



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DE UNA DIETA ALTA EN POTASIO EN LA EXPRESIÓN
DEL CANAL DE AMONIO HCN2 EN EL RIÑÓN DE LA RATA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

ERIKA GUTIÉRREZ VÁSQUEZ



MÉXICO, D.F.

AÑO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** **ELENA ZAMBRANO GONZALEZ**

VOCAL: **Profesor:** **MARIA ELENA IBARRA RUBIO**

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

1er. SUPLENTE: **Profesor:** **VANESSA REBECA MAYA AMPUDIA**

2° SUPLENTE: **Profesor:** **GUILLERMO CELESTINO CARDOSO SALDAÑA**

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:

TERESA PADILLA FLORES

SUSTENTANTE:

ERIKA GUTIÉRREZ VÁSQUEZ

El financiamiento para la realización de este trabajo fue proporcionado por:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
Proyecto: CB-2010/151480

Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica
Proyecto: PAPIIT IN214613

ÍNDICE

I.	<u>LISTA DE ABREVIATURAS</u>	5
II.	<u>RESUMEN</u>	7
III.	<u>INTRODUCCIÓN</u>	9
	3.1. CANALES IÓNICOS	9
	3.2. CANALES DEPENDIENTES DE VOLTAJE	11
	3.3. CANALES CATIÓNICOS ACTIVADOS POR HIPERPOLARIZACIÓN Y MODULADOS POR NUCLEÓTIDOS CÍCLICOS (HCN)	11
	3.4. ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA RENAL	14
	2.4.1 REGULACIÓN RENAL DEL EQUILIBRIO ÁCIDO BASE	18
	2.4.2 HOMEOSTASIS DEL POTASIO	23
IV.	<u>ANTECEDENTES</u>	26
V.	<u>JUSTIFICACIÓN</u>	27
VI.	<u>OBJETIVO</u>	28
VII.	<u>HIPÓTESIS</u>	28
VIII.	<u>METODOLOGÍA</u>	29
	8.1 WESTERN BLOT	29
	8.1.1 FUNDAMENTO	29
	8.1.2 MÉTODO	30
	8.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	33
IX.	<u>RESULTADOS</u>	35
X.	<u>DISCUSIÓN</u>	42
XI.	<u>CONCLUSIONES</u>	47
XII.	<u>PERSPECTIVAS</u>	47
XIII.	<u>REFERENCIAS</u>	48
XIV.	<u>SOLUCIONES Y REACTIVOS</u>	53

I. Lista de abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico
AE1: Intercambiador aniónico cloruro-bicarbonato
 α -KG: Alfa-cetoglutarato
AMPc: Adenosín monofosfato cíclico
ATP: Trifosfato de Adenosina
B^oAT1: Cotransportador de aminoácidos neutros
Ca²⁺: Ión calcio
CaMKII: Proteína cinasa II calmodulina dependiente de Ca²⁺
CCC: Conducto colector cortical
CCME: Conducto colector de la médula externa
CCMI: Conducto colector de la meédula interna
Ce: Cerebelo
Cl: Ión cloruro
CNBD: Dominio de unión a nucleótidos cíclicos
CO₂: Dióxido de carbono
Cor: Corazón
Cx: Corteza renal
DAH: Porción delgada ascendente del Asa de Henle
DDH: Porción delgada descendente del Asa de Henle
ENaC: Canal epitelial de sodio
FEK: Fracción excretada de potasio
GA: Glutaminasa
GAH: Porción gruesa ascendente del Asa de Henle
GDH: Glutamato deshidrogenasa
Gln: Glutamina
Glu: Glutamato
H⁺: Protón
H₂O: Agua
HCN: Canales catiónicos activados por hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos
HCO₃⁻: Bicarbonato
HRP: Peroxidasa de rábano
IgG: Inmunoglobulina G
K⁺: Ión potasio
KCR1: Proteína reguladora de canales de potasio
Kv1.3: Canal de potasio activado por voltaje 1.3
MaxiK: Canal de potasio de gran conductancia
Me: Médula renal
Mg²⁺: Ión magnesio
MinK: Proteína mínima de canal de K⁺

MINT2: Proteína blanco de interacción nuclear
MiRP1: Proteína relacionada con MinK
Na⁺: Ión sodio
NBCe1: Cotransportador sodio-bicarbonato electrogénico ($\text{Na}^+/\text{3HCO}_3^-$)
NBCn1: Cotransportador sodio-bicarbonato electroneutro ($\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$)
NH₃: Amoníaco
NH₄⁺: Ión amonio
NHE-3: Intercambiador sodio-protón
NKCC: Cotransportador sodio-potasio-cloruro ($\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$)
OAA: Ácido oxaloacético
p38-MAPK: Proteína cinasa activada por mitógeno
PEP: Fosfoenol piruvato
PEPCK: Fosfoenolpiruvato carboxicinasa
PIP₂: Fosfatidil inositol 4,5 bifosfato
PKC: Proteína cinasa C
Rhbg: Glicoproteína Rhesus B
Rhcg: Glicoproteína Rhesus C
ROMK: Canal de potasio de la médula externa renal
SNAT: Transportador de aminoácidos neutros
TBS-T: Amortiguador salino Tris con Tween al 0.1%
TCA: Ciclo de los ácidos tricarbónicos
TCD: Túbulo contorneado distal
TCN: Túbulo conector
TCP: Túbulo contorneado proximal
TRP: Túbulo recto proximal
V-ATPasa: ATPasa vacuolar transportadora de protones

II. RESUMEN

Los canales catiónicos activados por la hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos (HCN) son canales permeables a sodio (Na^+) que participan en la regulación de la actividad marcapaso. Existen 4 isotipos (HCN1- 4) y se encuentran distribuidos principalmente en el tejido nervioso y cardíaco.

Recientemente, en nuestro laboratorio, se identificó a la familia de canales HCN en el riñón de la rata y se observó que se expresan de manera diferencial a lo largo de la nefrona. Asimismo, se demostró que el canal HCN2 se encuentra en la membrana basolateral de las células intercaladas secretoras de ácido del conducto colector y que participa en el transporte transcelular del ión amonio (NH_4^+).

Las excreción de NH_4^+ en la orina a través de las células intercaladas es muy importante para la regulación del pH sanguíneo debido a que es el principal amortiguador urinario, por lo que su síntesis y transporte le permite a los riñones incrementar la excreción de protones.

Sin embargo, también en trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, se observó que en ratas con acidosis metabólica crónica no se alteran los niveles del canal HCN2, pero si se regula a la baja la abundancia relativa del RNAm.

Se sabe que existe una estrecha relación entre los niveles plasmáticos de potasio (K^+) y la producción renal de amonio, lo que a su vez regula el equilibrio ácido base. Por ello, en este proyecto se evaluó el efecto de una dieta con alto contenido de K^+ (10%) sobre los niveles del canal HCN2 en el epitelio renal de la rata, para lo cual se estudiaron dos grupos: control, sometido a una dieta con contenido estándar de K^+ (0.6%) y experimental, alimentado con una dieta alta en K^+ (10%).

La dieta alta en K^+ provocó una disminución de los niveles del canal HCN2 en la corteza renal con respecto al grupo control, mientras que en la médula renal tuvo el efecto contrario, es decir, indujo un incremento de los niveles del HCN2.

Estos resultados sugieren que en estas condiciones el canal HCN2 funciona como un canal de sodio y, en consecuencia, su abundancia se regula a la baja en la corteza renal, mientras que en la médula renal, se regula a la alta para favorecer la eliminación del exceso de K^+ en la orina.

III. INTRODUCCIÓN

3.1 CANALES IÓNICOS

La membrana plasmática es un complejo supramolecular compuesto por fosfolípidos, proteínas (transmembranales y periféricas), carbohidratos y colesterol. Constituye una barrera selectivamente permeable que separa físicamente a la célula del ambiente externo y permite regular la composición del medio interno, de manera que éste sea favorable para la vida.

Las proteínas transmembranales que permiten el paso de solutos a través de la membrana plasmática son 1) las proteínas que forman poros, comúnmente llamados canales iónicos y 2) las proteínas transportadoras (por simplicidad denominadas transportadores). Los canales iónicos se clasifican en términos de su selectividad iónica y sus mecanismos de regulación (Aidley, 1998).

Por su selectividad iónica se dividen en:

Canales catiónicos

- Canales de sodio (Na^+)
- Canales de potasio (K^+)
- Canales de calcio (Ca^{2+})
- Canales catiónicos no selectivos

Canales aniónicos

- Canales de cloruro (Cl^-)

Por su mecanismo de regulación se dividen en:

- Canales dependientes de voltaje
- Canales regulados por ligando
- Canales regulados por su combinación con ligandos internos (tales como: iones calcio, ATP, nucleótidos cíclicos, etc.)
- Canales sensibles a presión
- Canales de uniones celulares (conectan el citoplasma de dos células adyacentes)

Los transportadores se unen al soluto que va a ser transportado y sufren una serie de cambios conformacionales que permiten su transferencia. Algunos pueden catalizar un transporte activo, es decir, el transporte de un soluto en contra de su gradiente de concentración, el cual requiere un aporte energético tal como la hidrólisis de ATP. Los canales iónicos no unen al soluto, forman poros hidrofílicos que atraviesan la bicapa lipídica, dichos poros son estrechos, selectivos y no se encuentran abiertos continuamente (Figura 1).

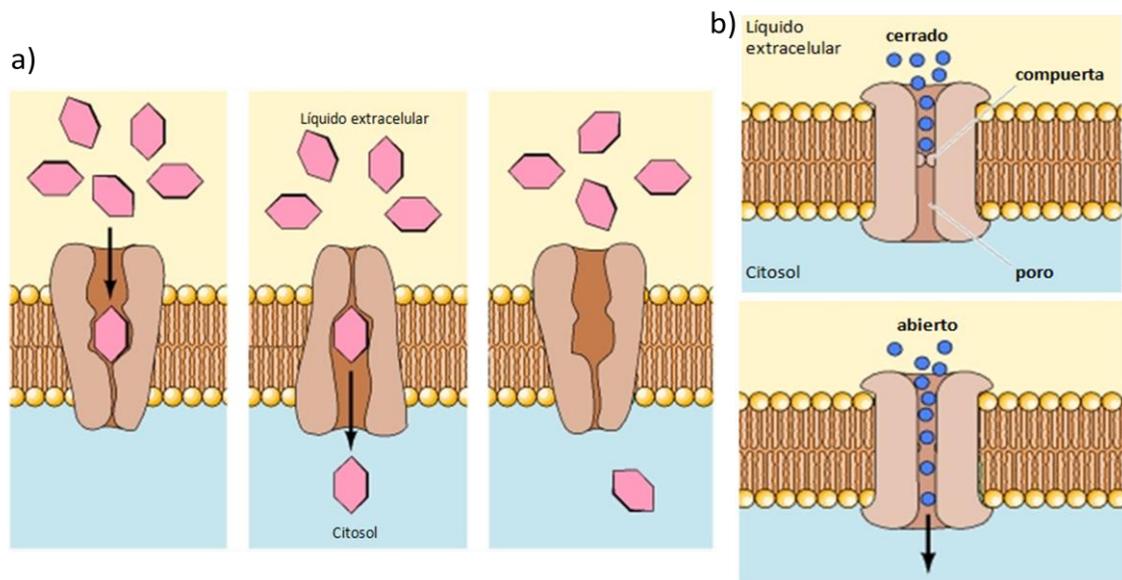


Figura 1. Transportadores y canales iónicos (modificada de Cooper, 2000). a) Muestra el mecanismo de transporte a través de una proteína transportadora. El soluto se une a un sitio de la proteína, expuesto extracelularmente, lo que induce un cambio en su conformación y una vez que libera al soluto en el interior de la célula, regresa a su conformación inicial. b) Muestra el mecanismo de transporte a través de un canal. En la conformación cerrada el flujo de iones es bloqueado por una “compuerta”. La apertura de la compuerta permite rápidamente el flujo de iones a través del canal. *Por simplicidad en esta imagen se describe el paso de solutos desde el líquido extracelular hacia el citosol, sin embargo, el transporte también ocurre en la dirección contraria, lo cual depende del tipo de proteína transportadora y de las necesidades de la célula.

Además, los canales suelen presentar una elevada selectividad para determinada especie iónica y se caracterizan por un umbral específico de activación (Conti, 2010). El transporte a través de los canales siempre es a favor del gradiente de concentración (transporte pasivo). Respecto a su eficiencia de transporte, los canales tienen ventaja sobre los transportadores, ya que permiten que iones con el tamaño y carga adecuados crucen la

membrana a favor de sus gradientes electroquímicos a velocidades 1000 veces mayores que las que se alcanzan mediante un transportador (Alberts, 2002).

3.2 CANALES DEPENDIENTES DE VOLTAJE

La mayoría de los canales dependientes de voltaje se abren después de una despolarización, es decir, el cambio del potencial de membrana hacia valores menos negativos que su potencial en reposo, pero también existen canales que se activan cuando ocurre una hiperpolarización, es decir, una acentuación del potencial en reposo hacia valores más negativos (Conti, 2010).

Los canales dependientes de voltaje desempeñan una función clave en los mecanismos que determinan la liberación de neurotransmisores en las terminaciones nerviosas y participan en la actividad rítmica espontánea de las células marcapaso (Alberts, 2002).

3.3 CANALES CATIONICOS ACTIVADOS POR HIPERPOLARIZACIÓN Y MODULADOS POR NUCLEÓTIDOS CÍCLICOS (HCN)

Los canales catiónicos activados por hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos (HCN) permiten el flujo de Na^+ en condiciones fisiológicas (Biel et al., 2009; Kusch et al., 2010), sin embargo, recientemente se demostró que en el tejido renal también transportan amonio (Carrisoza et al., 2011). Existen 4 subtipos (HCN1- 4) y se encuentran ampliamente distribuidos en los tejidos nervioso y cardiaco (Biel et al., 2009).

El flujo de iones Na^+ , a través de los HCN, genera una corriente entrante llamada I_h (Biel et al., 2009; Wahl-Schott y Biel, 2009), característica en el corazón y el cerebro para el control de la actividad de marcapasos eléctrico.

