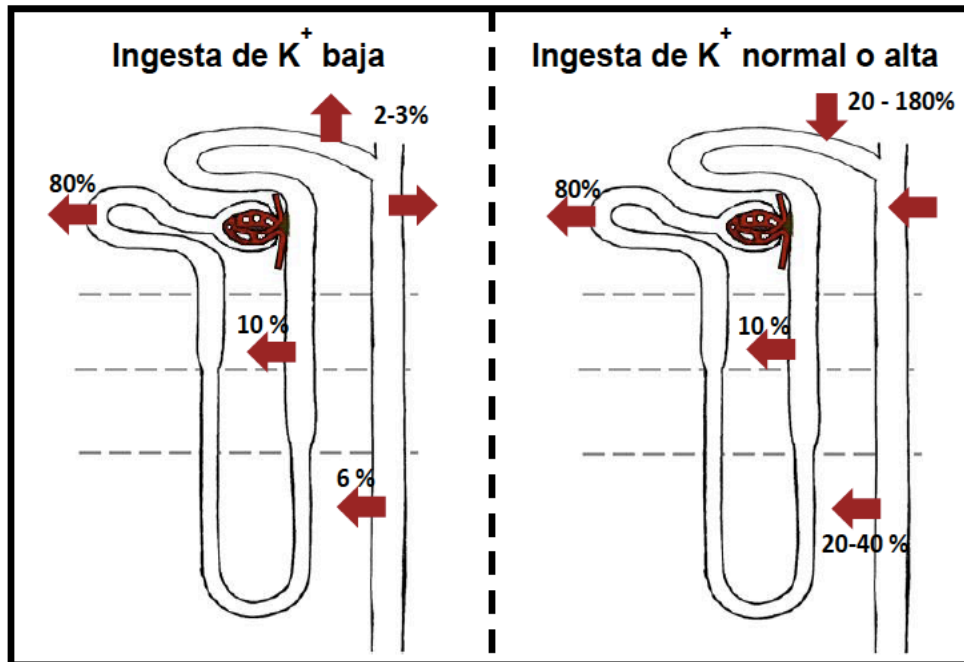


Figura 3 La excreción renal del K^+ esta determinada por tres procesos, filtración (en glomérulo), reabsorción (flechas salientes de la nefrona) y secreción (flechas entrantes a la nefrona). (Carrisoza Gaytán, 2012)

En el túbulo contorneado proximal la reabsorción ocurre por la vía paracelular a través de dos mecanismos:

- a) Arrastre de solvente: en el túbulo proximal también se lleva a cabo la reabsorción de gran parte del fluido, principalmente del agua; junto con éste, el K^+ pasa del lumen al intersticio.
- b) Difusión: conforme se avanza a lo largo del túbulo proximal, el voltaje se torna más positivo, así, al final del túbulo hay un gradiente favorable para la difusión del K^+ vía paracelular.

El asa delgada ascendente de Henle también presenta reabsorción paracelular, ya que el gradiente luminal medular de K^+ entre lumen e intersticio va aumentando poco a poco debido a la disminución progresiva de la concentración de K^+ en el intersticio, esto da lugar a la reabsorción de K^+ . Ya en el asa gruesa ascendente de Henle la reabsorción es tanto paracelular como transcelular.

La estructura epitelial de la nefrona distal está compuesta por dos tipos de células, las células principales, que son alrededor del 70% y el 30% restante lo conforman las células intercaladas, estas últimas a su vez se clasifican en alfa intercaladas y beta intercaladas.

La reabsorción de K^+ en la nefrona distal es transcelular y está a cargo de las células alfa intercaladas. En cambio la secreción está mediada por las células principales. El grado en el que se da la reabsorción o secreción es regulable, esto se detallará mas adelante.

Existen ciertas variaciones en la dinámica del transporte de K^+ entre las nefronas glomerulares y las yuxtamedulares, ya que el asa delgada de las yuxtamedulares alcanza la médula interna y secreta K^+ en la región descendente. Este hecho da lugar al proceso de reciclamiento medular de K^+ . Posteriormente, el K^+ se reabsorbe en el asa ascendente y pasa al intersticio medular, de igual manera, el conducto colector medular también reabsorbe K^+ . El resultado de todo esto es un intersticio medular con altas concentraciones de K^+ ; lo cual es particularmente útil para evitar la reabsorción por difusión, sobre todo cuando el cuerpo requiere excretar altas cantidades de K^+ .

REGULACIÓN DE LA EXCRECIÓN DE POTASIO

Se estima que la ingesta diaria de K^+ oscila entre 80 y 120 mmol, (el líquido extra celular contiene 70 mmol), por lo que para mantener un equilibrio es preciso que el organismo excrete la misma cantidad ingerida. Esto es posible gracias a que la excreción es regulable, mediante la modulación de la secreción en la nefrona distal.

La secreción en la nefrona distal varía en respuesta a la variación en las concentraciones de distintos iones inorgánicos, a la administración de medicamentos y a hormonas, entre otros factores. En el Cuadro 2 se muestran algunos ejemplos de factores inductores e inhibidores de la secreción de K^+ en la nefrona distal. A continuación se revisara la modulación endocrina.

Cuadro 2 Factores que modifican la secreción de K^+ en la nefrona distal. (Modificado de Boron & Boulpaep, 2008)

FACTORES A NIVEL DEL LUMEN	
ESTIMULANTES	INHIBIDORES
↑ Flujo renal tubular	↑ $[K^+]$
↑ $[Na^+]$	↑ $[Cl^-]$
↓ $[Cl^-]$	↑ $[Ca^{2+}]$
↑ $[HCO_3^-]$	Na^{2+}
Potencial luminal negativo	Amilorida
Diuréticos con blanco en el ICT/CCT	
FACTORES A NIVEL DEL TÚBULO Y EL INTERSTICIO	
ESTIMULANTES	INHIBIDORES
↑ Ingesta de K^+	↓ pH
↑ $[K^+]$	Epinefrina
↑ pH	

Aldosterona	
Vasopresina	

REGULACIÓN ENDOCRINA

Las hormonas que participan en la regulación endocrina del K^+ son los glucocorticoides y los mineralocorticoides, y ambas inducen la excreción de potasio.

Los mineralocorticoides regulan el equilibrio del Na^+ y del K^+ ; estos estimulan la retención de $NaCl$ y agua, e incrementan la excreción de K^+ (Stuart, 2008). La aldosterona es el mineralocorticoide mas potente, como todos los corticoides, esta es una hormona esteroidea secretada por la corteza suprarrenal que induce la secreción de K^+ a nivel del TC y el CCC por las células principales.

CANALES IÓNICOS

Los canales iónicos son proteínas de transporte selectivo de iones que forman angostos poros hidrofílicos a través de la membrana y sólo presentan transporte pasivo. Los canales iónicos se caracterizan por interactuar de forma más débil con los solutos, a comparación de las proteínas acarreadores, lo cual se traduce en una alta tasa de transporte.

Los canales iónicos son una gran subclase de los canales proteicos, cuya función es permitir el paso de iones inorgánicos, como el Na^+ , K^+ , Ca^{2+} o Cl^- , a través de la membrana lipídica y se encuentran presentes en todas las células. El movimiento de los iones a través de los canales es esencial para mantener el equilibrio osmótico, para la transducción de señales y para efectuar cambios del potencial de membrana responsables de la neurotransmisión.

Destacan dos propiedades de los canales iónicos, una es su selectividad iónica, gracias a que cuentan con un filtro selectivo que permite el paso de ciertos iones e impide el paso de otros, es dicho filtro el que limita la velocidad de transporte, la cual varía entre 10^6 y 10^8 iones por segundo; la segunda propiedad es la alternancia entre el estado abierto y cerrado. Dicha apertura o cierre de los canales responde a estímulos específicos (Alberts & Bray, 2006).

Los estímulos que regulan la apertura de los canales iónicos son: cambios en el potencial de membrana (también conocidos como canales sensibles al voltaje), estimulación

mecánica y la unión de un ligando, la cual puede ser a nivel intra o extracelular (Figura 4) (Alberts et al., 2002).

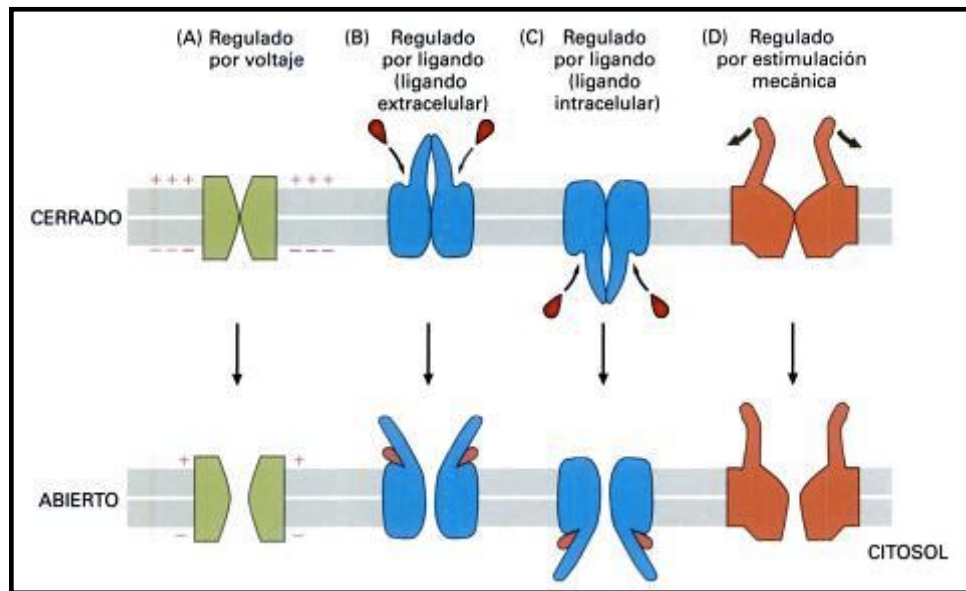


Figura 4 Clasificación de canales por tipos de estímulos. (Traducido de Alberts, 2002)

Generalmente la actividad de los canales también es regulable, así como en el caso de las enzimas, la mayoría de los canales pueden sufrir modificaciones covalentes como la fosforilación y desfosforilación, entre las más habituales, las cuales permiten activar o inactivar a los canales. Por otro lado, los canales también presentan inactivación por exposición prolongada a un estímulo, esto se conoce como desensibilización y provoca un estado refractario

CANALES DE POTASIO

Los canales de potasio conforma la mayor clase y mas diversa de canales iónicos (Figura 5). Estos participan en distintas funciones entre las que destacan, el mantenimiento del potencial de membrana, la regulación del volumen celular, la excreción y el reciclamiento del potasio y el ciclo celular, entre otras.

Los canales de K^+ están compuestos por subunidades alfa y beta. La primera se encarga de la conducción de los iones a través de un segmento de aminoácidos denominado región P o poro. La mayoría de los canales de K^+ contienen cuatro regiones P en disposición tetramérica (Flórez, 2003).

La familia génica de los canales de K^+ incluye la subfamilia canales de potasio dependientes de voltaje (K_v), los canales de potasio activados por calcio (K_{Ca}) y los canales rectificadores entrantes (K_{ir}).

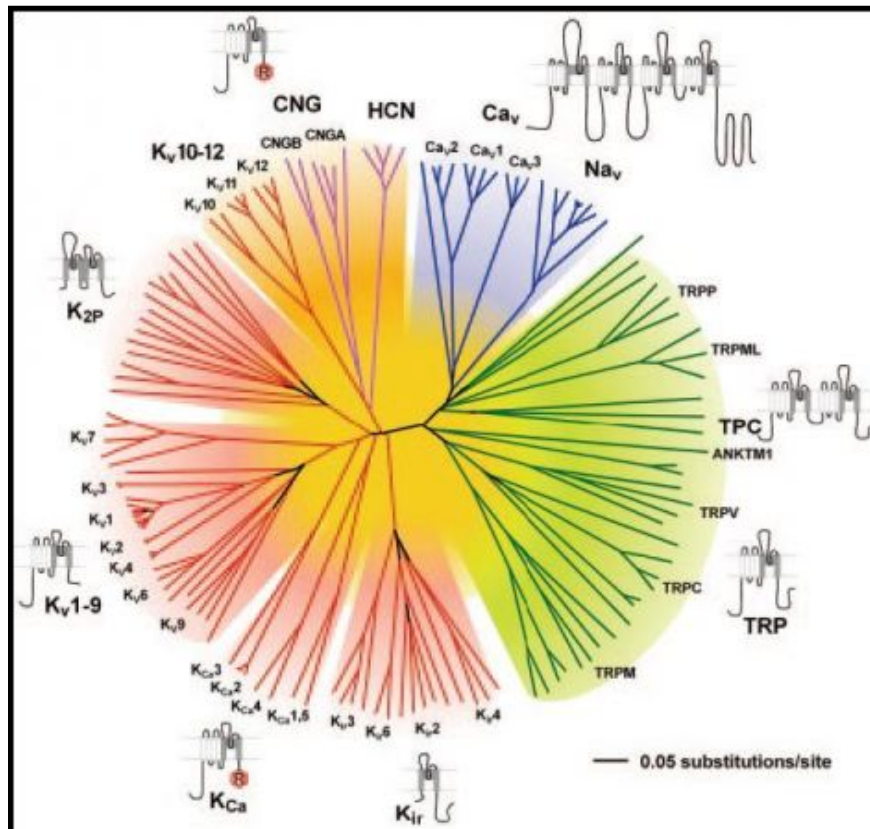


Figura 5 Superfamilia de los canales iónicos. Obsérvese que en su mayoría por canales de potasio.

Los canales K_v se activan por la despolarización membranar, son los responsables de las propiedades eléctricas de las neuronas y de las células musculares, incluyendo el mantenimiento del potencial de membrana y la repolarización; también son trascendentales para la función de marcapasos en las células cardíacas (Waxman, 2007). En el caso de las células no excitables, los K_v contribuyen con el potencial de membrana y la regulación de procesos de secreción.

La familia de los canales K_v contiene alrededor de 40 miembros dividida en 12 subfamilias. La subunidad alfa de estos canales está formada por seis segmentos transmembranales [S1-S6] donde S4 actúa como sensor de potencial.

