



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIO DE LA GLICOSILACIÓN DEL CANAL CATIÓNICO HCN3 ACTIVADO  
POR VOLTAJES HIPERPOLARIZANTES DEL RIÑÓN DE LA RATA**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**CECILIA COSETE AYALA AGUILERA**



**MÉXICO, D.F.**

**2015**



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: María Eugenia Torres Márquez

**VOCAL:** Profesor: Elena Zambrano Gonzales

**SECRETARIO:** Profesor: Leonila Irma Laura Escobar Pérez

**1er. SUPLENTE:** Profesor: Aurora Lara Núñez

**2° SUPLENTE:** Profesor: Ruth Bustamante García

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Laboratorio 510 del edificio A en la Facultad de Medicina de la UNAM.

## **ASESOR DEL TEMA:**

Dra. Leonila Irma Laura Escobar Pérez

## **SUSTENTANTE:**

Cecilia Cosete Ayala Aguilera





# Índice

---

<b>Resumen.....</b>	<b>7</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>8</b>
1. Modificaciones post-traduccionales .....	8
2. Tipos de N-glicosilación .....	11
3. Canales iónicos.....	13
4. Canales HCN.....	14
5. N-glicosilación de los Canales HCN.....	17
6. Fisiología del riñón .....	19
7. Mecanismos renales para la formación de orina.....	20
8. Regulación de la homeostasis .....	22

<b>Antecedentes.....</b>	<b>26</b>
<b>Hipótesis.....</b>	<b>29</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>29</b>
<b>Metodología.....</b>	<b>30</b>
<b>Resultados y Discusión.....</b>	<b>34</b>
<b>Conclusión.....</b>	<b>44</b>
<b>Perspectivas.....</b>	<b>44</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>45</b>
<b>Apéndice.....</b>	<b>48</b>

# Resumen

---

Las proteínas con la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr son susceptibles a ser modificadas por una *N*-glicosilación<sup>1,2</sup>, es decir, se unen a un oligosacárido del tipo Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> a la cadena polipeptídica mediante un enlace amida a la asparagina<sup>3</sup>.

Los canales iónicos HCN presentan una secuencia consenso para la *N*-glicosilación y está presente en las cuatro isoformas del canal. Está demostrado que los canales HCN1 y HCN2 están *N*-glicosilados, lo que incrementa de ~4 a ~20 kDa su peso molecular.<sup>4-9</sup>

Nuestro laboratorio, identificó a la familia de canales HCN en el riñón de la rata y fue el primer laboratorio en identificar la participación del canal HCN2 en el transporte de amonio en el riñón<sup>10,11</sup>. La inmunodetección por Western blot del HCN3 reveló la presencia de dos bandas inmunoreactivas, una de 86 kDa y otra banda 65 kDa. El objetivo de este trabajo fue determinar si el canal HCN3 en hipotálamo y riñón presenta *N*-glicosilación, como ocurre con el HCN2<sup>12</sup>,

Se realizaron ensayos enzimáticos con una glicosidasa (PNGasa F) con una fracción enriquecida de membranas plasmáticas de hipotálamo, corteza y medula externa renal de ratas. Las condiciones experimentales fueron las siguientes: solución de fosfatos 0.025M, pH 8.6; EDTA 0.025M; β-Mercaptoetanol 1%; PMSF 1mM; SDS 0.13%; NP-40 0.8% y 45 µg de proteína. Desnaturalización a 95°C por 10 minutos, seguido de una incubación a 37°C por 20 horas con 5 U de enzima PNGasa F. Posteriormente, se inmunodetectaron los canales HCN2 y HCN3.

El resultado de los ensayos enzimáticos indica que el canal HCN3 en hipotálamo está *N*-glicosilado y que el canal HCN3 renal no lo está. También se sugiere que la banda de ~65 kDa del HCN3 observada en hipotálamo, corteza y medula renal es resultado de una proteólisis.



# Introducción

---

## 1. Modificaciones post-traduccionales.

Durante las últimas décadas los científicos han descubierto que el proteoma humano es más complejo que el genoma humano. Se estima que el genoma humano comprende entre 20,000 y 25,000 genes, mientras que el número total de proteínas en el proteoma humano es mayor a 1 millón. Varios mecanismos como son la recombinación genómica, iniciación de la transcripción en promotores alternos, terminación diferencial de la transcripción y edición alternativa de los transcritos generan diferentes ARNm transcritos a partir de un solo gen<sup>13</sup>.

Las modificaciones post-traduccionales (MPT) incrementan la variabilidad de las proteínas en la célula e incrementan la diversidad proteómica. Las MPT son un mecanismo bioquímico por el cual los residuos de aminoácidos de una proteína se modifican covalentemente después de su síntesis en el ribosoma<sup>14</sup>; juegan un papel clave en la proteómica funcional<sup>15</sup> ya que regulan la actividad, la localización y la interacción con otras moléculas como son las proteínas, los ácidos nucleídos, los lípidos y los cofactores<sup>13</sup>.

Las MPT pueden alterar drásticamente la función biológica de una determinada proteína. Además, la incidencia de una reacción de modificación post-traducciona depende de la orientación espacial de los residuos de aminoácidos específicos, así como de sus aminoácidos vecinos que confieren selectividad y reactividad, afectando la naturaleza electrofílica del residuo de aminoácido que es modificado. Estas modificaciones ocurren en distintos aminoácidos de las cadenas laterales o en los enlaces peptídicos y son comúnmente mediadas por enzimas. Se estima que el 5% del proteoma comprende enzimas que llevan a cabo más de 200 tipos de modificaciones post-traduccionales. Las enzimas que se incluyen son cinasas, fosfatasas, transferasas y ligasas, que remueven o adicionan grupos funcionales, proteínas, lípidos o azúcares hacia o desde aminoácidos de cadenas laterales, y proteasas, que cortan enlaces peptídicos para remover secuencias específicas o subunidades reguladoras. Muchas proteínas también pueden modificarse ellas mismas usando dominios autocatalíticos, como son las autocinasas y los dominios autoproteolíticos.<sup>15</sup>

A continuación se enlistan algunas de las MPT más comunes en las proteínas:

- **Fosforilación**

La fosforilación reversible de proteínas, ocurre principalmente en los residuos de serina, treonina o tirosina, donde se une un grupo  $\text{PO}_3^{-2}$  por la acción de enzimas cinasas. Es una de las modificaciones post-traduccionales más importantes y mejor estudiadas, que juega un papel crítico en la regulación de muchos procesos celulares, incluyendo la del ciclo celular, el crecimiento, la apoptosis y las vías de transducción de señales.

- **Ubiquitinación**

La ubiquitina es un polipéptido de 8 kDa que consta de 76 aminoácidos que se añade a la  $\text{NH}_2$ -terminal de la lisina en proteínas diana a través de la glicina C-terminal de ubiquitina. Después del proceso inicial de monoubiquitinación, se puede producir la formación de un polímero de ubiquitina y proteínas poliubiquitinadas. Entre las funciones de la ubiquitinación se encuentran: la regulación de la degradación en el proteosoma y lisosoma, el reclutamiento de proteínas que participan en vías de señalización; la regulación de la interacción, actividad y localización de las proteínas.

- **N-acetilación**

La N-acetilación es la transferencia de un grupo acetil ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ) al nitrógeno, ocurre en casi todas las proteínas de eucariotas. Un grupo de acetiltransferasas catalizan la transferencia del grupo acetil de la acetil-CoA al amino terminal de un residuo de lisina de la cadena peptídica aun unida al ribosoma. Mientras que el 80-90% de las proteínas de los eucariotas están N-acetiladas, su papel biológico aun no es claro<sup>16</sup>.

- **Metilación.**

La metilación es la transferencia de grupos metilo de un carbono a un nitrógeno u oxígeno (N y O-metilación, respectivamente) a las cadenas laterales de aminoácidos; incrementa la hidrofobicidad de la proteína y puede neutralizar una carga negativa de un aminoácido cuando se une a los ácidos carboxílicos. La metilación está mediada por metiltransferasas, y S-adenosil metionina es el principal donador de grupos metilo<sup>13</sup>.

- **Lipidación.**

La lipidación es un método para dirigir a las proteínas a las membranas de orgánulos (retículo endoplasmático, aparato de Golgi, mitocondrias), vesículas (endosomas, lisosomas) y a la membrana plasmática. La lipidación aumenta la hidrofobicidad de una proteína y por lo tanto su afinidad por las membranas<sup>13</sup>.

- **Proteólisis.**

Las proteasas comprenden una familia de enzimas que escinden los enlaces peptídicos críticos en el procesamiento de antígenos, la apoptosis, la translocación a la superficie de la proteína y la señalización celular.

La proteólisis es crítica para eliminar proteínas mal plegadas y para mantener las concentraciones de las proteínas. También juegan un papel en la biología celular biosintética que incluye la escisión de péptidos señal de proteínas nacientes y la activación de zimógenos. En este sentido, las proteasas actúan como interruptores moleculares para regular la actividad de la enzima.

Una clasificación para las proteasas se basa en los grupos de sitios activos de una proteasa dado que están implicados en la proteólisis, más del 90% de las proteasas conocidas caen en una de las cuatro categorías siguientes<sup>13</sup>:

- a) Serina proteasas
- b) Cisteína proteasas
- c) Ácido aspártico proteasas
- d) Metaloproteasas de zinc.

- **Glicosilación.**

La glicosilación de proteínas es la modificación post-traducciona l más abundante en la naturaleza y contribuye en numerosas funciones biológicas. Las unidades de glicanos en las glicoproteínas son cruciales para la secreción de proteínas, influyen en el plegamiento proteico, contribuyen con la supervisión del control de calidad en el retículo endoplasmático (RE), median el transporte y la selección de proteínas a través de la vía secretora.

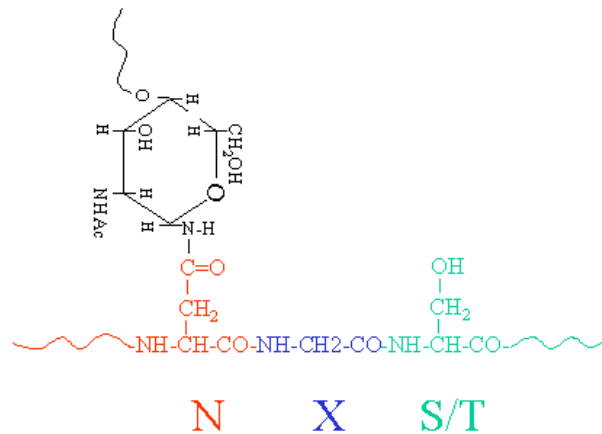
Las estructuras de glicanos también contribuyen a la regulación de las funciones del citosol y el núcleo, a la vigilancia del sistema inmune, en la acción hormonal y la metástasis tumora l<sup>3</sup>.

## 2. Tipos de glicosilación.

Los glicanos se pueden unir a los polipéptidos a través de diferentes enlaces: mediante un enlace amida (Figura 1) en las cadenas laterales de Asn (*N*-glicosilación), con enlace glucosídicos (*O*-glicosilación) a las cadenas laterales de Ser / Thr, o a través de enlaces C-C al Trp (*C*-manosilación)<sup>3</sup>

La **N-glicosilación** de las proteínas es una modificación post-traducciona l que ocurre tanto en procariontes como en eucariontes<sup>1,2</sup> y se refiere a la unión de un oligosacárido a un átomo de nitrógeno, por lo general el N4 del residuos de asparagina de proteínas secretadas o unidas a la membrana (Figura 1).

En eucariotas, la *N*-glicosilación comienza como un evento co-traducciona l en el retículo endoplasmático, donde un oligosacárido de  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  (glucosa, manosa y *N*-acetilglucosamina, respectivamente) se une a la cadena del polipéptido naciente con la secuencia consenso para la *N*-glicosilación (Asn-X-Ser/Thr). Después el oligosacárido se escinde a  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$  y la proteína se transfiere al aparato de Golgi, donde los glicanos pierden un número variable de residuos de manosa y adquieren una estructura más compleja durante un proceso llamado 'glicosilación terminal'<sup>1,2</sup>



**Figura 1. Enlace amida en la N-glicosilación.** Se muestra el sitio consenso N-X-S/T en la cadena polipeptídica y el glicano (N-acetilglucosamina) unido a la Asparagina (N) por un enlace amida.

La **O-glicosilación** de las proteínas secretadas o unidas a la membrana es un evento post-traducciona que inicia en el aparato de Golgi. A diferencia de la N-glicosilación, la O-glicosilación no tiene una secuencia consenso, pero se sabe que los glicanos se unen a residuos de Ser y Thr. Los Glicanos O-ligados juegan un papel importante en la localización, la solubilidad, la antigenicidad de las proteínas y las interacciones célula-célula.

El tipo más común de O-glicosilación en las proteínas de mamíferos, es la adición de N-acetilgalactosamina (GalNAc). El GalNAc puede ampliarse o modificarse por sialilación, sulfatación, acetilación, fucosilación y polilactosamina-extención<sup>16,17</sup>.