La corriente I_h contribuye con diversas funciones nerviosas incluyendo la determinación del potencial de membrana en reposo, la generación de oscilación neuronal, la regulación de la integración dendrítica y la transmisión sináptica, por lo cual está implicada en múltiples procesos fisiológicos como los

latidos del corazón, los ciclos sueño-vigilia, el aprendizaje, la memoria, la sensación y percepción (He et al., 2014).

Estructura y distribución

Los canales HCN están ampliamente distribuidos en el corazón y el cerebro, sin embargo, también se ha reportado su expresión en tejidos no excitables. En la Tabla 1 se muestra la distribución de las cuatro isoformas en diferentes tejidos.

Tabla 1. Distribución de la familia de canales HCN en la rata

Isoforma	Localización
HCN1	Hipocampo, neo-corteza, cerebelo, tallo encefálico, ganglios de la raíz dorsal, médula espinal, nódulo sino auricular, retina, ovario, células pancreáticas, glándula pituitaria, riñón.
HCN2	Tálamo, tallo encefálico, bulbo olfativo, ganglios de la raíz dorsal, células cardiacas, riñón, ovario, células pancreáticas, retina y glándula pituitaria.
HCN3	Cerebro, bulbo olfativo, ganglios de la raíz dorsal, corazón, retina, ovario, células pancreáticas, glándula pituitaria, riñón.
HCN4	Bulbo olfativo, tálamo, nódulo sinoauricular, fibras de Purkinje, ganglios de la raíz dorsal, retina, ovario, células pancreáticas, glándula pituitaria, riñón.

Santoro et al., 2000; Kaupp, 2001; Muller et al., 2003; El-Kholy et al., 2007; Bolivar et al., 2008; Yeh et al., 2008; Kouranova et al., 2008; Calejo et al., 2014.

Cada canal posee 4 subunidades, las cuales forman un poro y cada una de ellas presenta 6 dominios transmembranales (S1-S6), incluyendo un dominio cargado positivamente (S4) que funciona como sensor de voltaje (Vaca et al., 2000) y un dominio de unión de nucleótidos cíclicos (cyclic nucleotide-binding domain, CNBD) en el carboxilo terminal (Figura 2). En la región del poro tienen un motivo glicina-tirosina-glicina (GYG) entre S5 y S6, el cual funciona como filtro de selectividad en los canales de K⁺ (Wahl-Schott y Biel, 2009; Macri et al., 2012).

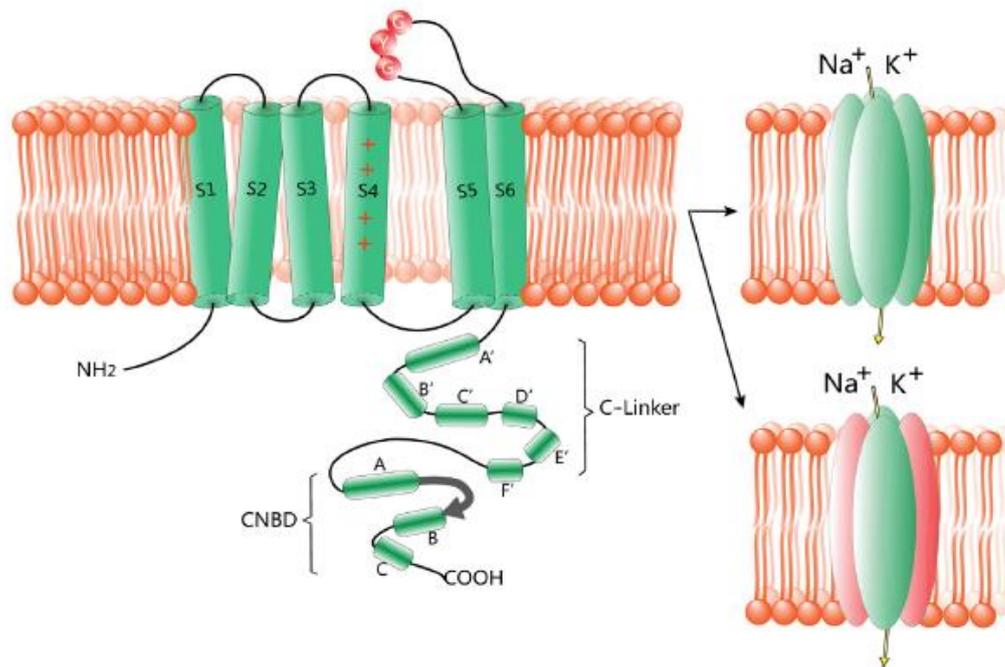


Figura 2. Estructura de los canales HCN (He et al, 2014). Izquierda: se muestra una subunidad completa con sus seis segmentos transmembranales (S1-S6), el dominio sensor de voltaje cargado positivamente (S4) y la región del poro que presenta el motivo GYG entre S5 y S6. El carboxilo terminal de los canales HCN contiene a la región C-enlazadora, que consta de 6 α -hélices (A'-F'), y el dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD) que media su respuesta a AMPc. El CNBD consta de 3 α -hélices (A-C), con una lámina β entre las hélices A y B. Derecha: las cuatro subunidades se ensamblan en tetrámeros homoméricos o heteroméricos.

Cinética y regulación

La activación voltaje-dependiente de los canales HCN tiene lugar a voltajes más negativos que -50 mV, no obstante dicho potencial varía cuantitativamente entre los diferentes subtipos del canal HCN. El canal HCN1 se activa alrededor de -70 mV; el canal HCN2 a -95 mV; el canal HCN3 a -77 mV y el canal HCN4 a -100 mV. Sin embargo, estos potenciales de activación pueden modificarse por diversas condiciones (Altomare et al., 2003; He et al., 2014).

La expresión y propiedades funcionales de los canales HCN se diversifican para adaptarse a sus papeles fisiológicos correspondientes, a través de una regulación precisa. A corto plazo por metabolitos celulares que interactúan directamente con los canales, o proteínas cinasas que inducen su fosforilación. Mientras que a largo plazo se regula su expresión, heteromerización o redistribución subcelular (He et al., 2014).

Los canales HCN están modulados por su unión a AMPc. La sensibilidad de los canales HCN al AMPc está mediada por el carboxilo terminal. La unión del AMPc al CNBD acelera la apertura del canal y cambia el voltaje de activación a valores más positivos (Zagotta et al., 2003; Wahl-Schott y Biel, 2009). Por otro lado, los canales HCN también están regulados por su interacción con diferentes proteínas y moléculas pequeñas (PIP₂, Filamina A, KCR1, MiRP1, MINT2, etc.), proteínas cinasas (Tirosina cinasa Src, p38-MAPK, PKC, CaMKII) y por neurotransmisores extracelulares, así como por la concentración intracelular de iones cloruro y protones (Biel et al., 2009; He et al., 2014).

3.4 ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA RENAL

El riñón es un órgano muy importante que tiene diversas funciones: la excreción de productos de desecho, la regulación del equilibrio hidroelectrolítico y de la presión arterial, el mantenimiento del equilibrio ácido-base, la regulación de la producción de eritrocitos, la secreción, metabolismo y excreción de hormonas, así como la producción de calcitriol (vitamina D3), entre otras (Guyton y Hall, 2011).

Los riñones son órganos, con forma de frijol, situados en la pared posterior del abdomen fuera de la cavidad peritoneal, que forman parte del aparato urinario junto con la vejiga, uréteres y uretra. En el humano adulto cada riñón pesa en promedio entre 140 y 150 gramos, y mide 10 cm de largo por 5 cm de ancho.

En la cara medial de cada riñón se encuentra el hilio renal, sitio por el cual pasan las arterias y las venas renales, los nervios renales, los vasos linfáticos y el uréter. Este último se origina en la pelvis renal, emerge por el hilio renal y desciende hasta conectarse con la vejiga urinaria. La orina que se forma en los riñones pasa por los uréteres hasta la vejiga urinaria, en donde se almacena hasta que este órgano se distiende y se produce la micción para expulsar la orina a través de la uretra (Drucker, 2005).

Cada riñón está rodeado por una cápsula fibrosa de tejido conectivo que protege sus estructuras internas. En un corte sagital del riñón se observan dos regiones principales: corteza y médula. La primera es la región externa y rodea

por completo a la médula. La segunda ocupa la región central del riñón y se divide en 8-10 estructuras cónicas llamadas pirámides renales, tal como se muestra en la figura 3 (Guyton y Hall, 2011).

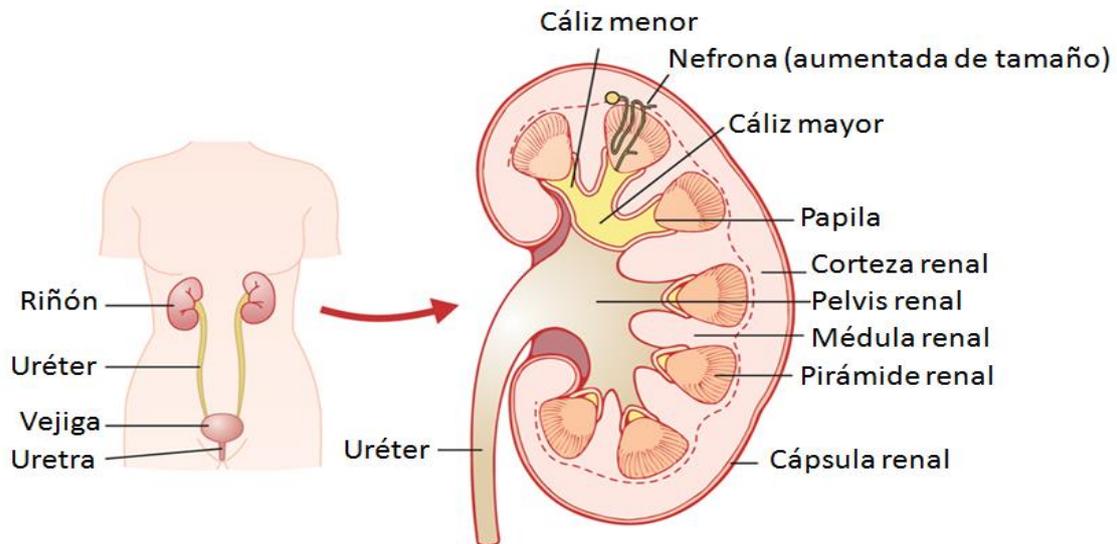


Figura 3. Organización general de los riñones y del sistema urinario (Guyton y Hall, 2011)

La nefrona es la unidad funcional del riñón. Cada riñón tiene alrededor de 1.2 millones de nefronas (Boron, 2009), cuya regeneración es muy lenta, por lo que hay una reducción gradual de su número por lesión, enfermedad o envejecimiento (Maeshima, 2003; Bruno 2014). Cada nefrona está integrada por los segmentos siguientes: el glomérulo (rodeado por la cápsula de Bowman), el túbulo contorneado y recto proximal, el asa de Henle (con una rama descendente delgada, una ascendente delgada y una ascendente gruesa), el túbulo contorneado distal y el conducto colector (Figura 3). Cada segmento está compuesto por diferentes tipos celulares con funciones de transporte específicas (Tabla 2).

Los iones se transportan desde el lumen tubular hacia el intersticio por vía transcelular o paracelular. En la primera, la velocidad del transporte de los iones depende de los gradientes electroquímicos, de los canales iónicos y de los transportadores presentes en las membranas apical y basolateral; mientras que en la segunda, los iones pasan a través de las uniones estrechas entre las células (Boron, 2009).

Tabla 2. Transporte en los diferentes segmentos de la nefrona

Segmento de la nefrona	Tipo celular	Transporte
Túbulo contorneado proximal (TCP)	S1 y S2	Reabsorción: Na ⁺ , Cl ⁻ , K ⁺ , H ₂ O, HCO ₃ ⁻ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , aminoácidos, glucosa, urea fosfato, sulfato, lactato y otros ácidos monocarboxílicos y dicarboxílicos. Secreción: H ⁺ , NH ₃ /NH ₄ ⁺ , bases y ácidos orgánicos (sales biliares, oxalato, urato, catecolaminas, etc.).
Túbulo recto proximal (TRP)	S3	Reabsorción: Na ⁺ , Cl ⁻ , glucosa y urato. Secreción: K ⁺ , cationes orgánicos (neurotransmisores mono amina como la dopamina y noradrenalina y cationes orgánicos exógenos como la quinina, morfina, etc.).
Porción delgada descendente del Asa de Henle (DDH)	Células DDH	Reabsorción: Na ⁺ , H ₂ O. Secreción: K ⁺ , urea y NH ₄ ⁺ .
Porción delgada ascendente del Asa de Henle (DAH)	Células DAH	Reabsorción: Na ⁺ Secreción: urea
Porción gruesa ascendente del Asa de Henle (GAH)	Células GAH	Reabsorción: Na ⁺ , Cl ⁻ , K ⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , HCO ₃ ⁻ , fosfato y NH ₄ ⁺ . Secreción: H ⁺
Túbulo contorneado distal (TCD)	TCD	Reabsorción: Na ⁺ , Cl ⁻ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , K ⁺ , HCO ₃ ⁻ Secreción: H ⁺
Túbulo conector (TCN)	Células TCN Células intercaladas	Reabsorción: Na ⁺ , Cl ⁻ . Secreción: K ⁺
Conducto colector cortical (CCC)	Células principales	Reabsorción: Na ⁺ , Cl ⁻ . Secreción: K ⁺
	Células intercaladas	(α) Reabsorción: K ⁺ , HCO ₃ ⁻ Secreción: H ⁺ (β) Reabsorción: Cl ⁻ Secreción: HCO ₃ ⁻
Conducto colector de la médula externa (CCME)	Células principales e intercaladas	Reabsorción: K ⁺ , Na ⁺ , Cl ⁻ , HCO ₃ ⁻ Secreción: NH ₃ , H ⁺
Conducto colector de la médula interna (CCMI)	Células principales e intercaladas	Reabsorción: Na ⁺ , urea, K ⁺ Secreción: NH ₄ ⁺

Alpern y Hebert, 2008; Boron, 2009; Conti, 2010; Guyton y Hall, 2011.

