



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

DETERMINACIÓN DEL PAPEL FISIOLÓGICO DE LOS CANALES HCN EN EL RIÑÓN DE LA RATA

TESIS

QUE OPTAR POR PARA EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

LÓPEZ GONZÁLEZ ZINAEI

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. LAURA ESCOBAR PÉREZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARTHA FRANCO GUEVARA
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ

COMITÉ TUTOR: DR. LUIS VACA DOMÍNGUEZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

MÉXICO, CD. MX., ENERO, 2017.



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.

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 17 de octubre de 2016, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **LÓPEZ GONZÁLEZ ZINAEI** con número de cuenta **97151924**, con la tesis titulada **"DETERMINACIÓN DEL PAPEL FISIOLÓGICO DE LOS CANALES HCN EN EL RIÑÓN DE LA RATA"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. LAURA ESCOBAR PÉREZ**:

Presidente: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
Vocal: DR. MAXIMILIANO IBARRA BARAJAS
Secretario: DR. LUIS VACA DOMÍNGUEZ
Suplente: DR. RENÉ DE JESÚS CÁRDENAS VÁZQUEZ
Suplente: DRA. MARTHA FRANCO GUEVARA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 06 de enero de 2017

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

Proyecto: 166913 y 253586

Beca doctoral: 175629

Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)

Proyecto y Beca doctoral: IN214613

Miembros del Comité tutor:

Dra. Laura Escobar Pérez

Dra. Martha Franco Guevara

Dra. Luis Vaca Domínguez

AGRADECIMIENTOS

Facultad de Medicina, UNAM:

Dra. Laura Escobar Pérez por todo el apoyo que me brindó durante mi formación académica.

Dr. Rolando Carrisoza Gaytán y M. en C. Carolina Salvador Hernández por la instrucción técnica que me brindaron.

Q.F.B. Cosete Ayala Aguilera, M. en C.B. Claudia Rangel García y Q.F.B Teresa Padilla Flores por su apoyo técnico en la realización de este proyecto.

C.D María José Gómora Herrera por su colaboración en la obtención de las imágenes de microscopía confocal.

A todos mis compañeros del laboratorio 510 del departamento de Fisiología: Lili, Bety, Clau, Tere, Erika, Olmo, Cosete, Dilán, Paola, Miriam, Lulú, por acompañarme y ser parte de esta etapa de mi vida.

Facultad de Química, UNAM:

Dr. José Pedraza Chaverrí por su apoyo en la adquisición de los animales experimentales.

Unidad de Experimentación Animal (UNEXA) por permitirnos hacer uso de su bioterio.

M.V.Z Lucía Macía Rosales y M. en C. Héctor Rico Morales por su colaboración en la toma de las muestras de sangre de los animales.

Laboratorio de Farmacología Analítica de la Facultad de Medicina, U.A.S.L.P.:

Dr. Flavio Martínez Morales y Dra. Othir Galicia Cruz por su colaboración en la separación de las vesículas de membrana del borde en cepillo.

Laboratorio de Nefrología del Hospital Infantil de México Federico Gómez:

Dra. Mara Medeiros Domingo y Biol. Ana María Hernández por su colaboración en la determinación de electrolitos en las muestras de plasma.

DEDICATORIA

A Dios, porque es el principal tesoro en mi vida, porque Él es mi fortaleza y esperanza.

A mis padres, Omar Isaías López Luna y Elizabeth González Robledo, por su guía, amor y cuidados, porque gracias a su esfuerzo pude lograr esta meta profesional.

A mi esposo, Miguel Ángel Hernández Cuateta, por su amor y apoyo incondicional durante este largo recorrido.

INDICE

ABREVIATURAS	i
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1 Homeostasis de los electrolitos.....	3
3.1.1 Anatomía del riñón.....	4
3.1.2 Excreción renal.....	6
3.2 Manejo renal del K ⁺	8
3.3 Reabsorción renal de Na ⁺	12
3.4 Equilibrio ácido-base.....	16
3.4.1 Excreción y transporte renal de NH ₄ ⁺	16
3.4.2 Reabsorción de HCO ₃ ⁻	17
3.4.3 Acidosis metabólica.....	19
3.4.4 Acoplamiento entre el equilibrio ácido-base y el transporte de K ⁺	21
3.5 Canales catiónicos activados por hiperpolarización y nucleótidos cíclicos (HCN).....	22
4. ANTECEDENTES	25
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	26
6. OBJETIVO GENERAL	27
7. OBJETIVOS PARTICULARES	27
8. HIPOTESIS	28
9. METODOLOGÍA	28
9.1 Manejo de animales.....	28
9.2 Modelos experimentales y cuantificación de electrolitos.....	28
9.3 Ensayos de inmunofluorescencia.....	29
9.4 Extracción de proteínas e inmunoblots.....	30
9.5 Aislamiento de vesículas de membrana del borde en cepillo (BBMV).....	31
9.6 Análisis densitométrico y estadístico.....	32

10. RESULTADOS	33
10.1 Identificación del HCN1 y HCN3 en las membranas plasmáticas de la corteza y médula renal	33
10.2 Inmunodetección de los canales HCN1 y HCN3 en el encéfalo de la rata por ensayos de inmunofluorescencia.....	35
10.3 Localización de los canales HCN1 y HCN3 en el túbulo proximal de la nefrona	35
10.4 Inmunodetección y colocalización del HCN1 y HCN3 en las membranas del borde en cepillo (BBM) .	38
10.5 Colocalización del HCN3 y la endopeptidasa neutral (NEP) en el túbulo recto proximal.....	40
10.6 Localización del HCN3 en la membrana basolateral del asa de Henle ascendente gruesa medular....	41
10.7 Ausencia del HCN3 en la nefrona distal de ratas en condiciones fisiológicas basales	42
10.8 Determinación de electrolitos en las ratas sometidas a dietas crónicas y a acidosis metabólica	45
10.9 La dieta deficiente de K ⁺ (DK) incrementó la abundancia proteica del HCN3 en el asa de Henle ascendente gruesa medular y disminuyó la abundancia del HCN3 N-truncado en el túbulo proximal	47
10.10 La dieta alta en K ⁺ (AK) incrementó la abundancia proteica del HCN3 en los túbulos proximales y el asa de Henle ascendente gruesa medular, y disminuyó el HCN3 N-truncado en el asa de Henle ascendente gruesa medular	49
10.11 Expresión del canal HCN3 inducida por hipercalcemia en la nefrona distal.....	51
10.12 La deficiencia de Na ⁺ en la dieta no regula la abundancia proteica del HCN3 en el riñón.....	53
10.13 La acidosis metabólica crónica (AMC) incrementó la abundancia proteica del HCN3 y disminuyó la del HCN3 N-truncado en el asa de Henle ascendente gruesa medular.....	55
11. DISCUSIÓN	56
11.1 Identificación de los canales HCN1 y HCN3 en el riñón de la rata	56
11.1 Distribución del HCN3 en la nefrona de rata y la colocalización con el HCN1 en las BBM.....	57
11.2 Regulación de la expresión del HCN3 y su papel en la reabsorción de HCO ₃ ⁻	59
12. CONCLUSIONES	65
13. LITERATURA CITADA	66
14. ANEXO (Artículo requisito)	76

ABREVIATURAS	
AHAD	asa de Henle ascendente delgada
AHAG	asa de Henle ascendente gruesa
AHAGm	asa de Henle ascendente gruesa medular
AHDD	asa de Henle descendente delgada
A488	fluoróforo Alexa con excitación máxima a los 488 nm
A594	fluoróforo Alexa con excitación máxima a los 594 nm
AC II	anhidrasa carbónica tipo II
AC IV	anhidrasa carbónica tipo IV
AE-1	intercambiador de aniones tipo 1
AE-2	intercambiador de aniones tipo 2
AK	alto potasio/dieta alta en potasio (10%)
AMC	acidosis metabólica crónica
AQP1	acuaporina tipo 1
AQP2	acuaporina tipo 2
AQP7	acuaporina tipo 7
ATR	acidosis tubular renal
ATRd	acidosis tubular renal distal
ATRp	acidosis tubular renal proximal
BBM	membranas del borde en cepillo
BBMV	vesículas de membranas del borde en cepillo
BSA	albúmina de suero bovino
CaBP	proteína calbindina de 28 kDa
CCC	conducto colector cortical
CCME	conducto colector de la médula externa
CCMI	conducto colector de la médula interna
C-HCN1	anticuerpo anti-HCN1 con epítotope en la región COOH-terminal del canal
C-HCN3	anticuerpo anti-HCN3 con epítotope en la región COOH-terminal del canal
CNBD	dominio de unión a nucleótidos cíclicos
CZ	corteza renal
DK	deficiencia de potasio/dieta deficiente de potasio (0%)
DS	dieta deficiente de sodio (0%)
EDTA	agente quelante ácido etilendiaminotetraacético
EF	excreción fraccional
EF_{Cl}	excreción fraccional de cloro
EF_K	excreción fraccional de potasio
EF_{Na}	excreción fraccional de sodio
ENaC	canal epitelial de sodio
β-ENaC	subunidad β del canal epitelial de sodio
γ-ENaC	subunidad γ del canal epitelial de sodio
HCN	canales catiónicos activados por hiperpolarización y nucleótidos cíclicos
HCN1	canal catiónico activado por hiperpolarización y nucleótidos cíclicos tipo 1
HCN1 C-truncado	canal catiónico activado por hiperpolarización y nucleótidos cíclicos tipo 1 truncado en su extremo COOH
HCN2	canal catiónico activado por hiperpolarización y nucleótidos cíclicos tipo 2
HCN3	canal catiónico activado por hiperpolarización y nucleótidos cíclicos tipo 3

HCN3 N-truncado	canal catiónico activado por hiperpolarización y nucleótidos cíclicos tipo 3 truncado en su extremo NH ₂
HCN4	canal catiónico activado por hiperpolarización y nucleótidos cíclicos tipo 4
HEPES	4-(2-hidroxietil)-1- ácido piperazineethanesulfonic)
HRP	peroxidasa de rábano
If	corriente "funny"
Ih	corriente activada por hiperpolarización
KCC4	cotransportador potasio/cloro tipo 4
KCR1	proteína reguladora 1 de los canales de potasio
KCTD3	dominio de tetramerización 3 de canal de potasio
Kv	canal de potasio dependiente de voltaje
Kv1.3	canal de potasio dependiente de voltaje 1.3
αKG	alfa cetoglutarato
LEC	líquido extracelular
LIC	líquido intracelular
Maxi K ó BK	canal de potasio de gran conductancia activado por calcio
ME	médula externa renal
MiRP1	péptido 1 relacionado a la subunidad mínima de los canales de potasio
NaPi II	cotransportador sodio/fosfato tipo II
NaPi IIa	cotransportador electrogénico sodio/fosfato tipo II
NaPi IIc	cotransportador electroneutro sodio/fosfato tipo II
NBCe1	cotransportador electrogénico sodio(1)/bicarbonato(3)
NBCn1	cotransportador electroneutro sodio(1)/bicarbonato(1)
NCC	cotransportador sodio/cloro
NEP	proteína neutral endopeptidasa
N-HCN1	anticuerpo anti-HCN1 con epítoto en la región NH ₂ terminal del canal
N-HCN3	anticuerpo anti-HCN3 con epítoto en la región NH ₂ terminal del canal
NHE-3	intercambiador sodio/protón tipo 3
NHE-2	intercambiador sodio/protón tipo 2
NK	dieta con porcentaje normal de potasio (0.5-0.6%)
NKCC2	cotransportador sodio(1)/potasio(1)/cloro(2)
NS	dieta con porcentaje normal de sodio (0.13%)
PBS	amortiguador salino de fosfatos
PFA	paraformaldehído al 4% en amortiguador salino de fosfatos
pHe	pH extracelular
pHi	pH intracelular
PIP2	fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PKT	proteína tirosina cinasa
PMSF	inhibidor de proteasas fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	fluoruro de polivinilideno
RhCg	glicoproteína C de la familia Rh
ROMK	canal renal de potasio de la médula externa
S-16257	ivabradina
S1	segmento 1 del túbulo proximal
S2	segmento 2 del túbulo proximal
S3	segmento 3 del túbulo proximal
SCL4A4	gen del cotransportador electrogénico sodio(1)/bicarbonato(3)
SDS	detergente dodecilsulfato sódico

SGLT2	cotransportador sodio/glucosa tipo 2
SLC13A2	cotransportador de ácido dicarboxílico dependiente de sodio
SLC1A	cotransportador sodio/aminoácidos ácidos
SLC6A19	cotransportador sodio/aminoácidos neutros
Src	tirosina cinasa de la familia Src
TBS-T	amortiguador tris-salino con tween 20 al 0.1%
TCD	túbulo contorneado distal
TCP	túbulo contorneado proximal
TCN	túbulo conector
THP	proteína Tam Horsfall
TRIP8b	tetratricopéptido con dominio de interacción para la proteína Rab8b
TRP	túbulo recto proximal
Tx	detergente tritón-x 100
UL-FS49	zatebradina
V-ATPasa	bomba vacuolar de protones dependiente de adenosintrifosfato

1. RESUMEN

Los canales catiónicos activados por hiperpolarización y nucleótidos cíclicos (HCN) son permeables a K^+/Na^+ (4:1), debido a los gradientes fisiológicos, conducen principalmente Na^+ al interior de la célula. Los HCN comprenden cuatro isotipos: HCN1, HCN2, HCN3 y HCN4, los cuales se encuentran tanto en tejidos excitables como en tejidos no excitables. Recientemente en nuestro laboratorio, encontramos que esta familia de canales se localiza en los epitelios renales y demostramos que el HCN2 es una vía de amonio (NH_4^+) en la nefrona distal de la rata, por consiguiente, está implicado en el balance ácido-base en condiciones basales. El riñón es el órgano principal que regula la composición del fluido extracelular, así como el equilibrio ácido-base a través de mecanismos de reabsorción y secreción a lo largo de la nefrona. La excreción renal de NH_4^+ es la manera de eliminar la carga ácida del organismo y está estrechamente relacionada al transporte de K^+ debido a las similitudes moleculares entre estos iones. La excreción urinaria de NH_4^+ también está acoplada al transporte de Na^+ , pues la eliminación de ácido produce la reabsorción de $NaHCO_3$. Los niveles plasmáticos de los electrolitos pueden alterar la expresión, actividad o distribución subcelular de algunos transportadores y canales a lo largo de la nefrona. En el presente trabajo se determinó la localización del HCN1 y HCN3 en las nefronas del riñón de la rata por técnicas de inmunofluorescencia y microscopia confocal. Asimismo, con el propósito de comprender el papel fisiológico de estos canales en la nefrona se evaluó por inmunoblots la regulación de la abundancia proteica del HCN3 por dietas crónicas deficientes de Na^+ , deficientes de K^+ , altas en K^+ , así como por acidosis metabólica. Identificamos que el HCN1 y el HCN3 colocalizaron en la membrana apical del túbulo proximal, sólo el HCN3 se encontró en la membrana basolateral del asa de Henle ascendente gruesa. Los inmunoblots detectaron al HCN1 (130 kDa) y al HCN3 (90 KDa) y sus proteínas truncadas HCN1 C-terminal (93 KDa) y HCN3 N-terminal (65 KDa) en las membranas plasmáticas de la corteza (CZ) y la médula externa (ME) renal, así como en vesículas de membrana del borde en cepillo del túbulo proximal. La abundancia proteica del HCN3 incrementó en la CZ y la ME con la dieta de alto K^+ y sólo en la ME con dieta deficiente de K^+ . Se produjo el efecto opuesto con el HCN3 N-terminal truncado en CZ (en deficiencia de K^+) y ME (en alto K^+). Esta regulación diferencial sugiere la estabilización del HCN3 completo y/o la inhibición de la proteólisis del canal. La dieta deficiente de Na^+ no produjo ningún cambio en la abundancia proteica del HCN3, sin embargo, en acidosis metabólica se incrementó su expresión en la ME. Nuestros resultados sugieren que los canales HCN3 son una vía de entrada de Na^+ en los epitelios renales, que no participan directamente en la adaptación renal crónica a cambios en la ingesta de NaCl, pero que sí son sensibles al metabolismo del K^+ . El modelo que proponemos es que los canales HCN contribuyen a la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa para mantener el potencial de la membrana, así como a la reabsorción de HCO_3^- para mantener la homeostasis ácido-base en el riñón de la rata.

2. ABSTRACT

The hyperpolarization activated cationic and cyclic nucleotide gated channels (HCN) are permeable to both K^+ and Na^+ (ratio 4: 1), but due to physiological electrochemical gradients carry a Na^+ inward current when they open. HCN comprise four isotypes, HCN1, HCN2, HCN3 and HCN4, which are located in both non-excitabile and excitabile tissues. Recently in our laboratory we found that this family of channels is located in the renal epithelia. We demonstrated that HCN2 is a ammonium via (NH_4^+) in the rat distal nephron and is involved in acid-base balance in basal conditions. The kidney is the main organ that regulates the composition of extracellular fluid and acid-base balance by reabsorption and secretion mechanisms along the nephron. Renal excretion of NH_4^+ is the way to remove the acid load of body and is closely related to K^+ transport due to molecular similarities between these ions. Urinary excretion of NH_4^+ is also coupled to Na^+ transport, because the removal of acid produces $NaHCO_3^-$ reabsorption. Plasma levels of electrolytes can alter the expression, activity or subcellular distribution of some transporters and channels along the nephron. In this work, the HCN1 and HCN3 localization in nephrons of rat kidney by immunofluorescence and confocal microscopy techniques was determined. To understand the physiological role of these channels in the nephron, we also evaluated the regulation of HCN3 protein abundance by western blot in chronic diets: Na^+ depleted, K^+ depleted, high K^+ as well as metabolic acidosis. We found the HCN1 and HCN3 are colocalized in the apical membrane of proximal tubule, only HCN3 was located in the basolateral membrane of thick ascending loop of Henle. Immunoblot assays detected the HCN1 (130 kDa) and HCN3 (90 kDa) and their truncated proteins C-terminal HCN1 (93 kDa) and N-terminal HCN3 (65 kDa) in enriched plasma membranes from cortex (CX) and outer medulla (OM), as well as in brush border membrane vesicles from proximal tubule. HCN3 protein abundance increased in CX and OM by high K^+ and only in OM by K^+ depletion diets; the opposite effect occurred with the N-terminal truncated HCN3 in CX (K^+ depletion) and OM (high K^+). This differential regulation suggests the stabilization of full-length HCN3 and/or the inhibition of proteolysis channel. Na^+ depleted diet produced no change in HCN3 protein abundance, however, it increased by metabolic acidosis in OM. Our results suggest that HCN3 channels are an entry of Na^+ in renal epithelia, not directly involved in chronic renal adaptation in response to changes in $NaCl$ intake, but they are sensitive to the K^+ metabolism. The model that we propose is that HCN channels contribute to the activity of Na^+/K^+ ATPase to maintain the membrane potential, as well as HCO_3^- reabsorption to maintain homeostasis acid base in the rat kidney.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Homeostasis de los electrolitos

Los electrolitos son iones en solución y están presentes en la sangre como ácidos, bases y sales. En fisiología los iones primarios son sodio (Na^+), potasio (K^+), calcio (Ca^{2+}), magnesio (Mg^{2+}), cloro (Cl^-), fosfato monoácido (HPO_4^{2-}) y bicarbonato (HCO_3^-). Los iones constituyen el 95% de los solutos del agua corporal (Guyton y Hall, 2011). El Na^+ y el K^+ son los cationes más abundantes del líquido extracelular (LEC) y líquido intracelular (LIC), respectivamente. Los aniones predominantes del LEC son el Cl^- y el HCO_3^- y en el LIC son el fosfato, los aniones orgánicos y las proteínas (Fig.1).

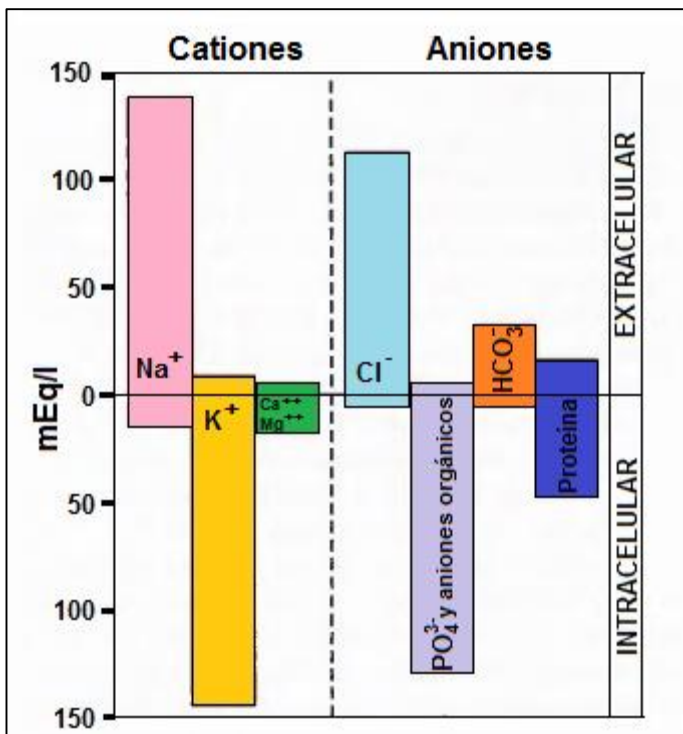


FIGURA 1. Distribución de los electrolitos en los fluidos corporales. Representación gráfica de las concentraciones de cationes y aniones en el líquido extracelular e intracelular (Modificada de Guyton y Hall, 2011).