Los canales K_{Ca} se clasifican a su vez en dos tipos, los canales de alta conductancia, denominados BK_{Ca} o Maxi K, los cuales se abren por la acción conjunta de la despolarización y las concentraciones intracelulares de calcio y los canales de baja

conductancia o canales SK_{Ca} los cuales sólo responden al calcio intracelular (Berkefeld, Fakler, & Schulte, 2010). Ambos tipos son estructuras homotetraméricas con un dominio de membrana integral muy similar al de los Kv. Los K_{Ca} muestran homología en una secuencia corta que participa en la detección de Ca^{2+} (Cox, 2011).

Antes de describir las propiedades de la familia de los canales Kir es necesario revisar a *grosso modo* la rectificación entrante; esto se refiere a que los canales iónicos tienen la capacidad para permitir un flujo de entrada de iones mucho mayor que uno de salida. Esto se debe a que el gradiente electroquímico del potasio influye más en su actividad que el potencial de membrana en sí.

Normalmente los canales Kir presentan una mayor conductancia a potenciales menores al potencial de equilibrio del potasio (E_K) y una menor conductancia en caso contrario, cuando el potencial es mayor al E_K (Hibino, Inanobe, Furutani, Murakami, & Findlay, 2010). Por esto mismo los canales Kir están abiertos y establecen el potencial de reposo y se cierran durante una despolarización.

Dichas características permiten que los canales rectificadores participen en el mantenimiento del potencial de reposo y regulen el potencial de acción en las células excitables.

Estructuralmente, los Kir son tetrámeros cuya subunidad alfa posee dos motivos helicoidales transmembranales (TM1 y TM2) unidos por la región P (H5); los extremos tanto amino como carbonilo son intracelulares y presentan interacción intermolecular. Diferencias en la secuencia aminoacídica en TM2, que es el dominio encargado de la formación del canal, influyen en las características biofísicas de los Kir y permiten clasificarlos en rectificadores fuertes y rectificadores débiles (Hibino et al., 2010).

CANAL ROMK O KIR1.1

El canal Kir1.1 fue el primero de los Kir en ser clonado. También se le conoce por ROMK porque originalmente fue descrito como "Rat Outer Medullary Channel" (Hibino et al., 2010). Actualmente se denomina como "Renal Outer Medullary Channel" ("OMIM Entry - * 600359 - POTASSIUM CHANNEL, INWARDLY RECTIFYING, SUBFAMILY J, MEMBER 1; KCNJ1," n.d.)

ROMK está codificado por el gen KCNJ1, el cual presenta 6 transcritos por splicing alternativo, sin embargo sólo se traducen en 3 proteínas ya que el polipéptido ROMK2 es igual al 4, 5 y 6, que además es el más corto; ROMK1 es 19 aminoácidos más largo que el ROMK2 en el extremo amino terminal y el ROMK3 26 aminoácidos (Figura 6, A). Dichos polipéptidos se agrupan para formar heterotetrámeros que dan lugar al canal ROMK.

El tráfico del canal a la superficie celular esta regulado por proteínquinasa, por un lado tenemos aquellas que promueven su expresión en membrana plasmática como la PKA y la SGK (Figura 7); y del otro están aquellas que inhiben su expresión como la PKC, las WNKs (WNK1, WNK3 y WNK4) y la monoubiquitinación.

La rectificación entrante del canal ROMK depende de las poliaminas y Mg^{2+} presentes en el citoplasma, que bloquean físicamente el flujo de salida del K^+ (Alarcón & Valentín, 2012). La actividad del ROMK también depende de la concentración del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, el pH y la fosforilación (tráfico de los canales).

Adicionalmente, el ROMK es sensible al ATP, a la carga de potasio en la dieta, a hormonas como la aldosterona, el cortisol y la insulina y a la proteína Klotho (Christov & Alper, 2010).

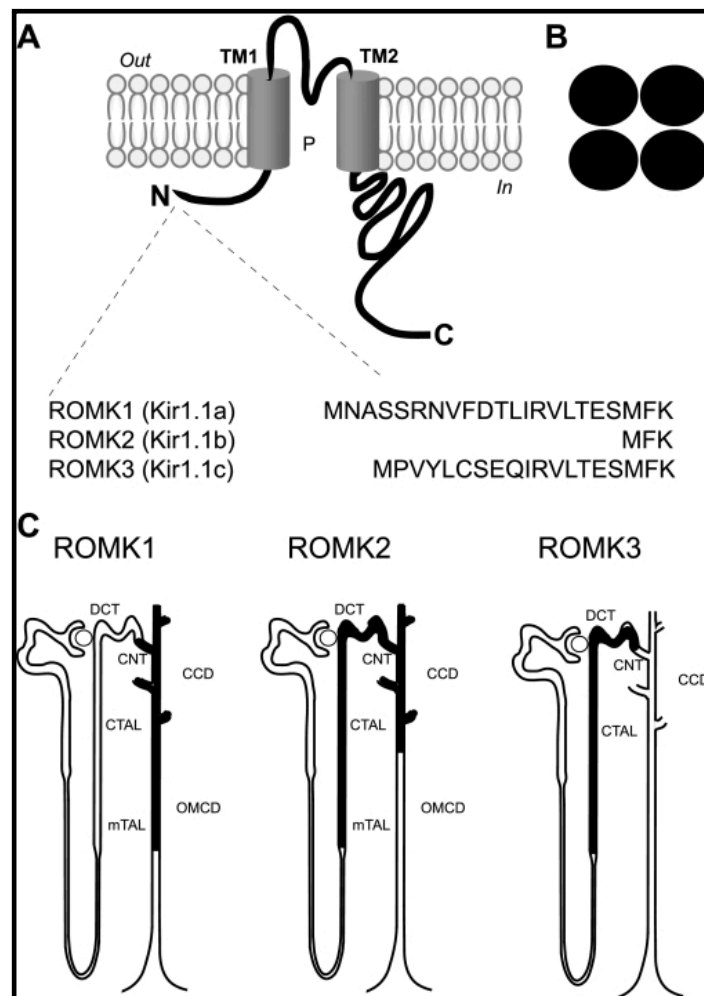


Figura 6 Esquema de las proteínas codificadas por los distintos transcrito de ROMK, obsérvese las distintas secuencias aminoterminales (A). Las proteínas de ROMK se agrupan en heterotetrameros (B). Regiones de la nefrona donde se ha localizado los respectivos transcritos de ROMK (C).

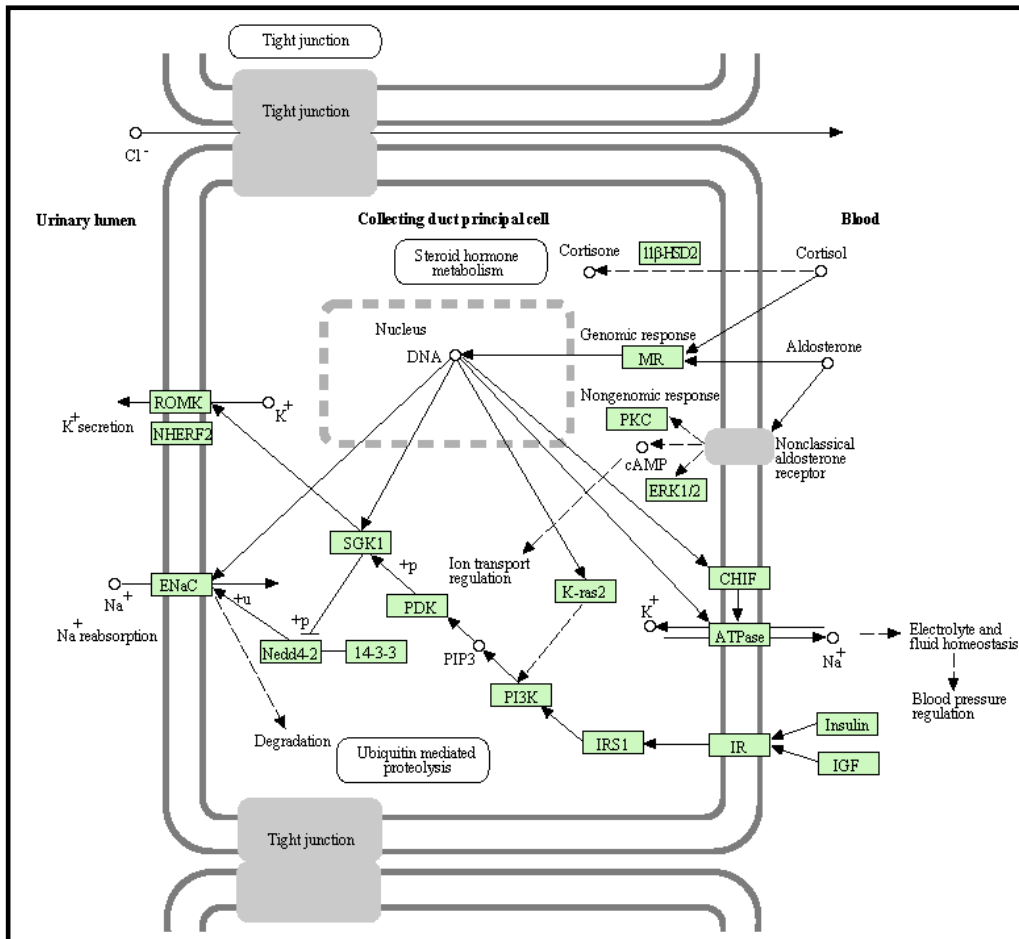


Figura 7 Ruta bioquímica de la regulación hormonal de la reabsorción y secreción de sales en el CCC. Tanto el Cortisol como la aldosterona se unen a su receptor citoplasmático, migran a núcleo y activan la expresión de la proteínaquinasa SGK1, la cual fosforila a ROMK para que migre a la superficie celular. La insulina se une a su receptor a nivel de membrana, el cual por segundos mensajeros activa a SGK1 por fosforilación para que estimule el tráfico de ROMK a la membrana apical (“KEGG PATHWAY: Aldosterone-regulated sodium reabsorption - Homo sapiens (human),” n.d.).

ROMK EN RIÑÓN

La expresión del canal ROMK en células epiteliales renales ha sido abundantemente documentada (Xu et al., 2012). ROMK es el canal responsable de la secreción de potasio en condiciones normales (Wang, 2006). Por esto mismo ha sido sujeto de un gran número de trabajos experimentales.

Se ha observado una localización diferencial de los transcritos de KCNJ1 en la nefrona distal, desde el asa gruesa ascendente de Henle hasta el conducto colector medular externo (Figura 6, C). Por inmunodetección se ha encontrado la proteína tanto en

compartimentos citoplasmáticos como en la membrana apical (membrana que da al lumen de la nefrona) de las células epiteliales de el asa gruesa ascendente de Henle, el túbulo contorneado distar, el túbulo colector y el conducto colector cortical.

En el asa gruesa ascendente de Henle el ROMK es responsable del reciclamiento de K^+ a través de la membrana apical para mantener activo el cotransportador NKCC2. El NKCC2 es un cotransportador electroneutro ya que reabsorbe un ión K^+ y un ión Na^+ por dos de Cl^- , por esto mismo el NKCC2 juega un papel muy importante en la reabsorción de $NaCl$, que después de entrar a la célula sale al intersticio y posteriormente para a la circulación sanguínea mediante la ATPasa sodio potasio y canales de cloro localizados en la membrana basolateral. Es también el ROMK el que permite la reabsorción de Na^+ y Ca^{2+} de forma paracelular, mediante variaciones en el potencial de membrana.

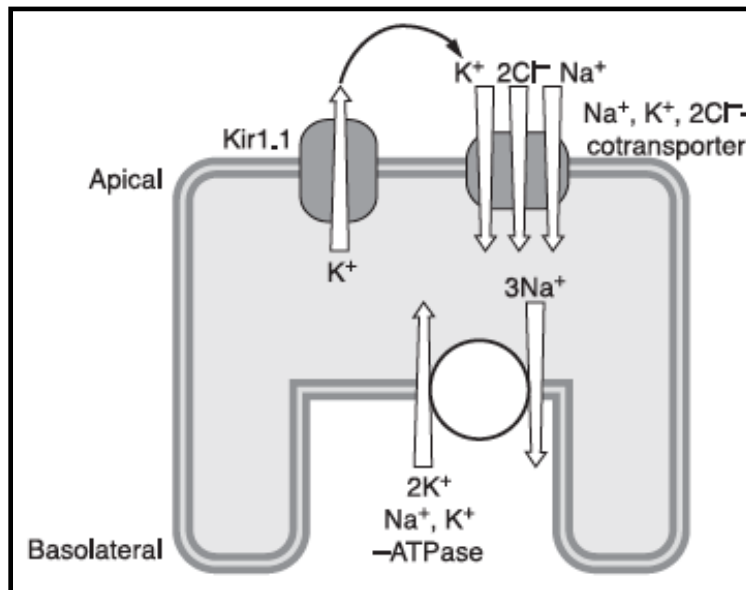


Figura 8 El canal Kir1.1 en el asa gruesa ascendente de Henle recicla el potasio para mantener activo el cotransporte por el NKCC2, el cual participa en la reabsorción del sodio (Hibino et al., 2010).

Interesantemente el canal ROMK es un canal con un valor de conductancia unitaria de 30-pS. Sin embargo, en el asa gruesa ascendente de Henle se ha identificado un canal secretor de potasio con una conductancia unitaria de 70-pS. Dicho canal apunta a ser un heterotetrámero de ROMK y otras subunidades aún desconocidas. Esto está fuertemente justificado con experimentos en ratones homocigotos mutantes en quienes no se presentan tanto el canal de 30-pS como el de 70-pS. Además, se ha visto que con dietas altas de potasio tanto en ratones homocigotos silvestres como en heterocigotos se duplica el número de canales 70-pS a costa de la reducción de canales 30-pS. Esto permite

suponer un aumento de la formación de canales de 70-pS a través de la reducción de la formación de canales de 30-pS, es decir una reestructuración (Lu et al., 2004).

En las células principales de la nefrona distal, principalmente del conducto colector, el Kir1.1 tiene una función principalmente secretora.