Hay dos tipos de nefronas, las corticales y las yuxtamedulares (Figura 4). Las primeras son las más abundantes, su glomérulo se localiza en la parte más superficial de la corteza y tienen asas de Henle cortas que terminan en el sitio donde comienza la médula interna. En cambio, las nefronas yuxtamedulares son menos abundantes, sus glomérulos se localizan en la parte profunda de la corteza renal, cerca de la médula externa, y presentan largas asas de Henle que atraviesan la médula y desembocan en las papilas renales.

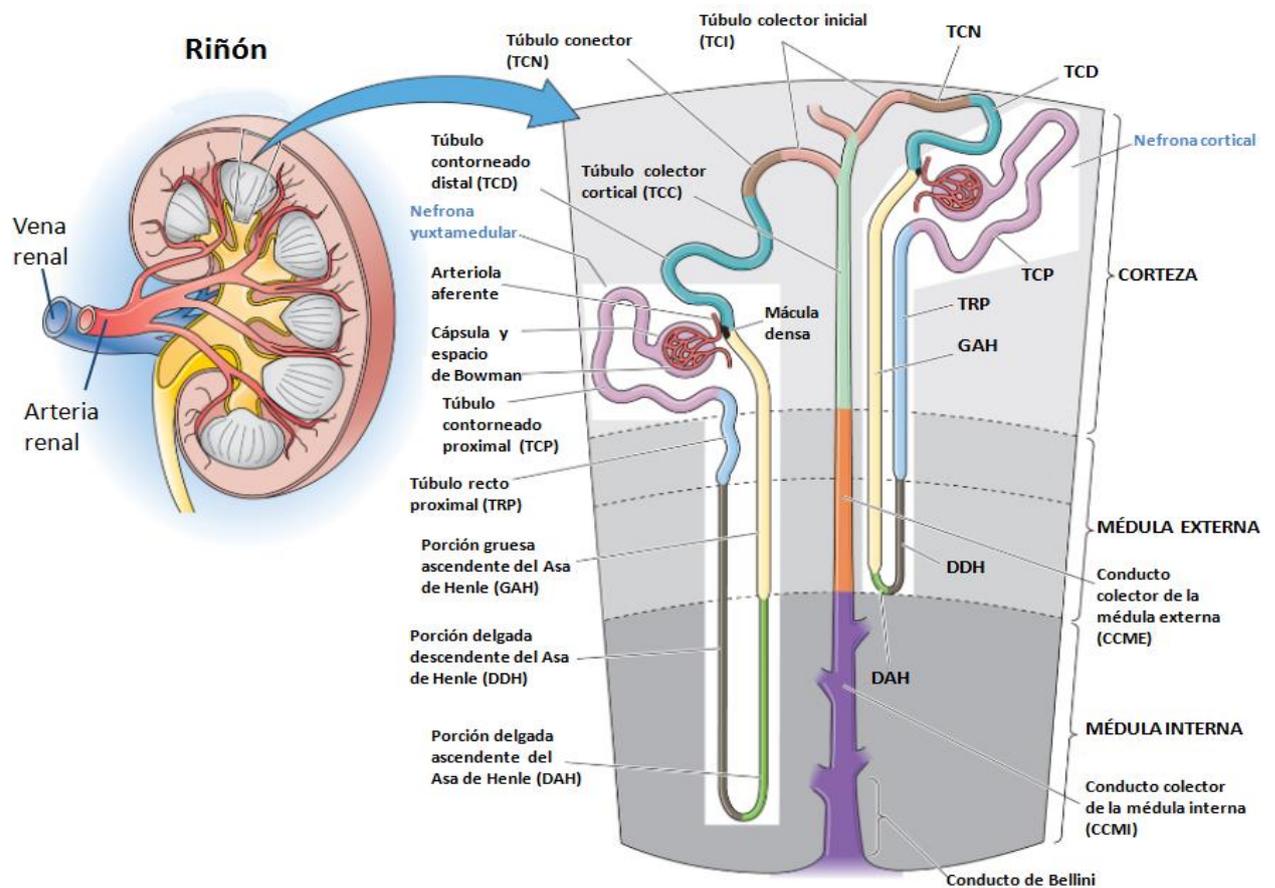


Figura 4. Estructura de la nefrona (Traducida de Boron, 2009)

La formación de orina, mecanismo por el cual se excretan diferentes cantidades de agua, iones y productos de desecho, es el resultado de tres procesos renales:

- 1) Filtración glomerular.
- 2) Reabsorción de sustancias de los túbulos renales hacia la sangre.
- 3) Secreción de sustancias desde la sangre hacia los túbulos.

Cada uno de estos procesos se regula de acuerdo a las necesidades del organismo. En el proceso de filtración glomerular, una gran cantidad de agua y solutos pasa desde los capilares glomerulares hacia la cápsula de Bowman. La mayor parte de las sustancias del plasma se filtran libremente, excepto las proteínas plasmáticas debido a su tamaño y carga negativa.

A medida que el ultrafiltrado del plasma abandona la cápsula de Bowman y pasa por el túbulo de células epiteliales, su composición se modifica por la reabsorción de agua y solutos hacia la sangre, y por la secreción de algunas sustancias desde los capilares peritubulares hacia la luz tubular. De este modo, el riñón regula la excreción o reabsorción de diferentes sustancias dependiendo de las necesidades del organismo. Por ejemplo, algunas sustancias como la glucosa, los aminoácidos, el bicarbonato (HCO_3^-), etc. se reabsorben totalmente en los túbulos, por lo que su excreción urinaria es casi nula. Los productos de desecho, como la creatinina, se reabsorben mal, por lo cual casi el 100% de la cantidad filtrada se excreta. En el caso de los iones del plasma, su reabsorción y excreción varían dependiendo de los requerimientos corporales (Guyton y Hall, 2011).

3.4.1 REGULACIÓN RENAL DEL EQUILIBRIO ÁCIDO-BASE

La regulación del pH es crítica para el funcionamiento de las células, por lo tanto el pH extracelular debe mantenerse dentro de un margen estrecho. El espectro de valores de pH extracelular compatible con la vida se encuentra entre 6.8 y 7.8, siendo los valores normales de 7.35-7.45 (Conti, 2010).

Para alcanzar la homeostasis ácido-base debe existir un equilibrio entre la ingestión o la producción de iones hidrógeno (H^+) y su eliminación neta del organismo. El control preciso de la concentración de H^+ en el líquido extra e intracelular implica distintos procesos. Los pulmones y los riñones regulan el balance ácido-base de la sangre, a través del control independiente de los dos componentes del sistema de amortiguación principal del cuerpo: CO_2 y HCO_3^- (Boron, 2009).

El organismo produce ácidos volátiles (CO_2) y no volátiles (ácido sulfúrico, ácido fosfórico y amonio), que proceden principalmente del metabolismo de las proteínas. El mecanismo principal de eliminación de los ácidos no volátiles es la excreción renal.

Los riñones regulan el equilibrio ácido-base al excretar orina ácida o básica, según se requiera, mediante tres mecanismos básicos: 1) secreción de H^+ ; 2) reabsorción del HCO_3^- filtrado, y 3) producción de nuevo HCO_3^- y amonio.

La secreción de H^+ y la reabsorción de HCO_3^- tienen lugar en casi todas las porciones del túbulo renal, salvo en las ramas delgadas descendente y ascendente del asa de Henle. Alrededor del 80-90% del bicarbonato se reabsorbe en los túbulos proximales, en la porción gruesa ascendente del asa de Henle se reabsorbe otro 10% y el resto en el túbulo distal y el conducto colector (Guyton y Hall, 2011).

Transporte de H^+ y HCO_3^- en los segmentos tubulares proximales

En las células epiteliales del túbulo proximal, la secreción de H^+ tiene lugar gracias a la presencia de un intercambiador sodio-protón (NHE3) en la membrana luminal, que utiliza el gradiente de sodio (Na^+) generado por la ATPasa Na^+/K^+ para transportar Na^+ a favor de su gradiente de concentración y H^+ en contra de su gradiente de concentración (Curthoys y Moe, 2013).

El HCO_3^- filtrado reacciona en el lumen con el H^+ secretado para formar H_2CO_3 , que se disocia en CO_2 y H_2O . El CO_2 se difunde hacia el interior de las células tubulares, donde reacciona con H_2O (bajo la acción de la anhidrasa carbónica tipo II) para formar H_2CO_3 , el cual se disocia a su vez en HCO_3^- y H^+ . Los H^+ se secretan hacia el lumen y el HCO_3^- se transporta hacia el intersticio por el co-transportador $\text{Na}^+/\text{3HCO}_3^-$ (NBCe1) presente en la membrana basolateral de los túbulos proximales (Koeppen, 2009; Curthoys y Moe, 2013).

Los mecanismos mediante los cuales se reabsorbe el HCO_3^- en la rama ascendente gruesa del asa de Henle son similares a los descritos en el túbulo proximal. Sin embargo, algunas de las isoformas de los transportadores

involucrados son diferentes, por ejemplo, la salida de HCO_3^- hacia el intersticio se da a través del cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBCn1) (Koeppen, 2009).

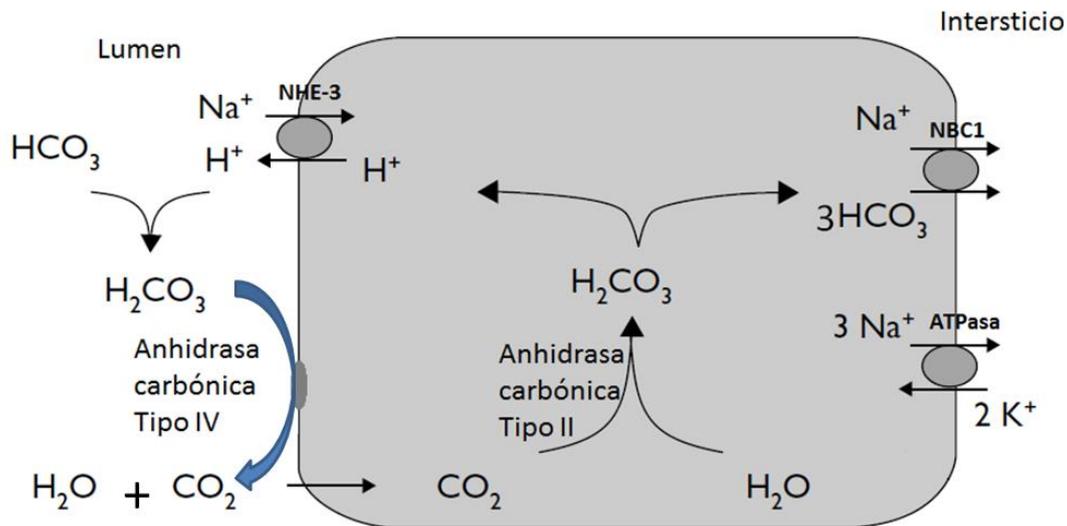


Figura 5. Manejo de H^+ y HCO_3^- en los segmentos tubulares proximales (Modificado de Goldfarb, 2003).

Transporte de H^+ y HCO_3^- en los segmentos tubulares distales

En la región distal de la nefrona el epitelio tubular secreta H^+ mediante el transporte activo primario, gracias a la presencia de la ATPasa vacuolar transportadora de protones (V-ATPasa) en la membrana luminal.

La secreción activa de H^+ tiene lugar en las células intercaladas tipo alfa, situadas en la porción final del túbulo contorneado distal y a lo largo del conducto colector (Boron, 2009)

El CO_2 disuelto en la célula se combina con H_2O para formar H_2CO_3 , el cual se disocia en HCO_3^- que se reabsorbe hacia la sangre y H^+ que se secreta hacia el lumen por la V-ATPasa. El HCO_3^- atraviesa la membrana basolateral vía el intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ AE1 (Wagner, 2009).

La secreción de H^+ en la nefrona distal representa sólo un 5% de la cantidad excretada de H^+ , sin embargo, es un mecanismo importante para la formación de orina con la máxima acidez. La concentración de H^+ puede aumentar hasta 900 veces en los conductos colectores, reduciendo el pH en el líquido tubular

hasta 4.5, el límite inferior de pH que pueden lograr unos riñones normales (Guyton, 2011).

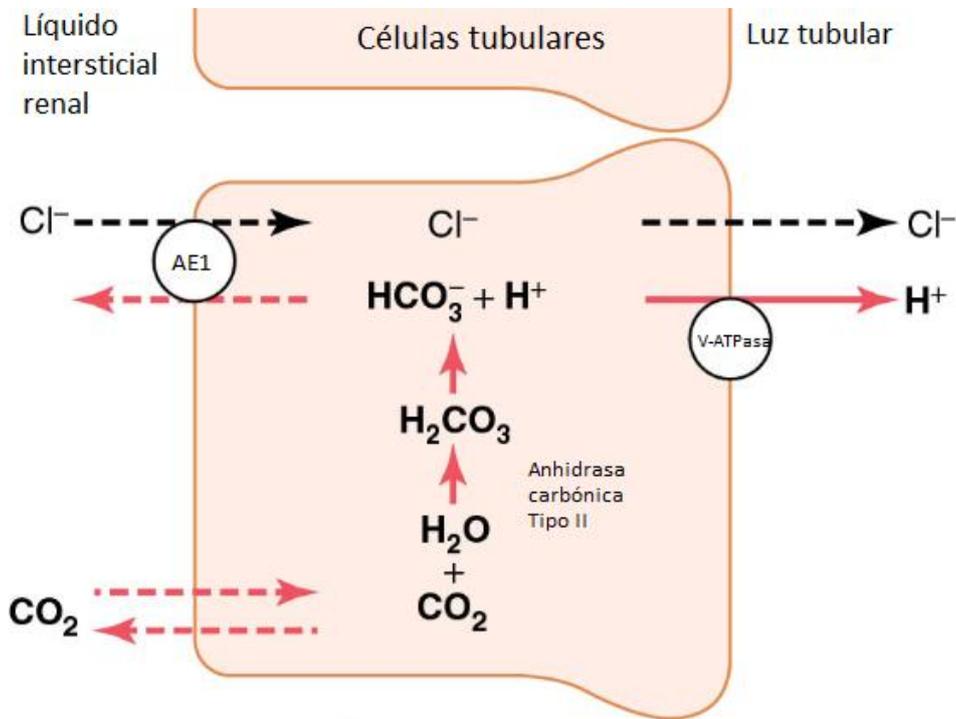


Figura 6. Manejo de H⁺ y HCO₃⁻ en las células epiteliales intercaladas de los segmentos tubulares distales (Modificado de Guyton y Hall, 2011).