La **C-glicosilación** es la unión covalente de un residuo de manosa a un residuo de triptófano dentro de una proteína extracelular. Se han propuesto dos secuencias consenso para C-manosilación: Trp-X-X-Trp (en el que los residuos del primero o ambos triptófanos se convierten en manosilados), y Trp-Ser / Trp-X-Cys<sup>16</sup>.

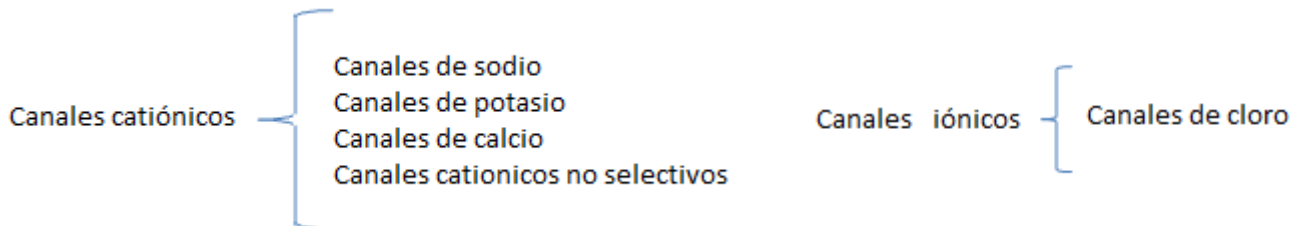
### 3. Canales iónicos.

Los canales iónicos son proteínas presentes en las membranas de los animales y plantas. Estas proteínas afectan específicamente el transporte de iones inorgánicos<sup>18</sup>. Un canal iónico se compone de una o más proteínas. Los canales tienen un poro central que se abre por cambios conformacionales para permitir el flujo de iones de un lado a otro de la membrana. Este movimiento de iones genera una corriente eléctrica que es suficiente para ser medida; por tanto podemos observar la actividad de un canal individual, y también de una molécula o complejo de moléculas.

Los canales iónicos tienen dos propiedades importantes que los distinguen de simples poros acuosos. Primero, varían considerablemente en su *regulación*; algunos canales se abren por la combinación con químicos particulares dentro o fuera de la célula, como son neurotransmisores o moléculas mensajeras citoplasmáticas. Otros se abren por cambios en el voltaje a través de la membrana, y algunos otros por estímulos sensoriales de varios tipos. La segunda propiedad importante de los canales iónicos es que son *selectivos* por los iones<sup>19</sup>.

#### ❖ Tipos de canales

Los canales iónicos comúnmente se describen en términos de su selectividad iónica y sus propiedades de regulación. Se clasifican por su selectividad iónica en:



De acuerdo a las propiedades de regulación de los canales, estos se pueden agrupar en<sup>19</sup>:

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

#### **4. Canales catiónicos activados por hiperpolarización y modulación por nucleótidos cíclicos (HCN)**

Los canales catiónicos activados por hiperpolarización, producen corrientes nombradas If, Ih, o Iq, las que fueron descubiertas en las células cardiacas<sup>20</sup> y nerviosas<sup>21</sup> hace más de 25 años. Debido a que los canales iónicos que presentan corriente Ih tienen una manera de activación compleja y dual, fueron nombrados canales activados por hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos (HCN)<sup>22</sup>. Hay cuatro miembros de la familia HCN (HCN 1-4). La familia HCN está relacionada con la familia de canales CNG (canales activados por nucleótidos cíclicos, por su nombre en inglés) y pertenece a la superfamilia de canales catiónicos activados por voltaje<sup>23</sup>.

La actividad de los HCN contribuyen en un amplio rango de funciones fisiológicas, incluyendo la actividad de marcapasos del corazón y las neuronas, control y limitación del potencial de reposo, la integración dendrítica y la regulación de la transmisión sináptica<sup>24</sup>.

Los canales HCN presentan una serie de características que son la base para servir como componentes cruciales de los generadores del ritmo. *Primero*, los HCN se activan por hiperpolarización y no por despolarización. *Segundo*, bajo condiciones fisiológicas transportan una corriente entrante catiónica no selectiva ( $\text{Ca}^+/\text{Na}^+$ ). *Tercero*, los canales HCN se unen al segundo mensajero AMPc<sup>25</sup>, pero presentan diferente sensibilidad a él. A diferencia del HCN2 y HCN4, cuya activación se ve favorecida por el AMPc, el HCN1 y HCN3 no se modulan por nucleótidos<sup>26</sup>.

### ❖ Estructura de los canales HCN.

Las subunidades de los canales HCN están ensambladas en complejos tetraméricos. Estos canales pueden funcionar como homo o heteromultímeros, Much y colaboradores en el 2003<sup>4</sup> realizaron construcciones quiméricas de los cuatro integrantes de la familia de canales HCN y demostraron que la heteromultimerización es posible en cualquier combinatoria entre dos diferentes canales, excepto para la combinación HCN2-HCN3<sup>4</sup>.

El modelo de la topología de los canales HCN se describe a continuación (Figura 2B):

#### Sensor de voltaje.

Los canales HCN contienen una hélice S4 cargada positivamente y su secuencia presenta de 3 a 9 residuos de argininas o lisinas regularmente espaciadas cada tres posiciones. Esta hélice funciona como un “sensor de voltaje”<sup>26</sup>.

#### Asa del poro y filtro de selectividad.

Entre los segmentos transmembranales S5 y S6 está localizada la región del poro y del filtro de selectividad. La secuencia del asa del poro de los canales HCN contienen el mismo motivo glicina-tirosina-glicina (GYG) que en los canales K<sup>+</sup> forma el filtro de selectividad<sup>22</sup>. La secuencia adyacente al poro de los HCN contiene varias sustituciones de aminoácidos comparada con la secuencia del poro de los canales selectivos a K<sup>+</sup>. Como consecuencia, en los canales HCN los enlaces carbonilo pueden haber perdido algo de su rigidez estructural permitiendo el transporte de K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> y NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a través del poro<sup>23,10</sup>.

#### Conector-C y dominio de unión a nucleótidos cíclicos.

En el C terminal, los canales HCN tienen un dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD, por su nombre en inglés)<sup>26</sup>. Este dominio está compuesto de alrededor de 120 aminoácidos y una secuencia de 80 aminoácidos que conecta el CNBD con el segmento S6<sup>22</sup>.



### ❖ Localización de los canales HCN.

Los canales HCN comprenden cuatro tipos: HCN1, HCN2, HCN3 y HCN4, se encuentran en las células nerviosas y cardíacas; además, de estar presentes en otros tejidos<sup>27</sup>. Los niveles de expresión y la distribución en los tejidos de los ARNm de canales HCN varían mucho entre los subtipos de HCN<sup>28</sup>.

A continuación se presenta una tabla de la distribución de los canales HCN <sup>23-25</sup> en varios tipos celulares:

HCN1	Neuronas centrales y periféricas (hipotálamo, cerebelo, neocorteza, ganglio de la raíz dorsal, células gustativas, fotoreceptores), nódulo sinoauricular, páncreas, glándula pituitaria, vejiga e hígado.
HCN2	Neuronas centrales y periféricas, retina, células cardíacas, páncreas, glándula pituitaria, vejiga e hígado.
HCN3	Cerebro, retina, células cardíacas, páncreas, glándula pituitaria, vejiga e hígado
HCN4	Tálamo, retina, bulbo olfatorio, nódulo sinoauricular, células gustativas, testículos, páncreas, la glándula pituitaria, la vejiga e hígado.

También se ha demostrado la expresión de canales de HCN en células de ovarios, páncreas<sup>29,30</sup> y en el conducto colector de la medula interna del riñón de la rata<sup>27</sup>. El HCN2 se ha identificado en la medula y en el túbulo colector renal<sup>27,10</sup> mientras que el HCN3 se ubicó en las uniones de la pelvis renal y se confirmó su papel en la peristalsis de este tejido<sup>31</sup>.

### ❖ **Actividad marcapasos.**

En el corazón los canales HCN son responsables de la actividad eléctrica rítmica en el nodo sino auricular (actividad marcapaso). Los HCN son activados por la hiperpolarización de la membrana después del potencial de acción cardíaco. Al activarse los HCN producen una corriente entrante de  $\text{Na}^+$  y despolarizan la célula hacia el umbral de activación de los canales  $\text{Ca}^{2+}$  activados por voltaje, que a su vez favorecen que se produzca un potencial de acción cardíaco. Una vez alcanzada la meseta, cerca del equilibrio electroquímico del  $\text{Ca}^{2+}$ , se cierran los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y la permeabilidad de la membrana aumenta al  $\text{K}^+$  con la apertura de los canales de  $\text{K}^+$  hiperpolarizando la membrana, con lo que se activan los canales HCN y se mantiene el disparo rítmico del potencial de acción<sup>32</sup>.

## **5. N-glicosilación en los canales iónicos.**

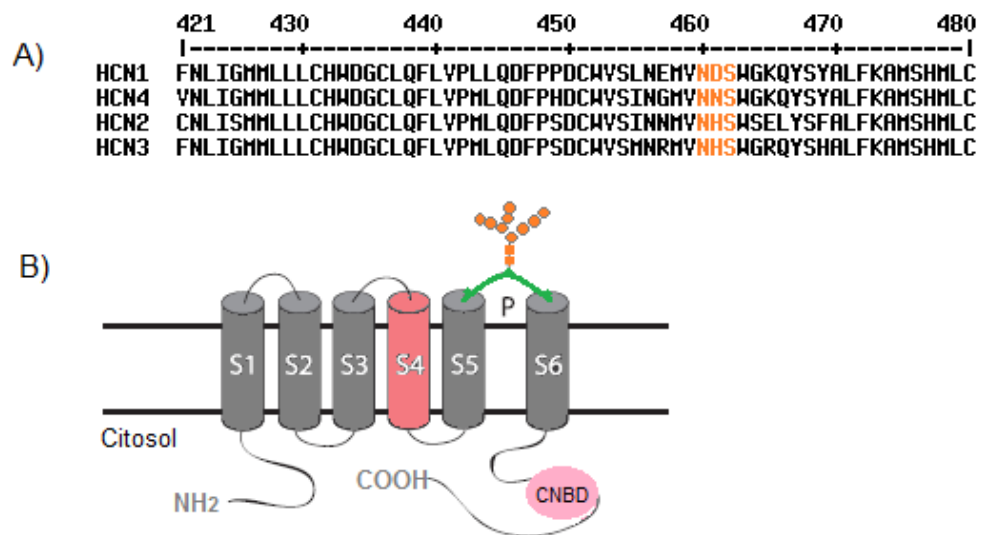
Varios canales iónicos tienen N-glicosilación; el número y la composición de los glicanos *N*-unidos pueden regular el tráfico, la estabilidad y la apertura de estos canales<sup>5</sup>. Existen varios canales iónicos que presentan esta modificación post-traducciona, tales como los canales catiónicos activados por hiperpolarización (HCN), los  $\text{Kv}$ , entre otros. La N-glicosilación incrementa el peso molecular de los canales de 4 a 20 kDa más<sup>4-9</sup>

En los canales HCN la secuencia consenso de aminoácidos para la glicosilación se encuentra en el segmento S5 cerca del poro y es homóloga en los cuatro canales (Figura 2A). Está demostrado que los canales HCN1 y HCN2 están N-glicosilados. Sin embargo, se sabe que esta modificación no es necesaria para la función de estos dos canales, pero sí tiene efecto en su expresión en la superficie celular. Por otro lado, el HCN1 es mucho menos dependiente de esta modificación<sup>4,29,33</sup>.

Los canales HERG (un tipo de canales  $\text{Kv}$ ), tanto su forma glicosilada como la no glicosilada son funcionales.<sup>7</sup>

Otros canales catiónicos son blancos de esta MPT como son los canales de  $K^+$  de dos poros ( $K_{2P}$ ), que juegan un papel fundamental en el proceso celular al permitir una fuga constitutiva de potasio en las células donde se expresan, esto influye en el potencial de membrana y la actividad celular. La mayoría de estos canales  $K_{2P}$  poseen la secuencia consenso para la N-glicosilación. Esta MPT está directamente relacionada con la estabilidad del canal, determinando así el número de canales presentes en la superficie celular<sup>5</sup>.

Los canales de potasio dependientes de voltaje KvLQT1/mink, Kv1.1y Kv4.3, que de manera general participan en la repolarización del potencial de membrana después de un potencial de acción, también presentan N-glicosilación y puede alterar la apertura del poro<sup>8</sup>. Otro Kv que es N-glicosilado es el Kv10.1<sup>9</sup>.