Debido a la carga eléctrica de los iones, su transporte a través de las membranas biológicas es necesariamente por un transporte facilitado (por proteínas transmembrana). Las proteínas transportadoras de iones se dividen en general en dos clases: los canales iónicos y los transportadores tipo acarreador. Los canales iónicos forman poros acuosos altamente selectivos a través de la bicapa lipídica que fluctúan entre un estado abierto y uno cerrado. El tipo de estímulos que provocan su apertura son el voltaje, los cambios mecánicos, los neurotransmisores, los segundos mensajeros y la temperatura (Purves et al., 2001). Los transportadores tipo acarreador tienen uno o más sitios de unión específicos al soluto que va a ser transportado a través de una

serie de cambios conformacionales de la proteína (Alberts et al., 2006). De acuerdo al número y sentido de los iones y/o moléculas transportadas, las proteínas acarreadoras se dividen en uniporter y cotransportadores simportes y antiportes (intercambiadores). También existen transportadores activos conocidos como bombas, las cuales dependen de la hidrólisis de ATP para transportar iones en contra del gradiente de concentración. La más importante de ellas es la bomba Na^+/K^+ , que ayuda a mantener el gradiente electroquímico de las células (Purves et al., 2001; Fig. 2).

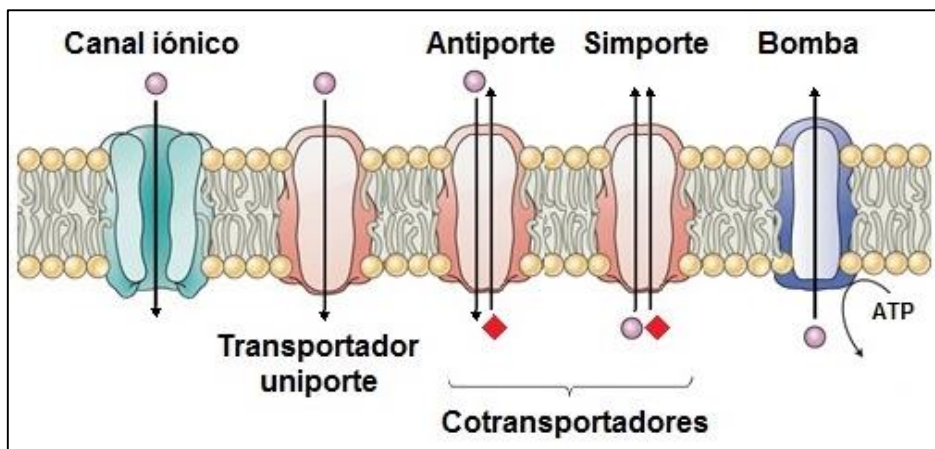


FIGURA 2. Proteínas transmembrana que conducen o transportan iones. Esquema de los canales iónicos y las proteínas tipo acarreador. Los canales iónicos constan de un poro acuoso central que permite el paso de iones. Las proteínas acarreadoras sufren un cambio conformacional para transportar iones y moléculas de manera uniporte, antiporte y simporte. Las bombas implican un transporte activo de iones, pues requieren de la hidrólisis de ATP (Modificada de Lazar, 2003).

Es de vital importancia mantener un balance de iones entre el medio intra y extracelular, debido a que estos afectan la excitabilidad celular, el balance ácido base, así como la presión osmótica de las células. Los riñones son el órgano principal que regula la composición del LEC, permitiendo a las células conservar una concentración adecuada de electrólitos y nutrientes para su funcionamiento óptimo (Guyton y Hall, 2011).

3.1.1 Anatomía del riñón

Los riñones son órganos glandulares que se encuentran a ambos lados de la columna vertebral en el exterior de la cavidad peritoneal, ocupan el 0.5% del peso corporal total y están revestidos por una cápsula fibrosa. En un corte sagital del riñón se observan dos regiones principales: **la corteza, y la médula** (Fig. 3). **La médula renal se divide en médula externa y médula interna**, y a su vez, **la médula externa se subdivide en capa externa y capa interna** (Fig.

4). La corteza renal es de coloración rojo parduzco y se encuentra inmediatamente abajo de la cápsula renal. La sustancia medular es de color más claro y está formada por 8-14 masas piramidales, que son estructuras cónicas llamadas pirámides de Malpighio. La extremidad de cada pirámide de Malpighio (llamada la papila) se vacía en un cáliz, y los cálices desembocan en la pelvis. En la pelvis renal se recolecta la orina, la cual es conducida a través del uréter hacia la vejiga urinaria para ser excretada (Boron y Boulpaep, 2009; Fig 3).

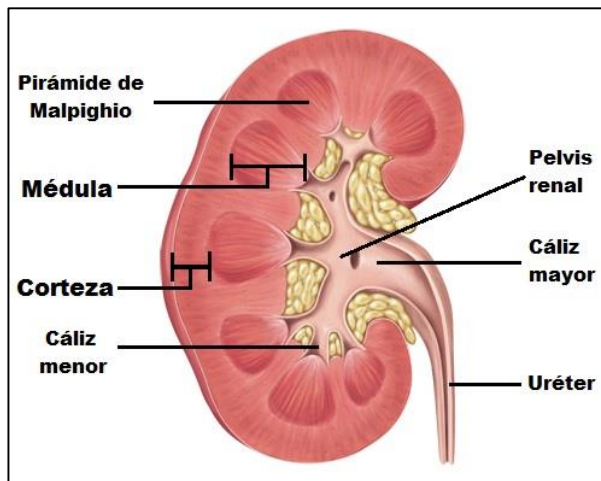


FIGURA 3. Anatomía macroscópica del riñón. Diagrama de un corte sagital de riñón humano donde se pueden apreciar dos capas principales, la corteza y la médula. La médula se subdivide en 8 a 15 pirámides renales (Malpighio), las cuales desembocan a través de los cálices menores en la pelvis renal y ésta a su vez, a través del cáliz mayor, en el uréter (Modificada de Boron y Boulpaep, 2009).

A nivel microscópico, las unidades anatómico-funcionales del riñón son las nefronas. En la rata cada riñón contiene de 30,000-35,000 nefronas, mientras que en el riñón humano se estiman aproximadamente 1 millón de nefronas. Las nefronas se conforman por un corpúsculo renal llamado glomérulo y una porción tubular con varios segmentos bien diferenciados: el **túbulo proximal**, el cual se divide en el **túbulo contorneado proximal** y el **túbulo recto proximal**, la ultraestructura de éstos les permite a su vez subdividirlos en los segmentos S1, S2 y S3. El segmento S1 empieza en el glomérulo e incluye la primera porción del TCP, el S2 empieza en la segunda mitad del TCP y continúa hasta la primera mitad del TRP y el S3 incluye la mitad más distal del TRP que se extiende hacia la médula. El **asa de Henle**, la cual se divide en **asa de Henle descendente delgada**, **asa de Henle ascendente delgada** y **asa de Henle ascendente gruesa**. El **túbulo contorneado distal**, el cual se divide en segmento temprano y tardío. El **túbulo conector** y los **conductos colectores**, los cuales se dividen en **conducto colector cortical**, **colector de la médula externa** y **colector de la médula interna** (Fig. 4). Cada segmento tubular de las nefronas es funcional y estructuralmente distinto, cada uno presenta una gran diversidad de transportadores y canales iónicos en sus membranas que permiten el transporte de varios iones, así como el de los productos finales del metabolismo (aminoácidos, glucosa, citratos, sulfatos, fosfatos, aniones orgánicos etc). Las

nefronas, aunque son esencialmente similares entre sí, difieren en su longitud, las más cortas tienen sus glomérulos en las capas más superficiales de la corteza y sus asas de Henle se extienden solamente hasta la médula externa, estas nefronas reciben el nombre de nefronas corticales. Por el contrario, el glomérulo de las nefronas largas se ubica junto a la médula y las asas de Henle de estas nefronas, denominadas nefronas yuxtamedulares, pueden llegar casi hasta alcanzar la papila (Fig. 4; Kriz y Kaissling, 2013).

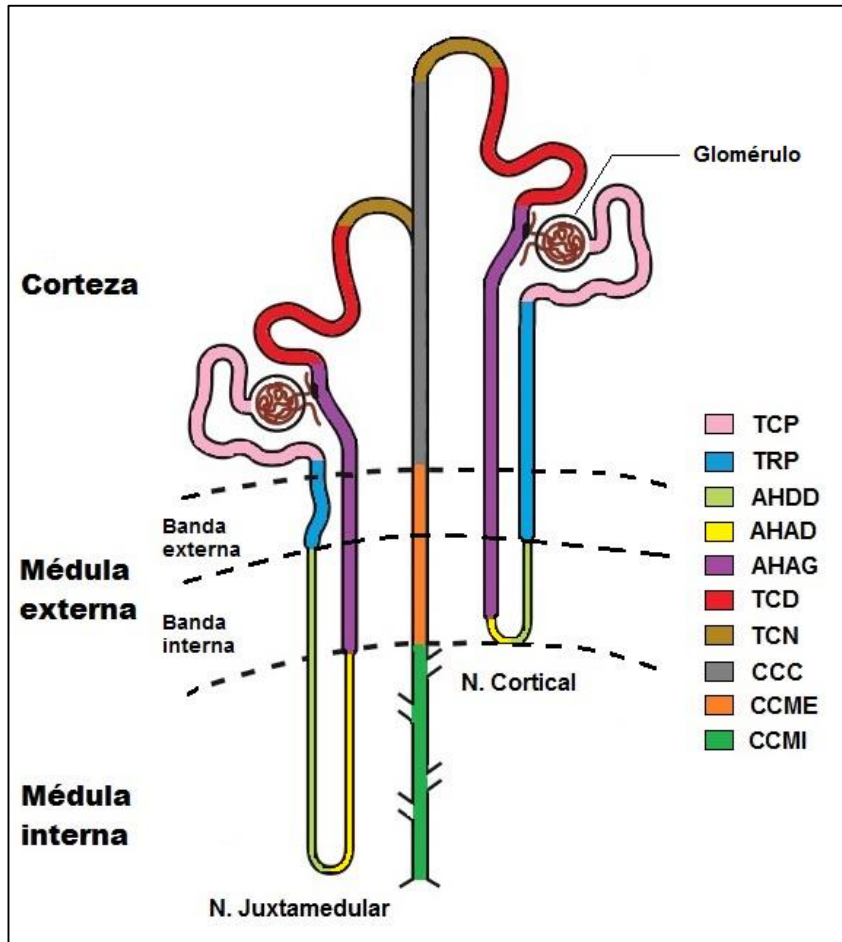


FIGURA 4. Segmentos tubulares de las nefronas (N.) corticales y yuxtamedulares. Esquema que muestra los diferentes segmentos de las nefronas marcados con diferentes colores. Túbulo contorneado proximal (TCP), túbulo recto proximal (TRP), Asa de Henle descendente delgada (AHDD), asa de Henle ascendente delgada (AHAD), asa de Henle ascendente gruesa (AHAG), túbulo contorneado distal (TCD), túbulo conector (TCN) conducto colector cortical (CCC), conducto colector de la médula externa (CCME) y conducto colector de la médula interna (CCMI). (Adaptada de Boron y Boulpaep, 2009).

3.1.2 Excreción renal

Una de las principales funciones del riñón es la de excretar los productos de desecho del metabolismo (urea, creatinina, ácido úrico, bilirrubina, etc), así como la mayoría de las toxinas, fármacos o sustancias extrañas que se producen o se ingieren por el organismo. La eliminación de estas sustancias ocurre a través de la producción de la orina en los túbulos renales, la cual se recolecta en los uréteres y se transporta hacia el resto del aparato urinario. A través de la excreción urinaria los riñones también regulan la cantidad de iones y agua para mantener la osmolaridad, la presión arterial y el pH de los fluidos corporales (Guyton y Hall, 2011).

Para la formación de la orina, el riñón lleva a cabo tres funciones principales:

a) Filtración glomerular: Es un proceso físico impulsado por un gradiente de presión hidrostática entre la cápsula de Bowman y los capilares glomerulares, a través del cual, sustancias tales como agua, glucosa, aminoácidos, sales y urea, atraviesan las paredes de los capilares y de la cápsula de Bowman (Fig. 5). De esta manera, los riñones filtran a diario unos 180 litros de sangre. Las paredes de los capilares glomerulares presentan poros en la capa endotelial (diámetro de 80 Amstrongs), así como podocitos, por lo que sólo pasan las moléculas pequeñas. No se filtran por el glomérulo las células sanguíneas ni las proteínas plasmáticas que son muy grandes para atravesar las membranas. Sin embargo, el tamaño no es el único factor limitante para la filtración, también influye la carga y la forma de las moléculas. El plasma que pasa por el glomérulo pierde un 20% de su volumen para formar el filtrado glomerular, la osmolaridad de este último es similar al plasma sanguíneo pero sin proteínas (Boron y Boulpaep, 2009).

b) Reabsorción: Consiste en la reabsorción regulada, de manera pasiva o activa, de todas las sustancias vitales para las células (aminoácidos, azúcares, agua, sales etc) a partir del filtrado glomerular. El proceso de reabsorción ocurre primeramente hacia las células epiteliales que revisten los segmentos tubulares de la nefrona, y de ahí hacia la sangre, devolviendo a los capilares vasculares las sustancias vitales en las proporciones adecuadas para mantener el medio interno estable. (Fig. 5). El mayor porcentaje de reabsorción ocurre en el TP de la nefrona, el cual presenta numerosas microvellosidades en las membranas luminales llamadas *borde de cepillo* (BBM). Las diferentes sustancias se reabsorben a lo largo de la nefrona por dos vías: la transcelular y la paracelular. En la vía transcelular, el paso de las sustancias es a través de las membranas apical y basolateral y su velocidad de transporte depende de los gradientes electroquímicos, de los canales iónicos y de los transportadores presentes en las membranas. En la vía paracelular, los iones atraviesan las uniones estrechas entre las células, para dirigirse hacia el espacio intersticial y posteriormente hacia la sangre, atravesando los capilares peritubulares (Boron y Boulpaep, 2009).

c) Secreción: Consiste en el paso de diversas sustancias (cationes, aniones, urea, creatinina etc) desde las células epiteliales, que revisten los túbulos de la nefrona, hacia el lumen tubular para mantener la homeostasis de los líquidos corporales y eliminar los productos del metabolismo (Fig. 5, Koeppen y Stanton, 2005.).

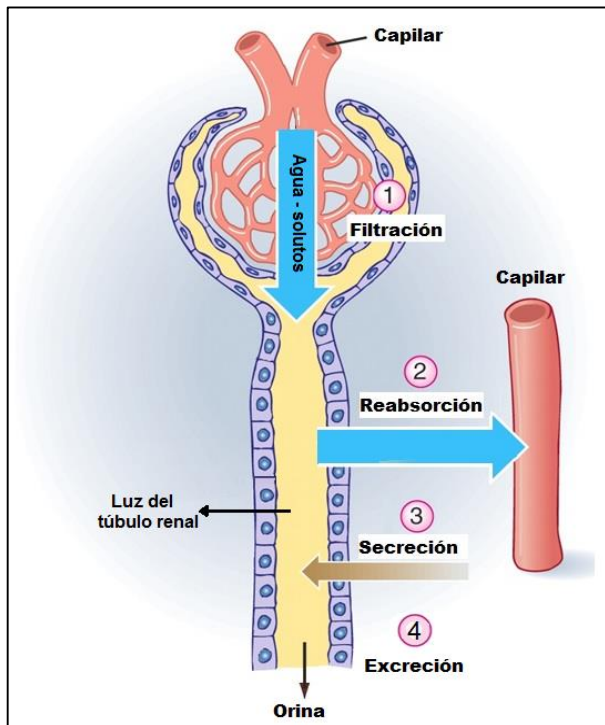


FIGURA 5. Mecanismos renales que determinan la composición de la orina. La orina se forma a través de los procesos de filtración, reabsorción y secreción, para finalmente ser excretada por la luz del túbulo renal. La tasa de excreción urinaria de una sustancia es igual a la velocidad en que la sustancia se filtra, menos su tasa de reabsorción, más la velocidad a la que se secreta por las células epiteliales (Modificada de Boron y Boulpaep, 2009).

3.2 Manejo renal del K^+

La diferencia de concentración de K^+ entre el líquido intracelular (150 mEq/L) y extracelular (4 mEq/L) es el principal determinante del potencial de membrana en reposo. Alteraciones en el balance plasmático de K^+ , como la hipocalemia (<3.5 mEq/L) o la hipercalemia (>5 mEq/L), pueden resultar en una parálisis muscular y arritmias cardíacas. La homeostasis de K^+ depende de tres procesos básicos: su ingesta, su distribución interna entre los compartimientos intra y extracelulares y su excreción. El balance corporal interno de K^+ se mantiene por la bomba Na^+/K^+ ATPasa, la cual puede ser regulada por algunas sustancias como la insulina y las β -catecolaminas (Bia y DeFronzo, 1981; Brown, 1986). La mayor parte de la excreción de K^+ (90-95%) se lleva a cabo por los riñones, la ingesta diaria (80-120 mmol) debe eliminarse para que la carga plasmática de K^+ permanezca constante (Youn y McDonough, 2009). La excreción renal es la defensa principal contra los desequilibrios crónicos de K^+ y depende de la filtración libre en el glomérulo, de la extensa reabsorción en el túbulo proximal, y de una secreción altamente regulada en el túbulo contorneado distal y los segmentos del conducto colector cortical y de la médula externa (Greenlee et al., 2009).

En condiciones fisiológicas normales el 80% del K^+ filtrado por el glomérulo renal se reabsorbe en el túbulo proximal y sólo un 10% en el asa de Henle ascendente gruesa. El 10% restante de la carga de K^+ filtrada llega a la nefrona distal (túbulo contorneado distal, túbulo conector, y conductos

colectores), la cual tiene la capacidad de secretar o reabsorber el K^+ , dependiendo de las necesidades del organismo. Por lo tanto, en la nefrona distal es donde se regula la cantidad final de K^+ que se excreta en la orina, esta región de la nefrona es susceptible de ser regulada por hormonas (Koeppen y Stanton, 2005). A pesar de la ingesta de K^+ o la función del sistema secretor distal, el conducto colector de la médula interna reabsorbe K^+ . La mayor parte del K^+ reabsorbido por este segmento se deposita en el intersticio medular, manteniendo una concentración elevada de K^+ en la médula, mecanismo conocido como “trampa de K^+ ”. La fracción restante del K^+ reabsorbido se secreta en el lumen del asa de Henle descendente delgada de las nefronas yuxtamedulares, contribuyendo a su reciclaje medular (Jamison et al., 1976).

En la nefrona distal se pueden observar dos poblaciones celulares: las *células principales* (70%), las cuales reabsorben Na^+ a través del canal epitelial de Na^+ (ENaC) y secretan K^+ a través de los canales secretores de K^+ , y las *células intercaladas* (30%), que se diferencian a su vez en células tipo A y tipo B (Fig. 6). Las células intercaladas tipo A o alfa se encargan de secretar la carga de H^+ a través de las bombas ATPasa vacuolar (V-ATPasa) y H^+/K^+ ATPasa (Doucet y Marsy, 1987; Brown et al., 1988). Las células intercaladas tipo B o beta, secretan HCO_3^- a través del intercambiador aniónico HCO_3^- / Cl^- (Kim et al., 2002; Wall y Lazo-Fernandez, 2015).

Los canales secretores de K^+ descritos en las células principales son los canales ROMK (canales rectificadores de K^+ de la médula externa; Lee y Hebert 1995) y los canales maxi-K ó BK (canales de K^+ de gran conductancia dependientes de Ca^{2+} ; (Frindt y Palmer, 1987; Pácha et al., 1991). En nuestro laboratorio se identificó otro canal secretor de K^+ en las células intercaladas de los túbulos colectores, se trata del canal Kv1.3, cuyo tráfico hacia la membrana apical se ve regulado por dietas con alto K^+ (Fig. 6; Carrisoza-Gaytan et al., 2010).