Sistema amortiguador del amonio

La homeostasis ácido-base depende del metabolismo renal de amonio. Grandes cantidades de bicarbonato se filtran por el glomérulo, pero en condiciones normales los túbulos renales reabsorben prácticamente todo el bicarbonato filtrado. Por lo tanto, la generación de nuevo bicarbonato es necesaria para reponer el álcali consumido en el amortiguamiento de ácidos endógenos y exógenos.

En condiciones normales, el 60-70% de nuevo bicarbonato formado por el riñón se debe al metabolismo renal de la glutamina (Weiner y Hamm, 2007). El amonio (NH₄⁺) y el bicarbonato se sintetizan simultáneamente en las células tubulares (principalmente en el túbulo proximal) por la degradación de la glutamina (Gln), la cual procede del metabolismo de los aminoácidos en el hígado (Boron, 2009).

El túbulo proximal reabsorbe glutamina tanto del lumen como del intersticio gracias a cotransportadores de Na^+/Gln . Una vez dentro de las células epiteliales la glutamina se metaboliza en la mitocondria bajo una serie de pasos enzimáticos. Primero, la enzima glutaminasa (GA) actúa sobre la glutamina transformándola en NH_4^+ y glutamato. Éste último, se transforma en α -cetoglutarato (αKG) y NH_4^+ , bajo la acción de la glutamato deshidrogenasa (GDH). Posteriormente, se obtienen dos HCO_3^- a partir del metabolismo del α -cetoglutarato (Figura 7).

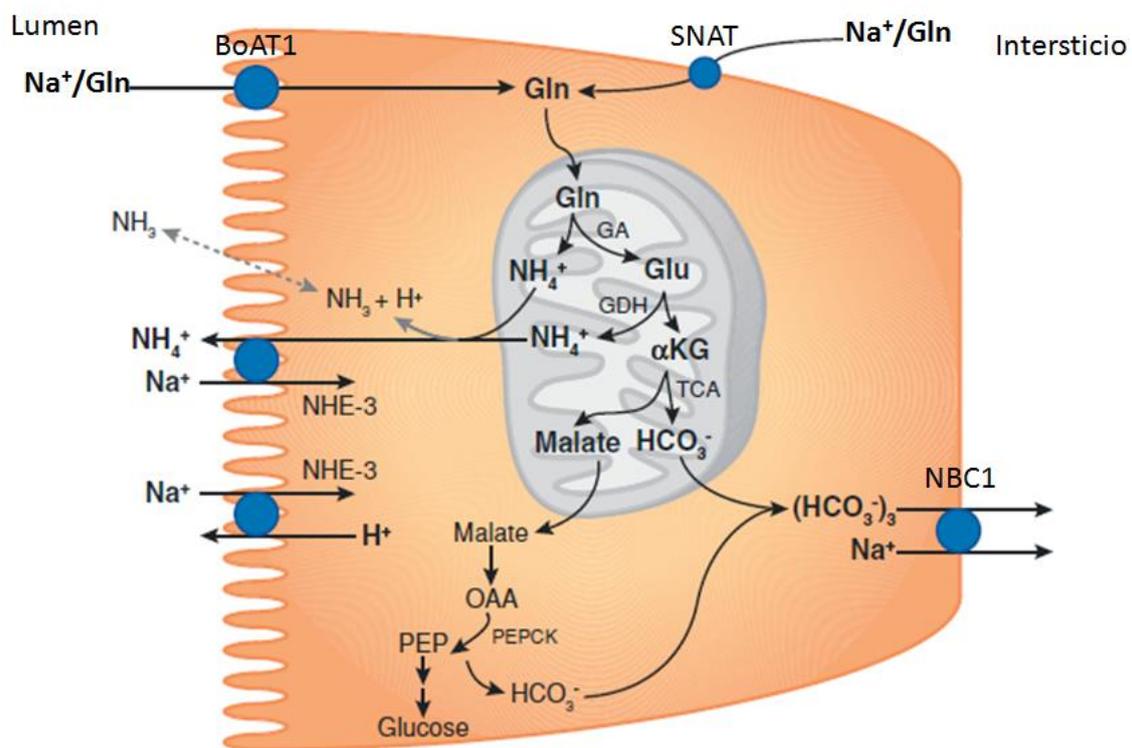


Figura 7. Amoniogénesis en el túbulo proximal (modificada de Weiner y Hamm, 2007). La glutamina se transporta a través de la membrana apical y basolateral hacia el interior de la célula. En la mitocondria, la enzima glutaminasa (GA) genera el primer ión amonio y la glutamato deshidrogenasa (GDH) produce el segundo. El metabolismo del α -cetoglutarato ($\alpha\text{-KG}$) conduce a la formación de un ión HCO_3^- . Además, el metabolismo en el citoplasma resulta en la producción de un segundo HCO_3^- . Por lo tanto, el metabolismo completo de una molécula de glutamina produce dos NH_4^+ y dos HCO_3^- . Los círculos azules denotan proteínas transportadoras. Las líneas grises punteadas indican componentes menores de transporte y las líneas grises sólidas un componente mayor de transporte. Otras abreviaturas: NHE-3, intercambiador Na^+/H^+ tipo 3; OAA, ácido oxaloacético; PEP, fosfoenolpiruvato; PEPCK, fosfoenolpiruvato carboxicinas; TCA, ciclo de los ácidos tricarboxílicos; SNAT (Synaptic neutral aminoacid transporter), transportador de glutamina; B^oAT1, cotransportador de aminoácidos neutros; NBC1 cotransportador $\text{Na}^+/\text{3HCO}_3^-$.

El NH_4^+ que se produce en el túbulo proximal se secreta hacia el lumen por la difusión de amoníaco (NH_3) y el transporte de NH_4^+ por el intercambiador apical Na^+/H^+ (NHE-3). El HCO_3^- se reabsorbe junto con el Na^+ a través de la membrana basolateral hacia el líquido intersticial (Boron, 2009), tal como se muestra en la Figura 7. Posteriormente, el NH_4^+ luminal se reabsorbe parcialmente en los segmentos distales del túbulo proximal (S3) y en la rama ascendente gruesa del asa de Henle. En este último segmento el NH_4^+ puede sustituir al K^+ (debido a que tienen propiedades biofísicas similares) en el cotransportador apical $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ (NKCC2) y atravesar la membrana basolateral vía el intercambiador Na^+/H^+ (NHE-4). Parte de este amonio se recicla en el asa descendente delgada de Henle por canales de NH_4^+ aún no identificados y por la difusión pasiva de NH_3 (Weiner y Hamm, 2007; Han, 2011).

La absorción de NH_4^+ en la rama ascendente gruesa del asa de Henle y la secreción pasiva de NH_3 en la rama descendente delgada del asa de Henle provocan la acumulación de NH_4^+ en el intersticio medular, lo que da lugar a un gradiente de concentración que favorece su entrada al lumen de los conductos colectores (Weiner y Verlander, 2011).

La secreción de amonio en el conducto colector contribuye con la mayor parte (~80%) del contenido de NH_4^+ en la orina y se lleva a cabo en las células intercaladas secretoras de ácido (Weiner y Hamm, 2007). El amonio pasa del intersticio al citoplasma de la célula intercalada a través de canales de NH_4^+ HCN2 (Carrizosa et al., 2011) y canales de NH_3 Rhbg/Rhcg en la membrana basolateral (Weiner y Verlander, 2011). Por último, sale de las células a través de canales de NH_3 Rhcg presentes en la membrana apical. En el lumen el NH_3 se combina con H^+ para formar NH_4^+ , que se excreta. (Weiner y Verlander, 2011).

3.4.2 HOMEOSTASIS DEL POTASIO (K^+)

El K^+ es el catión intracelular más abundante y su concentración extracelular se encuentra regulada en 4.2 mEq/L, aproximadamente. El mantenimiento de dicha concentración es de vital importancia puesto que muchas funciones

celulares son sensibles a los cambios en la concentración de potasio (Guyton y Hall, 2011).

El K^+ tiene dos funciones fisiológicas principales: 1) La diferencia entre la concentración intracelular y extracelular de potasio es el determinante principal para el establecimiento del potencial de membrana en reposo de una célula. El potencial de membrana en reposo permite la generación del potencial de acción, el cual se requiere para el funcionamiento neuronal y muscular normal, así como para la secreción exocrina de hormonas. 2) El mantenimiento de la concentración intracelular de K^+ dentro del rango normal es indispensable para una variedad de funciones celulares, incluyendo el crecimiento y la división celular, la síntesis de ADN y proteínas, la regulación del volumen celular y la actividad enzimática (Goilav y Trachtman, 2010).

La mayor parte del K^+ total corporal (~98%) se encuentra dentro de las células, y solo el 2% en el líquido extracelular, lo cual dificulta el mantenimiento de su homeostasis en este último compartimento. Por lo tanto, tras la ingesta de una comida normal (~40mEq de K^+) el K^+ se introduce a las células hasta que los riñones puedan eliminar el exceso, esto evita que la concentración de K^+ en el líquido extracelular se eleve a valores que podrían ser mortales (valores de referencia 3.5 - 5.0 mEq/L de K^+ en plasma).

En individuos con un funcionamiento renal normal, prácticamente todo el K^+ ingerido en la dieta se elimina en la orina. Es así que, un problema en la eliminación del K^+ podría provocar hipercalemia (concentración plasmática de K^+ por encima de 5 mEq/L), mientras que la pérdida excesiva de K^+ en el líquido extracelular podría provocar hipocalemia (concentración plasmática de K^+ menor a 3.5 mEq/L). En ambos casos la falta de las respuestas compensatorias adecuadas, induciría arritmias cardíacas (Goilav y Trachtman, 2010; Guyton y Hall, 2011).

Manejo renal del K^+

La excreción renal de K^+ juega un papel dominante en la respuesta a cambios en su ingesta y el mantenimiento de los niveles de K^+ sérico. En condiciones normales, alrededor del 50-70% del K^+ filtrado se reabsorbe en el túbulo

proximal. Otro 20-30% del K^+ filtrado se reabsorbe en el asa de Henle, en especial en la porción gruesa ascendente, a través del cotransportador NKCC2. La carga de K^+ filtrada que se reabsorbe en estos segmentos de la nefrona es relativamente constante, por lo cual, las variaciones diarias en la excreción de K^+ se deben a cambios en la secreción en los túbulos distal y colector (Goilav y Trachtman, 2010).

En la región distal de la nefrona, especialmente en el TCN y el conducto colector, el K^+ puede reabsorberse o secretarse dependiendo de las necesidades del organismo. Ante una ingesta elevada de K^+ , la excreción extra requerida se consigue incrementando su secreción. Por el contrario, si la ingesta de K^+ es baja, su secreción en los túbulos distal y colector disminuye (Boron 2009; Guyton y Hall, 2011).

El TCN y el conducto colector están constituidos por células principales e intercaladas. Las células principales secretan K^+ y constituyen alrededor del 60% de las células epiteliales en la corteza renal. El K^+ pasa desde el intersticio al interior de la célula a través de la ATPasa Na^+/K^+ presente en la membrana basolateral y sale al lumen por canales selectivos de K^+ (Guyton y Hall, 2011).

En circunstancias asociadas a una pérdida acentuada de K^+ , se detiene su secreción y hay una reabsorción neta de K^+ a través de las células intercaladas. El mecanismo aún no se conoce del todo, sin embargo, se sugiere que el K^+ se reabsorbe por la ATPasa H^+/K^+ localizada en la membrana luminal y posteriormente pasa hacia el intersticio por canales selectivos de K^+ (Boron, 2009).

IV. ANTECEDENTES

La actividad y función de los canales HCN ha sido ampliamente estudiada en tejidos excitables como el cerebro y el corazón. Sin embargo, su detección en tejidos no excitables, tales como el páncreas o el riñón, es relativamente reciente, por lo cual, su función y regulación en este tipo de tejidos no están dilucidadas del todo.

Recientemente, en nuestro laboratorio, se identificó a la familia de canales HCN en el riñón de la rata, los cuales se expresan de manera diferencial a lo largo de la nefrona: el HCN1 y el HCN3 se encuentran en los túbulos proximales, el HCN4 en el asa de Henle (datos no publicados) y el HCN2 en el conducto colector (Carrisoza et al., 2011).

Asimismo, se demostró que el canal HCN2 se localiza en la membrana basolateral de las células principales e intercaladas secretoras de ácido del conducto colector. En éstas últimas, participa en el transporte transcelular de NH_4^+ , el cual es importante en la regulación del pH sanguíneo al contribuir a la excreción neta de protones en la orina. Sin embargo, los niveles proteicos del canal no se regulan por acidosis metabólica crónica (Carrisoza et al., 2011).

Existe una estrecha relación entre los niveles de K^+ y la formación renal de amonio. Cambios en la concentración plasmática de K^+ afectan la producción renal de amonio (Tannen, 1987), lo cual perturba la homeostasis ácido-base puesto que el sistema amortiguador $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ es uno de los componentes esenciales para la excreción de ácido en la orina (Alpern y Hebert, 2008).

Se sabe que el incremento de la concentración plasmática de K^+ por arriba de 5.5 mEq/L (hipercalemia) conduce a una disminución en la excreción renal de amonio (DuBose y Good, 1991), lo cual puede deberse a que la hipercalemia aumenta el pH intracelular al favorecer el intercambio H^+/K^+ , deteriorando la actividad de las enzimas implicadas en la amoniogénesis (Karet, 2009), y/o a que una concentración luminal elevada de K^+ en la rama ascendente gruesa del asa de Henle compromete la reabsorción de amonio porque el K^+ y el NH_4^+

compiten por el sitio de unión al co-transportador apical NKCC2 y a canales de K^+ , reduciendo así los niveles de NH_4^+ en el intersticio medular y provocando una disminución en la difusión de NH_3 en el conducto colector medular, lo que finalmente conduce a una disminución en la cantidad de NH_4^+ excretada (DuBose y Good, 1992).