**Figura 2. Canales HCN.** **A)** La secuencia de aminoácidos de las isoformas se tomaron de UniProt (Q9JKB0 para HCN1\_RAT, Q9JKA9 para HCN2\_RAT, Q9JKA8 para HCN3\_RAT y Q9JKA7 para HCN4\_RAT). El alineamiento de las secuencias de aminoácidos se realizó en MultAlin. Se muestra en *anaranjado*, el sitio consenso (Asn-X-Ser) de la N-glicosilación. **B)** (modificado de Hegle.A et col, 2010) Modelo de la topología en la membrana de las subunidades de los canales HCN. Los dominios específicos se muestran en diferentes colores: en *rojo* el sensor de voltaje; en *verde*, la región del poro y en *rosa*, la región de unión a nucleótidos.

## 6. Fisiología del riñón.

### ❖ Anatomía del riñón.

Los riñones son órganos glandulares en forma de frijol que se encuentran a ambos lados de la columna vertebral en el exterior de la cavidad peritoneal, están situados en la región posterior del abdomen, representan el 0.5% del peso corporal total y están revestidos por una cápsula fibrosa<sup>34</sup>. La anatomía del riñón se ilustra en la figura 3A. La parte media de cada riñón contiene una hendidura, a través de la cual pasan la arteria y la vena renal, nervios, y pelvis. Si se cortara un riñón a la mitad, se distinguirían dos regiones: la **corteza** y la **médula**, esta última a su vez se subdivide en medula externa e interna.

La corteza y la médula se componen de más de un millón de **nefronas** (la unidad funcional del riñón). La nefrona consiste de un **corpúsculo renal** y de un **túbulo**. El corpúsculo renal se compone de capilares glomerulares y la cápsula de Bowman (figura 3B). El túbulo se divide en varios segmentos, túbulo contorneado proximal, túbulo recto proximal, asa delgada de Henle descendente y ascendente, asa gruesa ascendente de Henle, túbulo contorneado distal, túbulo conector, conducto colector cortical y los conductos colectores medulares externo e interno<sup>35</sup>.

Las células de los túbulos proximales tienen una membrana apical extensamente amplificada llamada **borde de cepillo**, que está presente solo en el túbulo proximal de la nefrona. La membrana basolateral (el lado de la célula con irrigación sanguínea) está altamente invaginada. Estas invaginaciones contienen muchas mitocondrias. En contraste, los segmentos delgados descendentes y ascendentes del asa de Henle tienen poco desarrollada la superficie apical y basolateral, además de tener pocas mitocondrias. Las células del segmento grueso ascendente y del túbulo distal tienen abundantes mitocondrias y extensos pliegues de la membrana basolateral<sup>35</sup>.

El túbulo colector está compuesto de dos tipos de células: las células principales y las células intercaladas. Las **células principales** tienen una membrana basolateral moderadamente invaginada y contienen pocas mitocondrias. Las células principales participan en la reabsorción del cloruro de sodio (NaCl) y la secreción de K<sup>+</sup>.

Las **células intercaladas**, que tienen un papel importante en la regulación del balance ácido-base, tienen una alta densidad de mitocondrias.

El segmento final de la nefrona, el túbulo colector medular interno, está compuesto de células que tienen poco desarrollada la superficie apical y basolateral, además de pocas mitocondrias.

## **7. Mecanismos renales para la formación de orina.**

Con el propósito de preservar los niveles apropiados de electrolitos y de agua en el cuerpo, el riñón varía la excreción de estos, pues a pesar de que las cantidades de líquido filtradas en el riñón son enormes, del orden de 180 Litros diarios, solamente se forman de 1 a 1.5 litros de orina, lo que implica que la cantidad de líquido reabsorbido es importantísima<sup>18</sup>.

El proceso para la formación de la orina involucra tres etapas básicas:

- 1) Filtración glomerular:** Grandes cantidades de fluido se hacen pasar a través de los capilares glomerulares de la capsula de Bowman, impulsados por un balance de fuerzas hidrostáticas y osmóticas coloidales. Los capilares glomerulares son relativamente impermeables a las proteínas, por lo que el filtrado glomerular es esencialmente libre de proteínas y desprovisto de elementos celulares, incluyendo células rojas de la sangre. Las concentraciones de los otros componentes del filtrado glomerular, incluyendo la mayoría de las sales y moléculas orgánicas, son similares a las concentraciones de la sangre, excepto por las concentraciones de algunas moléculas de bajo peso molecular, como el calcio y ácidos grasos, que no son filtrados libremente porque una porción de ellos está unido a proteínas del plasma sanguíneo.

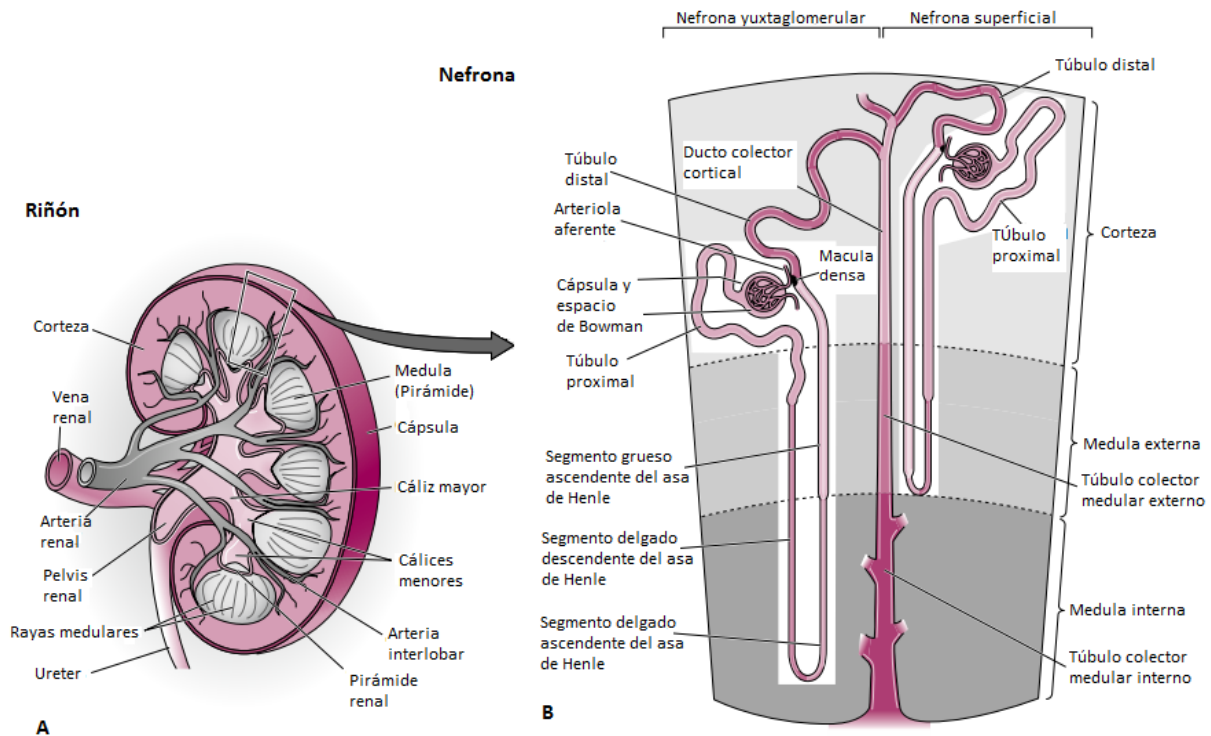
**2) Reabsorción tubular:** A diferencia de la filtración glomerular la reabsorción tubular es altamente selectiva. Algunas sustancias como la glucosa y los aminoácidos, se reabsorben completamente. Muchos de los iones del plasma, como el bicarbonato, sodio, cloro, potasio se reabsorben, aunque sus rangos de reabsorción varían dependiendo de las necesidades del cuerpo.

El agua y los solutos pasan a través de las membranas epiteliales del túbulo hacia el fluido intersticial y luego a través de la membrana peritubular de los capilares mediante difusión facilitada.

**3) Secreción tubular:** El túbulo proximal es también importante para la secreción de ácidos orgánicos y bases como las sales biliares, oxalato, urea, creatinina, ácido úrico, citrato, uratos y catecolaminas. Muchas de estas sustancias son productos finales del metabolismo y deben eliminarse del cuerpo rápidamente. Además de productos de desecho del metabolismo, los riñones secretan muchos fármacos potencialmente dañinos o toxinas directamente a través de las células tubulares hacia los túbulos, aclarando rápidamente la sangre<sup>18</sup>.

A través de la formación de la orina el riñón es capaz de regular<sup>18,36</sup>:

- la osmolaridad del plasma y de los líquidos corporales
- las concentraciones plasmáticas de iones y pequeñas moléculas orgánicas, gracias a la regulación de los sistemas de transporte.
- regulación de la presión arterial
- la producción de eritrocitos, por la secreción de eritropoyetina.
- la producción de 1,25-dihidroxivitamina D3 (*calcitriol*)
- la secreción, metabolismo y excreción de hormonas
- la excreción de productos de desecho del metabolismo y sustancias químicas externas.
- la concentración de hidrogeniones (excretados de manera activa por el riñón) y bicarbonato (reabsorbido en forma activa) y en consecuencia el balance ácido-base.



**Figura 3 Anatomía del riñón del humano**<sup>35</sup>. A) corte sagital que muestra estructura interna. B) Diagrama de una nefrona yuxtaglomerular (izq) y nefrona superficial (der). En comparación con la nefrona superficial, la nefrona yuxtaglomerular difiere anatómicamente en dos cosas importantes: el asa de Henle es más larga y se extiende más profundamente dentro de la medula, y la arteriola aferente no solo forma una red de capilares peritubulares sino también una serie de asas vasculares llamadas vasa recta.

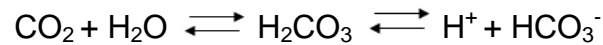
## 8. Regulación de la homeostasis.

Existen tres sistemas principales para regular el pH fisiológico (pH = 7.4): (1) el sistema amortiguador ácido-base de los fluidos corporales, que inmediatamente se combina con ácidos o bases para evitar cambios en la concentración de  $H^+$ ; (2) el sistema respiratorio, que regula el  $CO_2$  (y, por lo tanto,  $H_2CO_3$ ) del fluido extracelular; y (3) los riñones, que controlan la excreción de  $H^+$ , así como la reabsorción, la producción y la excreción renal de  $HCO_3^-$ .<sup>18</sup>

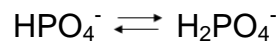
❖ **El sistema amortiguador ácido-base.**

El Sistema de amortiguadores ácido-base de los fluidos corporales cuenta con tres componentes principales:

- a) El amortiguador de bicarbonato, importante en los fluidos extracelulares:



- b) El amortiguador de fosfato, que principalmente regula el fluido tubular renal y los fluidos intracelulares:



- c) Proteínas plasmáticas. Por ejemplo, la hemoglobina que por su abundancia en la sangre y su papel en la respiración se destaca como amortiguador entre el resto de las proteínas.

❖ **El sistema respiratorio.**

El sistema respiratorio controla la concentración de CO<sub>2</sub> en los fluidos extracelulares y con ello el balance ácido-base.

El CO<sub>2</sub> se forma continuamente en el cuerpo por los procesos metabólicos intracelulares. Después de que se forma, difunde de las células hacia los fluidos intersticiales y a la sangre, el fluido sanguíneo lo transporta a los pulmones, donde se difunde en los alveolos y luego se elimina a la atmósfera por la ventilación pulmonar. Un incremento en la ventilación elimina al CO<sub>2</sub> del fluido extracelular, lo que reduce la concentración de H<sup>+</sup>. Inversamente, un decremento en la ventilación incrementa el CO<sub>2</sub>, lo que también aumenta la concentración de H<sup>+</sup>.<sup>18</sup>



### ❖ Regulación renal del equilibrio acido-base.

Los riñones regulan la concentración de  $H^+$  en los fluidos extracelular a través de tres mecanismos: (1) la excreción de  $H^+$ , (2) la reabsorción de  $HCO_3^-$  filtrado, y (3) la producción de nuevo  $HCO_3^-$ .<sup>18</sup>

Las células de la nefrona **secretan  $H^+$**  al fluido tubular a través de la membrana apical de las células del túbulo por dos mecanismos: el intercambiador  $Na^+/H$  y la bomba electrogénica de  $H^+$ . El mecanismo principal para la excreción de  $H^+$  es el intercambiador  $Na^+/H^+$  (NHE3). Este intercambiador está presente en el túbulo proximal, el asa gruesa ascendente y el túbulo contorneado distal. El NHE3 apical secreta  $H^+$  en intercambio por  $Na^+$  luminal, lo que hace este proceso dependiente del gradiente de  $Na^+$  generado por la bomba  $Na^+/K^+$  de la membrana basolateral. Otro mecanismo para la secreción apical de  $H^+$  es la bomba electrogénica de  $H^+$ , un tipo de  $H^+$ -ATPasa vacuolar, localizada en las mismas regiones de la nefrona que el NHE3.

La secreción de  $H^+$  está fuertemente ligada a la **reabsorción de  $HCO_3^-$**  a través de la membrana basolateral. Dos mecanismos son los responsables principales del transporte de  $HCO_3^-$  de la célula al fluido peritubular: el cotransportador electrogénico  $Na^+/HCO_3^-$ , que transporta tres  $HCO_3^-$  por cada  $Na^+$ , y el intercambiador  $Cl/HCO_3^-$ . El mecanismo celular por el cual el  $HCO_3^-$  se reabsorbe es esencialmente el mismo en el túbulo proximal y el asa gruesa ascendente.