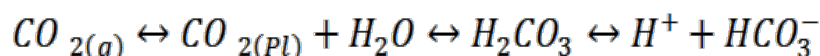
FISIOLOGÍA ACIDO BASE

En el contexto fisiológico en el que nos encontramos sobra y basta la definición acido-base de Bronsted, en la que se entiende por ácido a toda sustancia que puede donar un protón [H⁺] y por base a toda aquella sustancia que acepta un protón. La escala pH ($\text{pH} = -\log[\text{H}^+]$) nos permite determinar que tan ácido o básico es cualquier sustancia con base en la concentración de iones hidrógeno.

El pH en el organismo varía ampliamente según el compartimento del cuerpo, sin embargo se entiende por pH fisiológico al correspondiente al plasma sanguíneo y al fluido intersticial. El pH fisiológico tiene un valor de 7.4 (Boron & Boulpaep, 2008).

Gran parte de las moléculas biológicas son sensibles al pH, puesto que tienen un comportamiento ya sea como ácido débil o como base débil. Cambios mínimos en el pH del medio fisiológico puede alterar su carga eléctrica, su conformación y por ende, su actividad biológica. Dicho esto, es comprensible que el cuerpo cuente con mecanismos sofisticados para la regulación del pH. Además de la evidente participación del sistema endocrino, los principales sistemas implicados en el control del pH fisiológico son el respiratorio y el urinario.

Una solución amortiguadora o buffer es una sustancia que retiene o libera protones ayudando así, a estabilizar y minimizar los cambios del pH. El buffer de más trascendencia fisiológica es el par CO₂ y HCO₃⁻, que presenta tres equilibrios como se aprecia en la siguiente ecuación.



Eq. 1 Equilibrios en el sistema buffer CO₂ y HCO₃⁻

Gran parte de la efectividad de este sistema reside en que es un sistema abierto mediante el sistema respiratorio. Los pulmones permiten la liberación de CO_{2(g)}, equilibrando así las concentraciones plasmáticas ([CO_{2(pl)}] o P_{CO2}). La anhidrasa carbónica cataliza la hidratación del CO_{2(pl)} para formar ácido carbónico (H₂CO₃), el cual rápidamente se disocia

en un protón (H^+) y bicarbonato (HCO_3^-). Los riñones por su parte, regulan las concentraciones plasmáticas de H^+ y HCO_3^- .

REGULACIÓN RENAL DEL EQUILIBRIO ACIDO BASE

Para mantener el equilibrio ácido base, los riñones deben de reabsorber parte del HCO_3^- filtrado y sintetizar nuevo HCO_3^- diariamente para neutralizar la carga ácida endógena.

Del 80 al 85% del HCO_3^- filtrado es reabsorbido por el túbulo contorneado proximal (Kraut & Madias, 2010). La anhidrasa carbónica II (CA II) en la células del túbulo contorneado proximal permiten la rápida disociación del H_2CO_3 citosólico en H^+ y HCO_3^- ; los protones son secretados hacia el lumen y el bicarbonato pasa a la circulación mediante el cotransportador sodio bicarbonato. En menor medida, las regiones del asa ascendente de Henle y el conducto colector también reabsorben HCO_3^- .

El túbulo contorneado distal y el conducto colector son los principales implicados en la generación de HCO_3^- . En el túbulo contorneado distal el metabolismo de la glutamina genera NH_3 y HCO_3^- . El bicarbonato pasa a la circulación y el amoníaco se transporta al lumen, donde se conjuga con un protón para formar amonio NH_4^+ . De esta manera, el par amonio-amoniaco es el principal buffer urinario.

ACIDOSIS METÁBOLICA

Se clasifican en cuatro los principales desórdenes ácido base, los cuales se presentan en el cuadro 3. Sin embargo para fines de este estudio sólo se abordará la acidosis metabólica.

Cuadro 3 Principales desórdenes ácido base.

DESORDEN	CAUSAS CLÍNICAS	CAUSAS BIOQUÍMICAS	CAMBIOS EN SANGRE ARTERIAL	RESPUESTA COMPENSATORIA
Acidosis respiratoria	Ventilación alveolar disminuida, disminución en la capacidad de difusión pulmonar.	P_{CO_2} aumentado	pH ↓ [HCO_3^-] ↑ P_{CO_2} ↑	Aumento de la excreción renal de H^+
Alcalosis respiratoria	Hiperventilación, ansiedad, intoxicación con aspirina.	P_{CO_2} disminuido	pH ↑ [HCO_3^-] ↓ P_{CO_2} ↓	Aumento de la excreción renal de HCO_3^-
Acidosis	Disminución de la	Incremento de ácidos	pH ↓	Hiperventilación

Metabólica	secreción urinaria de H ⁺ , cetoacidosis, acidosis láctica, diarrea.	distintos al CO ² o HCO ₃ ⁻	[HCO ₃ ⁻] ↓ Pco ² ↓	alveolar
Alcalosis Metabólica	Ingesta terapéutica de bicarbonatos, vómito.	Aumento de compuestos alcalinos, disminución de ácidos distintos al CO ₂ o HCO ₃ ⁻	pH ↑ [HCO ₃ ⁻] ↑ Pco ² ↑	Hipoventilación alveolar

La acidosis metabólica es un estado fisiopatológico que se caracteriza por una reducción primaria de la concentración sérica de bicarbonato y de manera secundaria una reducción de la presión parcial de dióxido de carbono y del pH sanguíneo (Kraut & Madias, 2010). Esto ocurre cuando se incrementa la producción de ácidos no volátiles o se pierde bicarbonato a niveles que superen los mecanismos de homeostasis ácido base o se comprometan los mecanismos renales de acidificación.

Existen distintos tipos de acidosis metabólica, una clasificación es aquella en la que utilizamos como referencia los niveles de cloruro plasmático y el valor de brecha aniónica o anión gap (AG), éste último se calcula con la ecuación 2 y permite estimar *grosso modo* la concentración de aniones orgánicos o inorgánicos en el organismo.

$$\text{Anión gap} = [\text{Na}^+] - ([\text{Cl}^-] + [\text{HCO}_3^-])$$

Eq. 2 El anión gap corresponde a la diferencia entre la concentración plasmática del ión sodio y la suma de las concentraciones plasmáticas del cloruro y el bicarbonato

Debido a que el sodio es el principal catión extracelular y que por principio de electroneutralidad, la número de cargas positivas es igual al número de cargas negativas en el LEC, se supone que la diferencia entre las concentraciones del ión sodio y las concentraciones del cloruro y el bicarbonato sumadas equivale a un valor correspondiente a la concentración de los aniones distintos al Cl⁻ y al HCO₃⁻, esto es el anión gap.

El intervalo de valores anión gap normal es de 6 a 10 mmol/L, sin embargo puede variar por distintos factores. El anión gap disminuye cuando la los niveles de albúmina sérica bajan, o cuando hay acumulación de proteínas con carga positiva, bromuros o yoduros. Aumenta con la acumulación de proteínas aniónicas, en hiperfosfatemia o por la acumulación de aniones orgánicos e inorgánicos; ésta última suele ser la causa más frecuente y la más relevante a nivel de acidosis metabólica.

Con respecto al anión gap los tipos de acidosis que tenemos son:

- Acidosis con anión gap alto normoclorémicas: se presenta cuando la acidosis se debe a la acumulación de otro anión distinto al cloruro, lo que ocasiona una caída del HCO_3^- que explica el aumento en el anión gap.
- Anión gap normal hiperclorémica: se debe a la acumulación de ácido clorhídrico y no origina cambio en el anión gap, ésta a su vez se presenta en dos formas, aquella con potasio sérico normal y aquella con hipocaliemia, la última tiene lugar cuando se llevan a cabo mecanismos renales en respuesta a la acidosis con excreción colateral de electrolitos.

Cada tipo de acidosis se presenta bajo distintas circunstancias, en el Cuadro 4 se muestran las causas mas frecuentes de cada tipo de acidosis descrita. Tal como se puede ver, en algunos casos los mecanismos de excreción de potasio suelen verse implicados.

Cuadro 4 Causas de acidosis metabólicas (Modificado de Kraut & Madias, 2010).

Anión gap alto	AG normal hiperclorémica con K^+ normal o alto	AG normal hiperclorémica con K^+ disminuido
Daño renal agudo	Administración de HCl o precursores (aas parenterales)	Diarrea
Insuficiencia renal crónica	Administración de aminoácidos catiónicos ácidos	Fistulas intestinales, pancreáticas o biliares
Cetoacidosis diabética, alcohólica, o por ayuno	Insuficiencia renal crónica	RTA proximal
Acidosis láctica	Insuficiencia adrenal	RTA distal
Intoxicación por salicilatos o tolueno	Hipoaldosteronismo	Cetoacidosis diabética
Intoxicación alcohólica (metanol y poliglicoles) con riesgo de muerte	Acidosis tubular renal distal hiperclorémica	Acidosis láctica
Acidosis piroglutámica	Pseudoaldosteronismo tipo 1 y tipo 2	Intoxicación con tolueno
	Fármacos (espironolactona, inhibidores de prostaglandinas, amilorida, trimetropin)	Intervenciones quirúrgicas

Es muy comprensible que inicialmente el paciente acidótico, independientemente de la causa del desorden, presente hiperkaliemia, ya que la acidosis extracelular conlleva a una liberación de K^+ de las células al medio extracelular.

Otra clasificación de la acidosis es en función de su temporalidad, se habla de acidosis aguda cuando ésta dura de minutos a un par de días y crónica cuando se extiende a semanas o inclusive a años. La primera es más común que la otra.

La cetoacidosis diabética y la acidosis láctica son los casos más comunes de acidosis aguda; y el daño renal agudo y la insuficiencia renal crónica son las causas más comunes de acidosis metabólica crónica. Los efectos adversos también son diversos entre una y otra (Cuadro 5).

Cuadro 5 Efectos adversos de la acidosis metabólica (Modificado de Kraut & Madias, 2010).

Acidosis Aguda	Sistema cardiovascular: predisposición a arritmias, vasodilatación arterial, vasoconstricción, hipotensión, contractilidad cardíaca débil, volumen de sangre bombeado disminuido
	Resistencia a catecolaminas
	Resistencia a insulina
	Alteración de las funciones del sistema inmunológico
	Estimulación de apoptosis
	Alteraciones en la respiración celular
	Disminución de la afinidad del oxígeno a la hemoglobina (efecto de Bohr)
Acidosis Crónica	Enfermedades óseas
	Retraso en el crecimiento
	Exacerbación de insuficiencia renal
	Desgaste muscular
	Síntesis de albúmina reducida
	Disminución en la tolerancia a la glucosa
	Aumento en la producción de beta-microglobulina

Evidentemente, cuando la acidosis cursa con un tipo de desbalance en los niveles de K^+ , como las expuestas con anterioridad, existen complicaciones tanto por los efectos adversos por acidosis, como por la alteración de la homeostasis del potasio (Cuadro 1).

JUSTIFICACIÓN

Cuando la acidosis metabólica cursa con algún desbalance en la homeostasis del K^+ , significa que los mecanismos de excreción de K^+ están participando o respondiendo directamente a los efectos de la fisiopatología.

En la gran mayoría de estos casos, es el sistema urinario el responsable de estas acciones, pues ya ha quedado claro que es este el principal sistema excretor de potasio en el cuerpo. Cuando la acidosis cursa con hipocaliemia denota que los riñones han incrementado el proceso de secreción de K^+ al nivel de la nefrona distal.

Las vías de secreción de K^+ son tres canales: el canal $Kv1.3$, el canal MaxiK y el canal ROMK.

Para determinar cual de estos es el encargado de secretar potasio en condiciones de acidosis metabólica, en el laboratorio de fisiología de canales a cargo de la doctora Laura Escobar, se lleva a cabo el estudio sistemático e individual de los canales $Kv1.3$ y ROMK.

El presente trabajo experimental corresponde a la parte inicial del estudio del ROMK.

HIPÓTESIS

La expresión del canal de potasio ROMK aumenta en respuesta a la acidosis metabólica en el riñón de rata.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la acidosis metabólica, tanto crónica como aguda, en la expresión del canal de potasio ROMK en riñones de ratas.

OBJETIVOS PARTICULARES

Realizar una estimación relativa de los cambios en los niveles de expresión de la proteína del canal ROMK en ratas bajo protocolos de acidosis aguda, acidosis crónica y control. Estudiar la expresión del canal ROMK en la corteza y médula renal.

Determinar si el cambio en la expresión del canal ROMK es debida a la síntesis de nueva proteína de canal o al tráfico celular.

METODOLOGÍA

Para determinar si existen cambios en la expresión del canal ROMK en ratas acidóticas, se utilizó la técnica de Western Blot con extractos proteicos de riñón de rata, en fracciones de la región cortical y medular.

Para distinguir entre la expresión del canal en membrana por síntesis de nueva proteína y la expresión por tráfico, se obtuvieron extractos proteicos enriquecidos con membranas plasmáticas y extractos con la totalidad de las membranas celulares (membranas totales); posteriormente, se analizaron con la técnica de Western Blot.

En la Figura 9 se muestra un esquema con la secuencia de técnicas experimentales que conformaron la metodología seguida.

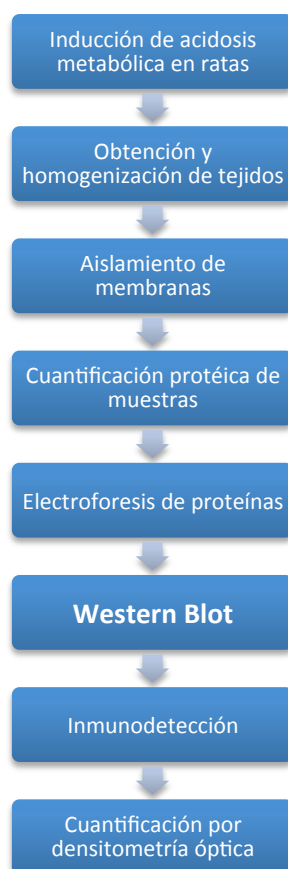


Figura 9 Secuencia de técnicas experimentales

MODELO ANIMAL

El modelo animal utilizado fue rata de laboratorio (*Rattus norvegicus*), cepa Wistar. Los sujetos utilizados fueron únicamente machos con un peso inicial entre 200 y 250g, esto con la única finalidad de delimitar las variación entre sujetos experimentales.