V. JUSTIFICACIÓN

El metabolismo y transporte renal de amonio es indispensable para mantener la homeostasis ácido-base del organismo, ya que contribuye a la excreción neta de protones en la orina. Si este mecanismo se altera, el pH sistémico también resulta alterado.

El estudio de “nuevos” canales que ayude a la comprensión de la homeostasis ácido-base en el riñón es de vital importancia, pues cambios relativamente pequeños en el pH del organismo pueden producir trastornos graves en múltiples órganos. El objetivo general de este proyecto es determinar el efecto de una dieta con un contenido elevado de K^+ sobre los niveles proteicos del canal de amonio HCN2 en el riñón de la rata, ya que esto apoyaría la información actual sobre la función de este canal en el transporte de NH_4^+ y proporcionaría información de su regulación.

VI. OBJETIVO

Determinar el efecto que tiene una dieta alta en K^+ sobre los niveles de proteína del canal de amonio HCN2 en el riñón de la rata.

VII. HIPÓTESIS

Sí el incremento de la carga de K^+ en la dieta disminuye la concentración de NH_4^+ en el intersticio renal, entonces los niveles de proteína del canal de amonio HCN2 disminuirán.

VIII. METODOLOGÍA

Para determinar si una dieta crónica alta en K^+ tiene efecto sobre la expresión del canal HCN2 se utilizó la técnica de Western Blot, mediante la cual se compararon muestras renales obtenidas de ratas del grupo control y del grupo experimental.

Cada grupo se integró con siete individuos (ratas Wistar macho con un peso de 220-280 g) que se sometieron a la dieta durante 15 días, con libre acceso a agua y alimento. El grupo control se alimentó con una dieta estándar para roedores con 0.6% de K^+ (Harlan[®]), mientras que al grupo experimental se le indujo hipercalemia al alimentarlo con una dieta con 10% de K^+ (Harlan[®]).

Este protocolo dietario fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Química de la UNAM y se utilizó previamente para evaluar el efecto de una carga elevada de K^+ en la dieta sobre la abundancia proteica del canal de K^+ dependiente de voltaje Kv1.3 (Carrisoza et al., 2010). Una cantidad elevada de K^+ en la dieta no es letal. En la literatura se ha reportado el manejo de dietas con 15% de potasio durante 7-13 días (Muto et al., 1988; DuBose y Good, 1991; DuBose y Good, 1992).

El penúltimo día se colocó a las ratas en jaulas metabólicas para la recolección de la orina de 24h, en la cual se midió el pH y la concentración de Na^+ y K^+ , usando electrodos ion selectivos. Asimismo, se tomó una muestra sanguínea por vía retro-ocular para la determinación de electrolitos.

8.1 WESTERN BLOT

8.1.1. FUNDAMENTO

La técnica de inmunotransferencia (Western Blot) se utiliza para detectar y cuantificar una proteína inmovilizada en una matriz inerte (Towbin et al., 1979). Antes de emplearla es necesario contar con anticuerpos mono o policlonales

capaces de reconocer a la proteína de interés, ya sea en un extracto crudo o en una preparación más pura.

El extracto proteico se separa por electroforesis en un gel de poliacrilamida y se transfiere a una membrana adsorbente con gran afinidad por proteínas (generalmente nitrocelulosa o fluoruro de polivinilideno, PVDF), posteriormente se hace la detección del epítipo:

- Se incuba la membrana con el anticuerpo primario que reconoce a la proteína de interés.
- Se agrega el segundo anticuerpo, dirigido contra la inmunoglobulina G (IgG) que reconoce al anticuerpo primario y generalmente se encuentra acoplado a una enzima que permite la detección de la banda de interés mediante una reacción colorida o quimioluminiscente.

En este caso, la detección se llevó a cabo por quimioluminiscencia, mediante un anticuerpo secundario acoplado a la enzima peroxidasa de rábano (HRP), la cual cataliza la oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrógeno; inmediatamente después de la oxidación, el luminol se encuentra en un estado excitado (inestable) y al decaer al estado basal (reducido), emite energía en forma de luz en la zona en la que se unieron los anticuerpos (Moore, 2009). La luz emitida se detecta por medio de su exposición en una película fotográfica.

8.1.2. MÉTODO

Obtención de las muestras para Western Blot ¹

El último día del tratamiento cada rata se anestesió con pentobarbital sódico (50 mg/Kg) vía intraperitoneal. Una vez que la anestesia hizo efecto, se extrajeron los riñones, se disectaron la corteza y la médula renales y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Posteriormente, los tejidos se

¹ Este procedimiento, así como el protocolo dietario, se llevó a cabo en el laboratorio de canales iónicos de la Dra. Laura Escobar por la Maestra en Ciencias Biológicas Zinaeli López González

descongelaron y se resuspendieron en amortiguador de extracción con inhibidor de proteasas (1mL de amortiguador por cada 0.1g de tejido).

Los tejidos se homogeneizaron en frío y las muestras obtenidas se centrifugaron a 1000g durante 10 minutos a 4°C. Se desechó el sedimento y se contuvo el sobrenadante, correspondiente al extracto crudo de membranas (Marples et al., 1995; Lee et al., 2001; Carrisoza et al., 2010).

La mitad del extracto crudo (enriquecido en membranas totales) se centrifugó nuevamente a 17000g durante 20 minutos a 4°C. El sedimento obtenido se resuspendió en amortiguador de extracción (0.5 mL), para tener una preparación enriquecida en membranas de alta densidad (membranas plasmáticas) (Marples et al., 1995; Lee et al., 2001; Carrisoza et al., 2010).

Por último se cuantificaron las proteínas de cada extracto membranal por el método de Lowry.

Electroforesis en geles de poliacrilamida

1. Se prepararon geles de poliacrilamida al 5% (concentrador) y al 8% (separador). La concentración de 8% de poliacrilamida en el gel resulta ser óptima para separar proteínas entre 37 y 250 KDa.
2. Para cada muestra se tomó una alícuota equivalente a 20 µg de proteína, se mezcló con un volumen igual de amortiguador de carga (95% buffer Laemmli (BIO-RAD), 5% de β-mercaptoetanol) y se desnaturalizó a 70°C durante 10 minutos.
3. Se montaron los geles en la cámara de electroforesis, colocando 500 mL de la solución de electroforesis y se procedió a cargar las muestras, reservando el primer pozo para el marcador de peso molecular (BIO-RAD, 5µL).
4. Se corrió la electroforesis durante una hora a 110V.
5. Al terminar la electroforesis, se colocó el gel separador en la solución de transferencia durante diez minutos.

Transferencia

1. Se cortó la membrana de PVDF al tamaño exacto del gel, se permeabilizó en metanol durante diez segundos y posteriormente, se sumergió junto con las toallas para electro-transferencia en la solución de transferencia durante 10 minutos.
2. Se montó el dispositivo para electro transferencia semi-húmeda (Trans-blot, BIO-RAD); colocando debajo dos toallas, encima la membrana, después el gel y por último otra toalla. La transferencia de las proteínas a la membrana se llevo a cabo a 10 V durante una hora.
3. Al terminar el tiempo de transferencia se desmontó el dispositivo y la membrana se colocó en amortiguador salino Tris con Tween al 0.1% (TBS-T).

Inmunodetección

1. Se bloquearon los sitios inespecíficos de la membrana con una solución de leche al 5% en TBS-T, durante toda la noche a 4°C, con agitación constante.
2. Posteriormente, se decantó la leche y se enjuagó el exceso con TBS-T.
3. Se cortó la membrana en 50 KDa para tener por separado el canal HCN2 (~100 KDa) y la actina (~40KDa).
4. Se incubó la membrana, correspondiente al canal, con el anticuerpo primario (IgG de conejo anti-HCN2 ; Alomone) diluido 1:1000 en TBS-T en un volumen final de 2 mL, durante 18h a 4°C en un incubador rotatorio.

También se incubó la membrana correspondiente a la actina con el anticuerpo primario (IgG de conejo anti-actina; Santa Cruz Biotechnology) diluido 1:30,000 en TBS-T, durante una hora a temperatura ambiente en agitación constante.
5. Se retiró la solución del anticuerpo y se realizaron tres lavados de 10 minutos con TBS-T a temperatura ambiente.
6. Las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario (IgG de burro anti-IgG de conejo, acoplado a peroxidasa de rábano; Abcam)

- diluido en TBS-T; 1:15,000 en el caso del canal y 1:30,000 para la actina, durante una hora a temperatura ambiente en agitación constante.
7. La solución del anticuerpo se retiró y se realizaron tres lavados de 10 minutos con TBS-T a temperatura ambiente.
 8. Se preparó el reactivo de detección por quimioluminiscencia (Inmmobilon Western: Millipore) mezclando la solución de luminol y la de peróxido de hidrógeno en proporción 1:1 (volumen final de 800 μ L).
 9. El exceso de solución TBS-T se retiró de la membrana para cubrirla con el reactivo de detección, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente.
 10. Se escurrió el exceso de reactivo y se colocó la membrana entre dos acetatos dentro de un cassette para placas radiográficas.
 11. Se procedió al revelado en el cuarto oscuro. Se colocó una hoja de placa radiográfica (Kodak 1D) sobre la membrana y se cerró el cassette. El tiempo de exposición puede ir desde 30 segundos hasta 15 minutos dependiendo de la intensidad de la señal.
 12. Una vez terminado el tiempo de exposición, se retiró la placa radiográfica para sumergirla en la solución reveladora (Kodak) hasta observar las bandas.
 13. Posteriormente se enjuagó con agua y se sumergió durante un minuto en solución fijadora (Kodak).
 14. La intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría óptica usando el software Kodak 1D. La intensidad de las bandas se normalizó con el control de carga (actina)
 15. Finalmente, se realizó el análisis estadístico para establecer si la diferencia entre los grupos control y experimental era significativa.

8.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos se analizaron mediante el programa Microsoft Excel 2010:

1. Para normalizar los resultados, se realizó para cada individuo un cociente entre la densidad óptica relativa de la banda del canal y la de la actina correspondiente (D.O. relativa HCN2/D.O. relativa actina)

2. Se obtuvo la media para cada grupo y se normalizó con respecto al control.
3. Se aplicó a los datos (D.O. relativa HCN2/D.O. relativa actina) la prueba *t* de Student de una cola y se consideró una $P < 0.05$ como significancia estadística.

IX. RESULTADOS

Se estudiaron dos grupos de ratas, uno alimentado con una dieta control (0.6% de K⁺) y otro con una dieta alta en K⁺ (10%), durante 15 días. Este último grupo, mostró pérdida de apetito y en consecuencia, disminución de peso corporal (Tabla 3). En la Tabla 4 se muestra la determinación de electrolitos en plasma y orina.

Tabla 3. Efecto de la dieta alta en K⁺ sobre el peso corporal.

Grupo	Ganancia de peso (g/día)*
Control	3 ± 0.42
Alto K ⁺	-2.5 ± 1.7

Los resultados indican la media ± el error estándar en las unidades correspondientes. *p<0.05

Tabla 4. Efecto de una dieta alta en K⁺ sobre el pH urinario y los niveles de K⁺ en sangre y orina.

Dieta	Número de ratas	pH urinario	Fracción excretada de K ⁺ (FEK, %)	Concentración plasmática de K ⁺
Control	7	6.52 ± 0.16	17.73 ± 1.13	3.97 ± 0.13
Alto K ⁺	7	8.62 ± 0.12	153.41 ± 8.5	5.43 ± 0.41

Los resultados indican la media ± el error estándar en las unidades correspondientes. *p<0.05. La fracción excretada de K⁺ (FEK) indica el porcentaje del K⁺ filtrado hacia el túbulo proximal que aparece en la orina.

$$FEK(\%) = \left(\frac{[K^+]_{orina} [creatinina]_{plasma}}{[K^+]_{plasma} [creatinina]_{orina}} \right) \times 100$$

La fracción excretada de K⁺ (FEK) es del 2 % de la carga filtrada durante una dieta baja en K⁺, del 10-20 % bajo una dieta “normal” en K⁺, y del 20-150 % cuando el contenido de K⁺ en la dieta es alto. (Boron, 2009). Como podemos observar en la Tabla 3, la fracción excretada es ocho veces mayor en el grupo de alto K⁺ con respecto al grupo control, lo cual concuerda con lo que ocurre durante una elevada ingesta de K⁺ (Figura 8).

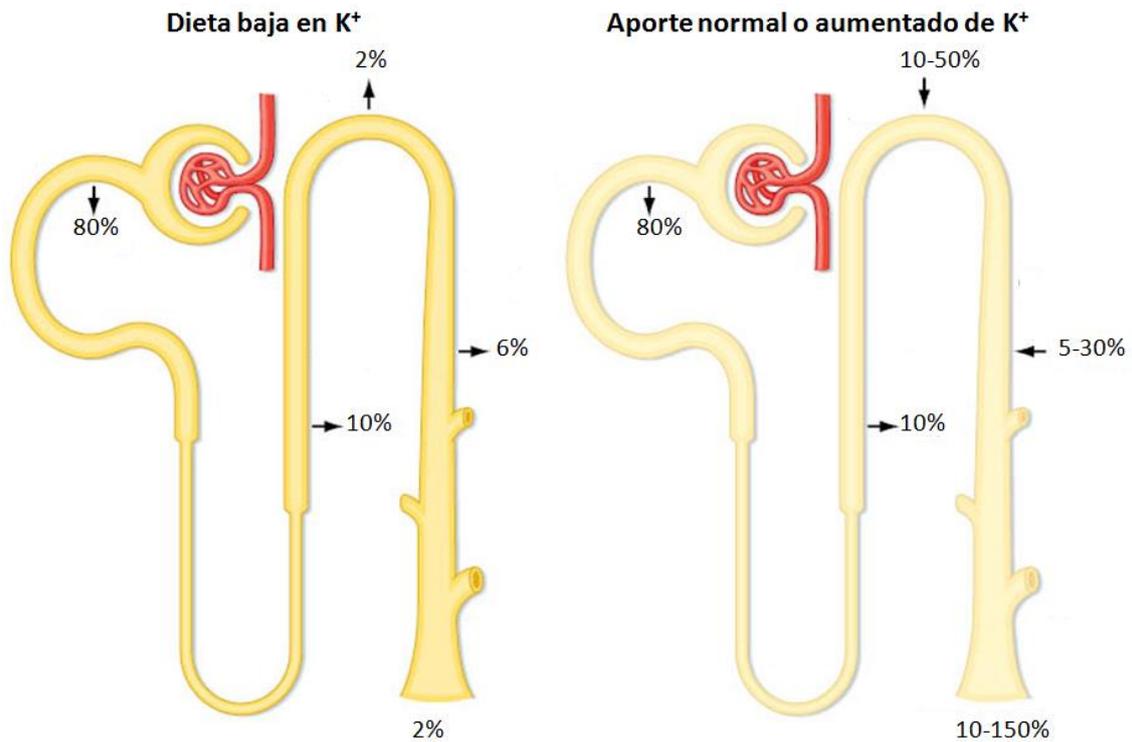


Figura 8. Transporte de K⁺ a través de la nefrona (Modificada de Koeppen y Stanton, 2009). Los porcentajes se refieren a la cantidad del K⁺ filtrado, reabsorbido o secretado por cada segmento de la nefrona. **A la izquierda**, dieta muy pobre en K⁺. Se excreta una cantidad de K⁺ igual al 2% de la carga filtrada de K⁺. **A la derecha**, aporte de K⁺ con una dieta normal y una dieta rica en K⁺. Se excreta una cantidad de K⁺ que puede ir del 10-150% de la carga filtrada.