Las enzimas anhidrasa carbónica (AC) tienen un papel importante en la secreción de  $H^+$  y la reabsorción de  $HCO_3^-$ . En el citoplasma de las células del túbulo proximal, el asa gruesa ascendente de Henle, y las células intercaladas de los túbulos distal y colector se encuentra la isoforma AC-II, que cataliza la formación de  $H^+$  y  $HCO_3^-$ . La AC-IV unida a la membrana apical del túbulo proximal y del asa gruesa ascendente de Henle cataliza la generación de  $H_2O$  y  $CO_2$  a partir del ácido carbónico luminal.

La producción de **nuevo  $\text{HCO}_3^-$**  y la **amoniogénesis** se llevan a cabo en las células del túbulo proximal, mediante el catabolismo de la glutamina generando de forma directa  $2 \text{NH}_4^+$  y de forma indirecta  $2 \text{HCO}_3^-$ . El  $\text{HCO}_3^-$  pasa a la sangre como “nuevo  $\text{HCO}_3^-$ “, y el  $\text{NH}_4^+$  se secreta al fluido luminal a través de la membrana apical. El amonio que no logra excretarse en la orina regresa a la sangre y se transforma en urea en el hígado<sup>37</sup>.

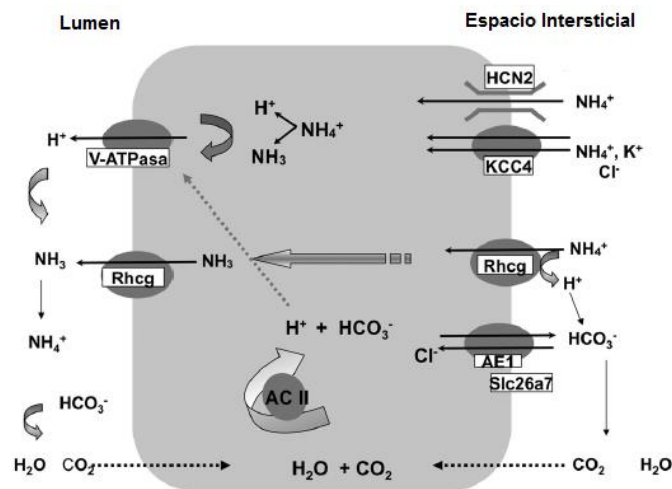
El amonio existe en dos formas moleculares:  $\text{NH}_3$  y  $\text{NH}_4^+$ , las cantidades relativas de cada una se determinan por el amortiguador  $\text{NH}_3 + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{NH}_4^+$ . A pH fisiológico (7.4), aproximadamente el 98.3% del amonio está presente como  $\text{NH}_4^+$  y el 1.7% restante está como  $\text{NH}_3$ .

La mayoría del  $\text{NH}_4^+$  se secreta por el intercambiador NHE3 en el túbulo proximal, con la sustitución del  $\text{H}^+$  por el  $\text{NH}_4^+$  en el transportador, resultando en el intercambio  $\text{Na}^+ / \text{NH}_4^+$ . Una pequeña parte del  $\text{NH}_3$  puede entrar al fluido tubular, donde nuevamente se protona.

Las glicoproteínas Rh son otros transportadores de  $\text{NH}_3 / \text{NH}_4^+$ . Las RhBG y las RhGC se encuentran en los riñones, hígado y tracto gastrointestinal. En los riñones se localizan en el segmento de la nefrona distal, iniciando con el túbulo contorneado distal y a través del conducto colector de la medula interna, tanto en la membrana apical como basolateral<sup>37,38</sup>.

# Antecedentes

Nuestro laboratorio fue el primero en identificar canales de amonio en el riñón de la rata. El canal **HCN2** se encuentra en la membrana basolateral de las células intercaladas secretoras de ácido y de las células principales de la corteza y de la médula renal. Este canal en condiciones basales capta el  $\text{NH}_4^+$  en las células intercaladas secretoras de ácido, sugiriendo su participación en el transporte transepitelial y, sucesivamente, en la excreción urinaria de  $\text{NH}_4^+$  en la nefrona distal del riñón de rata<sup>10,11</sup> (figura 4).



**Figura 4. Modelo de una célula  $\alpha$ -intercalada secretora de ácido<sup>11</sup>.** La captación de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) tiene lugar a través de la membrana basolateral. Este proceso puede ocurrir en tres formas: a través del transportador KCC4, el canal Rhcg de amoniaco y el canal HCN2 de amonio. La V-ATPase transporta  $\text{H}^+$  del citoplasma hacia el lumen y produce ácidos titulables, mientras que los canales Rhcg de amoniaco transportan el amoniaco y lo excretan en la orina.

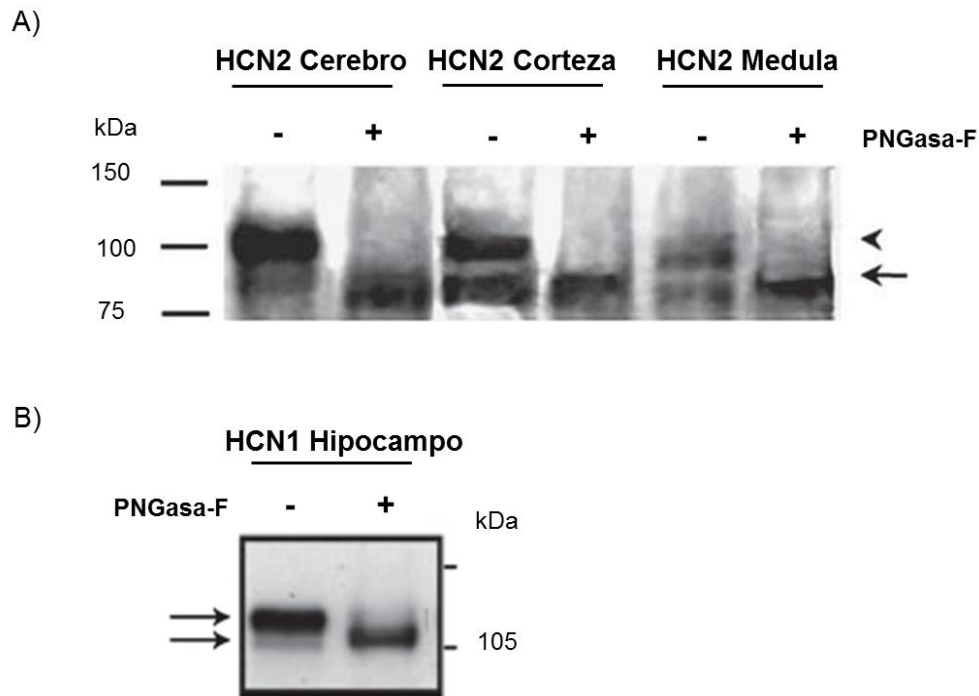
También, se demostró que el ADNc del HCN2 renal es idéntico al de su homólogo en el cerebro y que la proteína está N-glicosilada. La inmunodetección del canal HCN2 renal mostró dos bandas inmunoreactivas: una de ~90 kDa que corresponde a la forma no glicosilada y otra de ~120 kDa que es la forma N-glicosilada del canal<sup>10</sup> (figura 5A). Adicionalmente, en otras publicaciones se ha descrito la presencia de la N-glicosilación del canal HCN1, para este canal se reporta dos bandas inmunoreactivas: una de ~105 kDa que es la forma no glicosilada y otra de ~125 kDa para la forma N-glicosilada<sup>4,6,29</sup> (figura 5B).

En una tesis previa, se identificó al canal **HCN3** por microscopia confocal en la membrana apical del túbulo proximal (corteza) y en la membrana basolateral del asa ascendente gruesa de Henle (médula externa) del riñón de rata (datos no publicados). La inmunodetección por western blot del HCN3 reveló la presencia de dos bandas inmunoreactivas, una de ~92 kDa y otra de ~65 kDa.

Adicionalmente, se estudió la regulación de la expresión del canal HCN3 bajo dietas con diferente contenido de  $K^+$ : se encontró que una dieta con alto  $K^+$  (10%) disminuyó la expresión del HCN3 en las membranas plasmáticas de la medula externa (membranas basolateral del asa ascendente de Henle). En contraste, una dieta deficiente de  $K^+$  disminuyó su expresión pero en las membranas plasmáticas de la corteza (membranas apicales del túbulo proximal). Cabe mencionar que esta regulación por dietas se observó en la banda de ~65 kDa del HCN3.

Esta regulación dual del canal HCN3 por dietas con alto y deficiente contenido de  $K^+$  sugiere su relevancia en el transporte de  $NH_4^+$  y/o el equilibrio ácido-base en la nefrona de la rata (datos no publicados). Se cree posible la participación del HCN3 en la regulación renal del equilibrio ácido-base pues está demostrado que el HCN2 tiene un papel en el transporte del ión amonio en el riñón.

El canal HCN3 se ha encontrado en diversos tejidos<sup>10,23,24,27,29-31</sup> como el cerebro, el corazón, el riñón, etc... con un rango de peso que va de 78 a 94 kDa<sup>33</sup>. Debido a que los canales HCN1 y HCN2 presentan N-glicosilación y esta modificación incrementa el peso molecular de la proteína entre 4 y 20 kDa<sup>4-9</sup>, es posible que el canal HCN3 renal también presente esta modificación post-traducciona. Ensayos enzimáticos con una glicosidasa (PNGasa F) nos permitirán determinar si la banda inmunoreactiva de ~92 kDa del canal HCN3 en el riñón de rata corresponde a la proteína N-glicosilada.



**FIGURA 5. Inmunoblot de los canales HCN2 y HCN1 tratadas o no con la enzima N-glicosidasa F (PNGasa F).**  
**A)** Modificada de Carrisoza-Gaytán, R. et col, 2011. En membranas plasmáticas del hipotálamo, corteza y medula renal de rata se detectaron dos bandas inmunoreactivas para el canal HCN2, una de 120 kDa antes del tratamiento con la PNGasa F (proteína glicosilada) y otra de 90 kDa después del tratamiento con la PNGasa F (proteína no glicosilada) (flecha superior e inferior respectivamente). **B)** Modificada de Zha, Q. et col, 2008. En la fracción membranal del hipocampo de rata se detectaron dos bandas inmunoreactivas para el canal HCN1, una de 125 kDa antes del tratamiento con la PNGasa F (proteína glicosilada) y otra de 105 kDa después del tratamiento con la PNGasa F (proteína no glicosilada) (flecha superior e inferior respectivamente).

# Hipótesis

---

Las bandas proteicas de ~87 y 92 kDa del canal HCN3 inmunodetectadas en el hipotálamo y riñón, respectivamente, son la forma N-glicosilada del canal.

# Objetivo

---

Estudiar la glicosilación del canal catiónico HCN3 en tejido renal y en el hipotálamo.

## **Objetivos particulares.**

- Disectar el hipotálamo, la corteza y la médula externa renal de ratas para extraer las proteínas y separarlas en fracciones membranales (plasmáticas y totales) por centrifugación.
- Llevar a cabo la inmunodetección por western-blot del HCN3 en las membranas plasmáticas del hipotálamo, la corteza y la médula renal (post-tratamiento enzimático).

# Metodología

---

## OBTENCION DE LAS FRACCIONES MEMBRANALES.

### Método

Se obtuvieron los riñones y el cerebro de tres ratas de laboratorio (*Rattus norvegicus*), cepa Wistar. Los sujetos utilizados fueron macho adultos con un peso entre 200 y 250 g. Tras la extracción de los órganos, estos se colocaron inmediatamente en solución de NaCl al 0.9%. Posteriormente, se disectaron los riñones para obtener por separado la corteza y la médula externa. Del cerebro se aisló el hipotálamo para usarlo como control positivo.

Cada tejido se sumergió en solución de extracción de proteínas (ver apéndice) y se homogenizó (homogenizador de tejidos; THOMAS), seguido del fraccionamiento de membranas por centrifugación (17000 gs por 20 minutos), a través del cual se obtuvo una fracción enriquecida de las membranas plasmáticas. Finalmente, las proteínas contenidas en cada extracto fueron cuantificadas por el método de Lowry (ver apéndice).

## REACCIÓN CON LA N-GLICOSIDASA F.

### Fundamento

La deglicosilación de las glicoproteínas es importante para la elucidación de su estructura, función y biosíntesis. Existen varias enzimas que llevan a cabo la deglicosilación de las proteínas<sup>39</sup>, una de ellas es el péptido-*N*<sup>4</sup>-(*N*-acetil- $\beta$ -D-glucosaminil) asparagina amidasa (PNGasa F) de *Flavobacterium meningosepticum*, que corta el enlace amida entre la GlcNAc y el residuo de asparagina del glucopéptido *N*-unido, generando una cadena polipeptídica con un residuo de ácido aspártico en el lado de la hidrólisis y el 1-amino-*N*-acetilglucosaminil oligosacárido; que subsecuentemente se hidroliza bajo pH neutro a *N*-acetilglucosaminil oligosacárido y amonía<sup>40,41</sup> (figura 6).