Se trabajaron 3 distintos protocolos dietarios para la inducción de acidosis metabólica en ratas (Figura 10). El primero fue el control, en éste los animales tuvieron libre acceso al consumo de alimento y agua. El segundo protocolo fue el de acidosis aguda, en el cual se les proporcionó a los sujetos experimentales libre acceso a alimento y a una solución de cloruro de amonio 0.28M durante 24h, con el fin de inducir un estado de acidosis metabólica en etapa aguda (Vinay, Allignet, Pichette, & Watford, 1980). El tercero fue el protocolo de acidosis crónica, similar al de acidosis aguda pero con una duración de 5 días (Good, 1990). Se estudiaron 3 grupos de cuatro sujetos para cada protocolo.



Figura 10 Descripción del protocolo dietario utilizado para inducir acidosis metabólica, aguda y crónica, en las ratas.

WESTERN BLOT

FUNDAMENTO

La técnica de Western Blot se basa en la detección de moléculas de carácter proteico por su capacidad de unión al anticuerpo dirigido contra ella (Voet et al., 2007). Como se esquematiza en la Figura 11, dichas moléculas se separan por electroforesis, y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa o polivinildifluoruro (PVDF) que funge que soporte sólido.

Para hacer evidente la reacción antígeno anticuerpo se utilizan dos anticuerpos, el denominado anticuerpo primario, el cual reacciona con el antígeno deseado, y el anticuerpo secundario, dirigido contra la inmunoglobulina, es decir el anticuerpo primario. El anticuerpo secundario esta conjugado con enzimas como la peroxidasa (POD) o la fosfatasa alcalina (AP) (Müller-Esterl, 2009).

En este caso se utilizó la detección por reacción de luminiscencia (ECL: Enhanced Chemiluminescence) en la que el anticuerpo secundario esta acoplada a la peroxidasa de rábano (HPR) la cual cataliza la reacción de quimioluminiscencia del luminol en presencia de peróxido de hidrógeno. El producto de la oxidación es energéticamente inestable, que al decaer emite luz en la zona a la que se han adherido los anticuerpos (Amersham Bioscience).

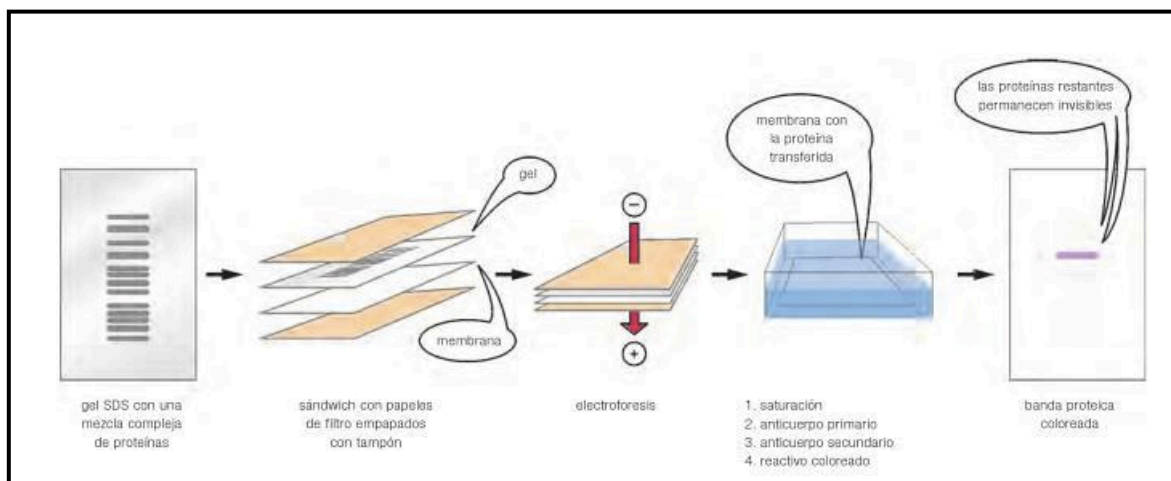


Figura 11 Esquema del algoritmo seguido para realizar la técnica de Western Blot.

MÉTODO

Previa obtención de los extractos proteicos de membranas totales y membranas plasmáticas, tanto de corteza como médula renal de cada sujeto experimental, se realizó la separación electroforética de las mismas^a.

La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 8%. Se cargaron 50microg de proteína de cada muestra para el caso de las membranas totales y 40microg para membranas plasmáticas. Posteriormente se realizó la transferencia húmeda de las proteínas a una membrana de PVDF (Bio-Rad Immun-Blot® PVDF membrane). La membrana se bloqueó con leche descremada (Bio-Rad Blotting-Grade Blocker) al 5%.

Se realizó la inmunodetección del canal ROMK y de beta actina. Para el canal ROMK se utilizó como anticuerpo primario el anti-ROMK1 producido en conejo (1:200) (Alomone) con incubaciones de 18h (On) a 4C. Para la beta actina se utilizó anti-actina producido en conejo (1:10000) (Santa Cruz Biotechnology) con incubaciones de 1h a temperatura ambiente (TA).

Como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG de conejo producido en cabra y conjugado con peroxidasa de rábano (1:10000) (Santa Cruz Biotechnology) con incubaciones de 1h TA. Para la detección se usaron los reactivos ECL Prime Western Blotting Detection Reagent® (Amersham Bioscience) y Millipore.

Posteriormente se revelaron las membranas en placas radiográficas Kodak. La señal de bandas impresa en la placas se cuantifico por densitometría óptica utilizando el software Kodak 1D.

Para el control positivo del método, se llevó a cabo el método antes mencionado utilizando extracto proteico de cerebelo de rata. Para control negativo también se siguió el método con cerebelo de rata, sólo que el anticuerpo anti-ROMK se incubó 1h con péptido control previo a su utilización.

^a Los detalles técnicos de los métodos ejecutados así como de las soluciones empleadas se encuentran en el Apéndice.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los registros de cada protocolo dietario de un solo grupo.

Cuadro 6 Registro de peso, consumo de alimento y agua de ratas control

Registro de Ratas Control											
Rata	Día 0	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4		Día 5	
	Peso (g)	Peso (g)	Consumo	Peso (g)	Consumo	Peso (g)	Consumo	Peso (g)	Consumo	Peso (g)	Consumo
1	237	240	16.5g, 36.6mL	244	24.4g, 41.3mL	250	22.5g, 40mL	252	27g, 43.8mL	266	30g, 51.3mL
2	231	232	16.5g, 36.6mL	233	24.4g, 41.3mL	241	22.5g, 40mL	247	27g, 43.8mL	254	30g, 51.3mL
3	228	234	16.5g, 36.6mL	235	24.4g, 41.3mL	240	22.5g, 40mL	247	27g, 43.8mL	262	30g, 51.3mL
4	234	239	16.5g, 36.6mL	243	24.4g, 41.3mL	244	22.5g, 40mL	250	27g, 43.8mL	255	30g, 51.3mL

Cuadro 7 Registro de peso, consumo de alimento y agua de ratas con acidosis aguda

Registro de Ratas con Acidosis Aguda			
Rata	Día 0	Día 1	
	Peso (g)	Peso (g)	Consumo
1	208	190	26.3g, 27mL
2	210	197	26.3g, 27mL
3	202	186	25.8g, 23mL
4	212	196	25.8g, 23mL

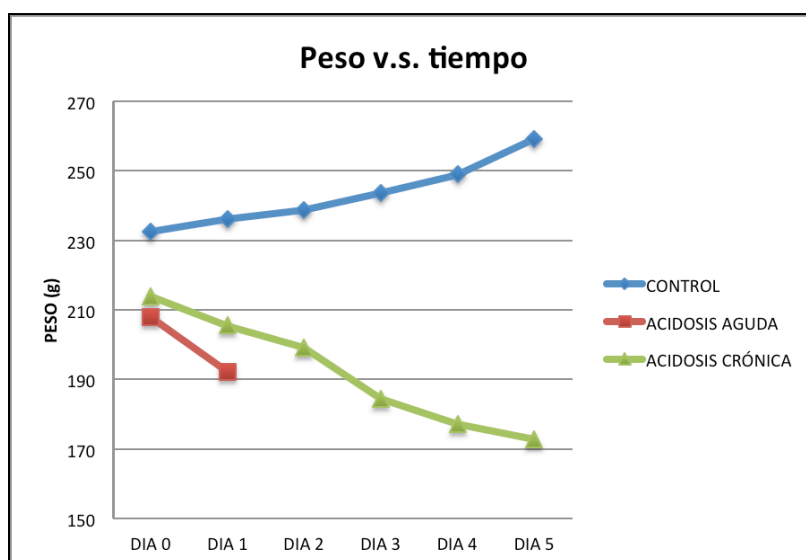
Cuadro 8 Registro de peso y consumo de alimento y líquido de ratas con acidosis crónica.

Registro de Ratas con Acidosis Crónica											
Rata	Día 0	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4		Día 5	
	Peso (g)	Peso (g)	Consumo	Peso (g)	Consumo	Peso (g)	Consumo	Peso (g)	Consumo	Peso (g)	Consumo
1	241	220	11.3g, 32mL	220	3.9g, 60mL	198	1.3g, 63mL	190	5g, 24mL	188	4.1g, 31mL
2	210	194	2.9g, 40mL	181	1.1g, 39mL	165	0.1g, 36mL	150	0g, 22mL	145	0.1g, 20mL
3	190	210	8.7g, 36mL	197	6g, 17mL	184	5.3g, 28mL	174	1.9g, 32mL	166	2.3g, 26mL
4	215	198	7.2g 28mL	199	6.8g, 33mL	191	9.1g, 45mL	195	9.2g, 34mL	192	8.9g, 31mL

Los protocolos dietarios están diseñados para inducir en el modelos animal acidosis metabólica con brecha aniónica (anión gap) normal, con hipercloremia e hipocaliemia. Durante el tiempo en el que se aplicaron las distintas dietas a las ratas, se llevó a cabo un registro diario del peso de cada sujeto, así como la cantidad de alimento y líquido consumido. En los cuadros 6, 7 y 8 se muestra el registro de 4 sujetos por protocolo dietario.

En el caso de los sujetos control, debido a la imposibilidad de mantenerlos en cajas aisladas, las 4 se mantuvieron en una misma caja, de tal manera que se registró el consumo total de la caja y se dividió entre las cuatro ratas.

Revisando detenidamente los datos se puede advertir la pérdida de apetito que mostraron las ratas acidóticas y la pérdida de peso de éstas por malnutrición, tal como se puede ver en los cuadro 7 y 8. Es singularmente impresionante el hecho de que dichos síntomas se presenten de manera casi inmediata, como en el caso de los sujetos de acidosis aguda (AA), quienes mostraron pérdida de peso con tan solo un día de tratamiento. De igual manera los sujetos con acidosis crónica (AC) comenzaron a perder peso desde el primer día y además, continuaron perdiendo peso durante todo el tratamiento. En cambio, los sujetos control mostraron una ganancia de peso. Esto se ilustra claramente en la gráfica 1. La pérdida de peso en ratas con carga ácida es un síntoma claramente documentado (Cheval, Morla, Elalouf, & Doucet, 2006).



Gráfica 1 Cambio del peso (promedio) de los sujetos experimentales día a día.

La Figura 12 muestra el inmunoblot correspondiente al control positivo y negativo del anticuerpo primario anti-ROMK, con el cual se validó su uso bajo la metodología de Western Blot (WB) que se llevo a cabo en toda la investigación.

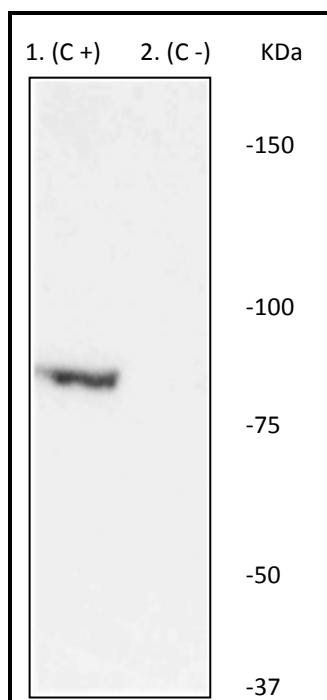


Figura 12. Inmunoblot control para el anticuerpo anti-ROMK. En ambos carriles se cargo extracto de cerebelo y medula oblongada, y se incubó con anti-ROMK (1:200). Únicamente en el segundo carril el anti-ROMK fue incubado previamente durante una hora con péptico control.

Para la realización de los ensayos de Western Blot se decidió realizar comparaciones de cuatro sujetos control contra cuatro sujetos acidóticos (n=4), de tal manera que se ejecutaba un ensayo de control v.s. acidosis aguda y otro ensayo control v.s. acidosis crónica; esto a su vez, se llevó a cabo por cada tipo de extracto membranal (membranas totales y membranas plasmáticas) y por cada región renal (corteza y médula). Esto se traduce en ocho ensayos distintos tal como se esquematiza en la Figura 13, dichos ensayos se realizaron para los tres grupos experimentales de cada protocolo dietario. Es necesario aclarar que se utilizaron los mismos sujetos controles para los ensayos contra acidosis aguda y para los ensayos contra acidosis crónica.

En cada ensayo se realizó la inmunodetección tanto de las bandas de ROMK como de las bandas de actina. La razón por la cual también se detectaron las actinas fue con fines de normalización de los resultados experimentales, como se describe mas adelante.