La concentración plasmática de K⁺ se incrementó en el grupo de alto K⁺, lo cual refleja que la elevada cantidad de K⁺ en la dieta sobrepasó la capacidad excretora del riñón. El pH urinario también aumentó en el grupo alimentado con la dieta alta en K⁺, con respecto al grupo control. Esto concuerda con los datos reportados en la literatura, y podría deberse a una inhibición de la excreción de H⁺ por la V-ATPasa en las células intercaladas, provocada por la presencia de una gran cantidad de cargas positivas en el lumen por la elevada actividad de los canales de potasio en la membrana luminal (Carrisoza et al, 2010).

Mediante Western Blot se identificó la banda correspondiente al canal HCN2 en extractos enriquecidos en membranas totales de corteza y médula externa renal (20 µg de proteína). Como controles positivos se utilizaron extractos enriquecidos en membranas totales de cerebro y corazón (10 µg de proteína); como control negativo se preincubó el anticuerpo primario con su péptido control (Alomone) durante una hora a temperatura ambiente. El péptido control contiene la secuencia de aminoácidos del canal utilizada como inmunógeno

para la producción del anticuerpo, por lo cual, las bandas específicas no serán visibles en el blot, ya que el anticuerpo preincubado no puede unirse a la proteína en la membrana.



Figura 9. Inmunoblot control para el anticuerpo α -HCN2. En cerebro (Ce) se detectaron bandas ~120 KDa y ~100 KDa correspondientes al canal HCN2 glicosilado y no glicosilado respectivamente. En corteza renal (Cx), médula renal (Me) y corazón (Cor) se observa la banda de ~100 KDa. Dichas bandas no se detectaron cuando el anticuerpo primario se preincubó con su péptido control (α -HCN2+ PC). En corazón también se observa una banda ~110 KDa, sin embargo ésta no desapareció cuando el anticuerpo α -HCN2 se preincubó con el péptido control, por lo cual es probable que deba a una inespecificidad del el anticuerpo secundario.

Posteriormente, utilizando la técnica de Western Blot y la cuantificación por densitometría óptica, se compararon los niveles de proteína correspondiente al canal de amonio HCN2 en dos grupos de ratas: control (0.6 % de K^+) y alto potasio (10% de K^+).

El estudio se llevó a cabo en corteza y médula renal, ya que el canal HCN2 se encuentra en las células intercaladas secretoras de ácido, presentes tanto en el TCN como en el conducto colector cortical y medular (Boron, 2009). Además, se sabe que los segmentos del conducto colector (cortical y medular) participan en la excreción de amonio por la orina (Star et al.,1987; Knepper 1991). Las tasas de transporte en las diferentes regiones del conducto colector aún no se conocen con exactitud, sin embargo, Alan Weinstein (2009) propuso un modelo matemático que sugiere que la tasa de excreción de amonio es similar en la región de la corteza y la médula externa, pero menor en la médula interna.

Se compararon los niveles proteicos del canal HCN2 en extractos enriquecidos en membranas plasmáticas y totales para discernir si el efecto puede deberse

a la síntesis proteica *de novo* o a la translocación del canal del citoplasma a la membrana plasmática.

Se detectó la banda correspondiente a la proteína actina la cual es un componente fundamental de citoesqueleto y, por ello, se utiliza como un control de la proteína total colocada en cada carril del gel de poliacrilamida. La expresión de la actina no varía por efecto de la dieta, por lo que es útil para normalizar los resultados experimentales.

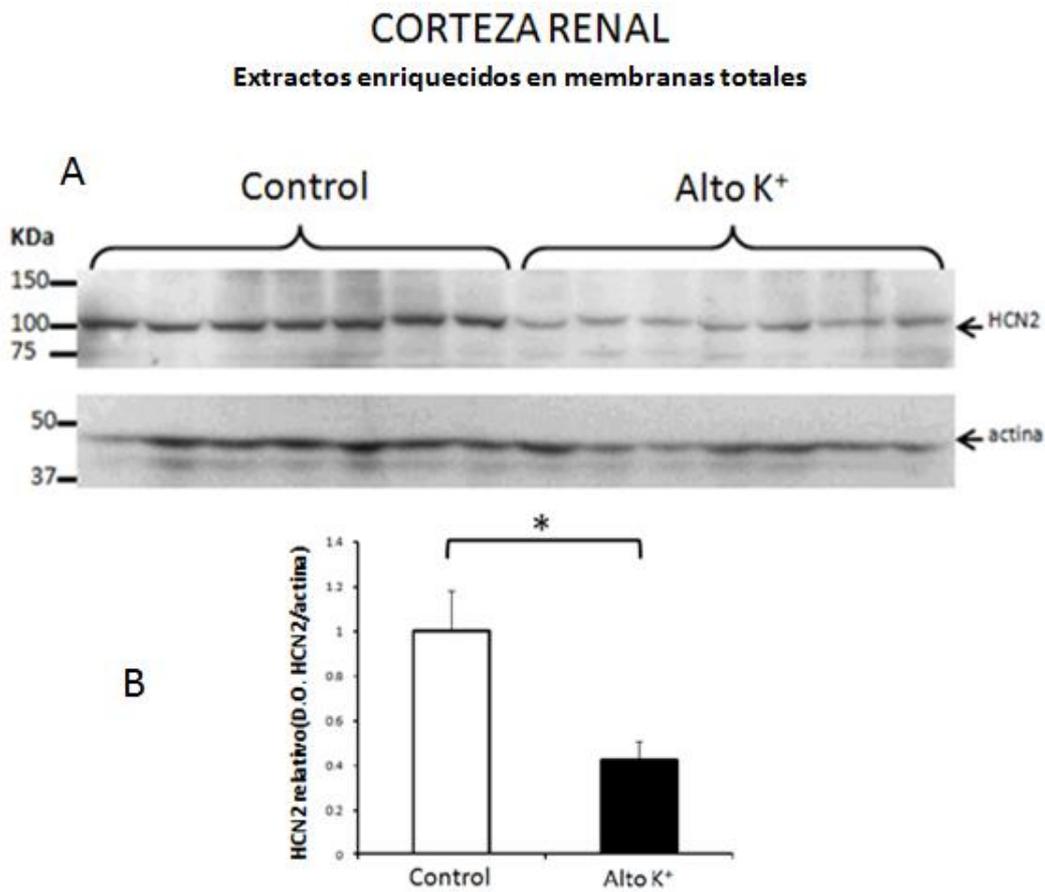


Figura 10. Efecto de una dieta con alto contenido de K⁺ sobre los niveles del canal HCN2, en extractos enriquecidos en membranas totales de corteza renal de rata. (A) Western Blot representativo del canal HCN2 y de la actina como control de carga, en muestras de corteza renal de ratas sometidas a una dieta control (0.6 % de K⁺) o a una dieta con alto contenido de K⁺ (10%) durante 15 días. **(B)** Gráfica del análisis densitométrico de los niveles del canal HCN2 ajustado contra la actina, en dietas control y alto K⁺. Las barras muestran la media ± el error estándar de las unidades densitométricas relativas del canal, n=7, *p<0.05.

MÉDULA EXTERNA RENAL

Extractos enriquecidos en membranas totales

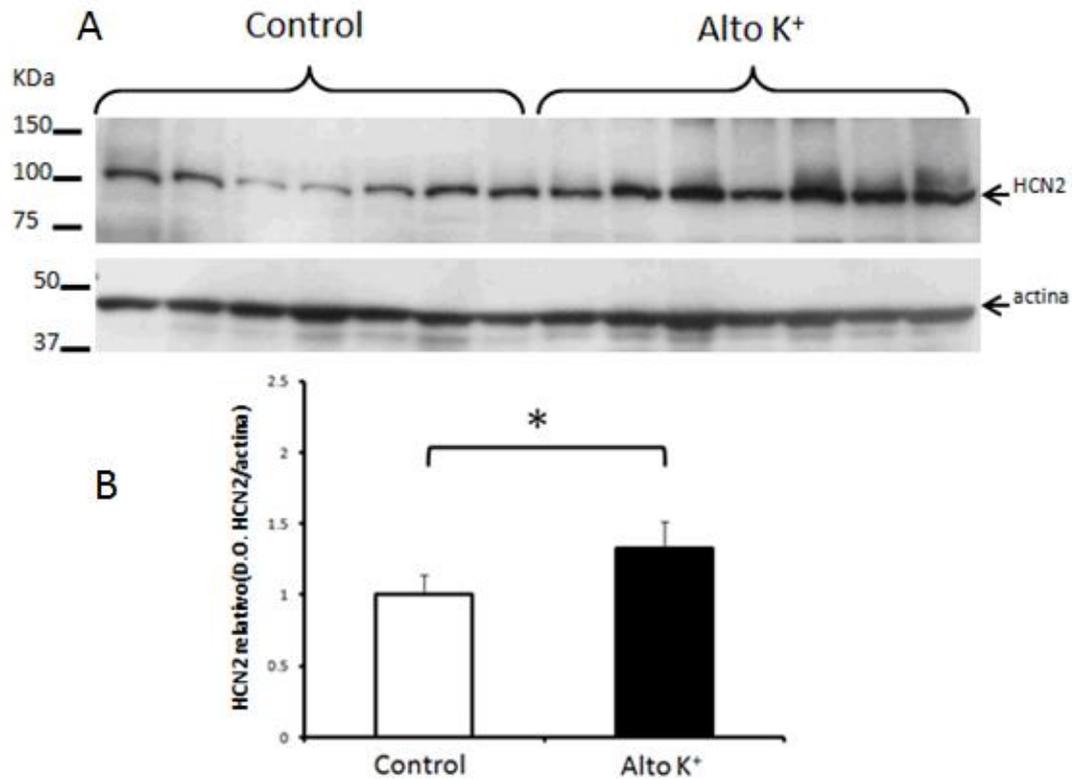


Figura 12. Efecto de una dieta con alto contenido de K⁺ sobre los niveles del canal HCN2, en extractos enriquecidos en membranas totales de médula renal de rata. (A) Western Blot representativo del canal HCN2 y de la actina como control de carga, en muestras de médula externa renal de ratas sometidas a una dieta control (0.6 % de K⁺) o a una dieta con alto contenido de K⁺ (10%) durante 15 días. **(B)** Gráfica del análisis densitométrico de los niveles del canal HCN2 ajustado contra la actina, en dietas control y alto K⁺. Las barras muestran la media ± el error estándar de las unidades densitométricas relativas del canal, n=7, *p<0.05.

X. DISCUSIÓN

La formación renal de amonio y bicarbonato, la excreción urinaria de amonio y la reabsorción del 100% del bicarbonato hacia el espacio intersticial, son los mecanismos principales que regulan la homeostasis ácido-base.

El conducto colector tiene un papel crítico en la excreción de NH_4^+ , puesto que secreta alrededor del 80% del NH_4^+ total que se excreta en la orina (Weiner y Hamm, 2007). Los únicos mecanismos propuestos hasta la fecha para la excreción de amonio en la orina a través de las células intercaladas, son:

1. A través del canal de NH_4^+ HCN2 (Carrisoza et al., 2011)
2. Por medio de los canales Rh, que transportan NH_3 pero no NH_4^+ (Weiner y Verlander, 2011).
3. Sustituyendo al K^+ , dado que tienen propiedades biofísicas similares (Tabla 5), en transportadores tales como la ATPasa Na^+/K^+ y el cotransportador NKCC1 (Wall et al., 1999).

Tabla 5. Propiedades similares entre el NH_4^+ y el K^+ (Weiner y Hamm, 2007)

Catión	Radio iónico (Å)	Radio hidrodinámico (Å)	Movilidad en agua ($10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$)
NH_4^+	0.133	1.14	7.60
K^+	0.143	1.14	7.62

NKCC1 no contribuye sustancialmente al transporte de NH_4^+ en el conducto colector (Wall y Fischer, 2002), mientras que la inhibición de la ATPasa Na^+/K^+ no altera la excreción de NH_4^+ (Knepper y Burg, 1984). Esto deja a los canales Rh y HCN2 como los responsables de la excreción de urinaria amonio. Sin embargo, considerando que al pH intersticial de ~ 7.3 la especie predominante es el NH_4^+ (Figura 14), el canal HCN2 desempeñaría el papel primordial en la excreción de amonio en la orina, por ello es de vital importancia estudiar su regulación.