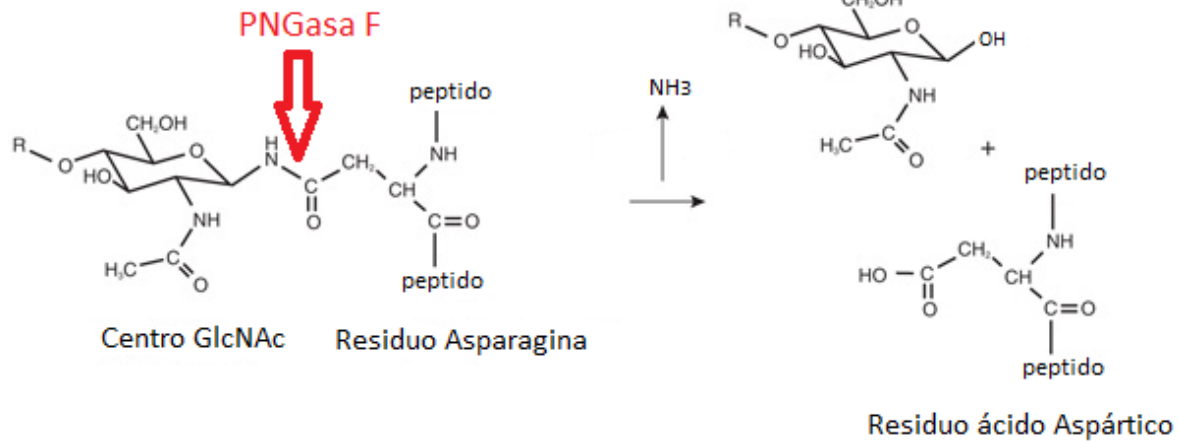


Figura 6. Reaccion de la N-glicosidasa F.

## Método

Como control positivo de la actividad enzimática se utilizaron las membranas plasmáticas del hipotálamo, en el cual se sabe se expresa el canal HCN2 glicosilado. Para el análisis del canal HCN3 en el hipotálamo, la corteza y la médula externa renal, también se utilizaron las membranas plasmáticas.

En un tubo eppendorf se colocaron 90 µg de proteína de cada tejido, se le agregó la solución desnaturizante (PB 0.025M, pH 8.5; EDTA 0.025M; β-Mercaptoetanol 1.0%; SDS 0.5%) y se dejaron a 95° C por 10 minutos. Pasado este tiempo se les agregó la solución de incubación (PB 0.025M, pH 8.5; EDTA 0.025M; PMSF 1mM; SDS 0.13%) y se repartió en dos tubos cada tejido (45 µg cada tubo). A cada tubo se le agregó un detergente no iónico (Nonidet P-40) en una concentración final de 0.8%. Finalmente, se adicionó o no la enzima PNGasa F (5 U) y se incubó a 37°C por 20 horas (ver apéndice).



## WESTERN-BLOT.

### Fundamento

Esta técnica fue descrita por primera vez por Leammli (1970) y Towbin et al (1979). Consiste en la separación de las proteínas en función de su diferente peso molecular, mediante el uso de geles de electroforesis de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio (SDS), para después transferir las proteínas a una membrana capaz de absorberlas e inmovilizarlas. Generalmente estas membranas son de nitrocelulosa o PVDF. Posteriormente, se bloquea la membrana para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos a su superficie.

El paso siguiente es unir a la proteína de interés a un anticuerpo específico y luego a un anticuerpo secundario marcado con una enzima, para finalmente añadir un sustrato quimioluminiscente que al combinarse con la enzima produzca luz como producto final que puede ser detectado mediante una película.

Una de las enzimas más utilizadas en el marcaje de anticuerpos es la peroxidasa de rábano (HRP) que cataliza la oxidación de luminol por el peróxido de hidrógeno; el producto oxidado alcanza un estado excitado que al volver a su estado basal emite luz. Esta liberación de luz se puede detectar en una película autoradiográfica que queda impresa (figura 7).

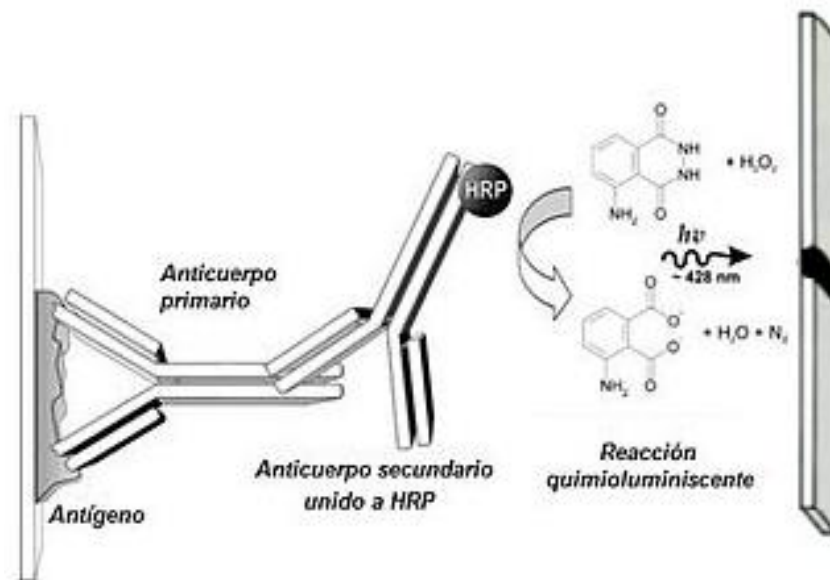


Figura 7. Ilustración del proceso de un Western-blot.

## **Método**

Las proteínas contenidas en las membranas plasmáticas de hipotálamo, corteza y medula externa renal previamente tratadas o no con la enzima PNGasa F (Roche<sup>®</sup>) se separaron por la técnica de electroforesis vertical en geles de poliacrilamida al 6 y 8%. Las proteínas separadas en el gel se electrotransferieron a una membrana de PVDF (Bio-Rad Inmun-Blot<sup>®</sup> PVDF membrane). La membrana se bloqueó con leche descremada (Bio-Rad Blotting-Grade Blocker) al 5%. Posteriormente, se realizó la inmunodetección de las proteínas que corresponden a los canales HCN2 y HCN3. Para ello se utilizaron los anticuerpos primarios para cada canal (IgG de conejo anti-HCN2 y HCN3; Alomone y anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano (anti-IgG de conejo). La membrana se reveló por quimioluminiscencia (Chemiluminescent HRP substrate; Millipore) y se expusieron a placas autoradiográficas en oscuridad (ver apéndice).

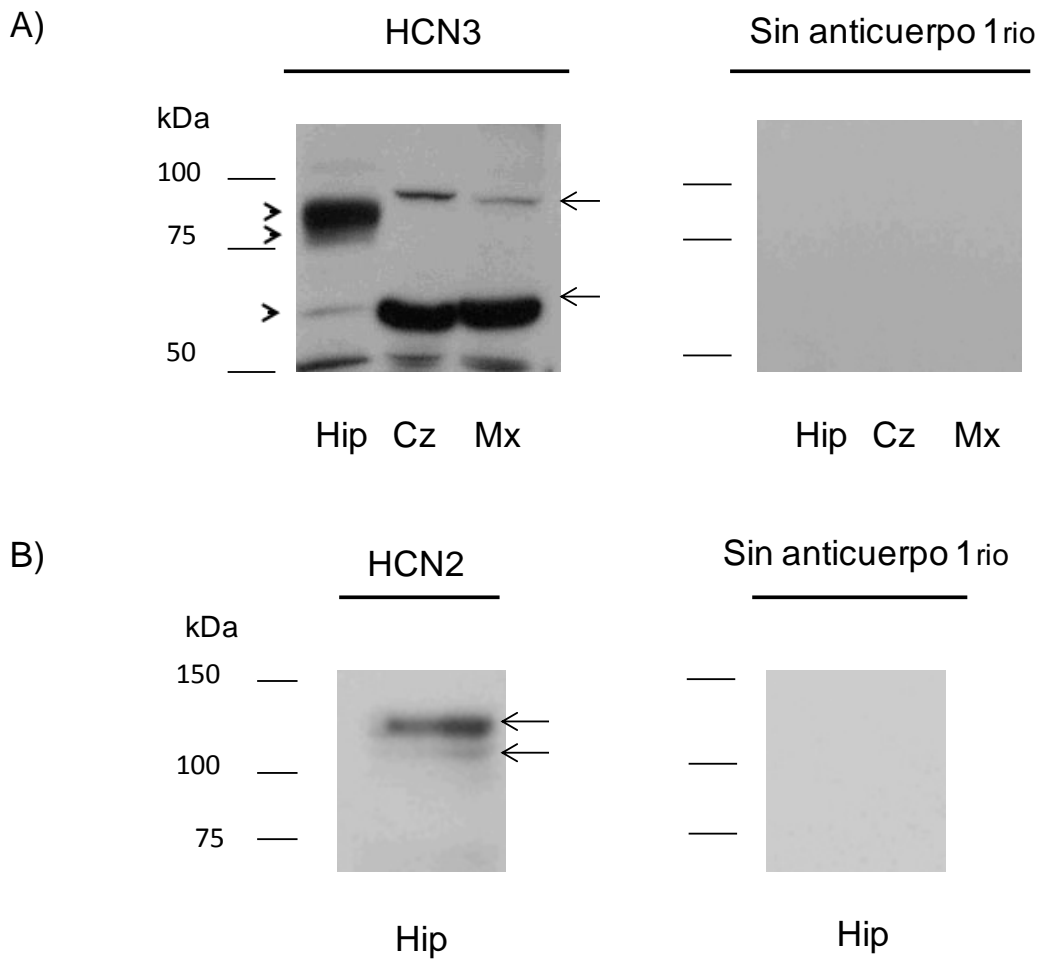
# Resultados y Discusión

---

Con el propósito de determinar si la banda inmunoreactiva de ~ 92 kDa para el canal HCN3 encontrada en el riñón de la rata era la proteína N-glicosilada se realizaron ensayos con la enzima PNGasa F, usando como control positivo al canal HCN2 en hipotálamo. Posteriormente se analizaron por Western-blot utilizando anticuerpos (Alomone Labs) anti-HCN2 con el epítipo en el NH<sub>2</sub>-terminal (aminoácidos 147-165) y anti-HCN3 con el epítipo en el COOH-terminal (aminoácidos 727-744).

Para llevar un control de la especificidad de los anticuerpos utilizados en el ensayo, se inmunodetectó en una fracción enriquecida de membranas plasmáticas de hipotálamo, corteza y médula renal al canal HCN3 y HCN2 sólo en el hipotálamo. La figura 8A muestra un Western-blot del canal HCN3 en el hipotálamo, donde se observa una banda muy abundante de ~87 kDa y dos bandas muy tenues de ~79 kDa y ~65 kDa. En la corteza y la médula externa renal, se inmunodetectó una banda de ~92 kDa y otra de ~65 kDa, ésta última fue mucho más abundante que en el hipotálamo. Esto sugiere que la forma funcional del canal HCN3 en el riñón es la banda proteica de ~65 kDa, pues es la que se regula con las dietas de K<sup>+</sup> (datos no publicados).

En la figura 8B se muestran las bandas de ~120 y ~100 kDa para el canal HCN2. En los paneles derechos de la figura 8 se muestra la incubación sólo con los anticuerpos secundarios (sin anti-HCN2 y anti-HCN3) llevada a cabo como control negativo para descartar que las bandas observadas se debieran a inespecificidades de los anticuerpos.



**FIGURA 8. Inmunoblot de los canales HCN2 y HCN3 en una fracción enriquecida de membranas plasmáticas. A)** Inmunoblot del HCN3 en hipotálamo (**Hip**) corteza (**Cz**) y medula externa renal (**Mx**) (Ac. 1rio.1: 400, Ac. 2rio. 1:20000). Se detectó en Hipotálamo una banda de ~87 kDa y otras muy tenues de ~79 kDa y 65 kDa (cabeza de flecha, en orden descendente). En Cz y Mx se detectó una banda de ~92 kDa y otra de ~65 kDa, flecha superior e inferior respectivamente, en ambos tejidos. **B)** Inmunoblot del HCN2 en el hipotálamo (**Hip**) (Ac. 1rio.1: 1000, Ac. 2rio. 1:15000). Se detectaron dos bandas inmunoreactivas, una de ~120 kDa y otra de ~100, flecha superior e inferior respectivamente. Los paneles derechos de A y B muestran la incubación solo con los anticuerpos secundarios.