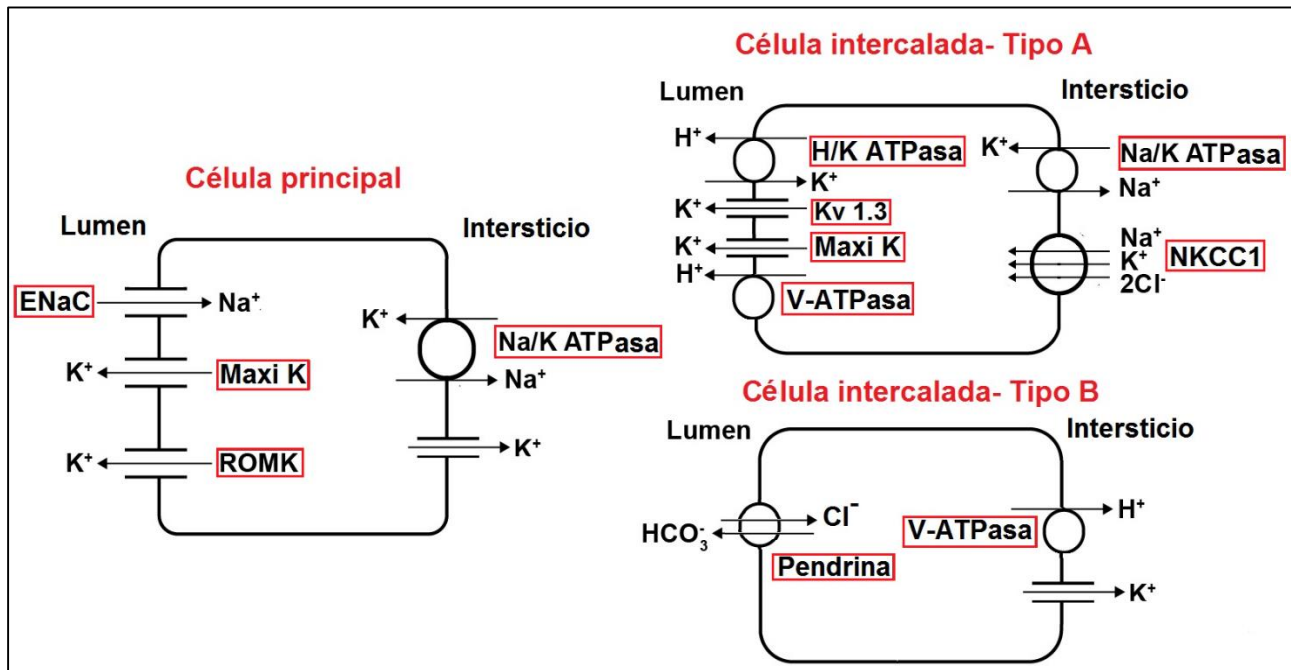


Figura 6. Poblaciones celulares de la nefrona distal. Esquema donde se representan los principales canales y transportadores de la membrana apical (lumen) y basolateral (intersticio) de las células principales y las células intercaladas. Las células principales se encargan de la reabsorción de Na^+ acoplada a la secreción de K^+ . Las células intercaladas tipo A secretan la carga ácida y reabsorben K^+ , mientras que las células intercaladas tipo B son secretoras de HCO_3^- (Adaptada de Boron y Boulpaep, 2009).

Los riñones filtran ~800 mmol de K^+ por día y normalmente excretan 10% a 15% de la carga filtrada para mantener el equilibrio. Sin embargo, la tasa de excreción urinaria de K^+ varía dependiendo de su consumo en la dieta (Fig. 7), desde un 2% (ingesta baja de K^+ : <80 mmol/día) hasta un 150% de la carga de K^+ filtrada (ingesta elevada de K^+ : >120 mmol/día). Mientras más se eleve la ingesta de K^+ , más incrementa su secreción y, por lo tanto, su excreción urinaria. En dietas con bajo K^+ no hay secreción sólo reabsorción de K^+ a lo largo de la nefrona, sin embargo, aun así se pierde aproximadamente el 2% de la carga filtrada, lo que evidencia que los mecanismos para retener el K^+ no son tan eficientes como los mecanismos de secreción (Lee Hamm et al., 2013).

Si el periodo de ingesta en alto K^+ se prolonga, se desarrolla una condición de tolerancia al K^+ (adaptación), en la cual los riñones pueden excretar eficientemente grandes cantidades de K^+ en la orina (Kaliuresis) para regresar la concentración plasmática de este ion a los niveles basales (Stanton y Giebisch, 1982). La carga aguda o crónica de K^+ en la sangre produce un aumento en la secreción de K^+ , lo cual se asocia con un incremento en la capacidad secretora de las células principales en la nefrona distal (Wright et al., 1971). A pesar de la adaptación que se logra en animales experimentales sometidos a una dieta alta en K^+ , se ha visto que este tipo de dieta

administrada de manera crónica (6-13 días) en altos porcentajes (10-15% de K^+) puede ocasionar hipercalemia (DuBose y Good, 1991, 1992).

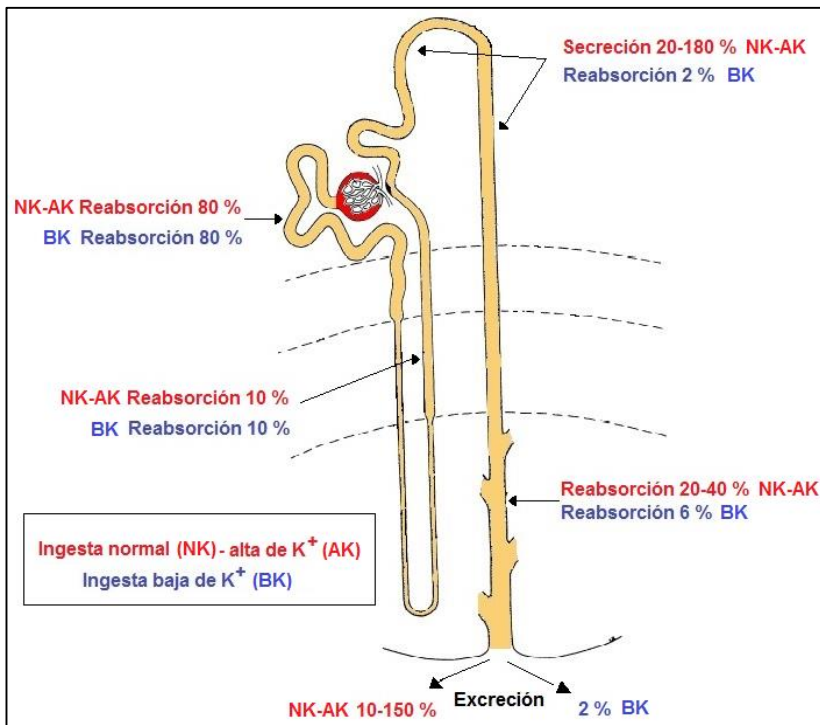


Figura 7. Reabsorción y secreción de K^+ en la nefrona bajo condiciones de alto y bajo K^+ . Independientemente de la ingesta de K^+ , en el túbulo proximal se reabsorbe el 80% y en el asa de Henle ascendente gruesa el 10% de la carga filtrada. Mientras que en el conducto colector de la médula interna se reabsorbe K^+ , contribuyendo al reciclamiento medular de este ión. En el túbulo contorneado distal tardío, el túbulo conector y los conductos colectores corticales y de la médula externa (sistema secretor distal) se regula la cantidad de K^+ que se excretará en la orina, dependiendo de la condición fisiológica del organismo. En una ingesta baja o depletada de K^+ no hay secreción, sólo reabsorción (Adaptada de Boron y Boulpaep, 2009).

Incrementos tan pequeños como 0,1 mmol/L en la concentración de K^+ plasmático pueden estimular la síntesis y la secreción de la aldosterona en la zona glomerulosa de la glándula adrenal. La aldosterona promueve la secreción de K^+ por las células principales a través de varios mecanismos: a) una marcada amplificación de la membrana basolateral de las células principales, lo que aumenta el número de Na^+/K^+ ATPasas y, en consecuencia, la recaptura basolateral de K^+ , b) un incremento en la reabsorción de Na^+ por los canales ENaC, presentes en la membrana apical de las células principales y c) un incremento de la conductancia de K^+ de los canales ROMK en la membrana apical de las células principales (Unwin et al., 2011).

Por el contrario, en la depleción de K^+ , la secreción tubular disminuye y aumenta la reabsorción de K^+ en la nefrona distal a través de los mecanismos siguientes: a) la abundancia proteica del canal ROMK disminuye ~55% (Mennitt, et al., 2000), b) se reduce la abundancia de algunas proteínas transportadoras de Na^+ como el cotransportador $Na^+/K^+/2Cl^-$ (NKCC2), el cotransportador Na^+/Cl^- (NCC) y los canales ENaC en ~50 (Frindt y Palmer, 2010); como consecuencia disminuye el gradiente electroquímico para la secreción de K^+ , c) el canal ROMK se endocita por medio de su fosforilación por PKT (proteína tirosina cinasa; (Lin, 2004), y e) aumenta la expresión de la H^+/K^+

ATPasa en la membrana apical de las células intercaladas tipo A para favorecer la reabsorción de K^+ (Silver y Soleimani, 1999).

3.3 Reabsorción renal de Na^+

El Na^+ es el principal catión que determina la osmolaridad del LEC. Las variaciones en la ingesta de Na^+ se acompañan de cambios en el volumen corporal circulante y en la excreción de Na^+ . Los riñones son los órganos excretores de Na^+ y ajustan la cantidad eliminada en la orina únicamente a través de mecanismos celulares de reabsorción tubular. Diariamente los riñones filtran $\sim 25,500$ mmol de Na^+ por día, excretando menos del 1% a través de la orina. En una dieta occidental típica (~ 120 mmol de Na^+), los riñones reabsorben 99.6% de la carga filtrada de Na^+ (Boron y Boulpaep, 2009). El Na^+ se filtra libremente en los glomérulos y se reabsorbe del 60-70% en el túbulo proximal, 25% en el asa de Henle ascendente gruesa, 5-10% en el túbulo contorneado distal, el túbulo conector y el conducto colector cortical; y 3-5% en el conducto colector de la médula interna; Fig. 8).

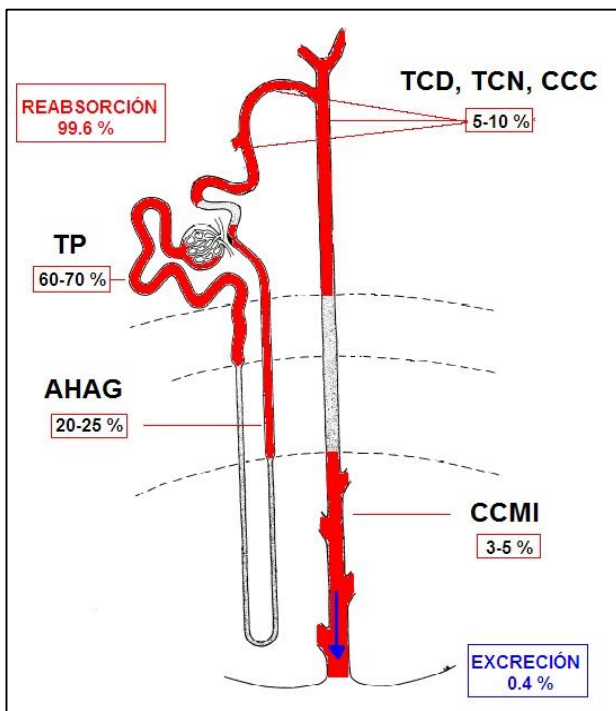


Figura 8. Reabsorción de Na^+ a lo largo de la nefrona. Los mecanismos de reabsorción de Na^+ en la nefrona son muy eficientes, retienen el 99.6% de la carga filtrada. En el túbulo proximal (TP) se reabsorbe el mayor porcentaje de Na^+ , seguida por el asa de Henle ascendente gruesa (AHAG) y la nefrona distal: túbulo contorneado distal (TCD), túbulo conector (TCN), conducto colector cortical (CCC) y conducto colector de la médula interna (CCMI), (Adaptada de Esteva-Font et al., 2007).

En las membranas apicales y basolaterales de cada segmento tubular se encuentran diferentes mecanismos para el transporte transcelular de Na^+ (Fig. 9). En el túbulo proximal, el asa de Henle ascendente gruesa y el túbulo contorneado distal, se encuentran varios cotransportadores e intercambiadores que mueven el Na^+ a través de la membrana apical y/o basolateral acoplado a

otras moléculas orgánicas (glucosa, aminoácidos, lactato, oxalacetato, citrato) ó inorgánicas (Cl^- , K^+ , HCO_3^- , fosfatos; Esteva-Font et al., 2007).

El túbulo proximal contribuye de manera esencial a la homeostasis de los electrolitos y nutrientes en el plasma, debido a la reabsorción del 70% de agua, de NaCl , de NaHCO_3 , y de la mayoría de los nutrientes del ultrafiltrado glomerular. En la primera porción del túbulo proximal, el Na^+ se reabsorbe junto con el HCO_3^- , a través del intercambiador Na^+/H^+ tipo 3 (NHE-3) y el cotransportador $1\text{Na}^+/3\text{HCO}_3^-$ electrogénico (NBCe1) que se encuentran en la membrana apical y basolateral, respectivamente (Alpern, 1985). En este segmento el Na^+ también se reabsorbe acoplado a diversas moléculas orgánicas como: a) la glucosa, a través del cotransportador $\text{Na}^+/\text{glucosa}$ tipo 2 (SGLT2), b) diferentes aminoácidos neutros (>80% de los aminoácidos filtrados) o ácidos, a través de los transportadores SLC6A19 ó SLC1A, respectivamente (Shayakul et al., 1997; Mackenzie y Erickson, 2004; Curthoys y Moe, 2014), c) el citrato, a través del cotransportador de ácido dicarboxílico dependiente de Na^+ (SLC13A2), el cual también tiene otros sustratos como el succinato, fumarato, y alfa-cetoglutarato (Pajor, 1995). Otro transportador que contribuye de forma relevante a la reabsorción del Na^+ en el túbulo proximal es el cotransportador $\text{Na}^+/\text{fosfato}$ (Pi) tipo II o NaPi II, del cual hay dos isoformas NaPi IIa (electrogénico) y NaPi IIc (electroneutro; (Virkki et al., 2007). En la segunda mitad del túbulo proximal el Na^+ se reabsorbe principalmente acoplado a la reabsorción de Cl^- por el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Cl}^-/\text{aniones orgánicos}$ (Aronson y Giebisch, 1997). En el asa de Henle ascendente gruesa la reabsorción apical de Na^+ ocurre por el cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ tipo 2 (NKCC2), en el túbulo contorneado distal tardío y túbulo conector por el cotransportador Na^+/Cl^- (NCC) y por los canales ENaC (células principales). En el túbulo contorneado distal tardío y túbulo conector la reabsorción de Na^+ se encuentra acoplada a una secreción efectiva de K^+ (Giebisch y Wang, 2010). La reabsorción de Na^+ en la nefrona distal ocurre también a través del intercambiador Na^+/H^+ (NHE, tipo 1, 2 y 4) en las membranas apicales y basolaterales de las células principales; y por el cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ tipo 1 (NKCC1) en la membrana basolateral de las células intercaladas tipo alfa (Wall, et al., 2001). La reabsorción de Na^+ hacia la sangre ocurre en las membranas basolaterales de los epitelios renales a través de dos mecanismos principales: la Na^+/K^+ ATPasa, que ayuda a mantener la $[\text{Na}^+]$ baja en el medio intracelular (15 mM) y alta en el medio extracelular (142 mM; Koeppen y Stanton, 2005), el cotransportador $1\text{Na}^+/3\text{HCO}_3^-$ electrogénico (NBCe1) en el túbulo proximal y el cotransportador $1\text{Na}^+/1\text{HCO}_3^-$ electroneutro NBCn1 en el asa de Henle ascendente gruesa (Fig. 9).

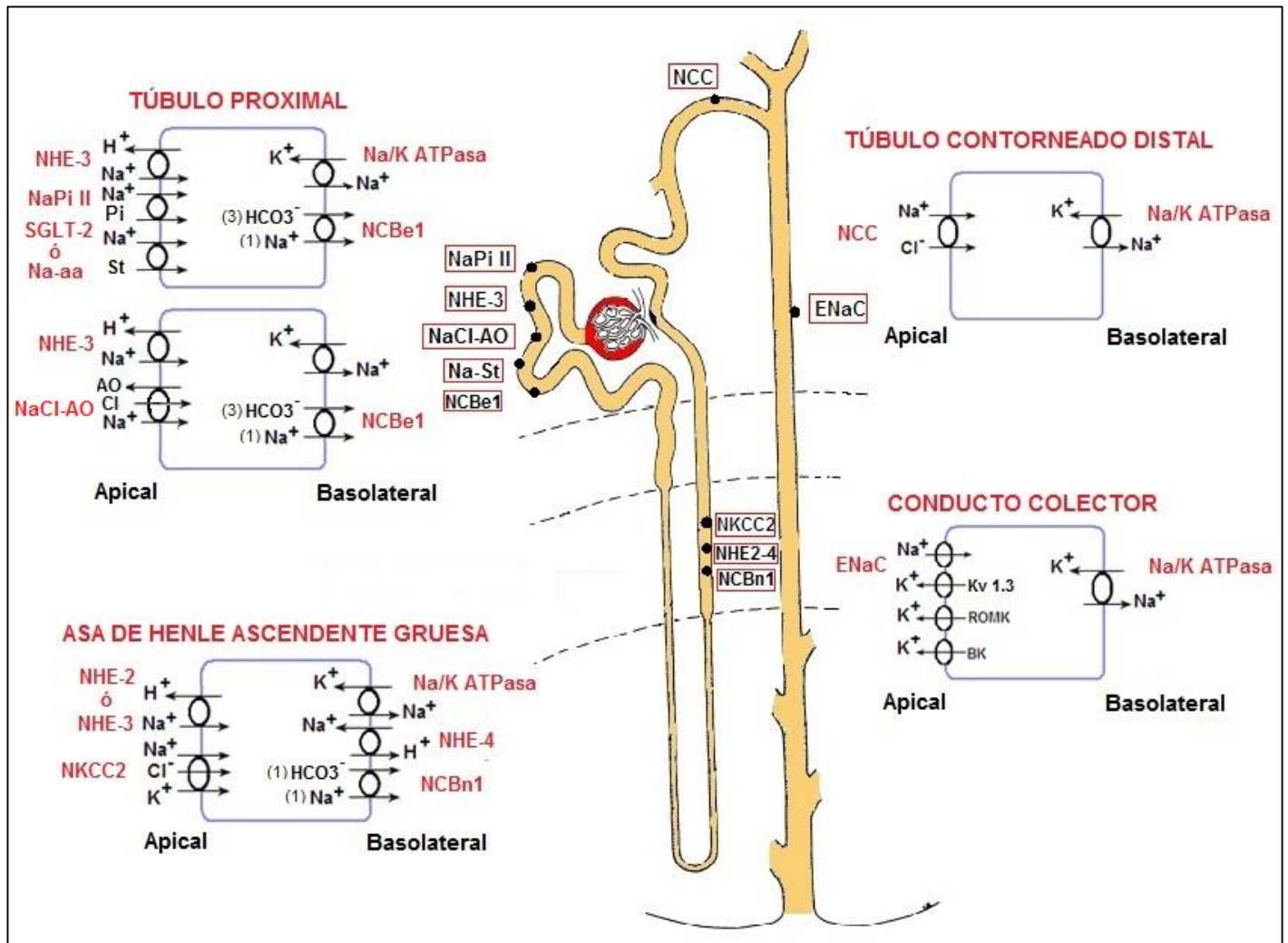


Figura 9. Transportadores y canales de Na⁺ en los diferentes segmentos de la nefrona. El túbulo proximal es el sitio principal para la reabsorción de Na⁺. En este segmento el Na⁺ se reabsorbe acoplado al intercambio de H⁺ (NHE-3), así como a la reabsorción de HCO₃⁻ (NCBe1), de Cl⁻ y aniones orgánicos (NaCl-AO), de Pi (NaPi II), y de diferentes sustratos orgánicos del ultrafiltrado tubular (Na-St), como aminoácidos (Na-aa) y glucosa (SGLT2). En el asa de Henle ascendente gruesa y el túbulo contorneado distal el Na⁺ se reabsorbe junto con el K⁺ y/o Cl⁻ (NKCC2 y NCC). En el conducto colector el Na⁺ se reabsorbe a través del ENaC, el único canal de Na⁺ conocido hasta el momento en la nefrona. En este segmento la reabsorción de Na⁺ se encuentra acoplada a la secreción de K⁺ a través de los canales Kv 1.3, ROMK y BK (Adaptada de Boron y Boulpaep, 2009; Esteva-Font et al., 2007).

La expresión y distribución subcelular de los diferentes transportadores y/o canales de Na⁺ a lo largo de la nefrona se puede regular por la carga plasmática de este electrolito. En dietas sin Na⁺, ocurre un incremento en la expresión del NCC, β-ENaC y γ-ENaC (Frint y Palmer, 2009). En contraste, en dietas con alto contenido de Na⁺ (4-5%) existe un decremento de la expresión proteica del NCC y la subunidad β-ENaC (Frint y Palmer, 2009; Lai et al., 2012). En la región proximal se han observado cambios en la distribución subcelular y en la actividad del NHE-3 por efecto de la carga plasmática de Na⁺. Una ingesta elevada de Na⁺ promueve la retracción del NHE-3 hacia la base del borde de cepillo (Yang et al., 2008), así como un decremento en la actividad de este

intercambiador (Moe et al., 1991). Una dieta baja en Na^+ combinada con una dieta baja en K^+ es capaz de incrementar la expresión proteica del NHE-3 en un 35%, este incremento se conserva sólo con una dieta baja en K^+ (Frindt et al., 2011). Lo que sugiere el estrecho acoplamiento entre el transporte de Na^+ y K^+ en la nefrona.