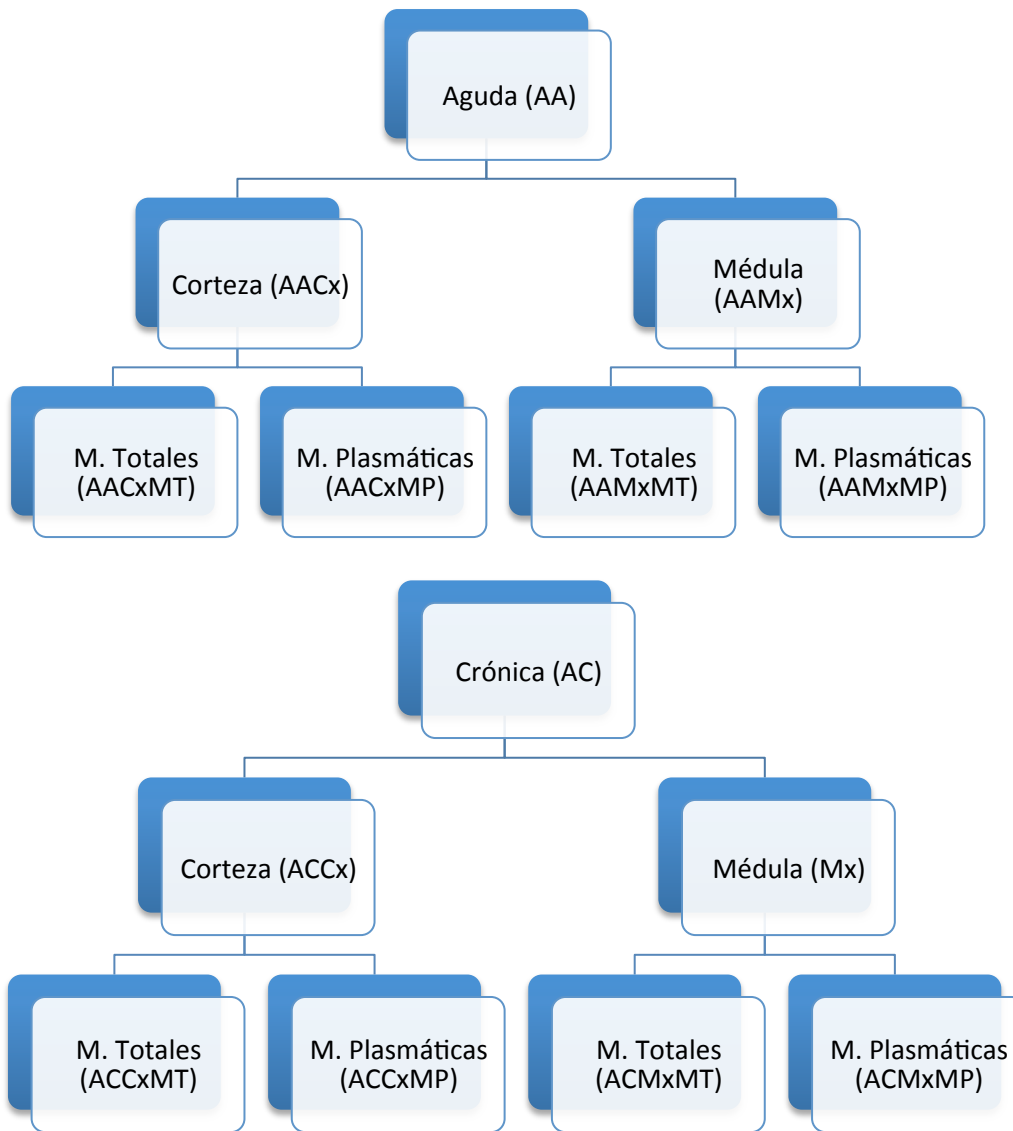


Figura 13 Esquema de los 8 tipos de ensayos de WB realizados, con la clave de identificación utilizada

El objetivo de estudiar ambos estadios de acidosis fue realizar un análisis comparativo de los distintos efectos de cada tipo de acidosis en la expresión del canal ROMK. Por esto se presentan y se analizan los resultados de tanto de acidosis aguda como de acidosis crónica de manera conjunta.

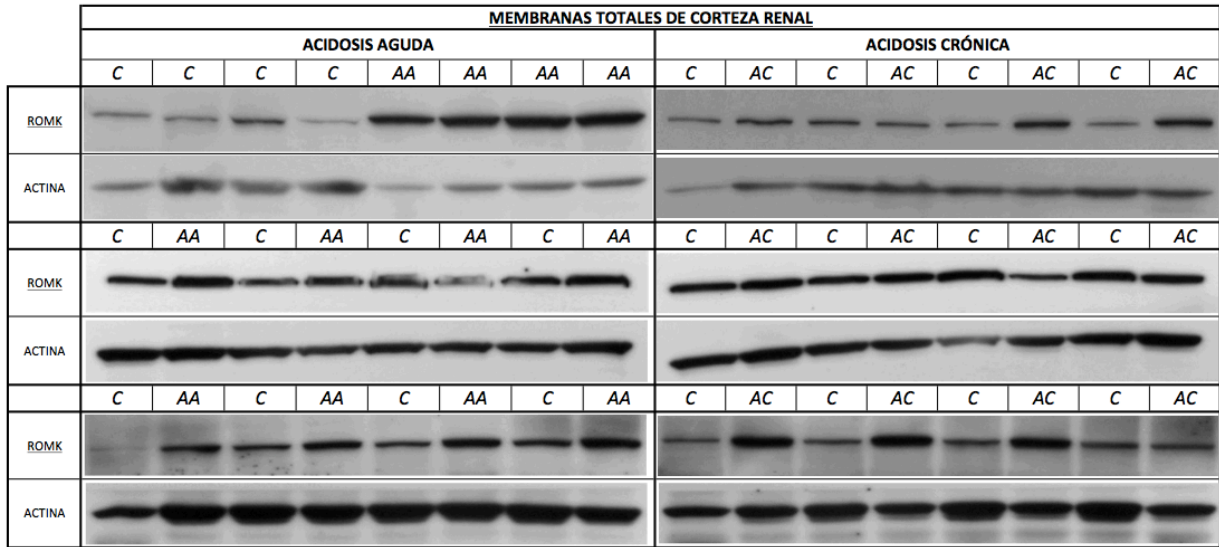


Figura 14 Conjunto de bandas de los ensayos de WB para extractos de membranas totales de corteza renal, tanto para acidosis aguda como para acidosis crónica. En la parte superior de cada grupo de bandas se indica la disposición experimental de las muestras, mediante la nomenclatura de C, AA y AC, las cuales se refieren a control, acidosis aguda y acidosis crónica respectivamente.

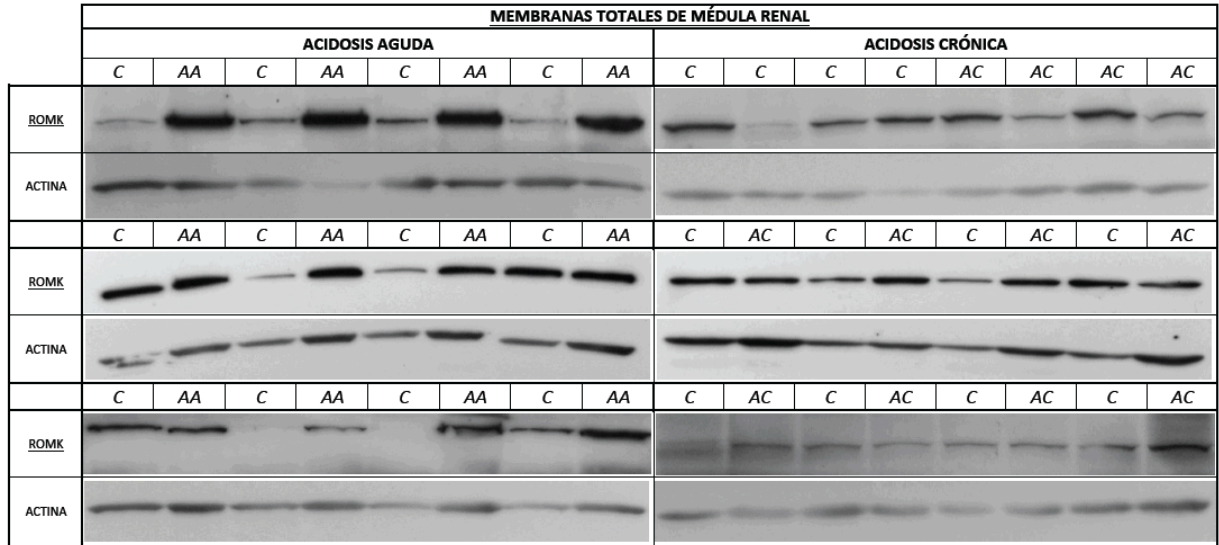


Figura 15 Ensayos de WB para extractos de membranas totales de médula renal, de igual manera, para acidosis aguda y para acidosis crónica. Se utiliza la misma nomenclatura que en la Figura 14.

Las figuras mostradas anteriormente corresponden a la totalidad de los ensayos de extractos protéicos de membranas totales, tanto de corteza como de médula. Recuérdese que la corteza y la médula son regiones renales distintas, en la corteza ROMK se expresa a nivel del túbulo contorneado distal y el conducto colector cortical, y en médula a nivel del asa gruesa ascendente de Henle y el túbulo colector.

También recuérdese que los ensayos con membranas totales permiten estudiar los cambios cuantitativos en la síntesis proteica, particularmente para este caso, del canal de potasio ROMK, esto ya que los extractos de membranas totales incluyen tanto las membranas plasmáticas como las de los organelos celulares (mitocondria, retículo endoplásmico, aparato de golgi, entre otros).

En cambio los ensayos con extractos enriquecidos en membranas plasmáticas son útiles para estudiar los cambios netos cuantitativos en el tráfico del canal ROMK, del medio intracelular a la membrana plasmática y viceversa.

A continuación se presentan las figuras correspondientes a los ensayos de WB para los extractos proteicos de membranas plasmáticas.

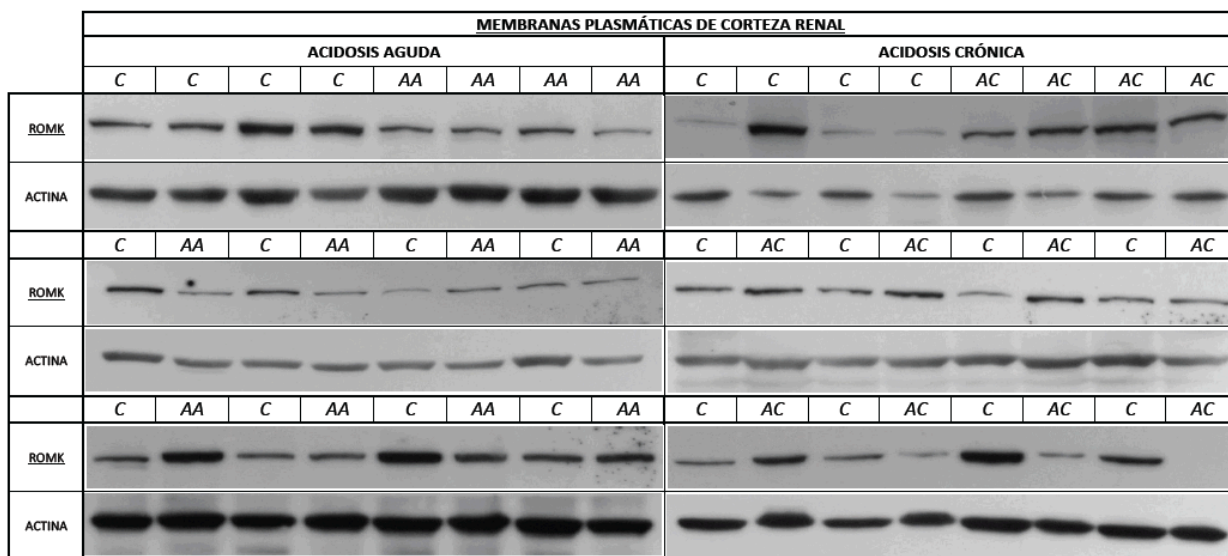


Figura 16 Ensayos de WB para extractos de membranas plasmáticas de corteza renal para acidosis aguda y para acidosis crónica. Se utiliza la misma nomenclatura que en la Figura 14.

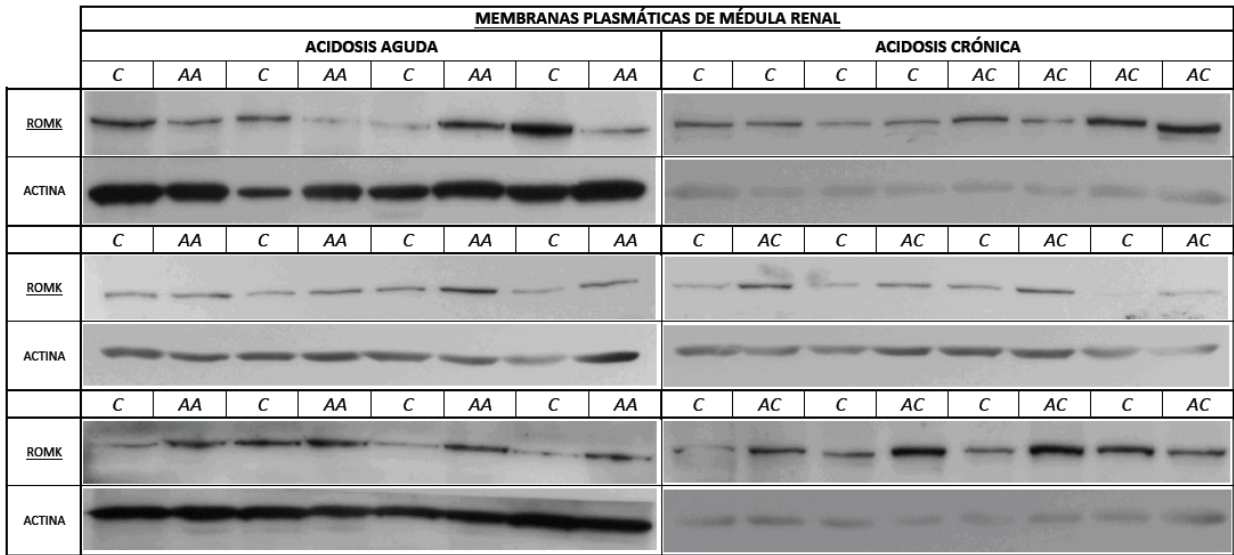


Figura 17 Ensayos de WB para extractos de membranas plasmáticas de médula renal para acidosis aguda, lado izquierdo, y para acidosis crónica, lado derecho. Se utiliza la misma nomenclatura que en la Figura 14.