Para llevar a cabo la reacción de deglicosilación de los canales HCN, las condiciones del ensayo tuvieron que estandarizarse previamente, para ello se probaron diferentes condiciones experimentales (Tabla 1): distintas concentraciones de agente desnaturante (SDS), tres tipos de detergentes no-iónicos (Tween-20, Tritón X-100 y NP-40) en diferentes concentraciones, diferentes tiempos de reacción enzimática y pH de las soluciones.

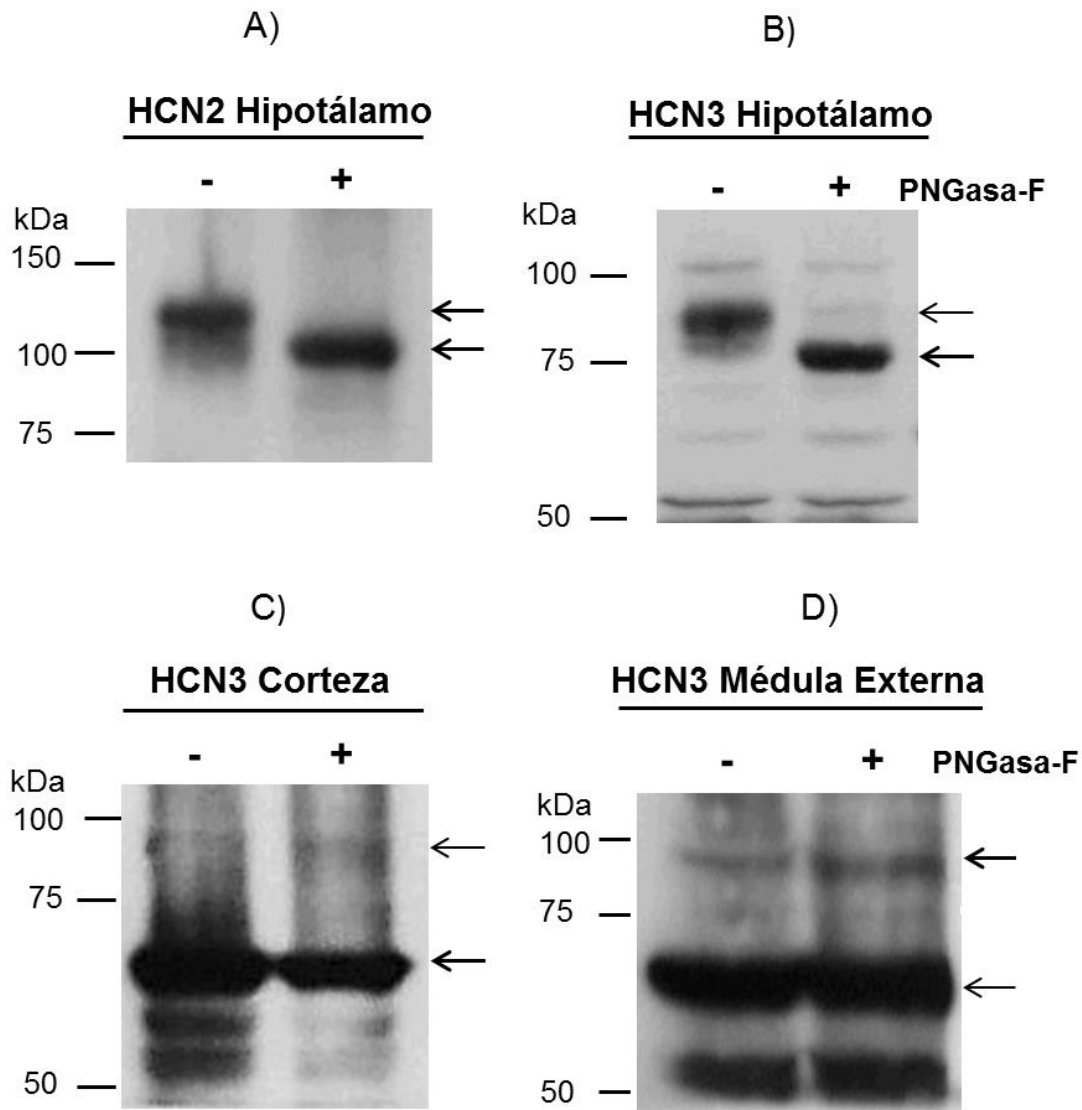
SDS	Detergentes no-iónicos			Tiempo de reacción
	NP-40	Triton-100x	Tween-20	
0.5%	0.8%	1.0%	1.0%	24 hrs
0.2%	0.5%	0.8%	0.5%	20 hrs
0.13%		0.5%		18 hrs

**Tabla 1. Variables experimentales utilizadas en la estandarización de la reacción de deglicosilación de los canales HCN.** Se probaron diferentes concentraciones de SDS, de detergentes no-iónicos y del tiempo de reacción enzimática (PNGasa F). En azul se señalan las condiciones óptimas para el ensayo de deglicosilación.

Las concentraciones de los detergentes resultan críticas para el funcionamiento correcto de la enzima; una concentración elevada de SDS, el cual se utiliza para desnaturalizar las proteínas de la muestra, puede inhibir la actividad enzimática<sup>42</sup>. La función del detergente no-iónico en la reacción de deglicosilación es evitar este efecto inhibitorio del SDS sobre la enzima, pero una concentración mayor al 1% de detergente no-iónico podría interferir con la separación en la electroforesis. Tras realizar varios ensayos con la enzima bajo diferentes concentraciones de detergentes, se concluyó que las concentraciones óptimas para el ensayo fueron: SDS al 0.13%, el NP-40 al 0.8%.

El pH de la solución de fosfatos (PB) que se utilizó en el ensayo fue de 8.6. La enzima tiene un amplio rango de pH (6.5-9) en el que funciona, pero se ha reportado que el pH óptimo para la reacción es de 8.6<sup>43</sup>. En cuanto al tiempo de incubación se probó la reacción con tres tiempos diferentes: 18, 20 y 24 horas; sin embargo, no se observaron diferencias en los resultados.

El análisis de la glicosilación se llevó a cabo con las fracciones enriquecidas de membranas plasmáticas del hipotálamo, la corteza y la médula externa renal para el canal HCN3, y sólo del hipotálamo para el canal HCN2. Se incluyeron controles negativos para cada una de las muestras, los cuáles fueron tratados bajo las mismas condiciones experimentales pero sin la adición de la enzima PNGasa F. La figura 9 representa los resultados obtenidos en cuatro experimentos realizados por separado.



**FIGURA 9. Inmunoblot de los canales HCN2 y HCN3 en fracciones membranales tratadas o no con la enzima N-glicosidasa F (PNGasa F).** **A)** Inmunoblot del HCN2 en hipotálamo (Ac. 1rio.1: 1000, Ac. 2rio. 1:15000), utilizado como control positivo de la reacción de deglicosilación. Se detectaron dos bandas inmunoreactivas, una de ~120 kDa antes del tratamiento con la PNGasa F (proteína glicosilada) y otra de ~100 kDa después del tratamiento con la PNGasa F (proteína no glicosilada), flecha superior e inferior respectivamente. **B)** Inmunoblot del HCN3 en hipotálamo (Ac. 1rio.1: 400, Ac. 2rio. 1:20000). Se detectaron abundantemente dos bandas inmunoreactivas, una de ~87 kDa antes del tratamiento con la PNGasa F (proteína glicosilada) y otra de ~79 kDa después del tratamiento con la PNGasa F (proteína no glicosilada), flecha superior e inferior respectivamente. **C)** Inmunoblot del HCN3 en corteza renal (Ac. 1rio.1: 400, Ac. 2rio. 1:25000). Se detectó débilmente la banda de ~92 kDa (peso esperado del canal glicosilado) y otra banda muy abundante de ~65 kDa, flechas en orden descendente. El tratamiento con la PNGasa F no modificó el peso de la banda de ~92 kDa. **D)** Inmunoblot del HCN3 en la médula externa renal (Ac. 1rio.1: 400, Ac. 2rio. 1:20000). Se detectaron, al igual que en corteza, las bandas de ~92 kDa y ~65 kDa, flecha superior e inferior respectivamente para el canal HCN3 pre y post-tratamiento con la PNGasa F. Se utilizaron 45 µg de membranas plasmáticas por carril (n=3). Figura representativa de cuatro experimentos hechos por separado.

El Western-blot posterior al ensayo con la glicosidasa (figura 9), presenta mucho fondo debido a la alta concentración de sales utilizadas durante el tratamiento con la enzima. Esto disminuye la señal de las bandas proteicas de estudio, especialmente la de ~92 kDa y 79 kDa para el HCN3, las cuáles se encontraron en mucho menor abundancia que la banda de ~65 kDa. Por lo anterior, resultó muy complicado obtener un western blot con una mayor definición de las bandas.

En la muestra no tratada con la enzima (-) se observó tanto la forma glicosilada de la proteína (120 KDa) como la no glicosilada (100 kDa). Mientras que en la muestra tratada con la enzima (+), sólo aparece la forma no glicosilada debido a una deglicosilación total del canal HCN2 (figura 9A).

Adicionalmente se analizó al canal HCN3 en el hipotálamo, ya que no se ha reportado si este canal presenta N-glicosilación como ocurre con el HCN1 y HCN2 en el cerebro<sup>10,29</sup>. En la figura 9B se observa una banda de ~87 kDa muy abundante y otra de ~79 kDa poco abundante en la muestra sin enzima (-), por el contrario en la muestra tratada con la enzima PNGasa F (+) la banda de ~79 kDa es más abundante que la de ~87 kDa. Esto indica que la banda de ~87 kDa del HCN3 en el hipotálamo corresponde a la forma N-glicosilada del canal, pues tras la adición de la N-glicosidasa pierde ~8 kDa y disminuye su peso a ~79 kDa, (incrementando su intensidad) siendo esta última el peso del canal sin glicosidación.

Debido a que todos los canales HCN tienen la secuencia consenso (Asn-X-Ser)<sup>33</sup> para la N-glicosilación y a que se utilizaron las mismas condiciones experimentales (misma cantidad de proteína: 45 µg y de enzima: 5 U) para los ensayos enzimáticos (figura 2A), se esperaba que la banda de ~92 kDa del canal HCN3 renal disminuyera su peso molecular después de la adición de la enzima, como ocurrió con la banda de ~120 kDa para el HCN2 y la banda de ~87 kDa para el HCN3 en el hipotálamo. Sin embargo, aun después del tratamiento con la PNGasa F (+), no se observó cambio en el peso molecular de la banda inmunoreactiva de ~92 kDa para el HCN3 ni en la corteza (figura 9C) ni en la medula externa renal (figura 9D). Este resultado nos permite concluir que el canal HCN3 en el tejido renal no está N-glicosilado. Es probable que el canal HCN3 tenga otra MPT que justifique el peso de ~92 kDa.

Para saber si el HCN3 presenta una MPT diferente a la N-glicosilación, se realizó un análisis de las secuencias del HCN1, HCN2 y HCN3 (Tabla 2). Las predicciones hechas a partir de las secuencias de las proteínas en cerebro, indican que los tres canales tienen probabilidad de sufrir fosforilación, ubiquitinación y O-glicosilación. Sin embargo, los resultados no marcan una diferencia clara entre el procesamiento post-traducciona del HCN3 y los otros HCN. Asimismo, se ha demostrado que los pesos moleculares de los canales HCN1 (cerebro) y HCN2 (en cerebro y riñón): ~95 y ~120 kDa respectivamente, son debidos a una N-glicosilación y no a otra MPT.

MPT	HCN1	HCN2	HCN3
Fosforilación	29 Ser, 14 Thr, 7 Tyr	37 Ser, 11 Thr, 5 Tyr	32 Ser, 11 Thr, 4 Tyr
Ubiquitinación	6 Lys	1 Lys	2 Lys
N-acetilación	Sin resultados	Sin resultados	Sin resultados
C-glicosilación	Sin resultados	Sin resultados	Sin resultados
O-glicosilación	63 Ser/Thr	30 Ser/Thr	40 Ser/Thr

**Tabla 2. Predicción de las modificaciones post-traduccionales de los canales HCN1, HCN2 y HCN3.**

Los resultados muestran el número y tipo de aminoácidos con probabilidad de sufrir una determinada MPT. Las secuencias de aminoácidos se tomaron de UniProt (Q9JKB0 para HCN1\_RAT, Q9JKA9 para HCN2\_RAT y Q9JKA8 para HCN3\_RAT). Se usaron dos servidores para predecir las MPT: CBS Prediction Servers y Ubpred (para la ubiquitinación).