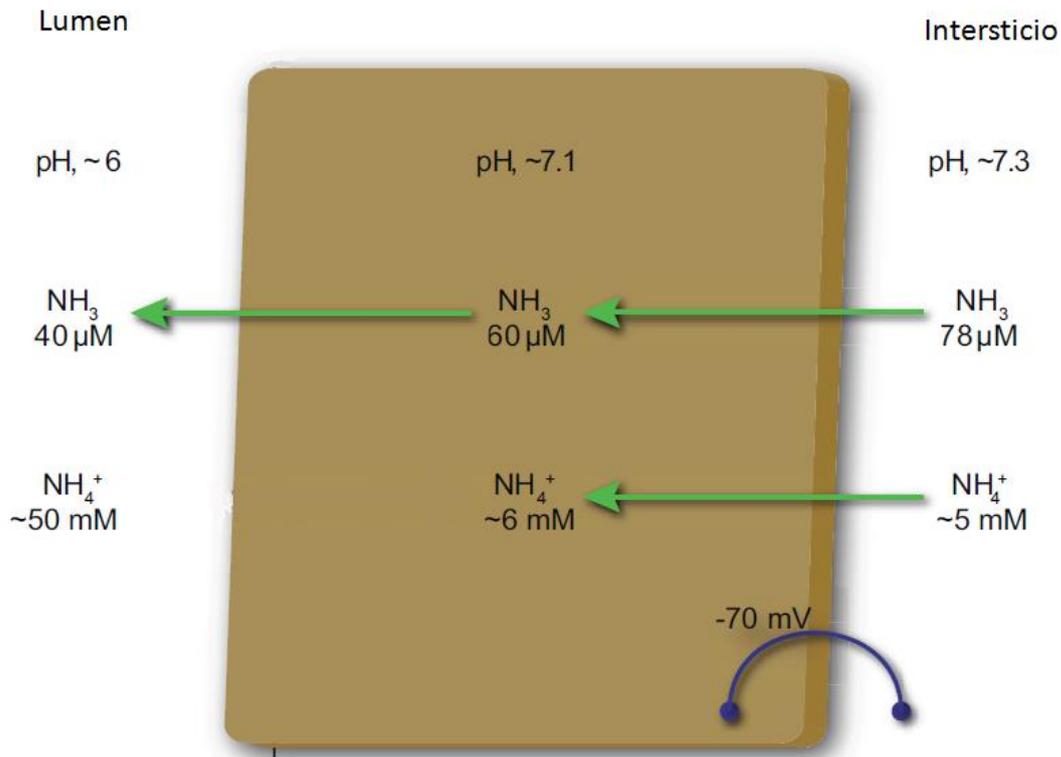


Figura 14. Dirección del transporte de NH_3 y NH_4^+ a través de la membrana apical y basolateral de células de conducto colector (modificada de Weiner y Verlander, 2014)

Los niveles proteicos del canal HCN2 disminuyeron en la corteza renal, tanto en extractos enriquecidos en membranas plasmáticas como en los de membranas totales, lo cual indica que probablemente disminuye tanto su síntesis como su translocación a la membrana. Esto apoya nuestra hipótesis y puede ser resultado de dos causas:

1. La hipercalemia disminuye la amoniogénesis (Tannen, 1977).
2. Un alto contenido de K^+ en el flujo luminal interfiere con la reabsorción de NH_4^+ en todos los segmentos de la nefrona.

Ambas posibilidades conducen a una disminución de la concentración de NH_4^+ en el intersticio, evitando así que se genere el gradiente necesario para su transporte a través del canal HCN2, por lo cual era de esperarse que su abundancia proteica disminuyera. Sin embargo, en la médula externa se observa una tendencia totalmente distinta a la esperada, ya que los niveles del canal se incrementan por efecto de la dieta alta en K^+ . Esto refleja que hay otras variables involucradas en la regulación del canal.

Para poder sugerir una explicación al incremento inesperado de la abundancia del canal, debemos tomar en cuenta tanto las características del canal como la respuesta fisiológica del organismo ante una ingesta elevada de K^+ .

Como ya se mencionó, durante la hipercalemia, la concentración de amonio en el intersticio disminuye (DuBose y Good, 1991). En condiciones fisiológicas, el canal HCN2 es permeable a Na^+ y NH_4^+ , pero es más afín por el NH_4^+ (Carrisoza et al., 2011). Sin embargo, el Na^+ está en mucho mayor concentración que el NH_4^+ en el intersticio, por lo que en condiciones fisiológicas, ambos cationes compiten por su paso a través de este canal.

Por otro lado, cabe recordar que ante una ingesta elevada de K^+ , el riñón logra mantener la homeostasis de K^+ incrementando su secreción en la porción distal de la nefrona y, por lo tanto, su excreción urinaria (Boron 2009). Esto puede atribuirse al aumento de la expresión y/o actividad de los canales de potasio ROMK, Kv1.3 y Maxi-K en la nefrona distal (Wang y Giebisch, 2009; Carrisoza et al., 2010).

Un incremento en la ingesta de K^+ estimula la actividad de la ATPasa Na^+/K^+ y la secreción de aldosterona (Wang, 2004). Esta última aumenta los niveles de la cinasa SGK1, la cual regula positivamente la expresión y actividad del canal epitelial de sodio (ENaC) y del canal ROMK en la membrana luminal de las células principales del conducto colector (Wang y Giebisch, 2009; Koeppen y Stanton, 2009).

Además, se ha observado que una concentración elevada de K^+ en el plasma interfiere con la reabsorción de Na^+ y H_2O en el túbulo proximal, esto incrementa el flujo luminal de Na^+ hacia la nefrona distal, con lo cual se activan los canales Maxi-K que secretan K^+ en las células intercaladas del conducto colector (Muto, 2001; Wang y Giebisch, 2009), tal como se muestra en la Figura 13. Es por ello que en años recientes se ha tomado en cuenta la participación de las células intercaladas en la excreción de K^+ (Welling, 2013).

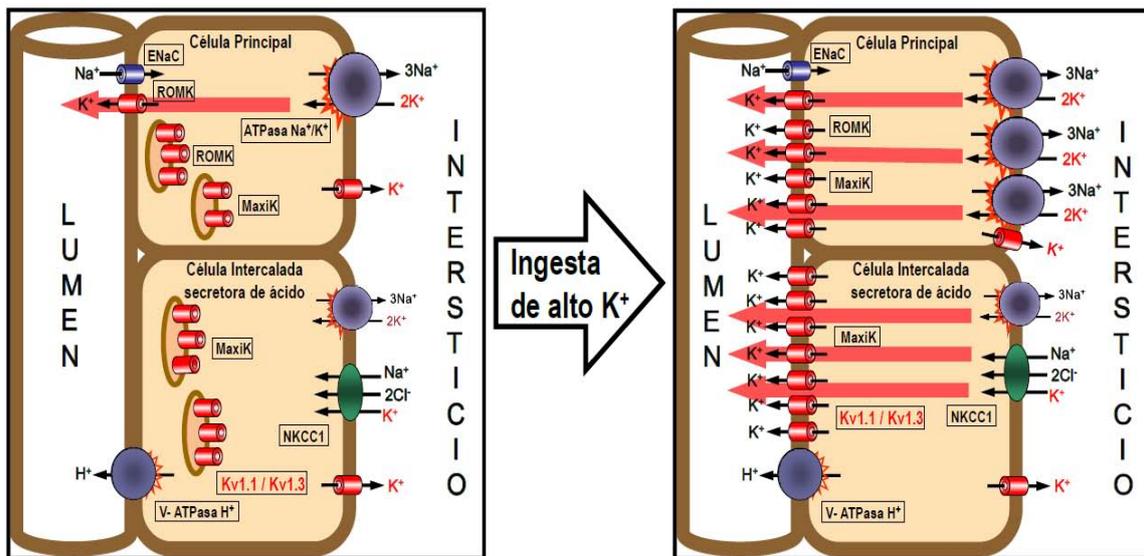


Figura 15. Secreción de potasio a través de los canales ROMK, Maxi K y Kv1.1/1.3 en condiciones control (panel izquierdo) y en respuesta a una elevada ingesta de potasio (Carrisoza, 2012).

En las células principales, la entrada de Na^+ a través del ENaC es de vital importancia, pues incrementa la actividad de la ATPasa Na^+/K^+ , lo que proporciona la fuerza motriz para la excreción de K^+ .

Las células intercaladas también participan en la secreción de K^+ durante una elevada ingesta K^+ , dado que incrementa la expresión de canales de K^+ , en su membrana luminal, sin embargo en dichas células no se ha descrito la presencia de canales que permitan la entrada de Na^+ . Por lo tanto, una posible explicación sobre el incremento de la expresión del HCN2 en la médula renal, durante la hipercalemia, es que podría funcionar como un vía de entrada de Na^+ a la célula para estimular la actividad de la ATPasa Na^+/K^+ , y de este modo favorecer la excreción de la carga de K^+ .

Suponiendo que lo anterior ocurra, la entrada de Na^+ a la célula a través del canal HCN2 favorecería la excreción de K^+ no sólo por incrementar la actividad de la ATPasa Na^+/K^+ , sino también porque la entrada de Na^+ a la célula despolarizaría la membrana, provocando la apertura de los canales de K^+ Kv1.1/1.3. La apertura de los canales Kv (por la despolarización) y Maxi K (por el flujo luminal) permitirían la salida de K^+ de la célula y por ende la

hiperpolarización de la membrana plasmática, con lo cual se abrirían los canales HCN2 y continuaría el proceso.

El transportador NKCC1 está presente en la membrana basolateral de las células intercaladas (Ginns et al., 1996), sin embargo, la velocidad de transporte a través de un canal es unas 1000 veces superior a la de un transportador (Alberts, 2002), por lo cual la cantidad de Na^+ que puede entrar a través del NKCC1 no se compara con la que podría entrar a través del canal HCN2.

Las causas de que la expresión del canal HCN2 se incremente únicamente en la médula son inciertas. Sin embargo, podría influir el hecho de que el intersticio sólo se vuelve hiperosmolar en la médula externa (Figura 14), y tomando en cuenta que el Na^+ y sus aniones asociados (Cl^- y HCO_3^-) representan alrededor del 94% de los osmoles extracelulares (Guyton y Hall, 2011), se facilitaría la formación de un gradiente para su paso hacia el interior de la célula.

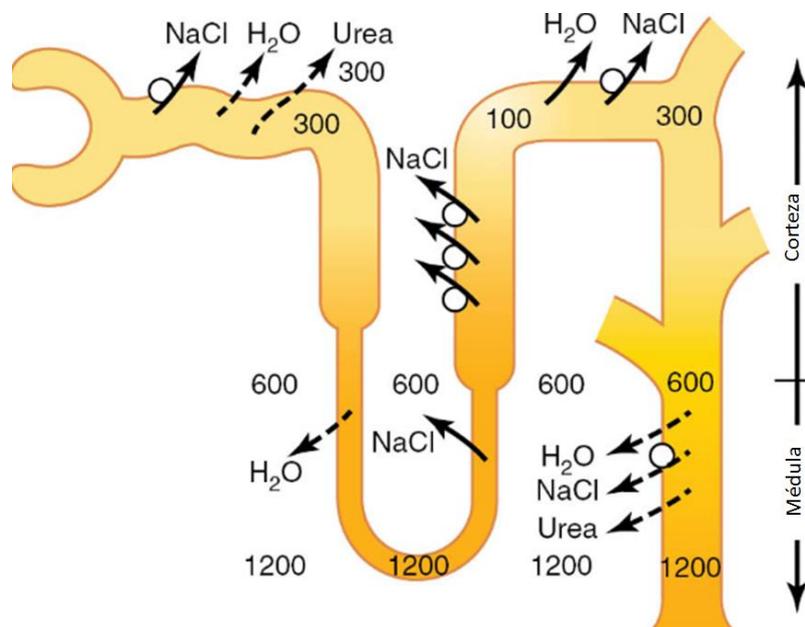


Figura 16. Formación de orina concentrada (Guyton y Hall, 2011). Con concentraciones elevadas de vasopresina, la osmolaridad de la orina es aproximadamente la misma que la osmolaridad del intersticio medular (Los valores numéricos corresponden a miliosmoles por litro).

XI. CONCLUSIONES

Los niveles de proteína del canal catiónico HCN2, en el tejido renal, varían por efecto de la dieta con alto contenido de K^+ :

- En la corteza renal los niveles del canal HCN2 disminuyen, lo que podría estar asociado a la disminución de la concentración de amonio en el intersticio renal.
- En la médula renal los niveles del canal HCN2 aumentan, lo cual sugiere la participación del canal HCN2 como un canal de sodio que contribuye en la generación de los gradientes electroquímicos necesarios para eliminar una carga elevada de K^+ .

XII. PERSPECTIVAS

- ❖ Realizar ensayos de inmunohistoquímica y microscopía confocal para determinar si se observa un cambio en la distribución del canal HCN2, en los conductos conector y colector de la corteza y de la médula renal, por efecto de la dieta alta en K^+ .
- ❖ Observar el efecto que tiene una carga aguda (24 h) de K^+ en la expresión del canal HCN2 para determinar si el canal se regula a corto plazo por el K^+ en la dieta.
- ❖ Corroborar si una dieta sin K^+ tiene el efecto contrario sobre los niveles del canal HCN2 en la corteza y médula renal.

XIII. REFERENCIAS

Aidley, J.D., Stanfield, P.R. "Ion Channels: Molecules in Action". 1st Ed, Cambridge University Press, UK, 1998, pp 1-15

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P., "Molecular Biology of the Cell". 4th edition, Garland Science, New York, 2002 pp 583-631.

Alpern, R.J., Hebert, S.C. "Selding and Giebisch's The Kidney: Physiology and Pathophysiology". Fourth Edition, Volume 1, Academic Press, USA, 2008, pp 479-572.

Altomare C, Terragni B, Brioschi C, Milanesi R, Pagliuca C, Viscomi C, Moroni A, Baruscotti M and DiFrancesco D. Heteromeric HCN1-HCN4 channels: a comparison with native pacemaker channels from the rabbit sinoatrial node. *J. Physiol.* 2003; 549: 347–359.

Biel M, Wahl-Schott C, Michalakakis S, Zong X. Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiol Rev*, 2009; 89:847–885.

Bolivar JJ, Tapia D, Arenas G et al. A hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated, (I_h-like) cationic current and HCN genes expression in renal inner medullary collecting duct cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 294: C893–C906.