Algunos ensayos de WB sugieren que existe un aumento de la expresión de ROMK en los sujetos acidóticos, tanto en corteza renal como en médula, así como en acidosis aguda y en acidosis crónica. Presumiblemente estos resultados sugieren una hipótesis acertada, ya que la intensidad de las bandas es proporcional a la cantidad de canal ROMK, lo que se traduce en un aumento de la expresión.

Sin embargo, es esencial hacer un análisis más metódico y preciso. Las bandas de actina, un componente fundamental y abundante del citoesqueleto, nos sirven para normalizar los resultados. A pesar de haber realizado la cuantificación proteica de cada muestra, existen ciertos errores inherentes a la metodología experimental; los ciclos de congelación y descongelación ocasionan una degradación proteica paulatina. De este modo y dando por sentado que la cantidad de actina no varía con acidosis metabólica, la actina es una referencia de la cantidad de proteína cargada durante el ensayo del WB.

Aunque es posible observar en las figuras 14 a 17 que la intensidad de las bandas de actina en la mayoría de los ensayos suele variar poco dentro de un mismo ensayo, en algunos casos es posible observar una variación considerable. Es por esto que para el procesamiento y análisis de datos se llevo a cabo una doble normalización.

Inicialmente se cuantificó la intensidad de las bandas por densitometría óptica con el programa Kodak 1D, tanto de las bandas de ROMK como de las de actina. Posteriormente se obtuvo la razón del valor de cada banda de ROMK entre el valor de su respectiva banda de actina, como una primera normalización. Consecuentemente, con la finalidad de

trabajar con valores mas comprensibles, se realizó una segunda normalización con respecto a la razón ROMK/actina de la primera muestra de cada ensayo; de tal manera que la relación ROMK/actina de la primer muestra siempre se manejó con un valor de 1 y el resto con un valor relativo con respecto a la primer banda.

Con los valores obtenidos se realizó tanto el conjunto de gráficos de las figuras 18 a 21 como el análisis estadístico, ambos con ayuda del programa GraphPad Prism 5. La herramienta estadística utilizada fue t de Student (*Unpaired t test*), con un intervalo de confianza de 95% ($\alpha=0.05$).

Como se puede notar, los casos en los que existe diferencia significativa en la expresión del canal de potasio ROMK en los sujetos acidóticos con respecto a los sujetos control son la minoría; únicamente 7 casos de 24:

1. Acidosis aguda-Corteza renal-Membranas totales (AACxMT) (Fig. 18.A)
2. Acidosis crónica-Corteza renal-Membranas totales (ACCxMT) (Fig. 18.F)
3. Acidosis aguda-Médula renal-Membranas totales (AAMxMT) (Fig. 19.A)
4. Acidosis crónica-Corteza renal-Membranas plasmáticas (ACCxMP) (Fig. 20.E)
5. Acidosis aguda-Médula renal-Membranas plasmáticas (AAMxMP) (Fig. 21.C)
6. Acidosis crónica-Médula renal-Membranas plasmáticas (ACMxMP) (Fig. 21.D)
7. Acidosis crónica-Médula renal-Membranas plasmáticas (ACMxMP) (Fig. 21.E)

Si bien, no es posible asegurar que la expresión del canal ROMK aumenta bajos estadios de acidosis metabólica, tampoco lo es afirmar que no hay efecto alguno.

Esta divergencia en los resultados da lugar a desconfiar *a priori* de los mismos. Sin embargo cabe hacer una acotación sugerente de la naturaleza de los datos, y es que algunos ensayos muestran un aumento significativo de la expresión de ROMK en acidosis, pero no hay ningún ensayo que muestre lo contrario, es decir, una disminución de la expresión de ROMK en acidosis. Con esto podemos descartar que los resultados se deben a errores aleatorios o la variación intrínseca del experimento.

GRÁFICAS COMPARATIVAS DE MEBRANAS TOTALES DE CORTEZA RENAL

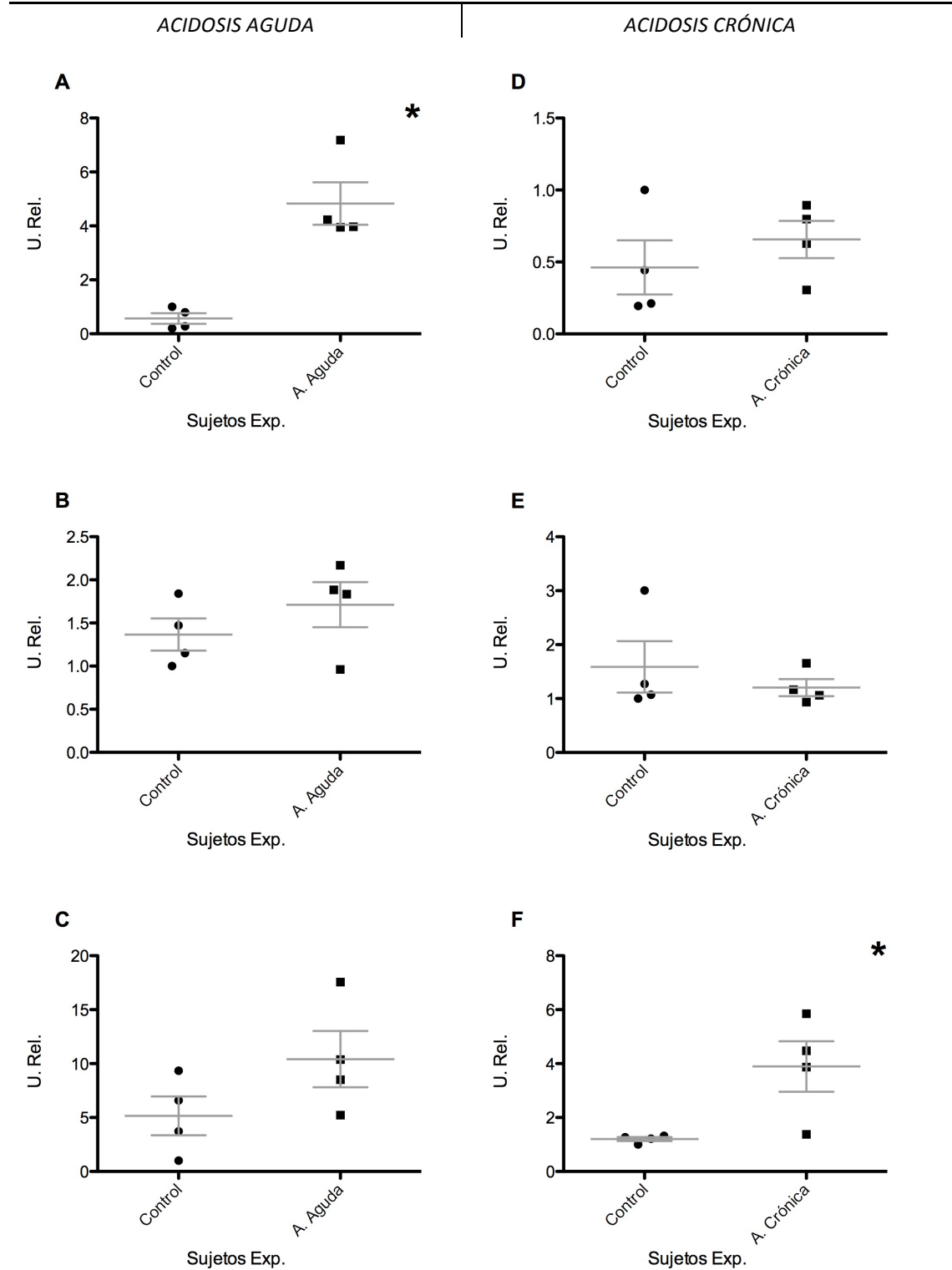


Figura 18 (A-F) Conjunto de gráficas correspondientes a la cuantificación densitométrica de las bandas de los ensayos WB ilustrados en la Figura 14. A, B, y C corresponden a los ensayos de acidosis aguda, y D, E y F corresponden a los de acidosis crónica. Con un asterisco se indican aquellos en los que se encontraron diferencias estadísticas significativas.

GRÁFICAS COMPARATIVAS DE MEBRANAS TOTALES DE MÉDULA RENAL

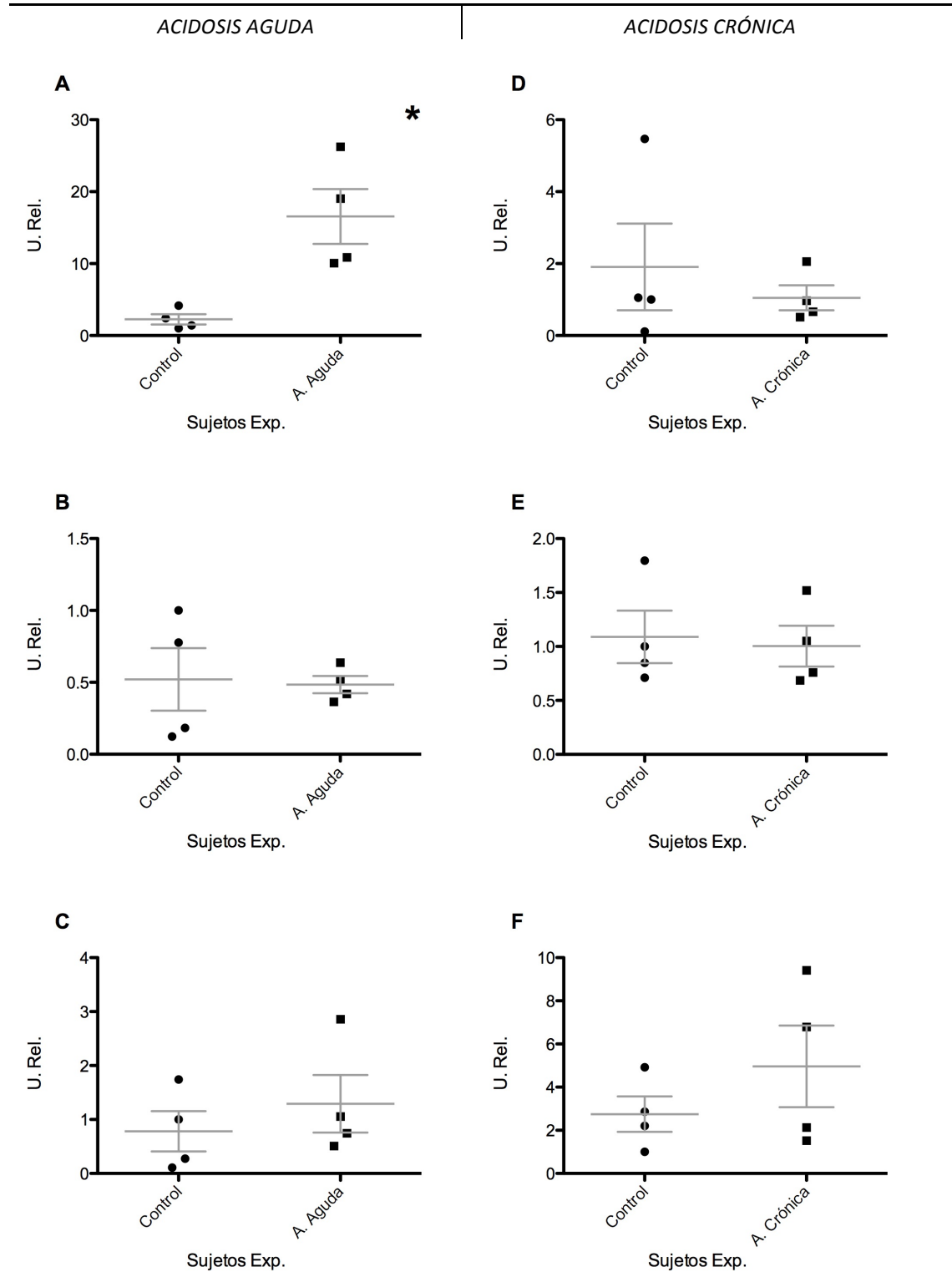


Figura 19 (A-F) El presente conjunto de gráficas es referente a los WB ilustrados en la Figura 15. A, B, y C corresponden a los ensayos de acidosis aguda, y D, E y F corresponden a los de acidosis crónica. De igual manera, aquellos con un asterisco presentan diferencias estadísticas significativas.