El transporte de Na^+ se modula más allá de la mácula densa por efecto hormonal (Fig. 10; Knepper, et al., 2003). La angiotensina II es quizás la hormona más potente para retener Na^+ en el organismo, ayuda a normalizar la presión arterial y el volumen extracelular al aumentar la reabsorción de Na^+ y agua en los túbulos renales a través de tres efectos principales: estimulación de la secreción de aldosterona, la contracción de las arteriolas eferentes y la estimulación directa del NHE-3, NaPi II, la bomba Na^+/K^+ ATPasa, el NCC, y el NBCe1 (Garvin, 1991; Eiam-Ong et al., 1993; Turban et al., 2006; Riquier-Brison et al., 2010). La hormona mineralocorticoide aldosterona estimula la reabsorción de Na^+ en los conductos colectores mediante la activación coordinada de la Na^+/K^+ ATPasa y los canales ENaC (Férraille et al., 2003).

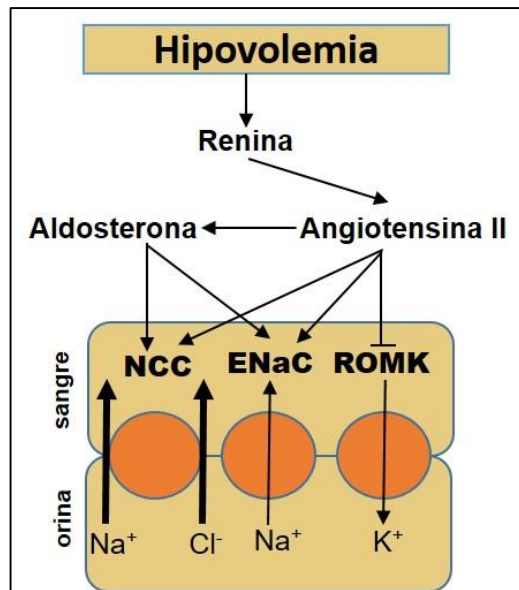


Fig. 10. Regulación de la reabsorción de Na^+ por angiotensina II en la nefrona distal.

Durante la hipovolemia (disminución del volumen sanguíneo) las arteriolas aferentes del riñón liberan renina. Esta hormona con actividad catalítica incrementa los niveles circulantes de angiotensina II y aldosterona, las cuáles actúan sinérgicamente para aumentar la actividad del cotransportador Na^+/Cl^- (NCC) y el canal epitelial de sodio (ENaC). La angiotensina II inhibe al canal renal de K^+ de la medula externa (ROMK). Estos eventos dan como resultado la máxima reabsorción de Na^+ para corregir la hipovolemia, conservando el K^+ (Modificada de Van der Lubbe et al., 2013).

Los niveles plasmáticos de K^+ alteran la reabsorción de Na^+ en los epitelios renales debido a que el transporte de Na^+ está acoplado a la reabsorción de K^+ por la Na^+/K^+ ATPasa, y a la secreción de K^+ por los canales secretores de K^+ . Una infusión aguda de K^+ en las ratas puede producir natriuresis debido a la inhibición de la reabsorción de NaCl en el TP (Brandis et al., 1972). En alto K^+ , el transporte de Na^+ , K^+ y Cl^- a través del NKCC2 también disminuye a lo largo del asa de Henle ascendente gruesa (Unwin et al., 1994). En contraste, la actividad específica de la Na^+/K^+ ATPasa

bajo esta condición se incrementa en homogenados de riñón, de manera más pronunciada en la médula externa que en la corteza (Silva et al., 1973).

3.4 Equilibrio ácido-base

El equilibrio ácido-base está relacionado con la conservación de las concentraciones normales de H^+ en los líquidos corporales. La homeostasis del pH es crítica para el funcionamiento de las células y, en consecuencia, de nuestros órganos. El pH extracelular se debe mantener dentro de un margen muy estrecho, de 7.38-7.42, fuera de este rango las enzimas pierden su habilidad para funcionar adecuadamente. El equilibrio ácido-base en el cuerpo es mantenido por tres mecanismos principales: los amortiguadores plasmáticos, los pulmones y el riñón. El riñón es el órgano principal que regula el equilibrio ácido-base a través de la eliminación de la carga ácida en forma de amonio (NH_4^+) y ácidos titulables ($H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$) en la orina, así como por la reabsorción y producción de HCO_3^- en el plasma (Good y Burg, 1984).

3.4.1 Excreción y transporte renal de NH_4^+

En las células del túbulo proximal el metabolismo de la glutamina, proveniente del hígado, produce amoniaco (NH_3) y alfa cetoglutarato (αKG); este último se metaboliza en glucosa, CO_2 y H_2O , para finalmente llegar a HCO_3^- , el cual se reabsorbe hacia la sangre. La anhidrasa carbónica tipo II (ACII) produce los hidrogeniones H^+ en el citoplasma, de manera que el NH_3 se convierte en NH_4^+ (Taylor y Curthoys, 2004). El transporte de NH_4^+ varía a lo largo de la nefrona (Fig. 11). El túbulo proximal es el sitio principal de producción (amoniogénesis) y secreción de NH_4^+ renal. El túbulo contorneado proximal presenta una tasa alta de secreción, mientras que una ligera reabsorción ocurre a lo largo del túbulo recto proximal (Good y Burg, 1984; Good, 1987). Un modelo propuesto para la secreción del NH_4^+ en el túbulo proximal es la disrupción del NH_4^+ en NH_3^+ y H^+ , el NH_3^+ difunde hacia el lumen, mientras que el H^+ es expulsado a través del intercambiador NHE-3 (Knepper et al., 1989). Sin embargo, se ha sugerido por estudios en vesículas de membrana del borde de cepillo que el NH_4^+ puede unirse y ser exportado directamente por el NHE-3 (Kinsella y Aronson, 1981). El NH_4^+ secretado en la orina a nivel del túbulo proximal se reabsorbe y se recicla en el asa de Henle ascendente gruesa medular a través del cotransportador NKCC2, en dicho proceso el NH_4^+ luminal compite con el K^+ por el sitio de unión, debido a sus similitudes moleculares (Kinne et al., 1986; Weiner y Verlander, 2011). Por esta razón, la reabsorción de NH_4^+ en este

segmento de la nefrona se inhibe por el aumento de la concentración luminal de K^+ (Good, 1988). El mecanismo de salida del NH_4^+ de las células del asa de Henle ascendente gruesa medular hacia el intersticio medular aún no está completamente establecido, pero se ha propuesto al intercambiador Na^+/H^+ tipo 4 (NHE-4) basolateral como un candidato para este proceso. Sin embargo, la inhibición del NHE-4 no abate toda la reabsorción basolateral de NH_4^+ , lo que indica que otros transportadores están involucrados (Bourgeois et al., 2010). La acumulación de NH_4^+ en la médula genera un gradiente de concentración que favorece su entrada por la membrana basolateral de los conductos colectores (Fig. 11) a través de las proteínas RhCg (Quentin et al., 2003), el cotransportador K^+/Cl^- tipo 4 (KCC4; (Boettger et al., 2002) y los canales HCN2 (Carrisoza-Gaytán et al., 2011). Finalmente, la secreción distal de H^+ en la orina se lleva a cabo por las células intercaladas tipo A (alfa) en los conductos corticales y medulares a través de la bomba de H^+ : V-ATPasa y H^+/K^+ ATPasa, ambas presentes en la membrana apical (Carraro-Lacroix y Malnic, 2010).

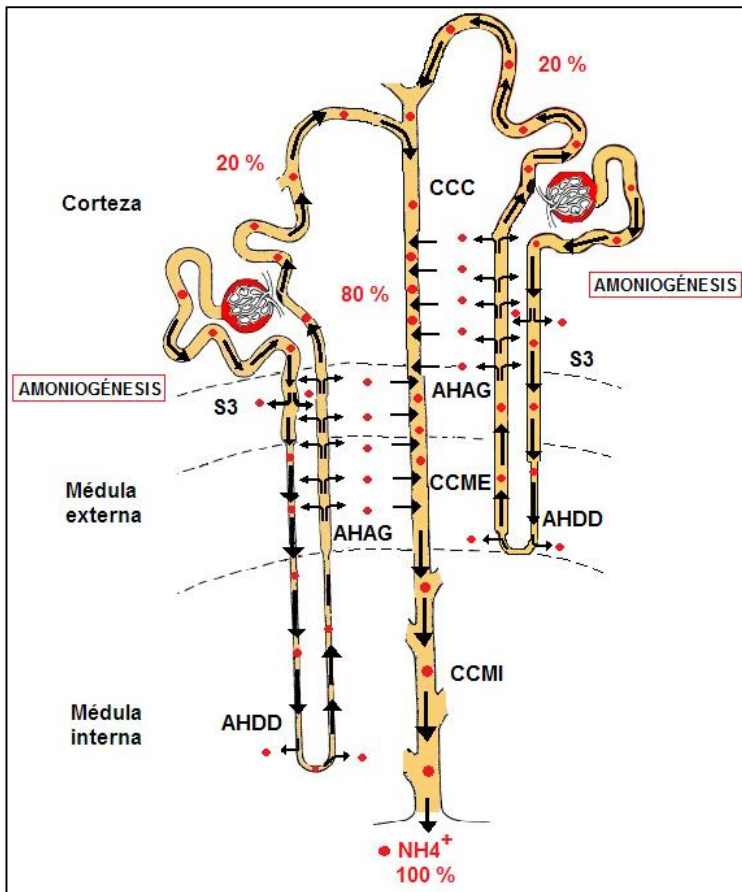


Figura 11. Transporte renal de amonio (NH_4^+). El túbulo proximal (TP) produce NH_4^+ a partir de la glutamina (amoniogénesis). En este segmento el NH_4^+ es secretado en el fluido luminal principalmente a través del intercambiador NHE-3, aunque hay una ligera reabsorción en el túbulo recto proximal (S3) y más adelante en el asa de Henle delgada descendente (AHDD). La mayor parte de la carga luminal de NH_4^+ (80%) se reabsorbe apicalmente en el asa de Henle ascendente gruesa (AHAG) por el cotransportador NKCC2, el remanente (20%) continúa su paso hacia la nefrona distal. El NH_4^+ reabsorbido en el AHAG pasa al intersticio medular creando un gradiente de concentración que lo impulsa a ser reabsorbido y secretado por las células del conducto cortical (CCC) y de la médula externa (CCME). La carga de NH_4^+ que llega al conducto colector de la médula interna (CCMI) y que es excretada es el 100% (Adaptada de Weiner y Hamm, 2007).

3.4.2 Reabsorción de HCO_3^-

Casi el 99.9% del HCO_3^- filtrado se reabsorbe y ello asegura la conservación de este amortiguador plasmático (Fig. 12A). La cantidad de HCO_3^- que se filtra es 4320meq/día, su tasa de

excreción media es únicamente 2 meq/día, por ende la cantidad de HCO_3^- reabsorbido es aproximadamente 4318 meq/día (Koeppen, 2009).

Alrededor del 80% de la carga filtrada de HCO_3^- se reabsorbe en el túbulo proximal acoplada a la secreción de H^+ . Se estima que dos tercios de la reabsorción proximal de HCO_3^- ocurre indirectamente a través del intercambiador de H^+ NHE-3, y el tercio restante a través de la V-ATPasa. Como en la mayoría de los segmentos involucrados en el transporte acido-base, la reabsorción de HCO_3^- es dependiente de la anhidrasa carbónica (Soleimani y Singh, 1995). La mayor parte de H^+ secretados en el lumen del túbulo proximal titulan el HCO_3^- filtrado, formando CO_2 y H_2O bajo la influencia de la anhidrasa carbónica tipo IV (AC IV), la cual está unida a la membrana apical. El H_2O atraviesa la membrana apical casi exclusivamente a través del canal de agua acuaporina 1 (AQP1), esta proteína también parece mediar la mayor parte del transporte de CO_2 al interior de la célula (Boron y Boulpaep, 2009). En el citoplasma, la ACII facilita la generación de H^+ y HCO_3^- a partir de la unión de CO_2 y H_2O . El H^+ se secreta en la luz tubular a través de la membrana apical, mientras que el HCO_3^- sale de la célula a través de la membrana basolateral por el cotransportador electrogénico NBCe1 (Alpern, 1985; Biagi y Sohtell, 1986), aunque existe evidencia de que también se reabsorbe al intersticio por un intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (AE; Nakhoul et al., 1990; Fig. 12B).

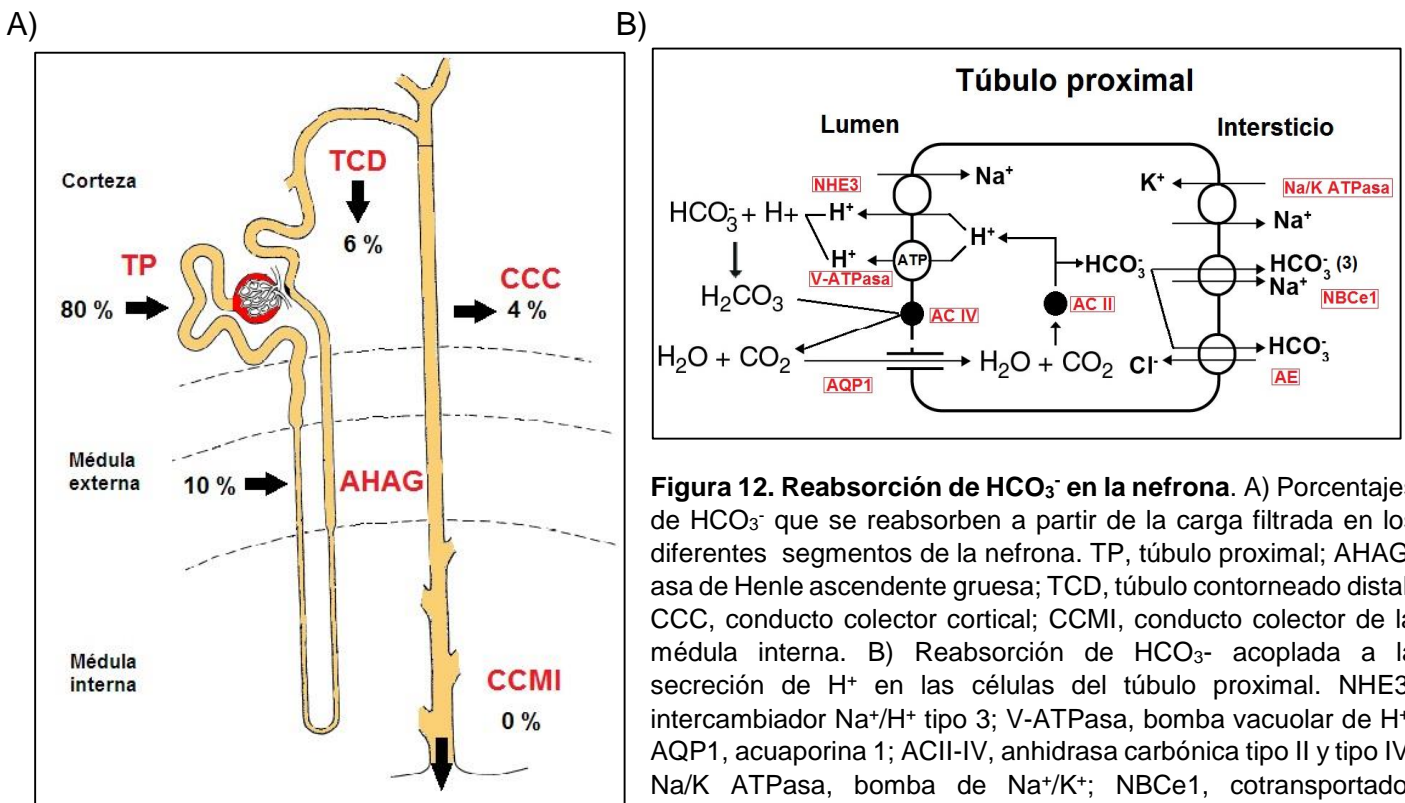


Figura 12. Reabsorción de HCO_3^- en la nefrona. A) Porcentajes de HCO_3^- que se reabsorben a partir de la carga filtrada en los diferentes segmentos de la nefrona. TP, túbulo proximal; AHAG, asa de Henle ascendente gruesa; TCD, túbulo contorneado distal; CCC, conducto colector cortical; CCMI, conducto colector de la médula interna. B) Reabsorción de HCO_3^- acoplada a la secreción de H^+ en las células del túbulo proximal. NHE3, intercambiador Na^+/H^+ tipo 3; V-ATPasa, bomba vacuolar de H^+ ; AQP1, acuaporina 1; ACII-IV, anhidrasa carbónica tipo II y tipo IV; Na/K ATPasa, bomba de Na^+/K^+ ; NBCe1, cotransportador electrogénico de $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$; AE, intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. (Adaptadas de Koeppen, 2009).

El asa de Henle ascendente gruesa reabsorbe el 10% del HCO_3^- filtrado, mientras que la nefrona distal reabsorbe el 10% restante, aproximadamente 6% el túbulo contorneado distal y 4% el conducto colector cortical. Los mecanismos celulares a través de los cuales se reabsorbe el HCO_3^- en el asa de Henle ascendente gruesa y el túbulo contorneado distal son esencialmente los mismos que en el túbulo proximal. Sin embargo, algunas de las isoformas de los transportadores son diferentes. Por ejemplo, la salida basolateral de HCO_3^- en el asa de Henle ascendente gruesa se produce por el cotransportador electroneutro $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ NBCn1, el intercambiador de aniones $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ tipo 2 (AE2) y el cotransportador simporte $\text{K}^+/\text{HCO}_3^-$ (Paillard, 1998). Adicionalmente al intercambiador NHE-3, la isoforma NHE-2 apical puede mediar la secreción de H^+ en el asa de Henle ascendente gruesa y el túbulo contorneado distal (Good y Watts, 1996; Attmane-Elakeb et al., 1996). En los conductos colectores las células intercaladas son las responsables del transporte de H^+ y HCO_3^- . En las células alfa o secretoras de ácido, el HCO_3^- se reabsorbe por la membrana basolateral a través del intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ tipo 1 (AE-1). Las células beta o secretoras de HCO_3^- , son menos abundantes y tienen la V-ATPasa en la membrana basolateral y un intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (pendrina) diferente al de las células alfa en la membrana apical (Carraro-Lacroix y Malnic, 2010).

3.4.3 Acidosis metabólica

La acidosis metabólica es una perturbación que conduce a un pH inferior a 7.35 y a una caída en la concentración de HCO_3^- en el plasma. La acidosis metabólica provoca hiperventilación compensatoria para mitigar la caída del pH sanguíneo, en consecuencia la homeostasis del pH se mantiene como resultado del cociente de la concentración $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$, que es el amortiguador de las células y la sangre por excelencia. Esta patología se produce como resultado de a) un aumento marcado en la producción o acumulación endógena de ácidos, como ocurre en la cetoacidosis o la acidosis láctica (acidosis metabólica aguda) y b) por la pérdida de los depósitos de HCO_3^- vía gastrointestinal, como ocurre en las diarreas ó cuando hay un defecto en su reabsorción o en la excreción urinaria de iones H^+ vía renal (acidosis metabólica crónica; Kraut y Madias, 2010; Escobar et al., 2013). Los efectos adversos de la acidosis metabólica aguda incluyen el decremento en el gasto cardíaco, la dilatación arterial con hipotensión, la disminución en la producción de ATP, la predisposición a arritmias y la disminución de la respuesta inmune (Khazel et al., 1969; Mitchell et al., 1972; Orchard y Cingolani, 1994; Kellum et al., 2004). Mientras que en la acidosis crónica los

efectos son el incremento de la degradación muscular y el metabolismo anormal del hueso (McSherry y Morris, 1978; Mitch, 2006).

Un parámetro que ayuda a diferenciar los tipos de acidosis metabólica, con mecanismos etiopatogénicos y enfoques terapéuticos distintos, es el **anión GAP**, otros nombres son hiato aniónico o brecha aniónica. El concepto de anión GAP se basa en la suposición de que los aniones deben tener igual magnitud con los cationes para mantener la electroneutralidad corporal. En la práctica diaria se puede medir el valor del GAP indirectamente, utilizando los valores del Na^+ , Cl^- y HCO_3^- plasmáticos.

- $\text{anión GAP} = \text{Na}^+ - (\text{Cl}^- + \text{HCO}_3^-)$. El valor del anión GAP es de 12 ± 2 mEq/l.

Los dos grandes grupos de acidosis metabólica son:

- 1.- *Acidosis metabólica con anión GAP elevado*, la cual se debe a la ganancia de ácidos.
- 2.- *Acidosis metabólica con anión GAP normal* (también llamadas hiperclorémias), se producen por pérdidas de HCO_3^- . Aquí se eleva el cloro plasmático (aumenta su reabsorción renal) para compensar la pérdida de HCO_3^- , manteniendo la electroneutralidad y al anión GAP resulta normal (Kraut y Madias, 2010).