Otra posibilidad para explicar el peso de ~92 kDa para el canal HCN3 renal es que se trate de una isoforma más larga que la del hipotálamo (~79 kDa sin N-glicosilación). Para confirmar que el canal HCN3 renal es una isoforma análoga a la del hipotálamo, sería necesaria la clonación del canal renal para poder comparar su secuencia con la isoforma del cerebro. Es importante mencionar que en la literatura se reporta un rango amplio de peso (78 a 94 kDa) para el canal HCN3 completo, tanto en tejido excitable como no excitable<sup>33</sup>

Previamente se demostró que tanto el canal HCN1 como el HCN2 en su forma no glicosilada están presentes en la superficie celular; pero el HCN1, a diferencia del HCN2, se expresa mayormente en la membrana plasmática sin la adición de N-glicanos. Esto indica que la presencia de la N-glicosilación en los HCN no es necesaria para su expresión en la membrana plasmática<sup>6</sup>. El HCN3 también es capaz de llegar a la membrana plasmática sin dicha modificación post-traducciona, pues recientemente en nuestro laboratorio fue detectada la banda de ~65 kDa en una purificación de membranas del borde en cepillo del



túbulo proximal (BBMV), mientras que la banda de ~87 kDa no se observó (datos no publicados).

Esta banda proteica de ~65 kDa observada en hipotálamo, corteza y médula externa renal (figura 8A y 9 B,C y D) podría ser el resultado de una proteólisis. Esto resulta consistente con un reporte hecho por Calejo et col<sup>33</sup> en el que se demuestra que los canales HCN presentan proteólisis enzimática por metaloendoproteasas y ello influye en su expresión en la membrana y las propiedades de los canales HCN. Asimismo, observaron que los HCN presentes en tejidos no excitables, como el riñón, parecen estar más fragmentados que en los tejidos excitables.

Se sabe que la N-glicosilación no solo está involucrada en el plegamiento y la función de una proteína, sino que también la protege de la proteólisis<sup>44</sup>. Esto apoya el hecho de que el HCN3 renal no esté N-glicosilado y por ello exista una mayor abundancia de la banda de ~65 kDa debida a la proteólisis con respecto al hipotálamo, donde si se observa la forma glicosilada del canal (~87 kDa).

Calejo y colaboradores demostraron que todos los miembros de la familia de canales HCN presentan secuencias consenso de corte en su cadena polipeptídica para metaloendoproteasas unidas a la membrana, las cuales se encuentran distribuidas ubicuamente en los tejidos de los mamíferos<sup>45</sup>. Los sitios de corte que encontraron para el canal HCN3 en el riñón son: Glu802-Val803, Ala162-Ile163 y Thr757-Val758. El tamaño propuesto de los fragmentos para el HCN3 es de 23-33 kDa y de 56-74 kDa (figura 10). La banda inmunoreactiva de ~65 kDa encontrada en nuestro estudio para el HCN3 entra en el rango de 56-74 kDa propuesto para el segundo fragmento; según el modelo, este fragmento carece del NH<sub>2</sub>-terminal, pero conserva el COOH-terminal. En nuestro estudio se usó un anticuerpo dirigido al COOH-terminal del canal, lo que hizo posible la detección de dicho fragmento y refuerza la hipótesis de que el canal HCN3 es susceptible a proteolizarse.

Otro hecho que respalda la hipótesis de una proteólisis, es la expresión abundante de metaloendoproteasas unidas a membrana en el riñón (Turner 1997). La subunidad  $\beta$  de la meprina, es una metaloendoproteasa que corta las subunidades  $\alpha$  y  $\gamma$  del canal epitelial de sodio (ENaC), presente en la membrana apical de la nefrona distal <sup>46</sup>, regulando directamente su actividad en el riñón<sup>47</sup>.

También se ha identificado la presencia de la metaloendoproteasa meprina en las BBMVs<sup>48</sup> del intestino y del túbulo proximal renal. Otra enzima de este tipo que también está presente en este segmento del riñón es la endopeptidasa neutral (NEP), que también se localiza en el intestino y el cerebro. Además, se sabe que las metaloendoproteasas están involucradas en la regulación de péptidos de importancia biológica en el riñón. Estas evidencias apoyan la hipótesis de la proteólisis del canal HCN3.

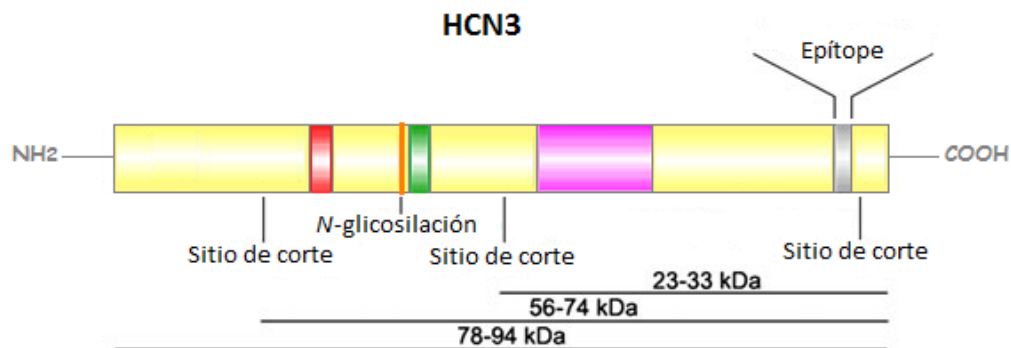
Se sabe que la proteólisis dirigida en los HCN puede favorecer la heteromerización entre los diferentes subtipos, cambiando sus propiedades funcionales. Esto se demostró en un estudio en el que se utilizaron anticuerpos específicos con diferentes epítopes en el HCN2 cardiaco; dos anticuerpos estaban dirigidos a dos regiones del NH<sub>2</sub>-terminal y otro más dirigido al COOH-terminal. En los Western-blots se encontró que solo los anticuerpos dirigidos al NH<sub>2</sub>-terminal revelaban una banda de ~60 kDa, menor al peso molecular esperado para el canal HCN2 (~105 kDa). Mientras que no se detectaron bandas inmunoreactivas con los anticuerpos con epítipo en el COOH-terminal del HCN2. Este hallazgo llevó a la conclusión de que el canal HCN2 presenta una proteólisis dirigida hacia el COOH-terminal. Asimismo, demostraron que el HCN2 forma un canal heteromérico con el HCN4, el cual es funcional y tiene propiedades distintas (se activa más rápidamente) que los canales homómeros HCN2 o HCN4 en el corazón<sup>49</sup>.

Es posible que al igual que el HCN2 cardiaco, el HCN3 en el riñón sufra una proteólisis dirigida y esté co-ensamblado con otro HCN, generando así un canal funcional. Para confirmar que la banda proteica de ~65 kDa encontrada en el riñón se trata de una proteólisis del canal HCN3 dirigida hacia el NH<sub>2</sub>- terminal, será necesario realizar un Western-blot con un anticuerpo dirigido a un epítipo COOH-terminal<sup>49</sup>. Con este experimento esperaríamos encontrar un fragmento de ~ 25 kDa, el cual correspondería al fragmento con el COOH - terminal y por lo tanto el fragmento de ~65 kDa no sería detectado.

Una explicación para la expresión en la superficie celular de los canales HCN1/HCN3 en su forma no glicosilada, es que son capaces de formar heterotetrámeros lo que hace redundante que las cuatro subunidades que forman el canal estén N-glicosiladas<sup>4</sup>. Para determinar si el canal HCN3 en el riñón forma heterotetrámeros será necesario realizar ensayos de co-inmunoprecipitación con las demás subtipos de HCN, excepto con el HCN2 ya que está demostrado que no forma heterotetrámeros con el HCN3<sup>4</sup>. Posteriormente, habría que confirmar que la isoforma que acompañe al HCN3 este N-glicosilada<sup>4</sup>. El ensayo se haría principalmente con el HCN1, que recientemente se localizó en las BBMV (datos no publicados).

Otro experimento que confirmaría que el fragmento de 65 kDa llega a la membrana plasmática, sería construir canales HCN3 sin NH<sub>2</sub>-terminal<sup>50</sup> y co-inyectar su RNAm junto con el del HCN1 en ovocitos. Los registros electrofisiológicos por voltage-clamp permitirían saber si es funcional. También, con el HCN3 truncado en el amino se podrían hacer estudios de microscopia confocal para saber si aun así llega a la membrana plasmática.

Estudios adicionales de funcionalidad como la microperfusión de túbulos aislados o el uso de vesículas del borde de cepillo serían necesarios para confirmar el papel de los canales HCN en el transporte de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, como ocurre con el HCN2.



**Figura 10. Diagrama del HCN3 (modificado de Calejo,A et col, 2014).** En el esquema de la cadena polipeptídica se ilustran las regiones que corresponden a los pesos moleculares de las bandas inmunoreactivas observadas de los fragmentos proteolíticos y de la proteína completa. A demás, se muestran los dominios en diferentes colores: en rojo el sensor de voltaje; en verde, la región del poro; en rosa, la región de unión a nucleótidos y en anaranjado, el sitio de N-glicosilación.

# Conclusión

---

- El canal HCN3 está N-glicosilado en el hipotálamo, pero no el riñón de la rata.

# Perspectivas

---

- Clonar el canal HCN3 renal, analizar su secuencia y compararla con la del canal en el cerebro.
- Llevar a cabo ensayos de Western Blot utilizando un anticuerpo dirigido a un epítotope en el amino N-terminal de canal HCN3 para confirmar que se trata de una proteólisis del canal completo en el tejido renal.
- Realizar estudios funcionales en ovocitos y la microperfusión de túbulos aislados para confirmar la funcionalidad y el transporte de amonio por el canal HCN3 renal.

# Referencias.

---

- (1) Schwarz, F.; Aebi, M. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2011**, *21*, 576–582.
- (2) Aebi, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1833*, 2430–2437.
- (3) Moremen, K. W.; Tiemeyer, M.; Nairn, A. V. **2014**, *13*, 448–462.
- (4) Much, B.; Wahl-Schott, C.; Zong, X.; Schneider, A.; Baumann, L.; Moosmang, S.; Ludwig, A.; Biel, M. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 43781–43786.
- (5) Mant, A.; Williams, S.; Roncoroni, L.; Lowry, E.; Johnson, D.; O’Kelly, I. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 3251–3264.
- (6) Hegle, A. P.; Nazzari, H.; Roth, A.; Angoli, D.; Accili, E. a. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2010**, *298*, C1066–C1076.
- (7) Gong, Q.; Anderson, C. L.; January, C. T.; Zhou, Z. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2002**, *283*, H77–H84.
- (8) Johnson, D.; Bennett, E. S. *Pflugers Arch.* **2008**, *456*, 393–405.
- (9) Napp, J.; Monje, F.; Stühmer, W.; Pardo, L. a. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 29506–29512.
- (10) Carrisoza-Gaytán, R.; Rangel, C.; Salvador, C.; Saldaña-Meyer, R.; Escalona, C.; Satlin, L. M.; Liu, W.; Zavidowitz, B.; Trujillo, J.; Bobadilla, N. a; Escobar, L. I. *Kidney Int.* **2011**, *80*, 832–840.
- (11) Escobar, L.; Mejía, N.; Gil, H.; Santos, F. *Nefrología* **2013**, *33*, 289–296.
- (12) Carrisoza, R.; Salvador, C.; Bobadilla, N. a; Trujillo, J.; Escobar, L. I. *Histochem. Cell Biol.* **2010**, *133*, 189–199.
- (13) Snider, J. Overview of Post Translational Modification  
<http://www.piercenet.com/method/overview-post-translational-modification> (accessed Aug 30, 2014).
- (14) Prabakaran, S.; Lippens, G.; Steen, H.; Gunawardena, J. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **2012**, *4*, 565–583.
- (15) Shumyantseva, V. V; Suprun, E. V; Bulko, T. V; Archakov, A. I. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *61*, 131–139.
- (16) Beck-Sickinger, A. G.; Mörl, K. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2006**, *45*, 1020–1020.
- (17) Van den Steen, P.; Rudd, P. M.; Dwek, R. a; Opdenakker, G. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1998**, *33*, 151–208.