GRÁFICAS COMPARATIVAS DE MEMBRANAS PLASMÁTICAS DE CORTEZA RENAL

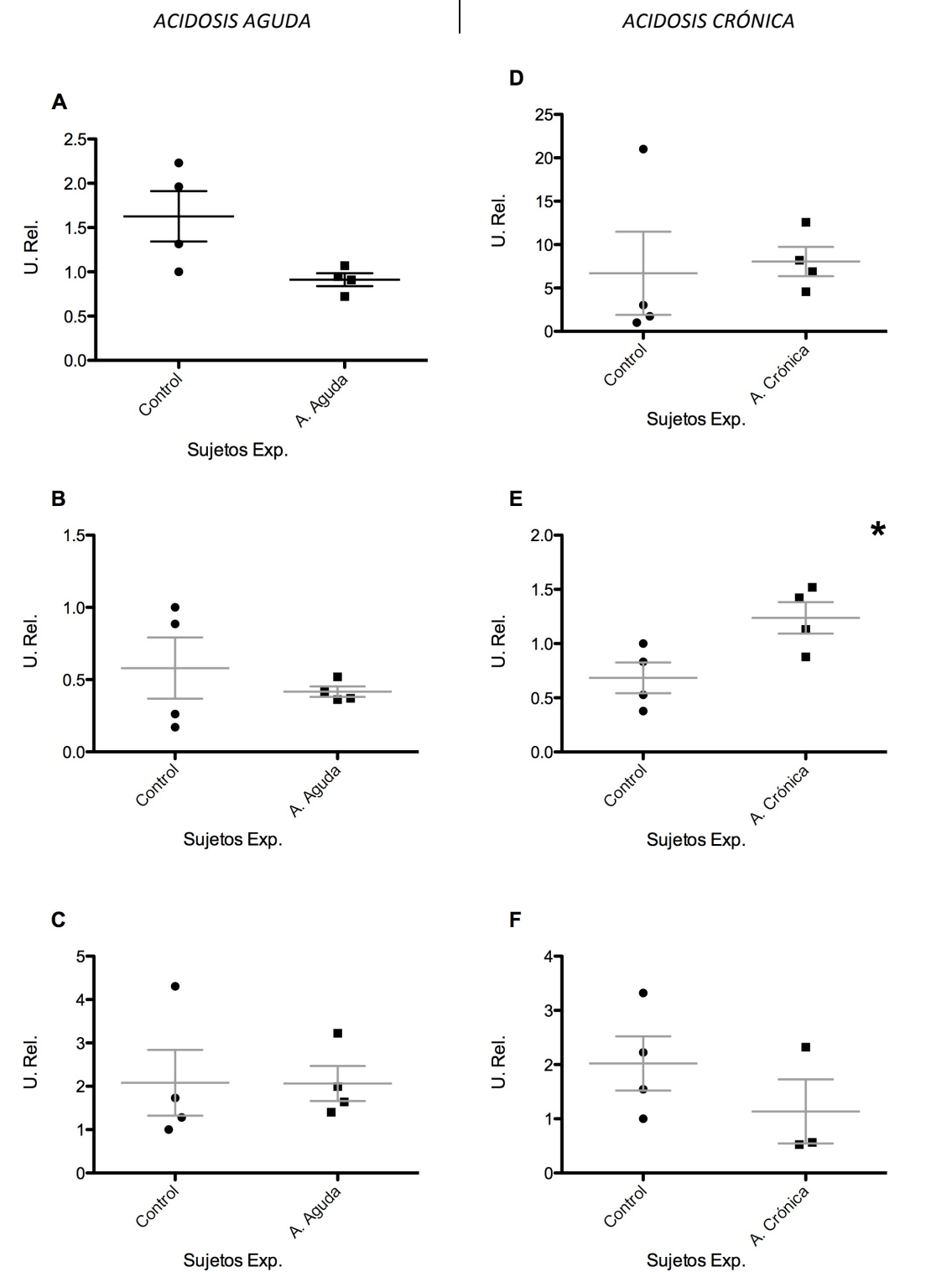


Figura 20 (A-F) Conjunto de gráficas correspondiente a los WB ilustrados en la Figura 16 (Extractos enriquecidos en membranas plasmáticas de corteza). A, B, y C corresponden a los ensayos de acidosis aguda, y D, E y F corresponden a los de acidosis crónica. De igual manera, aquellos con un asterisco presentan diferencias estadísticas significativas.

GRÁFICAS COMPARATIVAS DE MEMBRANAS PLASMÁTICAS DE MÉDULA RENAL

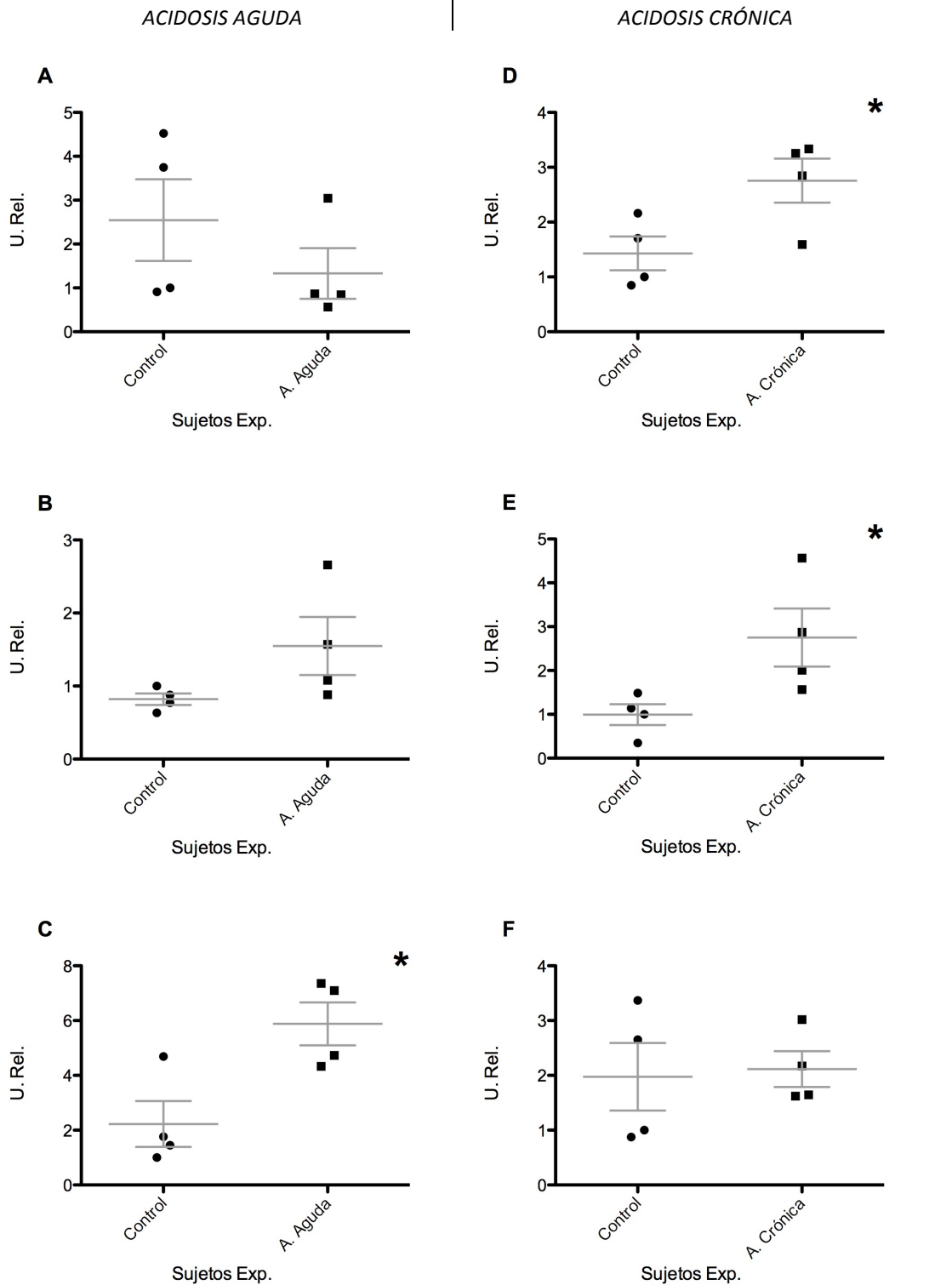


Figura 21 (A-F) Conjunto de gráficas correspondiente a los WB ilustrados en la Figura 17 (Extractos enriquecidos en membranas plasmáticas de médula). A, B, y C corresponden a los ensayos de acidosis aguda, y D, E y F corresponden a los de acidosis crónica. El asterisco marca a aquellos con diferencias estadísticas significativas.

Una explicación muy conveniente es que la expresión del canal ROMK aumenta en estados de acidosis metabólica en pequeñas proporciones, tales que caen justo en el umbral de sensibilidad del método de WB. Es por esto que a pesar de que en los gráficos mostrados podemos observar una tendencia en la mayoría de los datos, la cual sugiere una mayor expresión de ROMK en acidosis, ésta se observa principalmente en los ensayos de membranas totales y se disimula con el error inherente del método.

Este mimetismo de los resultados con el ruido del método es muy comprensible si se considera que el Western Blot es un método semicuantitativo, en donde los datos numéricos corresponde a una medida bidimensional de la intensidad lumínica, la cual es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo 2º unido a anticuerpo 1º unido a su vez al epítotope de la proteína de interés. Y como toda esta relación guarda proporcionalidad directa ponderamos esos valores como referentes de la cantidad de proteína.

Aún así, el aumento significativo de la expresión del canal secretor se observa en ensayos de todos los niveles. Comenzando por los distintos tipos de acidosis, tanto en acidosis crónica como en acidosis aguda se obtuvieron ensayos con aumentos significativos del canal. Por el lado de la acidosis aguda, esto sugeriría que los cambios en la regulación del canal son una respuesta inmediata, ya que con 24 horas de tratamiento ya se observa un aumento del canal. Por el lado de la condición crónica implica que este incremento, además de inmediato, se mantiene por cierto tiempo siempre y cuando se mantengan las condiciones acidogénicas.

A nivel de región renal, el hecho de que el incremento se observe tanto en corteza como en médula concuerda con que la secreción de potasio se presente en la nefrona distal, a nivel medular por el asa gruesa ascendente de Henle y a nivel cortical por el túbulo contorneado distal, el túbulo colector y el conducto colector cortical.

Finalmente, la razón por la cual se realizó el estudio con extractos proteicos de membranas totales así como de membranas plasmáticas fue poder discernir entre un aumento en la expresión de ROMK por:

1. Incremento de la síntesis proteica, lo cual se evidenciaría por un aumento de ROMK en los extractos de membranas totales.
2. Incremento en el trafico del canal de citoplasma a membrana, que se reflejaría en un aumento de ROMK en los extractos enriquecidos de membranas plasmáticas.
3. Ambas, tanto aumento de la síntesis como del tráfico, que se plasmaría con ambas situaciones simultáneamente.

Como se puede apreciar, el aumento del canal se presenta como el último caso, con un incremento tanto a nivel de membranas totales como a nivel de membranas plasmáticas. Es decir se agudizó la síntesis de la proteína aunada a la migración de ésta a membrana.

En el año 2006 se demostró, mediante la técnica de microarreglos, que el transcrito de ROMK aumentaba sus niveles en acidosis. Este hecho empata con el aumento de ROMK en membranas totales, además de sugerir no sólo un aumento en la traducción de ROMK, sino un aumento desde la transcripción. Cabe mencionarse que la técnica de microarreglos es más sensible que la de inmunoblot, permitiendo así, detectar pequeños cambios en la transcripción.

A pesar de que todas estas afirmaciones encajan perfectamente con la explicación inicial queda pendiente la respuesta a ¿Cómo puede ser el canal ROMK de entre los 3 canales (ROMK, MaxiK y Kv1.3) el responsable del aumento de la secreción de potasio en acidosis cuando sencillamente el aumento en su expresión es minúsculo? Para esto entiéndase que este estudio no descarta a los otros dos canales como participantes en la secreción de potasio en estados de acidosis. Inclusive el equipo de la Dra. Laura Escobar lleva de manera simultánea el estudio del canal Kv1.3, el cual, en resultados preliminares, presume de una participación significativa en la excreción de potasio. Así, posiblemente la kaliuresis es resultado de una cooperación aditiva de canales secretores en la nefrona distal.

Sin embargo también se puede conjeturar otra posibilidad y es que la secreción de potasio por ROMK no este enteramente ligada a la proporción de *proteína* expresada. Recuérdese el estudio antes citado de Lu et al. de 2004, en el que se habla de dos canales específicamente, el primero identificado con una conductancia unitaria de 30-pS, correspondiente al tetrámero de subunidades ROMK y el segundo, de conductancia unitaria de 70-pS, cuya conformación esta supuesta como una forma heterotetramérica de subunidades de ROMK junto con distintas proteínas. Aunado a esto, recuérdese la teoría de la reestructuración de los canales, en la cual se menciona que ante la necesidad de secretar potasio, los canales de 30-pS se desarman para utilizar las subunidades de ROMK para la formación de los canales de 70-pS. Considerando éste mecanismo, y el hecho de que el canal de 70-pS sea secretor de potasio, es evidente que no es necesario un incremento cuantioso de la síntesis de proteica para aumentar la secreción de potasio mediante canales *conformados* por subunidades de ROMK, y así, el aumento de ROMK a nivel de membranas totales no precisa de ser cuantioso. De igual manera, el aumento de ROMK en membranas plasmáticas también es poco, ya que la reestructuración de canales implica una disminución de canales de 30-pS y un aumento de aquellos de 70-pS, mas que un aumento significativo de la migración neta de canales.

Todo esto pone de manifiesto la necesidad de complementar el estudio con pruebas adicionales que nos permitan obtener resultados concluyentes. Entre las técnicas con las se podría continuar el estudio se encuentra la técnica de microperfusión de túbulos renales. Para esto se disectan túbulos renales y se conecta a micropipetas por ambos extremos, por uno se perfunde un medio de composición definida y por otro se colecta el medio saliente para analizarlos y determinar los cambios que ha sufrido debido a los mecanismos de transporte transepitelial (Burg & Knepper, 1986).

Así que, utilizando bloqueadores específicos para ROMK (Denton, Weaver, Lewis, Chauder, & Craig, n.d.) en túbulos renales obtenidos de ratas, tanto acidóticas como control, es posible determinar la contribución del canal ROMK en la secreción de potasio bajo condiciones de acidosis.

Evidentemente la manera de estudiar la hipótesis del canal de 70-pS es utilizando la misma técnica que usaron en el estudio de Ming Lu, la de fijación de membrana (*patch clamp*). Ésta consiste en un método electrofisiológico que nos permite medir el flujo de entidades cargadas a través de membranas biológicas mediante canales iónicos. El método también permite ajustar el voltaje en el sistema, permitiéndonos así, medir la dependencia de los canales hacia el potencial eléctrico. Utilizando esta técnica se podrían detectar cambios en la abundancia de los canales de 70-pS y de 30-pS a nivel de membrana.

CONCLUSIONES

Los resultados experimentales son muy sugerentes del aumento de expresión del canal ROMK en estados de acidosis metabólica, tanto de la síntesis de nueva proteína como del aumento del tráfico del canal hacia la membrana plasmática.

Sin embargo el método de Western Blot no permite demostrar definitivamente la hipótesis planteada debido al error intrínseco. Esto es sugerente de un aumento minúsculo de la expresión del canal.

Estos resultados aunados a los resultados preliminares del estudio del canal Kv1.3 que también lleva a cabo el equipo de trabajo de la Dra. Laura Escobar, colocan 2 nuevas hipótesis a la vista:

1. El canal ROMK participa en la secreción de potasio en acidosis metabólica, pero en menor medida que el canal Kv1.3
2. El canal ROMK participa en la secreción de potasio en la acidosis metabólica mediante mecanismos de reestructuración de canales, lo cual no exige un aumento significativo de la síntesis proteica.