Los trastornos que afectan la capacidad funcional de los túbulos renales, ya sea para secretar H^+ o para retener HCO_3^- , son conocidos colectivamente por el término acidosis tubular renal (ATR). La ATR es un síndrome clínico caracterizado por una acidosis metabólica hiperclorémica, secundaria a una anomalía en la acidificación renal. La anomalía en la acidificación renal puede manifestarse con un pH urinario alto o una bicarbonaturia (DuBose y Alpern, 2001). La ATR se debe, entre otras causas, a una alteración funcional de los transportadores que regulan el equilibrio ácido-base en las regiones proximales o distales de la nefrona (acidosis tubular renal proximal: ATRp y acidosis tubular renal distal: ATRd, respectivamente). Por ejemplo, una actividad ausente o disminuida de la ACII ó ACIV, así como mutaciones en el gen del cotransportador NBCe1 (SCL4A4) llevan a un decremento en la reabsorción de HCO_3^- , y por lo tanto pueden causar ATRp (Dinour et al., 2004; Watanabe, 2005). La ATRd puede resultar de defectos heredados en el intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (AE1) o la V-ATPasa (Karet et al., 1998; Stover et al., 2002). La ATR puede ocurrir clínicamente cursando con hipocalcemia o hipercalemia. La ATRd clásica o tipo I y ATRp o tipo II, se asocian con frecuencia a la hipocalcemia. Por el contrario, una disfunción generalizada de la nefrona distal, que puede estar asociada con hipoaldosteronismo o resistencia a la aldosterona,

generalmente se observa en asociación con hipercalcemia. Esto evidencia la estrecha relación entre el transporte renal de K^+ y el balance ácido base (DuBose y Alpern, 2001).

3.4.4 Acoplamiento entre el equilibrio ácido-base y el transporte de K^+

Los desajustes en el balance ácido-base alteran el transporte de K^+ en la nefrona a través de varios mecanismos. La acidosis metabólica aguda produce: a) una disminución en la secreción de K^+ al inhibir la actividad de los canales apicales secretores de K^+ en las células principales del conducto colectores (Schlatter et al., 1994), b) un incremento en la reabsorción de K^+ en los conductos colectores, a través de la estimulación de la H^+/K^+ ATPasa, lo cual puede aumentar los niveles extracelulares de K^+ (Stanton y Giebisch, 1982; Silver et al., 1996), c) una estimulación de la amoniogénesis, lo cual inhibe la secreción de K^+ , y por lo tanto, la reabsorción de Na^+ en los conductos colectores (Nakhoul et al., 2001). A pesar de esto, los efectos de la acidosis metabólica pueden ser modulados crónicamente por cambios en la tasa del flujo luminal y los niveles de la aldosterona, por ejemplo, la acidosis metabólica crónica inhibe la reabsorción de sal y agua en el túbulo proximal y asa de Henle ascendente gruesa, contribuyendo a un aumento en el flujo tubular distal y a su vez en la excreción de K^+ (Wingo, 1986). Por lo tanto, la acidosis aguda puede causar un aumento en la $[K^+]$ plasmático, mientras que la acidosis crónica puede causar un incremento en la excreción urinaria de K^+ (Gennari y Cohen, 1975).

Los cambios en los niveles plasmáticos de K^+ también tienen una influencia importante en la homeostasis ácido-base (Tannen, 1987). Se piensa que la depleción de K^+ (DK) o hipocalcemia causa acidosis intracelular (Adam et al., 1986), y por ello incrementa la secreción de H^+ a través de la estimulación del intercambiador NHE-3 en el túbulo proximal y el asa de Henle ascendente gruesa (Soleimani et al., 1990; Laghmani et al., 1997; Elkjær et al., 2002), y la H^+/K^+ ATPasa y la V-ATPasa, tanto en los túbulos distales como en los conductos colectores (Silver y Soleimani, 1999; Silver et al., 2000). Esto genera una mayor amoniogénesis y excreción urinaria de NH_4^+ , así como una reducción en la excreción de K^+ (Tannen, 1970; Kamm y Strobe, 1973). Asimismo, el aumento en la secreción de H^+ produce un incremento en la reabsorción de HCO_3^- a través de los cotransportadores de HCO_3^- dependientes de Na^+ , NCB_e1 y NCB_n1 en el túbulo proximal, el asa de Henle ascendente gruesa y el conducto colector de la médula interna (Amlal et al., 2000; Kwon et al., 2002). Por lo tanto, DK induce y mantiene una alcalosis metabólica en ratas y humanos debido

a un incremento en la capacidad de los túbulos renales para reabsorber HCO_3^- (Rector et al., 1964; Kunau et al., 1968; Jones et al., 1982).

Por el contrario, la hipercalemia inducida por una ingesta alta en K^+ (AK), disminuye la excreción urinaria de NH_4^+ produciendo acidosis metabólica (Hulter et al., 1983). Este efecto se debe a una inhibición de la amoniogénesis en el túbulo proximal y a una alteración en la absorción de NH_4^+ por el asa de Henle ascendente gruesa, lo que a su vez disminuye la $[\text{NH}_4^+]$ en la médula, y por lo tanto, su transferencia hacia los conductos colectores (DuBose y Good, 1991, 1992). AK se asocia también con un aumento notable en la excreción de K^+ en un esfuerzo del organismo por alcanzar la adaptación, sin embargo, ingestas crónicas muy elevadas de K^+ llegan a producir hipercalemia (Tannen et al., 1973).

3.5 Canales catiónicos activados por hiperpolarización y nucleótidos cíclicos (HCN)

Los canales activados por hiperpolarización y nucleótidos cíclicos (**HCN**, por sus siglas en inglés) pertenecen a una superfamilia de canales dependientes de voltaje. Se han encontrado cuatro isotipos en mamíferos: HCN1, HCN2, HCN3 y HCN4, y a diferencia de otros miembros de la superfamilia, se activan por voltajes hiperpolarizantes (-60 a -100 mV), cercanos al potencial de membrana en reposo de las células excitables (Robinson y Siegelbaum, 2003). Aunque los canales HCN presentan una permeabilidad catiónica no selectiva a K^+/Na^+ (4:1), debido a los gradientes electroquímicos fisiológicos, generan una corriente entrante de Na^+ (Knöpfel et al., 1998; Frère, et al., 2004). A la corriente de los HCN se le conoce como corriente "I_h" (corriente activada por hiperpolarización); sin embargo, cuando fue descubierta por primera vez (finales de los 70's-principios de los 80's) en el nodo sinoauricular de conejo (Yanagihara y Irisawa, 1980) le llamaron corriente I_f ("funny") por sus propiedades biofísicas inusuales. Entre estas propiedades se encuentran: su umbral de activación (HCN1:-70 mV, HCN2:-96 mV, HCN3:-77 mV, HCN4:-100 mV; Stieber et al., 2005), su permeabilidad catiónica mixta, su modulación interna por AMPc (Wainger, et al., 2001) y su conductancia pequeña de canal unitario (1 pS; DiFrancesco, 1986).

Los HCN están conformados estructuralmente por cuatro subunidades que se arreglan alrededor de un poro central (Fig. 13A). De manera similar a los canales de K^+ dependientes de voltaje (Kv), cada subunidad contiene seis segmentos transmembrana (S1-S6) y una región del poro con un motivo "GYG". El segmento S4, cargado positivamente, funciona como sensor de voltaje, y los segmentos S5 y S6 forman las paredes del poro (Biel et al., 2009; Fig. 13B). Un residuo de

asparagina altamente conservado entre el asa extracelular del S5 y la región del poro es susceptible de sufrir glicosilación, esta modificación postraduccional es importante para la expresión de algunos miembros HCN en la superficie celular (Much et al., 2003).

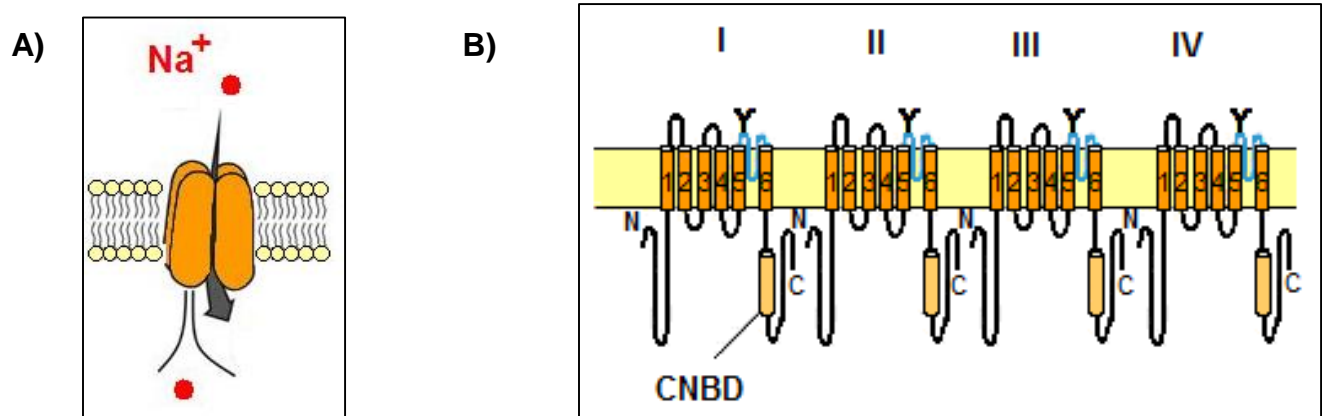


FIGURA 13. Topología de los canales HCN en la membrana plasmática. A) Representación esquemática del ensamblaje de las 4 subunidades de los canales HCN en la membrana plasmática, que permiten la formación de un canal funcional con un poro central B) Esquema de los segmentos transmembranales (S1-S6) de las diferentes subunidades (I-IV) que forman a los canales HCN. Las regiones NH₂-terminal (N) y COOH-terminal (C) de cada subunidad son citoplásmicas. En la región C-terminal se encuentra el dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD). El sitio de N-glicosilación (en una asparagina) entre el S5 y la región del poro está indicado como Y (Modificadas de Wahl-Schott y Biel, 2009).

Los canales HCN se han caracterizado ampliamente, tanto en su función como en su distribución, en los tejidos excitables como son el corazón y el sistema nervioso. En estos tejidos los HCN juegan un papel clave en la iniciación y la regulación de la actividad rítmica o marcapaso (DiFrancesco, 1993; Pape, 1996). Existen pocos estudios del canal HCN3 en cuanto a sus propiedades biofísicas y farmacológicas, debido a lo difícil que ha sido lograr expresarlo en sistemas heterólogos y a que *in situ* su corriente se enmascara por la de otros canales HCN (Stieber et al., 2005). La localización del HCN3 en el cerebro de rata es principalmente el tálamo, el hipotálamo y el bulbo olfatorio. Su expresión en el hipotálamo es muy abundante y es de particular interés farmacológico, debido a que las neuronas de esta zona del cerebro están involucradas en la regulación de funciones fisiológicas importantes como el hambre, la sed, la temperatura corporal, los ritmos circadianos y la secreción hormonal. Los canales HCN1 se localizan abundantemente en la neocorteza, corteza cerebelar e hipocampo, donde se piensa que están implicados en la regulación de la excitabilidad pre y postsináptica (Santoro et al., 1998; Notomi y Shigemoto, 2004). Los HCN también se localizan en tejidos no excitables como el páncreas, el ovario, las papilas gustativas, el oído interno, la vejiga y la pelvis renal (El-Kholy et al., 2007; Yeh et al., 2008; Hurtado et al., 2010; Horwitz et al., 2010; He et al., 2012), aunque en varios de estos tejidos su función no ha sido completamente dilucidada y/o estudiada.

Los miembros de la familia HCN difieren en su cinética de activación y su modulación por AMPc (Santoro y Tibbs, 1999), la cual está mediada por un dominio de unión a nucleótidos cíclicos de aproximadamente 120 aminoácidos (CNBD, por sus siglas en inglés) en la porción citosólica COOH-terminal (Zagotta et al., 2003). La unión del AMPc al CNBD acelera la apertura del canal y desplaza su voltaje de activación a potenciales más despolarizados (Wainger et al., 2001). El HCN2 y HCN4 son altamente sensibles a la modulación por AMPc, mientras que el HCN1 y HCN3 son menos sensibles (Wahl-Schott y Biel, 2009).

La corriente I_h se bloquea con Cs^+ (1 a 2 mM, >50% de bloqueo), así como con algunos compuestos orgánicos que incluyen al ZD-7288, al UL-FS49 (zatebradina) y la S-16257 (ivabradina; Gasparini y DiFrancesco, 1997; DiFrancesco y Mangoni, 1994; Bois et al., 1997). La relevancia de las corrientes I_h en el control de la frecuencia cardíaca las hace un blanco farmacológico importante. Algunos bloqueadores como la ivabradina inducen la reducción del ritmo cardíaco con efectos inotrópicos secundarios limitados, teniendo por lo tanto, una aplicación terapéutica potencial en aquellos casos donde es necesario ralentizar la frecuencia cardíaca sin alterar otras funciones cardiovasculares (Camici et al., 2016). Actualmente los HCN están siendo investigados como blancos terapéuticos contra el dolor, pues se demostró que la inhibición no selectiva de la corriente I_h en las terminales aferentes primarias de la médula espinal previene el dolor inflamatorio, así como el dolor neuropático (causado por una lesión directa de los nervios) en varios modelos animales, lo que sugiere su participación en las vías de la percepción al dolor (Momin et al., 2008; Takasu et al., 2010).

Debido a que miembros diferentes de la familia HCN pueden coexpresar en una misma célula, esto aumenta la posibilidad de que algunas corrientes I_h nativas se generen a través del coensamblaje de diferentes isotipos HCN, formando canales heteroméricos con nuevas propiedades, distintas a la de los canales homoméricos (Santoro et al., 2000). De hecho, se ha demostrado que todos los canales HCN pueden generar heteromultímeros funcionales, tanto en sistemas de expresión heteróloga como en sus tejidos nativos (Chen et al., 2001; Altomare et al., 2003; Much et al., 2003; Ye y Nerbonne, 2009).

Los canales HCN son regulados por la interacción con proteínas, iones o moléculas, que modifican sus propiedades funcionales, su expresión en la superficie celular y su tráfico a compartimentos celulares definidos (Biel et al., 2009). Algunos de estos moduladores son:

a) El pH, tanto intracelular (pHi) como extracelular (pHe), un pHi ácido (~6.0) cambia el voltaje de activación a potenciales más hiperpolarizados, mientras que un pHe ácido (<5.0) lo desplaza a voltajes más despolarizados (Zong et al., 2001; Stevens et al., 2001). b) Los fosfoinosítidos de membrana, como el fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP₂), que actúan como ligandos alostéricos y desplazan la activación dependiente de voltaje unos 20 mV hacia potenciales más positivos, independiente de la acción de los nucleótidos cíclicos (Pian et al., 2006). c) La Src cinasa, que fosforila una tirosina (Y476 en el HCN2) del “C-linker”, una región muy cercana al CNBD en el COOH, y acelera la cinética de activación de los HCN (Santoro et al., 1997; Zong et al., 2005). d) Proteínas transmembrana como la MiRP1 y la KCR1, las cuales funcionan como subunidades accesorias, para incrementar la densidad de corriente y acelerar la velocidad de activación de los HCN, pero no su dependencia de voltaje (Yu et al., 2001; Michels et al., 2008). e) Proteínas de andamiaje como la TRIP8b y la filamina A: la primera inhibe la expresión de los HCN en la membrana plasmática mientras que la segunda estimula el agrupamiento de subunidades y provoca el enlentecimiento de la cinética de activación y desactivación (Santoro et al., 2004; Gravante et al., 2004).

4. ANTECEDENTES

Recientemente identificaron a los miembros de la familia de canales HCN en el riñón de la rata. Bolivar y colaboradores (2008) mostraron la primera evidencia de una corriente catiónica I_h en un cultivo primario de células del conducto colector de la médula interna. Esta corriente fue activada por voltajes hiperpolarizados (más de -60 mV), modulada por AMPc, bloqueada por Cd²⁺ externo y potenciada por una alta concentración de K⁺ extracelular. Más tarde, en nuestro laboratorio se demostró que el HCN2 se localiza en la membrana basolateral de las células intercaladas alfa en el túbulo conector cortical y que permite la entrada de NH₄⁺, contribuyendo con esto al equilibrio ácido base en condiciones basales (Carrisoza-Gaytán et al., 2011). A través de técnicas de PCR en tiempo real y western blot, Calejo y colaboradores (2014) demostraron la presencia de toda la familia de canales HCN en el riñón de la rata. En ese trabajo se encontró que estos canales presentan varios sitios de corte en su secuencia primaria para metaloproteasas, por lo tanto, los HCN son sustrato y podrían ser regulados por estas endopeptidasas unidas a membrana. En nuestro laboratorio se ha estudiado la localización y regulación de los canales HCN en la nefrona de la rata, los canales HCN1, HCN3 y HCN4 se encontraron en el túbulo proximal, el HCN3 y HCN4 en el asa de Henle ascendente gruesa (datos no publicados) y el HCN2 en el túbulo conector y el conducto colector de la médula externa y médula interna (Carrisoza-Gaytán et al., 2011).

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Los electrolitos juegan un papel vital en el mantenimiento de la homeostasis corporal. El desequilibrio electrolítico más serio implica anomalías en los niveles de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y en el balance ácido-base. El riñón es el regulador más importante del balance electrolítico y ácido base. En particular, las alteraciones en el transporte de Na^+ generalmente se acompañan de cambios en el volumen del líquido extracelular y, en consecuencia, en la presión arterial. El transporte de Na^+ está estrechamente acoplado al transporte de K^+ y a la reabsorción de HCO_3^- en la nefrona. Por lo tanto, afectaciones en el transporte renal de Na^+ también pueden alterar la secreción de K^+ o el equilibrio ácido-base. La homeostasis ácido-base no sólo implica la modulación de la reabsorción de NaHCO_3 , sino de las vías que participan en el transporte de NH_4^+ . Por esta razón, la identificación de nuevos blancos moleculares implicados en la reabsorción de Na^+ y/o transporte de NH_4^+ en los epitelios renales sería de gran interés en la comprensión de la homeostasis de los líquidos corporales, del K^+ y/o del balance ácido-base.

Los canales HCN son una vía de absorción de Na^+ y NH_4^+ en condiciones fisiológicas en el contexto renal (Carrisoza-Gaytán et al., 2011). Aunque se ha reportado la presencia de los canales HCN en el riñón de la rata, nuestro laboratorio ha sido pionero en tratar de dilucidar el papel funcional y la localización de esta familia de canales en los diferentes segmentos tubulares de la nefrona. Todos los canales HCN han sido descritos en la vejiga urinaria de humano, pero sólo el HCN3 se encuentra en la unión de la pelvis renal (Hurtado et al., 2010; Xue et al., 2012), y ha sido implicado funcionalmente en la regulación de la actividad eléctrica de las células musculares para llevar a cabo la peristalsis. A pesar de esto, se desconoce su papel en los epitelios renales y en general es el miembro de la familia HCN menos caracterizado y estudiado debido a su pobre expresión en sistemas heterólogos.

Los datos previos de nuestro laboratorio indican que el HCN1 y HCN3 se localizan en el túbulo proximal de la nefrona. Esta región es muy importante para el transporte de Na^+ y el equilibrio ácido-base debido a que el túbulo proximal es responsable de reabsorber la mayor parte del Na^+ filtrado (70-80%) de manera acoplada a la reabsorción de varios solutos orgánicos e inorgánicos así como de HCO_3^- . Por esta razón, estamos interesados en estudiar el papel funcional del HCN1 y HCN3.

Gran parte del éxito de estudiar a las proteínas en sus tejidos nativos depende de su abundancia y de la eficiencia de los anticuerpos con que se detectan. Al inicio del presente estudio

fue difícil encontrar un anticuerpo de calidad para detectar al HCN1, esto, aunado a la poca abundancia del canal HCN1 en el tejido renal, dificultó los ensayos de western blot para este canal. Por esta razón, decidimos concentrarnos en estudiar los cambios en la abundancia proteica sólo del HCN3.

La carga plasmática de electrólitos puede regular la expresión, actividad o distribución subcelular de algunos transportadores y canales a lo largo de la nefrona, lo cual contribuye a dilucidar el papel de este tipo de proteínas en el metabolismo mineral. En un intento por conocer la contribución de los canales HCN en la homeostasis de Na^+ , K^+ y/o ácido base, en este trabajo evaluamos los cambios en la abundancia proteica del HCN3 en el tejido renal ante diferentes condiciones metabólicas estrechamente relacionadas entre sí: hipocalemia, hipercalemia, restricción de Na^+ y acidosis metabólica.

6. OBJETIVO GENERAL

- Determinar la distribución de los canales HCN1 y HCN3 en los diferentes segmentos de la nefrona del riñón de la rata y la abundancia proteica del HCN3 por efecto de dietas con diferente contenido de K^+ y Na^+ , así como por acidosis metabólica crónica.

7. OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Determinar por inmunofluorescencia y microscopía confocal la localización de los canales HCN1 y HCN3 en los diferentes segmentos tubulares de la nefrona en condiciones basales.
- b) Determinar si el HCN3 colocaliza con el HCN1 en la nefrona.
- c) Someter a ratas Wistar a dietas crónicas deficientes de K^+ (DK, 0%), con alto K^+ (AK, 10%) y deficientes de Na^+ (DS, 0%), y determinar la concentración en el plasma, así como la excreción fraccional urinaria del Na^+ , K^+ y Cl^- al término del tratamiento.
- d) Inducir acidosis metabólica crónica (AMC) en ratas Wistar y determinar la concentración plasmática de HCO_3^- , así como el pH plasmático y urinario al término del tratamiento.
- e) Determinar el efecto de dietas AK, DK y DS, así como de AMC sobre la abundancia proteica del canal HCN3 en el riñón de rata por técnicas de western blot.
- f) Determinar por técnicas de inmunofluorescencia y microscopía confocal si hay un cambio en la distribución del canal HCN3 en la nefrona, por efecto de dietas AK, DK y DS, con respecto al grupo control.

8. HIPOTESIS

Los canales HCN1 y HCN3 se encuentran en la membrana de las células epiteliales del riñón de la rata y constituyen una vía de entrada de Na^+ y/o NH_4^+ . Por lo tanto, su abundancia proteica puede incrementar en condiciones metabólicas de hipocalcemia, restricción de Na^+ o acidosis metabólica y disminuir en hipercalcemia, para contribuir en la reabsorción de HCO_3^- y la secreción de K^+ , respectivamente.

9. METODOLOGÍA

9.1 Manejo de animales

Se utilizaron ratas Wistar macho adultas de 220-280gr (Harlan, México), las cuales se mantuvieron a una temperatura ambiente constante ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), con un ciclo luz /oscuridad de 12h y con acceso libre al agua y los alimentos en todos los protocolos. Para la obtención de las muestras las ratas se anestesiaron mediante la administración intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/kg). Se obtuvieron aproximadamente 2-3 ml de sangre de la arteria ocular con capilares heparinizados y se separó el plasma por centrifugación. Un riñón se extirpó quirúrgicamente para los ensayos de western blot, mientras que el riñón contralateral se perfundió y fijó para los ensayos de inmunofluorescencia. Los animales se trataron de acuerdo con las "Especificaciones técnicas para la producción, el uso y cuidado de los animales de laboratorio" (NOM-062-ZOO-1999).

9.2 Modelos experimentales y cuantificación de electrolitos

Los animales se separaron al azar en cuatro grupos experimentales: el grupo 1 y grupo 2 se alimentaron durante 15 días con una dieta sin K^+ (0% de K^+ , MP Biomedicals, Solon OH) y con alto K^+ (10% de KCl; Harlan-Teklad, Madison WI), respectivamente; el grupo 3 se alimentó con una dieta sin NaCl (0%, MP Biomedicals, Solon OH) durante 7 días. Cada uno de estos grupos se comparó con su respectivo grupo control, cuya dieta contenía K^+ 0.54% (grupo 1), KCl 0.6% (grupo 2) y NaCl 0.13% (grupo 3). El grupo 4 se trató por vía oral con 0.28M de NH_4Cl durante 7 días, este fue adicionado en el agua de bebida para producir acidosis metabólica crónica. Las ratas control con las que se comparó el grupo 4 se mantuvieron con agua purificada (libre de sales). El grupo 4 y su control fueron alimentados con comida estándar para roedores (2018S, Harlan Tekland). Veinticuatro horas antes del sacrificio, los animales se colocaron individualmente en jaulas

metabólicas para recoger la orina durante 24 horas. Posteriormente, se determinó la concentración de Na⁺, K⁺ y Cl⁻ en la orina y el plasma utilizando un electrodo selectivo de iones (Dimension® RxL Max®, Siemens Healthcare, México). Asimismo, se calcularon las tasas de excreción fraccional (EF) para cada uno de estos electrolitos a través de la siguiente fórmula: $EF (\%) = \frac{[ion]_{orina} \times [creatinina]_{plasma}}{[ion]_{plasma} \times [creatinina]_{orina}} \times 100$. Adicionalmente, a los animales del grupo 4 se les determinó el pH del plasma y la orina (electrodo micro pH 9110DJWP, Orion Star A111), así como la concentración plasmática de HCO₃⁻ mediante un método enzimático (Kit L3K de Sekisui Diagnósticos).

9.3 Ensayos de inmunofluorescencia

Los animales se perfundieron a través de la aorta con 250 ml de amortiguador salino de fosfatos frío (PBS; NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 20 mM, NaCl 149 mM, KCl 2 mM, pH 7.4) seguido por 250 ml de paraformaldehído al 4% en PBS (PFA/PBS). Los riñones, el cerebro y el cerebelo se retiraron rápidamente y se fijaron en PFA (durante toda la noche), más tarde se crio-protegieron con una solución de sacarosa al 30%/PFA/PBS a 4°C. Se realizaron cortes sagitales de 10 µm de espesor en un criostato Leica (CM1100) a -20°C. Las muestras se hidrataron en PBS y se incubaron en una solución de citrato de sodio 10-20 mM (pH 8.5), durante 30 min a 80°C para la recuperación del antígeno. Las secciones de tejido se dejaron enfriar y se lavaron con PBS, luego se permeabilizaron con 0.3% Triton X-100 (Tx) en PBS durante 10 min. El bloqueo se realizó con albúmina de suero bovino (BSA) al 0.5% y suero bovino fetal al 10% en PBS-Tx al 0.1% durante 1h. Para el estudio de los canales HCN, los tejidos se incubaron con los anticuerpos primarios (dilución 1:100): conejo anti-HCN3 epítotope COOH-terminal y/o cobayo anti-HCN1 epítotope NH₂-terminal (Alomone, Jerusalén). Mientras que los anticuerpos secundarios empleados estaban acoplados a un fluoróforo verde (Alexa 488) o rojo (Alexa 594), respectivamente. Para evaluar la localización de los canales HCN1 y HCN3 a lo largo de la nefrona se realizaron dobles marcajes inmunofluorescentes con diferentes anticuerpos (Tabla 1) primarios (dilución 1:100) y secundarios (dilución 1: 200-500). Para obtener las imágenes de microscopía confocal (Leica TCS-SP5; objetivo 20x) los tejidos se cubrieron con un medio de montaje (Vectashield; Vector Laboratories). Las imágenes se analizaron con el programa Leica Application Suite Avance de fluorescencia Lite.

Tabla 1. Anticuerpos primarios y secundarios empleados como marcadores para determinar la inmunolocalización de los canales HCN1 y HCN3 en la nefrona.

Anticuerpos primarios	Hospedero	Compañía comercial	Segmento inmunomarcado	Anticuerpos secundarios	Fluoróforo
anti- Acuaporina 1 (AQP1)	ratón	Santa Cruz Biotechnology	túbulo proximal	burro anti IgG de ratón	A488/A594
anti- Acuaporina 7 (AQP7)	conejo	Santa Cruz Biotechnology	asa de Henle ascendente gruesa	burro anti IgG de cabra	A488
anti- proteína Tam Horsfall (THP)	cabra	Santa Cruz Biotechnology	asa de Henle ascendente gruesa	burro anti IgG de cabra	A488/A594
anti- Calbindina 28 KDa (CaBP)	cabra	Santa Cruz Biotechnology	túbulo contorneado distal y conector	burro anti IgG de cabra	A488/A594
anti- Acuaporina 2 (AQP2)	cabra	Santa Cruz Biotechnology	conducto colector	burro anti IgG de cabra	A488/A594
anti- α 1 Na ⁺ /K ⁺ ATPasa	ratón	Sigma Aldrich	membrana basolateral	burro anti IgG de ratón	A594
anti- endopeptidasa neutral	ratón	Santa Cruz Biotechnology	membrana del borde en cepillo del túbulo proximal	burro anti IgG de ratón	A594

Los anticuerpos primarios se incubaron con los cortes de tejido 19 horas a 4°C, mientras que los anticuerpos secundarios (Abcam y Molecular Probes) se incubaron 1h a temperatura ambiente en oscuridad. Los anticuerpos secundarios estaban acoplados al fluoróforo verde Alexa 488 (A488) o rojo Alexa 594 (A594).

9.4 Extracción de proteínas e inmunoblots

Se disectó el hipotálamo y el cerebelo, así como la corteza y la médula externa renal para ser homogenizados (Tissue Tearor, Biospec) en una solución amortiguadora fría (sacarosa 250 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7.6), la cual contenía un cóctel completo de inhibidores (Roche Diagnostic). El homogenado se centrifugó a 1,000g x 10min a 4°C para eliminar los desechos celulares y los fragmentos nucleares. Los sobrenadantes que contenían las membranas crudas totales se centrifugaron a 17,000g x 20 min a 4°C para enriquecer las membranas plasmáticas (Sachs et al., 2008; Nguyen et al., 2012), el sedimento obtenido se resuspendió en solución amortiguadora. La concentración de proteína se determinó por espectrofotometría a través del método de Lowry (Bio-Rad DC). Las fracciones de membrana se separaron por electroforesis en un gel de dodecilsulfato sódico (SDS)-poliacrilamida al 6-8% y se electrotransfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF). La membrana se bloqueó con leche libre de grasa (Bio-Rad) al 5% en amortiguador tris-salino con tween 20 (TBS-T; Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM, Tween 20 0.1%, pH 7.6) durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, la membrana se incubó con diferentes anticuerpos primarios y secundarios (Tabla 2). La expresión de la β -actina se utilizó como control interno para la normalización de la cantidad de proteína cargada en los ensayos, mientras que la expresión de la Na⁺/K⁺ ATPasa y la AQP1 fueron controles de la preparación de membranas del borde en cepillo. Las bandas inmunorreactivas se detectaron

utilizando un sustrato quimioluminiscente para la peroxidasa de rábano (HRP; Immobilon Millipore), y exponiéndose a películas autoradiograficas (Kodak).

Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en los ensayos de western blot.

Anticuerpos primarios	Hospedero	Compañía comercial	Dilución (Ac. primario)	Anticuerpos secundarios	Dilución (Ac. secundario)
anti- HCN1 (N-terminal)	cobayo	Alomone	1: 500	Burro anti IgG de cobayo	1: 5,000
anti- HCN1 (C-terminal)	cabra	Santa Cruz Biotechnology	1: 300	Burro anti IgG de cabra	1: 22,000
anti- HCN3 (N-terminal)	conejo	LSBio Inc	1: 500	Burro anti IgG de conejo	1: 6,000
anti- HCN3 (C-terminal)	conejo	Alomone	1: 500	Burro anti IgG de conejo	1: 18, 000
anti- β -actina	conejo	Santa Cruz Biotechnology	1: 20,000	Burro anti IgG de conejo	1: 23, 000
anti- α 1 Na ⁺ /K ⁺ ATPasa	ratón	Sigma Aldrich	1: 1,500	Burro anti IgG de ratón	1: 5, 000
anti-AQP1	ratón	Santa Cruz Biotechnology	1: 1,000	Burro anti IgG de ratón	1: 15,000

Los anticuerpos (ac.) primarios de los canales HCN1 y HCN3 estaban dirigidos contra un epítipo en el extremo NH₂ (N) o COOH (C) del canal. La incubación de la membrana con los ac. primarios y secundarios fue de 18h a 4°C y 1h a temperatura ambiente, respectivamente. Los ac. secundarios estaban acoplados a la enzima peroxidasa de rábano.

9.5 Aislamiento de vesículas de membrana del borde en cepillo (BBMV).

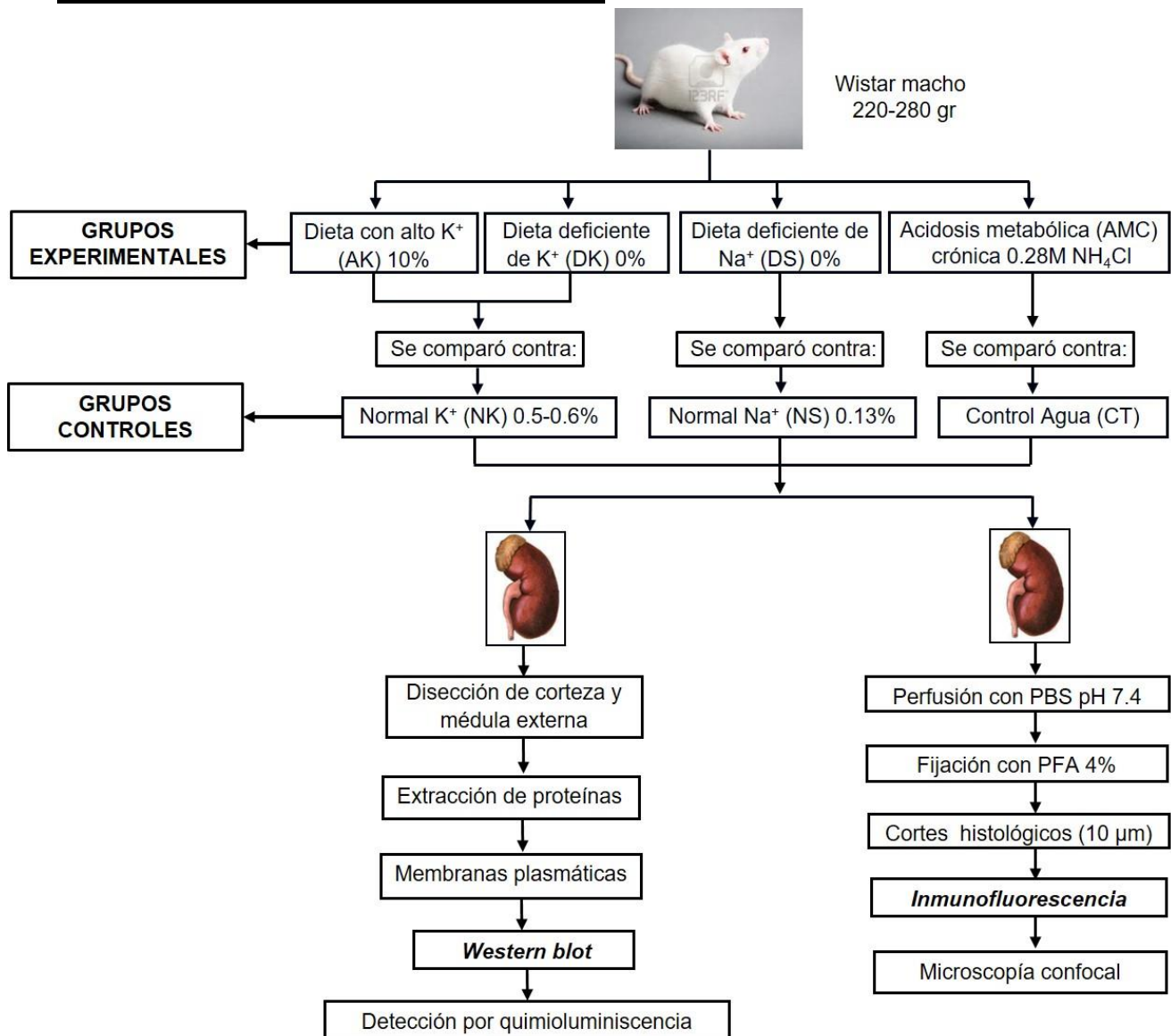
El ensayo se llevó a cabo a 4°C de acuerdo con una modificación del método de Booth y Kenny (Booth y Kenny, 1974; Martínez et al., 1990). Se extrajeron los riñones de 5 ratas Wistar macho, previamente anestesiadas con pentobarbital sódico (50 mg/kg), y se refrigeraron en amortiguador de aislamiento frío (manitol 300 mM, Tris-H₂SO₄ 12 mM, pH 7.4). Se disectó la corteza, se fragmentó en pedazos pequeños y se pesó. Se homogenizaron 4.0 gr de corteza en 160 ml de amortiguador hipotónico (manitol 100 mM, Tris-H₂SO₄ 12 mM, pH 7.4) 7 veces durante 1 min con un homogeneizador (SDT Tekman TR -10, Alemania). Una muestra de este homogenado fue retirada para la determinación de proteína y la actividad enzimática. Después de la adición de MgCl₂ 10 mM, el homogenado se agitó durante 15 min en hielo, y luego se centrifugó a 1,900g x 12 min en un rotor SS34, centrífuga Sorvall RC-5B (DuPont Instruments). El sobrenadante se volvió a centrifugar a 20,000g x 12 min. El sedimento se resuspendió en 20 ml de amortiguador intravesicular (manitol 300 mM, HEPES-Tris 20 mM, pH 7.4), se homogenizó a mano con 10 golpes en un homogeneizador Dounce de vidrio, se dejó reposar durante 60 min y se centrifugó a 30,000g x 20 min. Este paso se repitió y el sedimento final se resuspendió en amortiguador intravesicular mediante la aspiración de la suspensión 10 veces con una jeringa (aguja de calibre 25). La cantidad de proteína se determinó

según el método del ácido bicinconínico (Smith et al., 1985), utilizando un kit comercial (BCA Pierce® Biotechnology, Inc., Rockford, IL, EE.UU.). La pureza de las vesículas de membrana se determinó midiendo la actividad específica de la leucina aminopeptidasa y la fosfatasa alcalina en el homogenado total y la preparación de las BBMV final (Martínez et al., 1990).

9.6 Análisis densitométrico y estadístico

La cuantificación relativa de las intensidades de las bandas inmunorreactivas se llevó a cabo por un método de foto-documentación digital (Kodak EDAS 290). Para facilitar las comparaciones y determinar si hubo un efecto del tratamiento sobre la abundancia proteica del HCN3, los valores de densitometría se normalizaron con respecto al control, definiendo la media para el grupo control como 100%. Las comparaciones de las diferencias estadísticas se realizaron mediante la prueba *t* de Student.

9.7 Diagrama general de la metodología:



10. RESULTADOS

10.1 Identificación del HCN1 y HCN3 en las membranas plasmáticas de la corteza y médula renal

Debido a que toda la familia de canales HCN es susceptible de sufrir proteólisis y a que en el tejido renal se han observado distintos fragmentos proteicos para estos canales (Calejo et al., 2014), en este trabajo los HCN se detectaron por western blot con anticuerpos dirigidos a un epítipo, tanto NH₂ terminal (N-HCN1 y N-HCN3) como COOH terminal (C-HCN1 y C-HCN3). El anticuerpo N-HCN1 detectó dos bandas inmunorreactivas en las membranas plasmáticas del cerebelo (control positivo), una de 130 kDa y otra de 110 kDa (Fig. 14A). La de mayor peso molecular corresponde al HCN1 glicosilado mientras que la de menor peso a la forma no glicosilada (Much et al., 2003; Zha et al., 2008). En la corteza (Cz) y médula externa (Me) renal se detectó un peso molecular de 93 kDa para el HCN1 (Fig. 14A), ligeramente más bajo que su peso teórico reportado (102 kDa). La banda de 93 kDa ha sido observada para este canal en tejido renal y corresponde a la proteína cortada en su región COOH-terminal (HCN1 C-truncado, sitio de corte en los residuos Glu802-Val803; Calejo et al., 2014). De hecho, el HCN1 C-truncado no se detectó con el anticuerpo C-HCN1, éste sólo detectó al canal completo (110 kDa) en el cerebelo (Fig. 14B). Todas las bandas proteicas desaparecieron cuando la membrana se incubó con el anticuerpo anti-HCN1 pre-incubado con su péptido control.

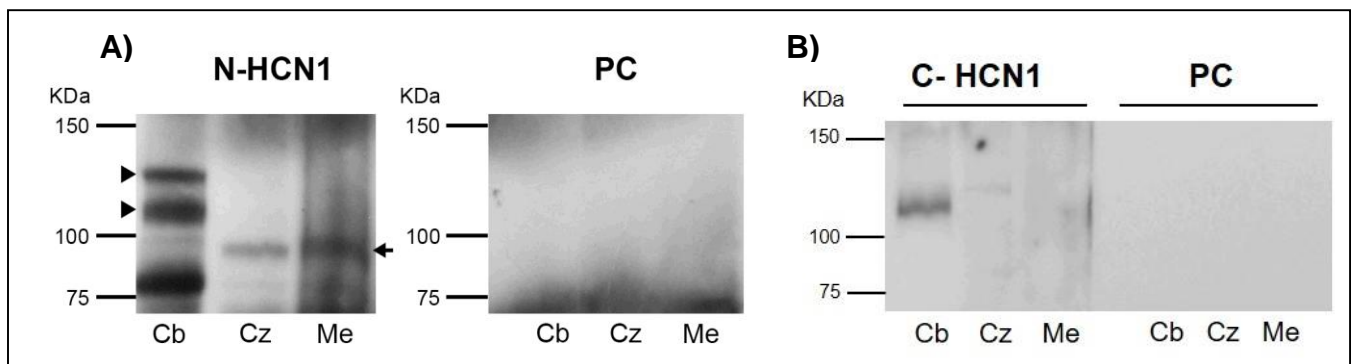


Figura 14. Inmunodetección del canal HCN1 completo y C-truncado en el tejido renal. A) El anticuerpo anti-HCN1 dirigido contra la región NH₂-terminal del canal (N-HCN1) detectó al HCN1 glicosilado (130 kDa) y no glicosilado (110 kDa, *cabezas de flecha*) en fracciones de membranas plasmáticas de cerebelo (Cb; 50 µg). En la corteza (Cz) y la médula externa (Me) renal (120 µg) el anticuerpo N-HCN1 detectó al canal HCN1 truncado en su región COOH terminal (C-truncado; 93 kDa, *flecha*). B) El anticuerpo anti-HCN1 dirigido contra la región COOH-terminal del canal (C-HCN1) detectó solo al HCN1 en su longitud completa (110 kDa) en las membranas plasmáticas de cerebelo pero no en la Cz y Me renal (50 µg). La inmunoreactividad para el canal HCN1 desapareció cuando los anticuerpos primarios fueron preincubados con su péptido control (PC).