Boron, W. F., Boulpaep E. L. "Medical Physiology a Cellular and Molecular approach". 2nd ed., Saunders, USA, 2009, pp 749-880.

Bruno S, Chiabotto G & Camussi G. Concise Review: Different Mesenchymal Stromal/Stem Cell Populations Reside in the Adult Kidney. *Stem cells translational medicine*, 2014; sctm-2014.

Bucchi A, Baruscotti M, DiFrancesco D. Current-dependent block of rabbit sinoatrial node I(f) channels by ivabradine. *J Gen Physiol.* 2002; 120:1-13.

Calejo AI, Reverendo M, Silva VS, Pereira PM, Santos MA, Zorec R, Gonçalves PP. Differences in the expression pattern of HCN isoforms among mammalian tissues: sources and implications. *Mol Biol Rep.* 2014;41(1):297-307.

Carrisoza-Gaytán R, Salvador C, Satlin LM, Liu W, Zamilowicz B, Bobadilla NA & Escobar LI. Potassium secretion by voltage-gated potassium channel Kv 1. 3 in the rat kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2010; 299: F255-F264.

Carrisoza-Gaytán R, Rangel C, Salvador C, Saldaña-Meyer R, Escalona C, Satlin LM, et al. The hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated HCN2

channel transports ammonium in the distal nephron. *Kidney Int* 2011; 80:832-840.

Carrisoza-Gaytán R. Expresión y distribución de los canales de potasio activados por voltaje (Kv) en el epitelio renal, 2012, UNAM.

Chen J, Mitcheson JS, Lin M, Sanguinetti MC. Functional roles of charged residues in the putative voltage sensor of the HCN2 pacemaker channel. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 36465–71.

Chen S, Wang J, Siegelbaum SA. Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of HCN1 and HCN2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotide. *J. Gen. Physiol.* 2001;117: 491–504.

Cheng L, Kinard K, Rajamani R, Sanguinetti MC. Molecular mapping of the binding site for a blocker of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-modulated pacemaker channels. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007; 322: 931–939.

Conti, F. “Fisiología Médica”. McGraw-Hill Interamericana, México, 2010, pp 62-81, 1245-1275

Cooper, G. M., Hausman, R. E. (2000). “The cell: A Molecular Approach. 2nd ed., Sunderland: Sinauer Associates, 2000.

Curthoys NP, Moe OW. Proximal Tubule Function and Response to Acidosis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2013; doi: 10.2215/CJN.10391012

DiFrancesco D. Block and activation of the pace-maker channel in calf Purkinje fibres: effects of potassium caesium and rubidium. *J. Physiol.* 1982; 329:485–507.

DiFrancesco D, Tortora P. Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature.* 1991; 351: 145–147.

Drucker Colín R. “Fisiología Médica”. El Manual Moderno, México, 2005, pp 193-272.

DuBose TD Jr, Good DW. Effects of chronic hyperkalemia on renal production and proximal tubule transport of ammonium in rats. *Am J Physiol* 1991; 260: 680-687.

DuBose TD Jr, Good DW. Chronic hyperkalemia impairs ammonium transport and accumulation in the inner medulla of the rat. *Journal of Clinical Investigation.* 1992; 90(4); 1443.

El-Kholy W, MacDonald PE, Fox JM et al. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels in pancreatic beta-cells. *Mol Endocrinol* 2007; 21: 753–764.

Giins SM, Knepper MA, Ecelbarger CA, Terris J, He X, Coleman Ra, Wade JB. Immunolocalization of the secretory isoform of the Na-K-Cl cotransporter in rat renal intercalated cells. *J Am Soc Nephrol* 7: 2533–2542, 1996

Goilav B, Trachtman H. Disorders of potassium balance. In *Fluid and Electrolytes in Pediatrics*. Humana Press. 2010:67-102.

Goldfarb S. Renal Tubular Acidosis. *Nephrology*. Volume 6 (Part 2), 2003.

Guyton, A. C., Hall J. E. “Tratado de fisiología Medica”. 12ª Ed. Elsevier, España, 2011, pp 303-393.

Han KH. Mechanisms of the effects of acidosis and hypokalemia on renal ammonia metabolism. *Electrolyte Blood Press* 2011; 9:45-49.

He C, Chen F, Li B, Hu Z. Neurophysiology of HCN channels: From cellular functions to multiple regulations. *Progress in Neurobiology*. 2014; 112: 1–23.

Jones JW, Sebastian A, Hulter HN, Schambelan M, Sutton JM, Biglieri EG. Systemic and renal acid-base effects of chronic dietary potassium depletion in humans. *Kidney Int*. 1982; 21:402-10.

Karet FE. Mechanisms in hyperkalemic renal tubular acidosis. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 251–254.

Knepper MA, Good DW, Burg MB. Mechanism of ammonia secretion by cortical collecting ducts of rabbits. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol*, 1984; 247: F729–F738.

Knepper MA. NH₄⁺ transport in the kidney. *Kidney Int*, 1991; 40: S95–S102.

Koeppen M. The kidney and acid-base regulation. *Advances in physiology education*, 2009; 33: 275-281.

Koeppen, B.M., Stanton, B.A. “Berne & Levy. Fisiología Humana”. 6ª edición. Ed. Elsevier, Barcelona, 2009 pp 557-649.

Kouranova EV, Strassle BW, Ring RH, Bowlby MR, Vasilyev DV. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel mRNA and protein expression in large versus small diameter dorsal root ganglion neurons: correlation with hyperpolarization-activated current gating. *Neuroscience*. 2008; 153: 1008–1019.

Kusch J, Biskup C, Thon S, Schulz E, Nache V, Zimmer T, Schwede F, Benndorf K. 2010. Interdependence of receptor activation and ligand binding in HCN2 pacemaker channels. *Neuron* 2010; 67: 75–85.

Lee J, Oh Y, & Kim SW. Altered renal expression of aquaporin-2 water channels in rats with experimental two-kidney, one clip hypertension. *Journal of Korean medical science*. 2001; 16(4): 462.

Macri V, Angoli D, Accili EA. 2012. Architecture of the HCN selectivity filter and control of cation permeation. *Sci. Rep.* 2012; 2: 894.

Maeshima A, Yamashita S, Nojima Y. Identification of renal progenitorlike tubular cells that participate in the regeneration processes of the kidney. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(12):3138-46

Marples D, Knepper MA, Christensen EI & Nielsen S. (1995). Redistribution of aquaporin-2 water channels induced by vasopressin in rat kidney inner medullary collecting duct. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 1995; 269(3): C655-C664.

Moore C. Introduction to western blotting. AbD serotec. 2009.

Muller F, Scholten A, Ivanova E, Haverkamp S, Kremmer E, Kaupp UB. HCN channels are expressed differentially in retinal bipolar cells and concentrated at synaptic terminals. *Eur J Neurosci.* 2003; 17: 2084–2096.

Muto S, Sansom S & Giebisch G. Effects of a high potassium diet on electrical properties of cortical collecting ducts from adrenalectomized rabbits. *Journal of Clinical Investigation*, 1988;81(2): 376.

Muto S. Potassium transport in the mammalian collecting duct. *Physiological reviews*, 2001; 81(1): 85-116.

Shin KS, Rothberg BS, Yellen G. Blocker state dependence and trapping in hyperpolarization-activated cation channels: evidence for an intracellular activation gate. *J Gen Physiol.* 2001; 117: 91–101.

Star RA, Kurtz I, Mejia R, Burg MB, Knepper MA. Disequilibrium pH and ammonia transport in isolated perfused cortical collecting ducts. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol*, 1987; 253: F1232–F1242.

Tannen RL. Relationship of renal ammonia production and potassium homeostasis. *Kidney Int.* 1977; 11: 453–465.

Tannen RL. Effect of potassium on renal acidification and acid-base homeostasis. In *Seminars in nephrology*. 1987; 7: 263-273.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1979; 76(9): 4350-4354.

Vaca L, Stieber J, Zong X, Ludwig A, Hofmann F, Biel M. Mutations in the S4 domain of a pacemaker channel alter its voltage dependence. *FEBS Lett.* 2000; 479: 35–40.

Wagner CA, Devuyst O, Bourgeois S, & Mohebbi N. Regulated acid–base transport in the collecting duct. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 2009; 458: 137-156.

Wahl-Schott C, Biel M. 2009. HCN channels: structure, cellular regulation and physiological function. *Cell. Mol. Life Sci.* 2009; 66:470–494

Wall SM, Davis BS, Hassell KA, Mehta P, Park SJ. In rat t1MCD, NH₄⁺ uptake by Na⁺-K⁺-ATPase is critical to net acid secretion during chronic hypokalemia. *Am J Physiol*, 1999; 277: F866–F874

Wall SM, Fischer MP. Contribution of the Na⁺-K⁺-2Cl-cotransporter (NKCC1) to transepithelial transport of H⁺, NH₄⁺, K⁺, and Na⁺ in rat outer medullary collecting duct. *J Am Soc Nephrol*, 2002; 13: 827–835.

Wang W. Regulation of renal K transport by dietary K intake. *Annu. Rev. Physiol.* 2004; 66: 547-569.

Wang WH, Giebisch G. Regulation of potassium (K) handling in the renal collecting duct. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*, 2009; 458:157–168.

Weiner ID, Hamm LL. Molecular mechanisms of renal ammonia transport. *Annu Rev Physiol*, 2007; 69:317-340.

Weiner ID, Verlander JW. Role of NH₃ and NH₄⁺ transporters in renal acid-base transport. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011; 300: F11–F23, 2011.

Weiner ID, & Verlander JW. Ammonia transport in the kidney by Rhesus glycoproteins. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2014; 306(10): F1107-F1120.

Weinstein AM. A mathematical model of rat ascending Henle limb. III. Tubular function. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010; 298: F543–F556.

Welling PA. Regulation of renal potassium secretion: Molecular mechanisms. *Seminars in nephrology*. WB Saunders, 2013; 33: 215-228.

Yeh J, Kim BS, Gaines L et al. The expression of hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated (HCN) channels in the rat ovary are dependent on the type of cell and the reproductive age of the animal: a laboratory investigation. *Reprod Biol Endocrinol* 2008; 6: 35.

Zagotta WN, Olivier NB, Black KD, Young EC, Olson R, Gouaux E. Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. *Nature* 2003; 425: 200–205.

XIV. SOLUCIONES Y REACTIVOS

Amortiguador de extracción de proteínas	
Sacarosa	250 mM
EDTA	1 mM
PMSF	0.1mM
Tris-HCl pH 7.6	10mM

*Adicionar una tableta de inhibidor de proteasas a mL de la solución.

Gel de poliacrilamida-SDS		
Reactivos	Gel separador 8% (5mL)	Gel concentrador 5% (2mL)
Agua desionizada	2.3 mL	1.4 mL
mix de acrilamida 30%	1.3 mL	330 µL
Tris 1.5M pH 8.8	1.3 mL	-----
Tris 1.0 M pH 6.8	-----	250 µL
SDS al 10%	50 µL	20 µL
Persulfato de amonio al 10%	50 µL	20 µL
TEMED	3 µL	2 µL

Solución de electroforesis		
Componente	Cantidad	Concentración final
Trizma base	3.0285 g	25mM
Glicina	18.8 g	250mM
SDS	1 g	0.1%
Agua destilada	cbp 1 L	

Solución de transferencia (towbin) pH 8.3		
Componente	Cantidad	Concentración final
Trizma base	1.51 g	25mM
Glicina	7.2 g	191mM
Metanol	100 mL	20%
Agua desionizada	cbp 500mL	

Solución amortiguadora Tris pH 8.8 *		
Componente	Cantidad	Concentración final
Trizma base	9.0825 g	1.5 M
Agua destilada	cbp 50 mL	
Solución amortiguadora Tris pH 6.8 *		
Trizma base	6.055 g	1.0 M
Agua desionizada	cbp 50 mL	
*Ajustar pH con HCl 1N, aforar , filtrar y almacenar a 4°C		

Buffer salino tris (TBS) pH 7.6	
componente	cantidad
Trizma base	4.844 g
NaCl	16 g
Agua destilada	cbp 2 L
Ajustar pH con HCl 1N, aforar , filtrar y almacenar a 4°C	

Solución TBS-T (TBS con Tween 20 al 0.1%)
Diluir 1 mL de Tween 20 en 999mL de TBS

Contenido de las dietas

Macronutrientes	%
Proteína	18.6
Grasa	6.2
Carbohidratos (disponibles)	44.2
Fibra	3.5

Minerales	
Calcio	1.0 %
Fosforo	0.7 %
Sodio	0.2 %
Potasio	Normal 0.6 % Alto 10%
Cloruro	0.4 %
Magnesio	0.2 %
Zinc	70 mg/Kg
Manganeso	100 mg/Kg
Cobre	15 mg/Kg
Yodo	6 mg/Kg
Hierro	200 mg/Kg
Selenio	0.23 mg/Kg

Aminoácidos	%
Ácido aspártico	1.4
Ácido glutámico	3.4
Alanina	1.1
Glicina	0.8
Treonina	0.7
Prolina	1.6
Serina	1.1
Leucina	1.8
Isoleucina	0.8

Valina	0.9
Fenilalanina	1.0
Tirosina	0.6
Metionina	0.6
Cisteína	0.3
Lisina	1.1
Histidina	0.4
Arginina	1.0
Triptófano	0.2

Vitaminas	
Vitamina A	30.0 UI/g
Vitamina D ₃	2.0 UI/g
Vitamina E	135 UI/Kg
Vitamina K ₃	100 mg/Kg
Vitamina B ₁	117 mg/Kg
Vitamina B ₂	27 mg/Kg
Niacina	115 mg/Kg
Vitamina B ₆	26 mg/Kg
Ácido pantoténico	140 mg/Kg
Vitamina B ₁₂	0.15 mg/Kg
Biotina	0.90 mg/Kg
Folato	9 mg/Kg
Colina	1200 mg/Kg

Ácidos grasos	%
Ácido palmítico	0.7
Ácido esteárico	0.2
Ácido oleico	1.2
Ácido linoleico	3.1
Ácido linolénico	0.3