- (18) Guyton, A. C.; Hall, J. E. *Textbook of Medical physiology*; 11th ed.; Elsevier Saunders, 2006.
- (19) Aidley, D. J. In *Animal Migration*; 1981; pp. 1–8.
- (20) Difrancesco, D.; Ph, D. **2006**, 151–155.
- (21) Pape, H. C. *Annu. Rev. Physiol.* **1996**, *58*, 299–327.
- (22) Wahl-Schott, C.; Biel, M. HCN channels: Structure, cellular regulation and physiological function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2009, *66*, 470–494.
- (23) Ludwig, a; Zong, X.; Hofmann, F.; Biel, M. *Cell. Physiol. Biochem.* **1999**, *9*, 179–186.
- (24) Robinson, R. B.; Siegelbaum, S. A. *Annu. Rev. Physiol.* **2003**, *65*, 453–480.
- (25) Santoro, B.; Tibbs, G. R. In *Annals of the New York Academy of Sciences*; 1999; Vol. 868, pp. 741–764.
- (26) Biel, M. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 9017–9021.
- (27) Bolívar, J. J.; Tapia, D.; Arenas, G.; Castañón-Arreola, M.; Torres, H.; Galarraga, E. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2008**, *294*, C893–C906.
- (28) Hofmann, F.; Biel, M.; Kaupp, U. B. *Pharmacol. Rev.* **2005**, *57*, 455–462.
- (29) Zha, Q.; Brewster, A. L.; Richichi, C.; Bender, R. A.; Baram, T. Z. *J. Neurochem.* **2008**, *105*, 68–77.
- (30) El-Kholy, W.; MacDonald, P. E.; Fox, J. M.; Bhattacharjee, A.; Xue, T.; Gao, X.; Zhang, Y.; Stieber, J.; Li, R. A.; Tsushima, R. G.; Wheeler, M. B. *Mol. Endocrinol.* **2007**, *21*, 753–764.
- (31) Hurtado, R.; Bub, G.; Herzlinger, D. *Kidney Int.* **2010**, *77*, 500–508.
- (32) Craven, K. B.; Zagotta, W. N. *Annu. Rev. Physiol.* **2006**, *68*, 375–401.
- (33) Calejo, A. I.; Reverendo, M.; Silva, V. S.; Pereira, P. M.; Santos, M. a S.; Zorec, R.; Gonçalves, P. P. *Mol. Biol. Rep.* **2014**, *41*, 297–307.
- (34) Boron, W. F.; Boulpaep, E. L. *Medical physiology: a cellular and molecular approach*; 2009; p. 1337.
- (35) Koeppen, B. M.; Stanton, B. A. Renal Physiology | 978-0-323-08691-2 | Elsevier <http://www.elsevier.com/books/renal-physiology/koeppen/978-0-323-08691-2> (accessed Aug 31, 2014).
- (36) Conti, F.; Weinberg, R. J. Shaping excitation at glutamatergic synapses. *Trends in Neurosciences*, 1999, *22*, 451–458.

- (37) Koeppen, B. M. **2014**, 275–281.
- (38) Weiner, I. D.; Verlander, J. W. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2011**, 300, F11–F23.
- (39) Thotakura, N. R.; Bahl, O. M. P. **1987**, 138, 350–359.
- (40) Suzuki, T. *Methods* **2005**, 35, 360–365.
- (41) Suzuki, T.; Park, H.; Lennarz, W. J. 635–641.
- (42) Haselbeck, A.; Schickaneder, E.; Von der Eltz, H.; Hosel, W. *Anal. Biochem.* **1990**, 191, 25–30.
- (43) Maley, F.; Trimble, R. B.; Tarentino, a L.; Plummer, T. H. *Anal. Biochem.* **1989**, 180, 195–204.
- (44) Varki, A. *Glycobiology* **1993**, 3, 97–130.
- (45) Turner, A. J.; Tanzawa, K. *FASEB J.* **1997**, 11, 355–364.
- (46) Loffing, J.; Pietri, L.; Aregger, F.; Bloch-faure, M. A. Y.; Ziegler, U. R. S.; Meneton, P.; Rossier, B. C.; Kaissling, B.; Pietri, L.; Aregger, F.; Bloch-faure, M.; Ziegler, U.; Meneton, P.; Rossier, C.; Differential, B. K. **2000**, 252–258.
- (47) Garcia-Caballero, A.; Ishmael, S. S.; Dang, Y.; Gillie, D.; Bond, J. S.; Milgram, S. L.; Stutts, M. J. *Channels* **2014**, 5, 14–22.
- (48) Bond, S.; Shirley, S.; Reckelhoff, J. F.; Judith, S. **1987**, 535–540.
- (49) Ye, B.; Nerbonne, J. M. *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 25553–25559.
- (50) Proenza, C.; Tran, N.; Angoli, D.; Zahynacz, K.; Balcar, P.; Accili, E. a. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 29634–29642.

# Apéndice

---

## PROCOLOS EXPERIMENTALES

### **Obtención de los tejidos para Western-blot .**

1. Inyectar 0.4 ml de pentobarbital sódico, vía intraperitoneal.
2. Una vez que el animal se encuentre profundamente anestesiado, colocarlo boca arriba y hacer una incisión en el abdomen para dejar expuestos los órganos internos.
3. Se rasga la capsula del riñón, se hace corta la vena y la arteria renal para así liberar al riñón.
4. Repetir el paso anterior para liberar al otro riñón.
5. Una vez obtenidos ambos riñones, se hace un corte en la primera cervical para dejar expuesta la parte posterior del cráneo.
6. Se corta la periferia del cráneo para liberar el cerebro.
7. Los tejidos se deben colocar inmediatamente en una solución de NaCl al 0.9% en baño de hielo.

### **Disección de los tejidos obtenidos.**

1. Riñones. Disectar cuidadosamente cada una de las secciones; corteza, medula externa y medula interna, sin contaminar una con otra.
2. Cerebro: Disectar el hipotálamo.

### **Procesamiento de los tejidos.**

1. Pesar cada tejido en una charola, sin la solución de extracción de proteínas.
2. Volver a colocar el tejido en un tubo y agregar 1 ml se solución de extracción de proteínas por cada 0.1g de tejido.
3. Homogenizar cada tejido con un homogenizador de vidrio
4. Congelar a -80°C para su posterior uso.



## **Fraccionamiento de las membranas.**

1. Centrifugar el homogenizado a 1000gs a 4°C por 10 minutos.
2. Recuperar el sobrenadante que corresponde a las membranas totales.
3. Cuantificar proteínas por Lowry.
4. Tomar una alícuota de las membranas totales y centrifugarla a 17000gs a 4°C por 20 minutos.
5. Retirar el sobrenadante.
6. Resuspender el pellet en solución de extracción de proteínas.  
Por cada ml de alícuota de membranas totales centrifugado agregar 200ml de solución de extracción.
7. Cuantificar proteínas por Método Lowry.
8. Alícuotar cada fracción de las membranas y almacenar a -20°C.

## **Reacción con la N-glicosidasa.**

1. Desnaturalizar 90 µg de proteína contenida en las membranas plasmáticas de: hipotálamo, corteza y medula externa renal en solución desnaturalizante (dilución 1:3) y calentar a 95°C por 10 minutos.
2. Dejar enfriar la muestra y agregar lo necesario de solución de incubación para diluir 1:4 la solución desnaturalizante.
3. Repartir la mezcla en 2 tubos, cada tubo tendrá 45 µg de la fracción membranal.
4. A uno de los tubos agregar 5 U de N-Glicosidasa F (Roche Diagnostics).
5. Incubar a 37 °C por 20 horas.
6. A cada tubo se le agregan 5 µl de solución Laemmli, para hacer la electroforesis.

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

Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización de la acrilamida por acción de un agente entrecruzador (N,N'-metilbisacrilamida), en presencia de un iniciador (N,N,N,N'-tetrametilnediamina o TEMED) y un catalizador ( $S_2O_8^-$ ). La efectividad en la separación de las proteínas está en función de la concentración de acrilamida, ya que esta determina el tamaño del poro en el gel. En este caso se usaron geles al 8% que separa proteínas de entre ~ 36-94 KDa. Los geles tenían un 1 mm de grosor y 10 pozos.

1. Después de preparar la solución de gel al 8% colocar 4 ml de esta en el soporte de solidificación.
2. Una vez solidificado, agregar al soporte la solución del gel concentrador y colocar el cepillo.
3. Esperar a que solidifique el gel.
4. Colocar el gel en el electroforador.
5. Agregar la solución de electroforesis y quitar el peine.
6. Cargar en un pozo 5  $\mu$ L de marcador de peso molecular.
7. Cargar las muestras en los pozos, dejando un espacio entre una y otra.
8. Cargar 5  $\mu$ L de solución de Laemmli en los pozos vacíos.
9. Conectar el electroforador a la fuente de poder.
10. Correr el gel a 100 V, hasta que el frente de corrida llegue a la parte inferior del gel.

### **Electrotransferencia.**

1. Cortar tres papeles filtro al tamaño del gel y una membrana de PVDF con las mismas dimensiones.
2. Humedecer la membrana de PVDF en metanol.
3. Retirar el gel del soporte.
4. Colocar por separado los filtros, la membrana y el gel en solución de transferencia.
5. Agitar suavemente por 15.
6. Sobre el aparato de electrotransferencia crear el sándwich de transferencia :
  - 2 papeles filtro
  - Membrana PVDF
  - Gel
  - 1 papel filtro
7. Colocar los electrodos y transferir a 10 V por 1 hora.
8. Una vez finalizada la transferencia retirar la membrana y lavar con solución TBS-T.

## **Inmunodetección.**

1. Bloquear la membrana sumergiéndola en solución de bloqueo por 1 hora a temperatura ambiente con agitación orbital constante.
2. Lavar con solución TBS-T.
3. Diluir el anticuerpo primario en solución de anticuerpo: para anti- HCN2 1:1000, anti-HCN3 1:400.
4. Agregar el anticuerpo primario a la membrana.
5. Incubar a 4°C toda la noche con agitación rotatoria.
6. Lavar la membrana con TBS-T por 10 minutos. Repetir tres veces.
7. Diluir el anticuerpo secundario anti-conejo en solución de anticuerpo: para el HCN2 1:15000 y para el HCN3 1:20000.
8. Agregar el anticuerpo secundario a la membrana.
9. Incubar a temperatura ambiente por 1 hora con agitación rotatoria.
10. Repetir el paso seis.
11. Dejar atemperar el reactivo Immobilon Western para revelado. Mezclar 750  $\mu$ L de solución A con 750  $\mu$ L de solución B.
12. Escurrir la membrana para eliminar el exceso de TBS-T (sin que se seque).
13. En una superficie limpia y plana, colocar la membrana para agregarle la mezcla de revelado. Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.
14. Escurrir la membrana para eliminar el exceso de la mezcla de revelado.
15. Colocar la membrana entre dos acetatos evitando la formación de burbujas y colocarla dentro del cassette para placas de rayos-X.
16. Una vez en un cuarto oscuro. Cortar una película autoradiográfica al tamaño de la membrana.
17. Abrir el cassette, colocar sobre los acetatos (con la membrana) la película y cerrar el cassette. Permitir la exposición de 30 segundos a 5 minutos dependiendo de la intensidad de la emisión.
18. Retirar la película del cassette, revelar y fijar.

## SOLUCIONES Y REACTIVOS

### Solución de extracción de proteínas

Sacarosa	250 Mm
EDTA	1 mM
Tris-Base (pH 7.4)	10 mM
PMSF	1 Mm

Adicionar una tableta de inhibidores de proteasas (Complete Roche) a 50 ml de la solución de extracción.

### Solución desnaturalizante

PB (pH 8.6)	0.025 M
EDTA	0.025 M
SDS	0.5%
$\beta$ -mercaptoetanol	1.0 %

### Solución de incubación

PB (pH 8.6)	0.025 M
EDTA	0.025 M
PMSF	1 mM

### Solución de electroforesis

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

### Solución de Laemmli (Bio-Rad)

Tris-HCl (pH 6.8)	65.8mM
SDS	2.1 %
Glicerina	26.3 %
Azul de Bromofenol	0.01 %

## Solución de Transferencia.

Tris-Base (pH 8.3)	25 mM
Glicina	192 mM
SDS	0.01 %
Metanol	20 %

## Gel de SDS-poliacrilamida.

### Gel separador (8 %)

Para 5 ml de gel separador se prepara con las siguientes concentraciones:

H <sub>2</sub> O desionizada		2.3 ml
Acrilamida mix (Bio-Rad)	30 %	1.3 ml
Tris (pH 8.8)	1.5 M	1.3 ml
SDS	10 %	0.05 ml
Persulfato de amonio	10 %	0.05 ml
TEMED (Bio-Rad)		0.003 ml

*Nota: El TEMED se agrega al final e inmediatamente después se vierte la mezcla en las placas de vidrio.*

*Para vidrios de 1mm verter 4 ml x gel*

### Gel concentrador (5 %)

Para 3 ml de gel concentrador se prepara con las siguientes concentraciones:

H <sub>2</sub> O desionizada		2.1 ml
Acrilamida mix (Bio-Rad)	30 %	0.5 ml
Tris (pH 6.8)	1.0 M	0.38 ml
SDS	10 %	0.03 ml
Persulfato de amonio	10 %	0.03 ml
TEMED (Bio-Rad)		0.003 ml

*Nota: El TEMED se agrega al final e inmediatamente después se vierte la mezcla en las placas de vidrio, sobre el gel separador. Para vidrios de 1mm verter 2 ml x gel*

### **Solución amortiguadora salina (TBS) pH 7.6**

NaCl	137 mM
Tris-Base	20 mM
H <sub>2</sub> O	c.b.p

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

Disolver 1 ml de Tween-20 en 999 ml de TBS.

### **Solución de bloqueo.**

5 % de leche en polvo sin grasa (Bio-Rad) en TBS-T 0.1%

### **Solución de anticuerpos.**

Disolver en TBS-T 0.1 % :

1 % Albumina en polvo

0.2 % Leche en polvo sin grasa (Bio-Rad)

### **Reactivo para cuantificar proteínas**

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

### **Reactivo inmobilon western (Millipore).**

Sustrato HRP que consisten en el reactivo luminol y solución de peróxido.

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

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

Almacenar en frasco ámbar.

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

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

Aforar a 1 L con agua.

Almacenar en frasco ámbar.