Como control positivo de la expresión proteica del canal HCN3 se utilizó tejido de hipotálamo. El anticuerpo N-HCN3 detectó una banda proteica de 90 kDa en fracciones de membranas plasmáticas de hipotálamo, Cz y Me renal; este peso molecular es cercano al peso teórico del canal ~87 kDa, por lo que corresponde al HCN3 completo (Fig. 15A). El anticuerpo C-HCN3 detectó al HCN3 completo (90 kDa) de una forma muy abundante en hipotálamo, y en poca cantidad en Cz y Me renal (Fig. 15B). En contraste, se observó una banda proteica de menor peso molecular (65 kDa) muy intensa en las membranas plasmáticas de la Cz y la Me renal, mientras que en la médula interna (Mi) se detectó muy poca o casi nula inmunoreactividad para el HCN3 (Fig.15B). El fragmento proteico de 65 kDa corresponde al canal HCN3 cortado en su región NH₂-terminal (HCN3 N-truncado, corte en los residuos Ala162-Ile163, Calejo et al., 2014). En hipotálamo el HCN3 N-truncado sólo se pudo detectar con el anticuerpo C-HCN3 cuando se incrementó la cantidad de proteína en el ensayo (hasta 100 µg; Fig. 15C). Como controles negativos, las membranas se incubaron con anticuerpos primarios previamente pre-adsorbidos por su péptido control, ó únicamente con el anticuerpo secundario. En ambos casos desaparecieron las bandas inmunoreactivas para el canal HCN3.

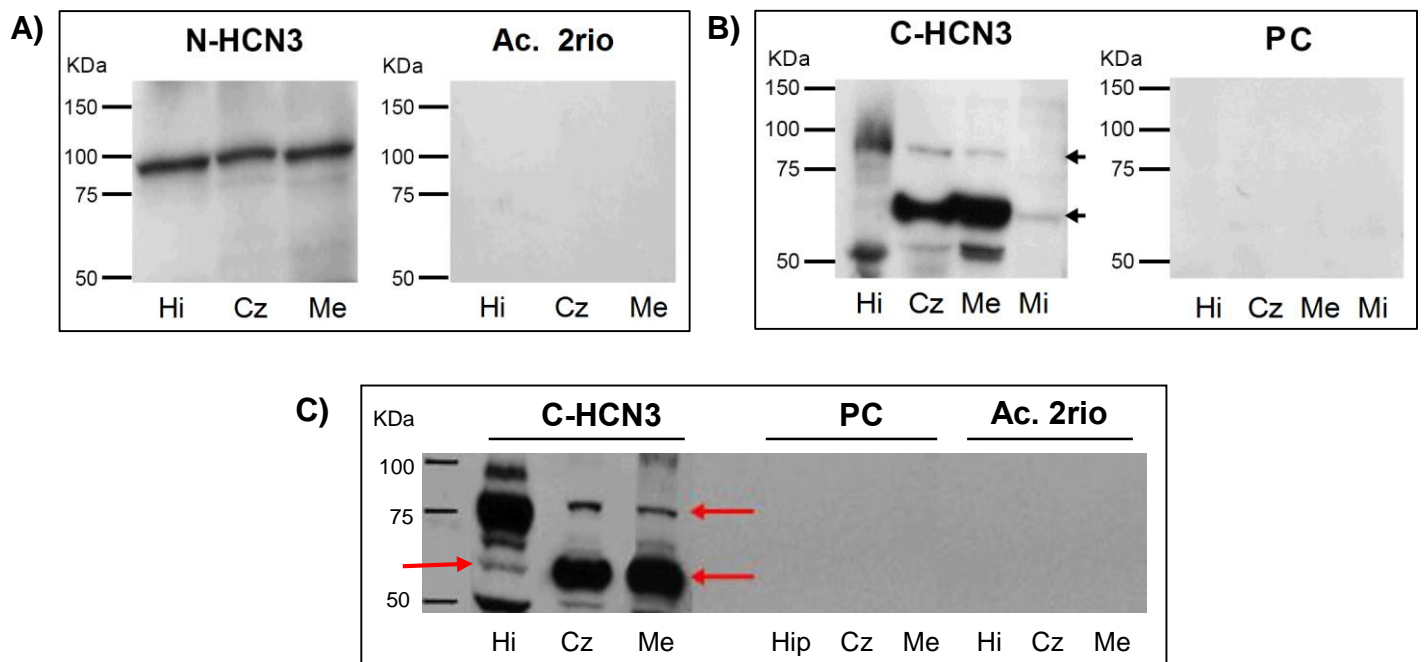


Figura 15. Inmunodetección del canal HCN3 completo y N-truncado en el tejido renal. El HCN3 se inmunodetectó en fracciones de membranas plasmáticas (25-30 µg) de hipotálamo (Hi), corteza (Cz), médula externa (Me) y médula interna renal (Mi) con anticuerpos dirigidos contra un epítipo en la región NH₂ (N-HCN3) y COOH terminal (C-HCN3) del canal. A) El anticuerpo N-HCN3 sólo detectó al HCN3 completo (90 kDa) en Hi, Cz y Me. B) El anticuerpo C-HCN3 detectó al canal completo (90 kDa, *flecha*) más abundantemente en Hi que en Cz y Me renal, y sólo al HCN3 N-truncado (65 kDa, *flecha*) en el tejido renal. Se observó muy pobre inmunoreactividad para el HCN3 en la Mi. C) El HCN3-N truncado (65 kDa, *flecha*) sólo se pudo detectar en Hi con 100 µg de proteína. La inmunoreactividad para el canal HCN3 desapareció cuando los anticuerpos primarios fueron preincubados con su péptido control (PC) o cuando la membrana se incubó sólo con el anticuerpo secundario (Ac. 2rio).

10.2 Inmunodetección de los canales HCN1 y HCN3 en el encéfalo de la rata por ensayos de inmunofluorescencia

Como un control positivo de la expresión del HCN1 y HCN3 estos canales se detectaron por técnicas de inmunofluorescencia y microscopía confocal en el encéfalo de la rata, donde se ha reportado que son muy abundantes (Notomi y Shigemoto, 2004). Se observó inmunorreactividad positiva para el HCN1 en células del cerebelo (Fig. 16A), mientras que el HCN3 se identificó en las células del hipotálamo (Fig. 16B). La señal de inmunofluorescencia para los HCN desapareció cuando el tejido se incubó con los anticuerpos primarios previamente pre-adsorbidos por su péptido control, esto permitió verificar la especificidad de los anticuerpos.

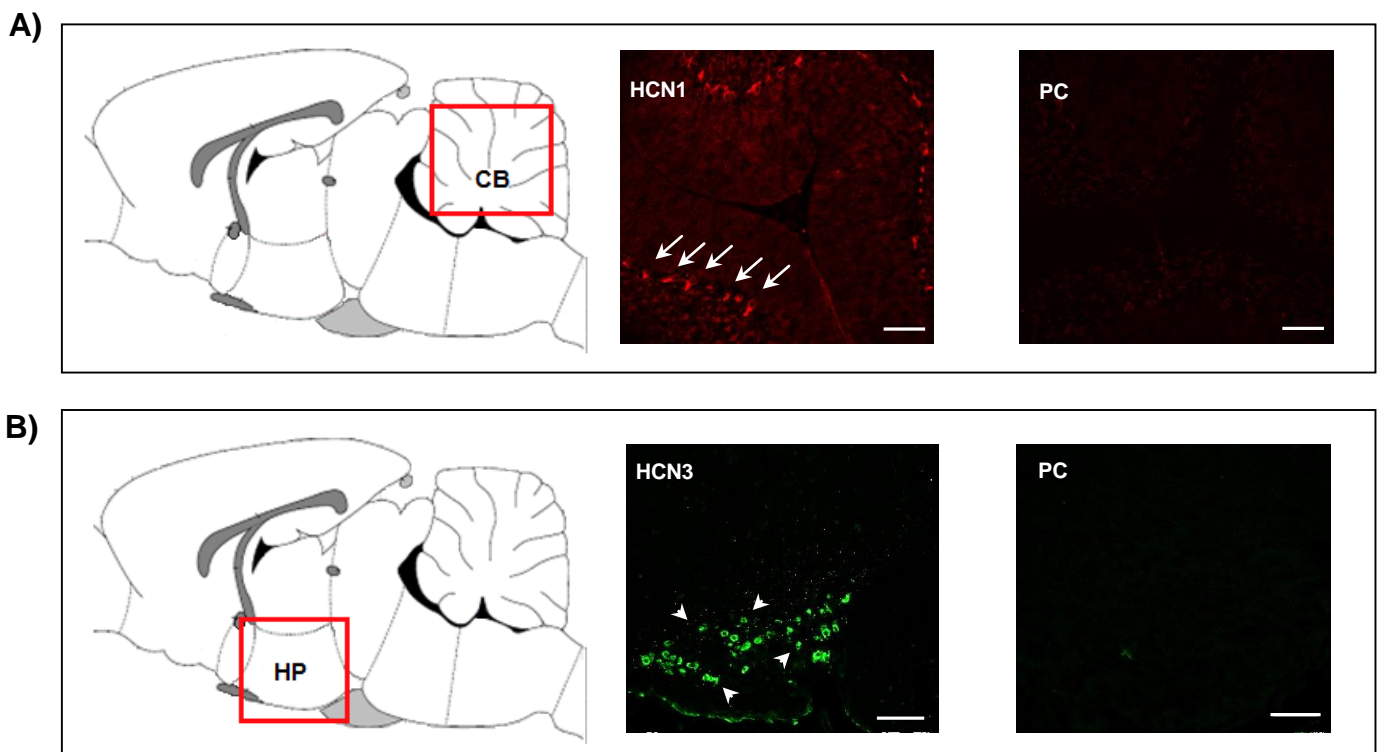


Figura 16. Identificación de los canales HCN1 y HCN3 en el encéfalo de la rata. El canal HCN1 se inmunodetectó en las células del cerebelo (A, flechas), mientras que el HCN3 en las células del hipotálamo (B, cabezas de flecha). La inmunorreactividad para los canales HCN desapareció cuando el anticuerpo primario fue pre-adsorbido previamente por su péptido control (PC). Barra de escala, 100 μ m. Los esquemas de la izquierda muestran la ubicación del cerebelo (CB) y el hipotálamo (HP) en un corte parasagital del encéfalo de rata.

10.3 Localización de los canales HCN1 y HCN3 en el túbulo proximal de la nefrona

Para confirmar el antecedente obtenido en nuestro laboratorio sobre la localización del HCN1 en el túbulo proximal de la nefrona (Saldaña, 2009), se realizó una doble inmunofluorescencia del canal HCN1 y la AQP1 (proteína que marca el túbulo proximal y el asa de Henle ascendente gruesa).

El HCN1 colocalizó con la AQP1, evidenciando que se localiza en la membrana apical del túbulo proximal cortical. Sin embargo, mostró una inmunoreactividad muy baja en la membrana apical de la capa exterior de la médula externa, su localización en esta región fue principalmente citoplásmica (Fig. 17). Un comarcaje del HCN1 con la AQP7 (marcador del túbulo recto proximal o segmento S3) demostró que el HCN1 es muy abundante en el S3 del túbulo proximal, pues se observó la colocalización de ambas proteínas, tanto en la corteza como en la capa exterior de la médula externa (Fig 17). El HCN1 no presentó inmunoreactividad en la capa interior de la médula externa, médula interna (MI) o la nefrona distal (datos no presentados).

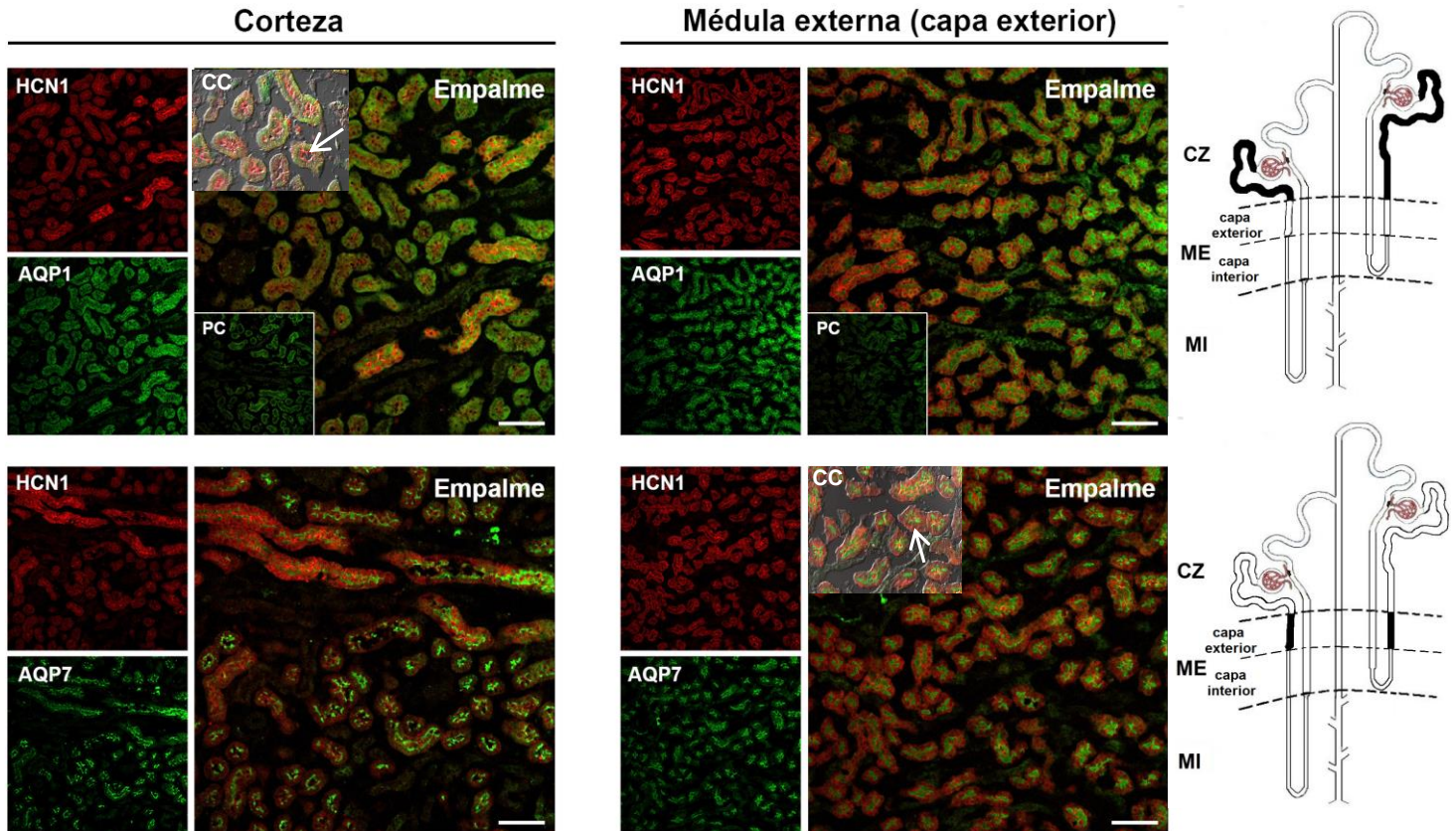


Figura 17. Localización del canal HCN1 en el túbulo proximal (TP). A) Doble marcaje inmunofluorescente con HCN1 (fluoróforo rojo, Alexa 594) y AQP1 o AQP7 (fluoróforo verde, Alexa 488). El empalme de imágenes muestra la colocalización (amarillo) del HCN1 y AQP1. Un aumento de la imagen en campo claro (CC) evidencia la localización del HCN1 en la membrana apical del TP cortical (*flecha*), sin embargo en la capa exterior de la médula externa (CEME) la marca para el HCN1 es principalmente citoplásmica. El HCN1 y AQP7 colocalizaron en el túbulo recto proximal o S3, tanto en la corteza (Cz), como en la CEME. Un aumento de la imagen en campo claro (CC) muestra la localización del HCN1 en el citoplasma del S3 en la CEME (*flecha*). No se detectó inmunorreactividad del HCN1 cuando el anticuerpo primario del canal fue pre-adsorbido con su antígeno control (PC). Barra de escala, 100 μ m. Los dibujos de las nefronas esquematizan los segmentos tubulares marcados por la AQP1 en la Cz (superior) y por la AQP7 en la CEME (inferior).

El comarcaje del HCN3 con la AQP1 reveló la colocalización de ambas proteínas en las membranas apicales de los túbulos proximales corticales. Un acercamiento de la imagen evidenció que el HCN3 se localiza en las membranas del borde en cepillo de este segmento (BBM; Fig 18).

En la capa exterior de la médula externa se observó la presencia del HCN3; sin embargo, no hubo colocación con la AQP1 en esta región del riñón (Fig. 18), lo que sugiere que el canal HCN3 no se encuentra en el asa de Henle descendente delgada, segmento marcado por la AQP1 en la médula externa. En la médula interna no se detectó la expresión del canal HCN3, sólo se encontró marca fluorescente para la AQP1 (Fig. 18).

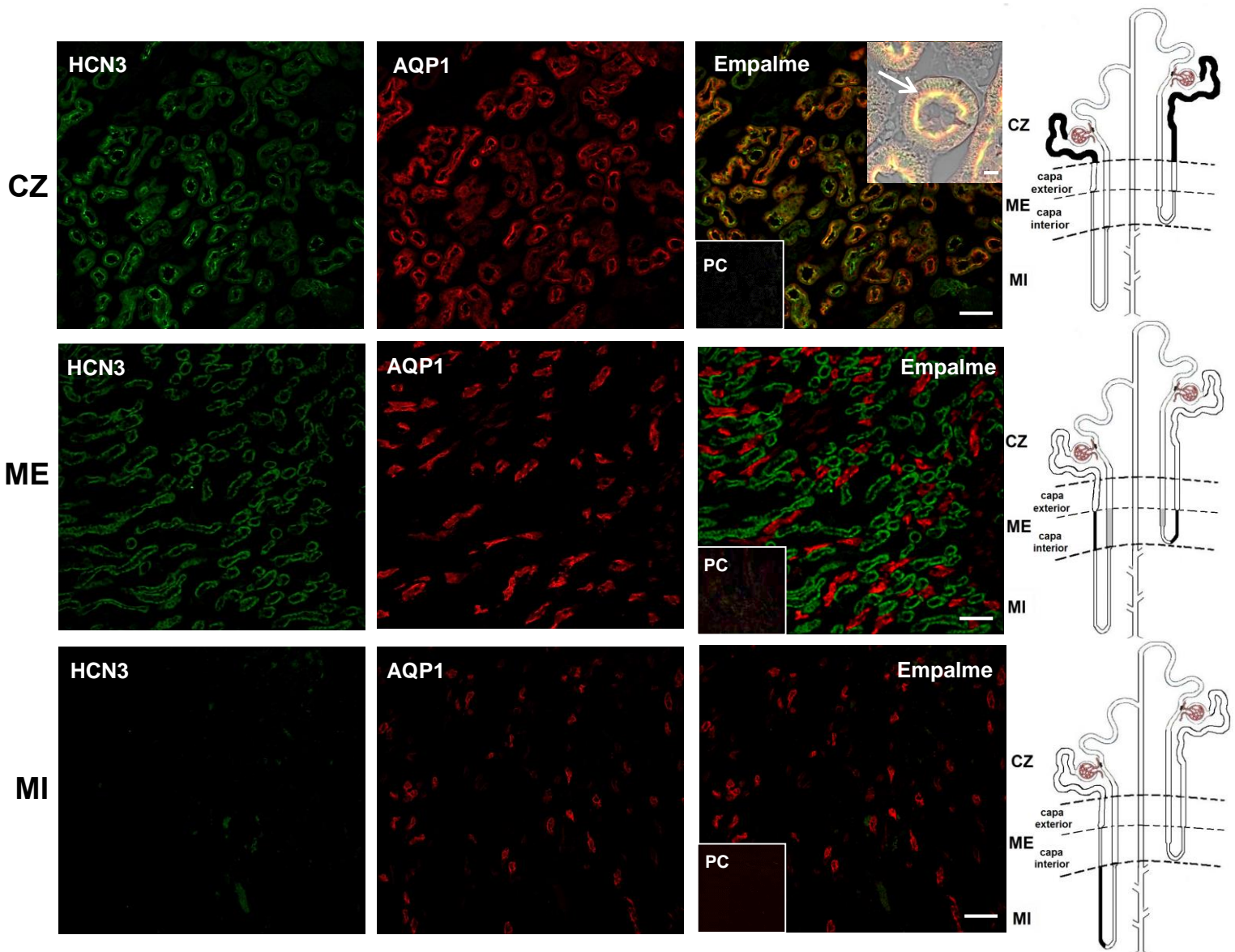


Figura 18. Inmunolocalización de canal HCN3 en el túbulo proximal (TP). Doble inmunofluorescencia en secciones de tejido renal marcadas con anti-HCN3 (verde) y anti-AQP1 (rojo). En corteza (CZ) se muestra la colocación (amarillo) del HCN3 y AQP1 en la membrana apical del TP cortical. Un mayor aumento (10 x) de la imagen en campo claro (CC) muestra al HCN3 en las membranas de borde en cepillo (*flecha*; barra de escala 10µm). En la capa interior de la médula externa (ME) hay inmunoreactividad para el HCN3 y la AQP1 pero no en los mismos túbulos. En la médula interna (MI), sólo se encontró la presencia de la AQP1 pero no del HCN3. La inmunoreactividad desapareció cuando el anticuerpo primario del HCN3 fue pre-adsorbido con su péptido de control (PC). Barra de escala, 100 µm. Los dibujos de las nefronas esquematizan los segmentos tubulares que se visualizan en las fotografías, donde se expresa la AQP1 (negro) y/o el HCN3 (gris).