Se han propuesto 2 técnicas experimentales para continuar con el estudio, la técnica de microperfusión y la técnica de fijación de membrana o *patch clamp*.

PERSPECTIVAS

- Medir el cambio de la expresión del canal ROMK en estados de acidosis, con las técnicas de microperfusión y la técnica de fijación de membrana.
- Observar el cambio de la expresión del canal ROMK en estados de acidosis mediante la técnica de inmunohistoquímica.
- Obtener extractos de membranas plasmáticas en lugar de extractos enriquecidos de membranas plasmáticas y realizar las pruebas experimentales mencionadas, para localizar a que nivel se da el cambio de la expresión del canal.
- Determinar el tiempo de respuesta en la rata en la expresión del canal ROMK ante condiciones acidogénicas y la cinética que sigue.
- Determinar que otros canales de potasio responden a la acidosis.

REFERENCIAS

- Alarcón, G., & Valentín, A. (Eds.). (2012). *Introduction to Epilepsy* (p. 300). Cambridge: Cambridge University Press. Retrieved from <http://books.google.com/books?id=SaKLcwGIZSoC&pgis=1>
- Alberts, B., & Bray, D. (2006). *Introducción a la biología celular* (p. 740). Ed. Médica Panamericana. Retrieved from <http://books.google.com/books?id=qrrYZJhrRm4C&pgis=1>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21054/>
- Avenidaño, L. H., & Hernando. (2009). *Nefrología Clínica* (Vol. 3, p. 1086). Ed. Médica Panamericana. Retrieved from <http://books.google.com/books?id=LfvX3WgYsNIC&pgis=1>
- Berkefeld, H., Fakler, B., & Schulte, U. W. E. (2010). Ca²⁺-Activated K⁺ Channels : From Protein Complexes to Function. *Physiological Reviews*, (90), 1437–1459. doi:10.1152/physrev.00049.2009.
- Boron, W. F., & Boulpaep, E. L. (2008). *Medical Physiology E-Book (Google eBook)* (Vol. 2008, p. 1352). Elsevier Health Sciences. Retrieved from <http://books.google.com/books?id=HIMJRW08ihgC&pgis=1>
- Burg, M. B., & Knepper, M. a. (1986). Single tubule perfusion techniques. *Kidney international*, 30(2), 166–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3761862>
- Carrisoza Gaytán, R. (2012). *Expresión y distribución de los canales de potasio activados por voltaje (Kv) en el epitelio renal*. UNAM.
- Cheval, L., Morla, L., Elalouf, J.-M., & Doucet, A. (2006). Kidney collecting duct acid-base “regulon”. *Physiological genomics*, 27(3), 271–81. doi:10.1152/physiolgenomics.00069.2006
- Christov, M., & Alper, S. L. (2010). Tubular transport: core curriculum 2010. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*, 56(6), 1202–17. doi:10.1053/j.ajkd.2010.09.011
- Costanzo, L. S. (2000). *Fisiología* (p. 468). México: McGraw-Hill Interamericana.

- Cox, D. H. (2011). Ca²⁺-regulated ion channels. *BMB reports*, (September), 635–646. Retrieved from <http://www.bmbreports.org/jbmb/pdf.php?data=MTIxMDA3MjJAcGRmX3JhaW50cmFjZV9sZWV5c0AlNUi0NC0xMCU1RDExMTAyODE1MDI4fjI4NjM1LTU0NiUyOUJNQjExLTAwOSUyOHJldmllZlIIMjkucGRm>
- Denton, A. J. S., Weaver, C. D., Lewis, L. M., Chauder, B. A., & Craig, W. (n.d.). Discovery of a small molecule inhibitor of ROMK and Kir7.1. *Molecular Libraries (Probe Report)*, (Cid 4536383).
- Flórez, J. (2003). *Farmacología Humana* (p. 1400). Elsevier España. Retrieved from <http://books.google.com/books?id=OvEPlvUwSqQC&pgis=1>
- Good, D. W. (1990). Adaptation of HCO⁻³ and NH⁺⁴ transport in rat MTAL: effects of chronic metabolic acidosis and Na⁺ intake. *The American journal of physiology*, 258(5 Pt 2), F1345–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2337153>
- Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., & Findlay, I. A. N. (2010). Inwardly Rectifying Potassium Channels : Their Structure , Function , and Physiological Roles. *Physiological Reviews*, 291–366. doi:10.1152/physrev.00021.2009.
- Kraut, J. a, & Madias, N. E. (2010). Metabolic acidosis: pathophysiology, diagnosis and management. *Nature reviews. Nephrology*, 6(5), 274–85. doi:10.1038/nrneph.2010.33
- Levy, M. N., Koeppen, B. M., & Stanton, B. A. (2006). *Berne y Levy fisiología* (p. 836). Elsevier España. Retrieved from <http://books.google.com/books?id=-n3C1jqrhoMC&pgis=1>
- Lu, M., Wang, T., Yan, Q., Wang, W., Giebisch, G., & Hebert, S. C. (2004). ROMK is required for expression of the 70-pS K channel in the thick ascending limb. *American journal of physiology. Renal physiology*, 286(3), F490–5. doi:10.1152/ajprenal.00305.2003
- Müller-Esterl, W. (2009). *Bioquímica. Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida* (p. 680). Reverte. Retrieved from <http://books.google.com/books?id=X2YVG6Fzp1UC&pgis=1>
- OMIM Entry - * 600359 - POTASSIUM CHANNEL, INWARDLY RECTIFYING, SUBFAMILY J, MEMBER 1; KCNJ1. (n.d.). Retrieved October 10, 2012, from <http://omim.org/entry/600359>
- Stuart, F. (2008). *Fox: Fisiología humana, 10a edc.* (p. 800). McGraw-Hill Interamericana. Retrieved from <http://books.google.com/books?id=XAVcPwAACAAJ&pgis=1>

- Vinay, P., Allignet, E., Pichette, C., & Watford, M. (1980). Changes in renal metabolite profile and ammoniogenesis during acute and chronic metabolic acidosis in dog and rat. *Kidney international*, 17, 312–25. Retrieved from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Acute Acidosis%22 rat 24 hours](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Acute+Acidosis%22+rat+24+hours)
- Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W. (2007). *Fundamentos De Bioquímica/ Fundamental of Biochemistry* (p. 1130). Ed. Médica Panamericana. Retrieved from <http://books.google.com/books?id=FXDiqLK6GmAC&pgis=1>
- Wang, W.-H. (2006). Regulation of ROMK (Kir1.1) channels: new mechanisms and aspects. *American journal of physiology. Renal physiology*, 290(1), F14–9. doi:10.1152/ajprenal.00093.2005
- Waxman, S. G. (2007). *Molecular Neurology (Google eBook)* (p. 584). Academic Press. Retrieved from <http://books.google.com/books?id=cZvHKy7TcxEC&pgis=1>
- Xu, J. Z., Hall, A. E., Peterson, L. N., Bienkowski, M. J., Thomas, E., Hebert, S. C., Arroyo, J. P., et al. (2012). Localization of the ROMK protein on apical membranes of rat kidney nephron segments. *American journal of physiology. Renal physiology*, 273, F739–F748.

APÉNDICE

SOLUCIONES Y REACTIVOS

- **SOLUCIÓN TRIS GLICINA (ELECTROFORESIS)**

<i>COMPONENTE</i>	<i>CANTIDAD PARA 1L</i>	<i>CONCENTRACIÓN FINAL</i>
Trizma base	3.02 g	25 mM
Glicina grado electroforesis	18.8 g	250 mM
SDS	1 g	0.1%
Agua destilada	cbp 1L	

- **SOLUCIÓN DE TRANSFERENCIA**

<i>COMPONENTE</i>	<i>CANTIDAD PARA 500 mL</i>	<i>CONCENTRACIÓN FINAL</i>
Trizma base	1.51 g	25 mM
Glicina grado electroforesis	7.2 g	191 mM
Metanol	100 mL	20%
Agua destilada	cbp 500 mL	

- **SOLUCIÓN AMORTIGUADORA TRIS 1.5 M pH=8.8**

Preparar y ajustar pH a 8.8 con HCl 1:2 antes de aforar, filtrar y almacenar a 4°C.

<i>COMPONENTE</i>	<i>CANTIDAD PARA 50 mL</i>	<i>CONCENTRACIÓN FINAL</i>
Trizma base	9.0825 g	1.5 M
Agua destilada	cbp 50 mL	

- **SOLUCIÓN AMORTIGUADORA TRIS 1.0 M pH=6.8**

Preparar y ajustar pH a 6.8 con HCl 1:2 antes de aforar, filtrar y almacenar a 4°C.

<i>COMPONENTE</i>	<i>CANTIDAD PARA 50 mL</i>	<i>CONCENTRACIÓN FINAL</i>
Trizma base	6.055 g	1.0 M
Agua destilada	cbp 50 mL	

- **SOLUCIÓN AMORTIGUADORA PARA LA EXTRACCIÓN PROTÉICA**

Preparar y ajustar pH a 7.6 con HCl 1:2 antes de aforar, almacenar a -20°C. Al momento de usar, añadir 500 µL de PMSF 0.1 M en EtOH absoluto y una tableta de inhibidores de proteasas (Complete Roche®)

<i>COMPONENTE</i>	<i>CANTIDAD PARA 100 mL</i>	<i>CONCENTRACIÓN FINAL</i>
Sacarosa	8.55 g	250 mM
EDTA (disódico)	0.0372 g	1 mM
Sol. Amortiguadora Tris 1.5 M	666 µL	10 mM
Agua destilada	cbp 100 mL	

- **SOLUCIÓN DE CLORURO DE AMONIO**

<i>COMPONENTE</i>	<i>CANTIDAD PARA 1 L</i>	<i>CONCENTRACIÓN FINAL</i>
Cloruro de amonio	14.9772 g	280 mM
Agua destilada	cbp 1 L	

TÉCNICAS EXPERIMENTALES

- **OBTENCIÓN Y HOMOGENIZACIÓN DE TEJIDO**

- Una vez concluido el protocolo dietario, sacrificar a las ratas y sustraer un riñón y el cerebelo
- Mediante disección, separar el riñón en corteza y médula.
- Pesar alrededor de 0.15g de cada tejido.
- Depositar los tejidos pesados por separado en pequeños contenedores cilíndricos y añadir 1mL de solución amortiguadora para extracción proteica por cada 0.1g de tejido.
- Homogenizar con el Tissue Tearor® con 3 pulsos de 10 segundos, en el caso de corteza, y con 5 pulsos de 10 segundos en el caso de médula y de cerebelo.
- Almacenar las muestras homogenizadas a -20°C hasta su utilización.

- **AISLAMIENTO DE MEMBRANAS**

- Descongelar las muestras homogenizadas y alicuotarlas en dos tubos eppendorf por mitad.
- Centrifugar a 1000G a 4°C por 10 minutos
- Recuperar el sobrenadante.
- Almacenar un sobrenadante recuperado como membranas totales (MT)
- Centrifugar a 17000G a 4°C por 20 minutos el otro sobrenadante recuperado.

- Recuperar el sobrenadante y etiquetar como extracto citosólico y enriquecido en membranas microsomaes (MM)
- Resuspender el pellet en 1/10 del volumen original y etiquetar como extracto enriquecido en membranas plasmáticas (MP).
- Almacenar las muestras a -20°C hasta su próxima utilización.

- **CUANTIFICACIÓN PROTEICA POR COLORIMETRÍA (ENSAYO DE LOWRY MODIFICADO)**

- Preparar curva de albumina de 5 puntos (0.3, 0.6, 0.9, 1.2 y 1.5 mg/mL).
- Descongelar muestras y diluirlas 1:15 en solución salina.
- Mezclar los reactivos y la muestra según la siguiente tabla. Utilizar como blanco solución salina

Componente	Volumen	
	Celda de 1 mL	Microplaca
Reactivo A	0.1mL	25 microL
Muestra	20 microL	5 microL
Reactivo B	0.8mL	200 microL

- Incubar 10 minutos a temperatura ambiente
- Leer absorbancia a 750nm.

- **ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS**

- Preparar geles de poliacrilamida, gel concentrador al 5% y gel separador al 8%.
- Descongelar las muestras y mezclar un volumen determinado con buffer de carga (95% buffer de Laemmli BioRad® y 5% beta-mercaptoetanol) en relación 1:1.
- Desnaturalizar las muestras a 70°C por 10 minutos.
- Montar el sistema electroforético utilizar como buffer de corrida solución tris glicina.
- Cargar los geles con las muestras, utilizar volúmenes de muestra equivalentes a 50microg de proteína para MT y Ce y 40microg de proteínas para MP.
- Cargar marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Standards BioRad®)
- Correr la electroforesis a 200V hasta lograr la separación deseada.

- **TRANSFERENCIA SEMIHÚMEDA**

- Humectar la membrana de PVDF con metanol y pasarla inmediatamente junto con las toallas para electrotransferencia a un contenedor con solución de transferencia.
- Esperar alrededor de 10 minutos.
- Montar el Transblot con las toallas, la membrana previamente humectada, el gel a transferir y nuevamente una toalla en la parte superior.
- Correr la transferencia a 10V por una hora.

- Al finalizar el tiempo, bloquear la membrana con leche descremada al 5% en solución TBST por una hora.

- **INCUBACIÓN CON ANTICUERPOS**

- Preparar el volumen de anticuerpo primario necesario a la dilución requerida en solución TBST.
- Incubar la membrana en un recipiente con el anticuerpo diluido, a 4°C por 18 horas, en el caso de anti-ROMK, y a temperatura ambiente por 1 hora, en el caso de anti-actina.
- Al finalizar el tiempo, lavar la membrana durante 10 minutos por triplicado con solución TBST.
- Preparar el volumen de anticuerpo secundario necesario a la dilución requerida en solución TBST.
- Incubar la membrana en un recipiente con el anticuerpo anti-conejo diluido, a temperatura ambiente por 1 hora.
- Al finalizar el tiempo, lavar la membrana durante 10 minutos por triplicado con solución TBST.
- Proceder con el revelado.