10.4 Inmunodetección y colocalización del HCN1 y HCN3 en las membranas del borde en cepillo (BBM)

Para confirmar y evaluar la expresión del canal HCN3 en las BBM del túbulo proximal, se aislaron vesículas de membrana del borde en cepillo (BBMV). Dado que el HCN1 se localiza también en el túbulo proximal, en este trabajo se evaluó la expresión, así como la colocalización del HCN1 y el HCN3 en las BBM. Como un control de la purificación de las BBMV se midieron las actividades específicas de enzimas altamente activas en las BBM como la fosfatasa alcalina y la leucina aminopeptidasa y se compararon estos valores con los del homogenado total de la corteza (Tabla 3). La actividad específica de la fosfatasa alcalina aumentó ~9 veces y la de la leucina aminopeptidasa ~10 veces en la preparación de las BBMV, en comparación con el homogenado cortical, lo que evidenció un enriquecimiento apropiado.

Tabla 3. Actividades enzimáticas específicas de las vesículas de membrana del borde en cepillo (BBMV) del riñón de la rata.

Enzima	Actividad específica (mU/mg)		BBMV/HC (tasa de enriquecimiento)
	HC	BBMV	
Fosfatasa alcalina	481.76	4097.3	8.5
Leucina aminopeptidasa	66.64	655.11	9.83

La preparación de BBMV presentó un enriquecimiento de 8.5-10 veces la actividad enzimática, comparado con el homogenado cortical total (HC).

Otros controles que se llevaron a cabo para verificar el enriquecimiento de las BBMV fue la detección por western blot de la AQP1 (proteína abundante en las BBM) y de la Na⁺/K⁺ ATPasa (proteína ausente en las BBM). En el inmunoblot se observó la forma glicosilada (35 kDa) y no glicosilada (25 kDa) de la AQP1 y, como se esperaba, no se encontró la expresión de la subunidad α 1 de la Na⁺/K⁺ ATPasa (proteína basolateral del túbulo proximal) en la preparación de las BBMV, pero sí en las membranas plasmáticas del homogenado total de la corteza (100 kDa; Fig. 19A). En el inmunoblot de los canales HCN1 (Fig. 19B) y HCN3 (Fig. 19C) en las BBMV, se detectaron tanto los canales completos (120 kDa para el HCN1 y 85-95 kDa para el HCN3) como sus fragmentos proteolíticos (93 kDa y 63 kDa para el HCN1 y 65 kDa para el HCN3). Los canales completos, tanto del HCN1 como del HCN3, fueron ligeramente mayores que sus peso teóricos (102 y 86 kDa, respectivamente), debido a la glicosilación que sufren estos canales (Much et al., 2003; Zha et al., 2008). El fragmento proteico más abundante del HCN1 fue el de 93 kDa, el cual es producto de un

corte proteolítico la región COOH-terminal del canal (HCN1 C-truncado; Calejo et al., 2014). El HCN3 se detectó con anticuerpos dirigidos, tanto a un epítipo NH₂- terminal (N-HCN3) como a uno COOH-terminal (C-HCN3). El canal HCN3 completo sólo se detectó con el anticuerpo N-HCN3, mientras que la forma proteolizada (65 kDa) se observó con el anticuerpo C-terminal debido a que este fragmento proteico es el resultado del corte del canal en su región NH₂-terminal (HCN3 N-truncado; Calejo et al., 2014).

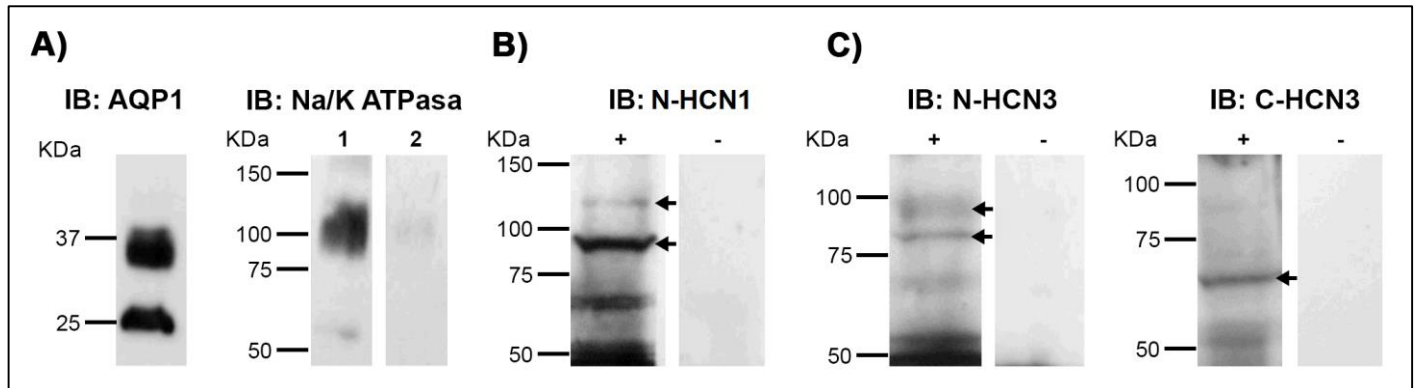


Figura 19. Inmunoblot (IB) del HCN1 y HCN3 en vesículas de membranas del borde en cepillo (BBMV) del túbulo proximal. A) Se observó la presencia de la forma glicosilada (35 kDa) y no glicosilada (25 kDa) de la proteína AQP1 en las BBMV. La subunidad $\alpha 1$ de la Na⁺/K⁺ ATPasa sólo se detectó en las membranas plasmáticas de los homogenados corticales (carril 1), no en las BBMV (carril 2). B) El canal HCN1 completo (120 kDa, *flecha*) se encontró en poca cantidad en las BBMV, mientras que el canal HCN1 C- truncado (93 kDa, *flecha*) fue muy abundante. C) El HCN3 completo (85-95 kDa, *flecha*) y su forma N- truncada (65 kDa, *flecha*) fueron detectadas con anticuerpos dirigidos contra un epítipo NH₂-terminal (N-HCN3) y COOH-terminal (C-HCN3), respectivamente. La inmunorreactividad de los anticuerpos HCN (+) desapareció cuando el anticuerpo primario fue pre-incubado con su péptido control (-).

El ensayo de doble inmunofluorescencia para el HCN1 y HCN3 presentó la colocalización de ambos canales en las BBM de los túbulos proximales corticales (Fig. 20A). En la capa exterior de la médula externa, ambos canales colocalizaron en el segmento S3 o túbulo recto proximal, sin embargo, la inmunorreactividad para el HCN1 y HCN3 parece ser principalmente citoplasmática en esta región de la nefrona (Fig. 20B).

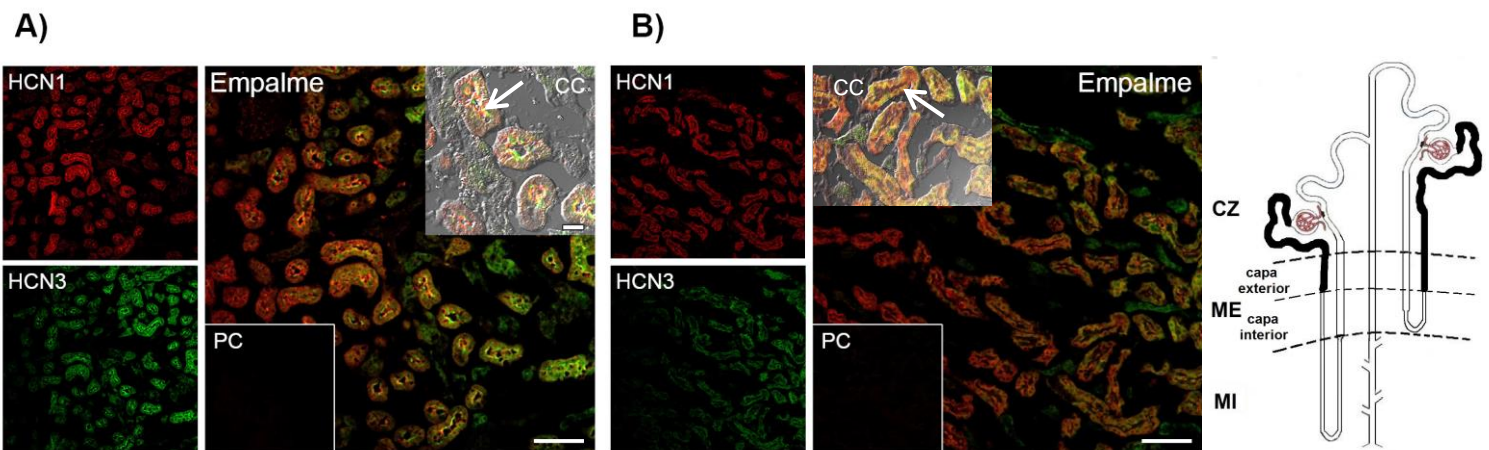
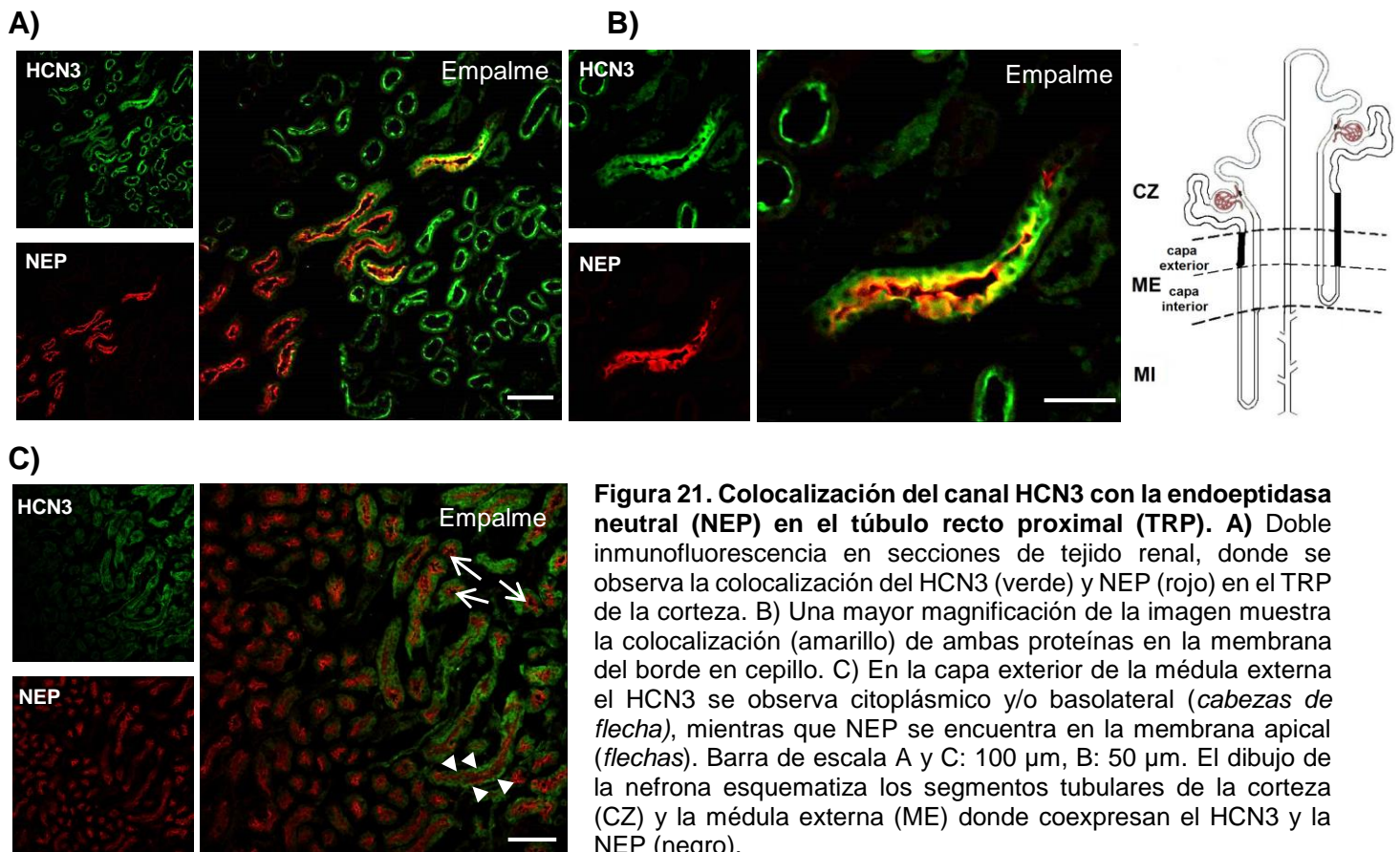


Figura 20. Colocalización del HCN1 y HCN3 en las membranas del borde en cepillo (BBM). A) Expresión apical del HCN1 (rojo) y HCN3 (verde) en el túbulo proximal cortical. Un aumento mayor (4x) permitió visualizar en campo claro (CC) que ambos canales colocalizan (amarillo, *flecha*) en las BBM (barra de escala de 25µm). B) En la capa exterior de la médula externa el HCN1 y HCN3 colocalizaron en el segmento S3 del túbulo proximal, aunque su localización fue principalmente citoplasmática (*flecha* en el inserto de CC). La inmunorreactividad para los HCN desapareció cuando se incubó el tejido con los anticuerpos primarios pre-adsorbidos por su respectivo péptido control (PC). Barra de escala, 100µm. El dibujo de la nefrona esquematiza los segmentos tubulares de la corteza (CZ) y la médula externa (ME) donde coexpresan el HCN1 y el HCN3 (negro).

10.5 Colocalización del HCN3 y la endopeptidasa neutral (NEP) en el túbulo recto proximal

La familia de canales HCN presenta varios sitios de corte para metaloendopeptidasas y los canales HCN1 C-truncado y HCN3 N-truncado son más abundantes que los canales completos en el tejido renal. En un intento por comprender la razón de este hallazgo, se evaluó la colocalización del HCN3 con una de las principales metaloendopeptidasas en las BBM, la endopeptidasa neutral-24.11 (NEP). De hecho, se ha registrado una actividad muy alta de la NEP en el túbulo recto proximal o S3 (Edwards et al., 1999). Nuestros ensayos de inmunofluorescencia demostraron la colocalización del HCN3 y la NEP en las BBM del S3 (Fig. 21), esto sugiere que el HCN1 y HCN3 podrían ser un sustrato de esta proteasa y abre nuevas preguntas acerca de una posible función reguladora.



10.6 Localización del HCN3 en la membrana basolateral del asa de Henle ascendente gruesa medular

El HCN3 no colocalizó en la corteza renal con la glicoproteína Tam Horsfall (THP), una proteína que marca el segmento del asa de Henle ascendente gruesa. Sin embargo, sí se observó colocalización de ambas proteínas en la capa exterior e interior de la médula externa; lo anterior indica que el HCN3 se encuentra en el asa de Henle ascendente gruesa medular. En esta región de la nefrona se puede apreciar que la THP marca el dominio apical de las membranas, mientras que el HCN3 el dominio basolateral (Fig. 22). No se encontró inmunorreactividad para el HCN3 ni para la THP en la médula interna (datos no presentados).

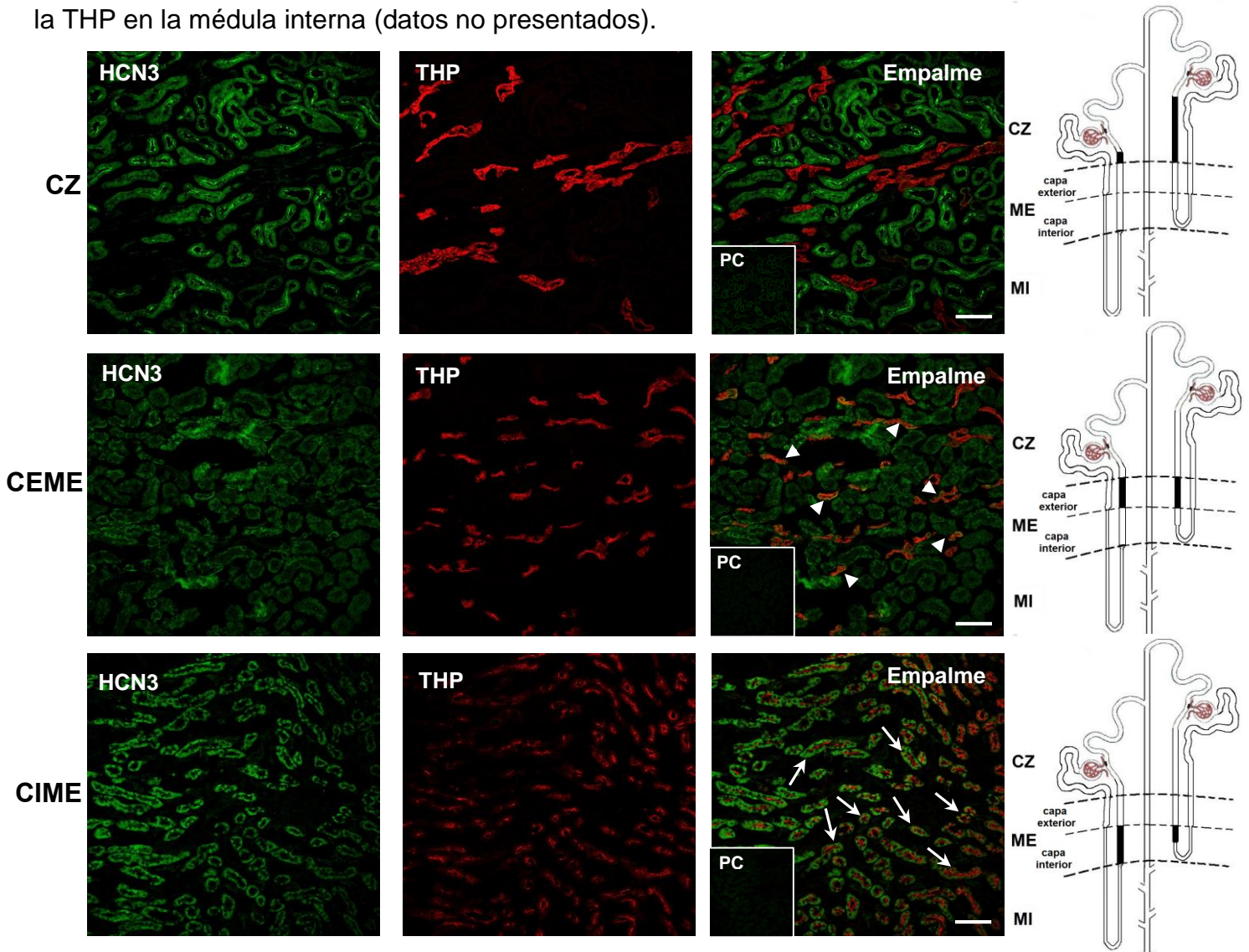


Figura 22. Inmunolocalización del HCN3 en el asa de Henle ascendente gruesa medular (AHAGm). Se comarcaron secciones de tejido renal con anticuerpos dirigidos contra el HCN3 (verde) y la glicoproteína Tamm Horsfall (THP). En el AHAG de la corteza (CZ) no se observa colocalización del HCN3 y la THP. Ambas proteínas colocalizaron en el AHAG, tanto en la capa exterior (CEME, *cabezas de flecha*) como en la capa interior (CIME, *flechas*) de la médula externa. La inmunorreactividad desapareció cuando el anticuerpo primario fue pre-adsorbido con el péptido de control (PC). Barra de escala, 100 μ m. Los dibujos de las nefronas esquematizan los segmentos tubulares que se visualizan en las fotografías. En la CZ se ilumina en negro donde sólo se expresa la THP y en gris el HCN3, mientras que en la CEME y la CIME se marca en negro donde colocalizan tanto el HCN3 como la THP.

Para confirmar la localización del HCN3 en la membrana basolateral del asa de Henle ascendente gruesa medular, se realizó un comarcaje del canal con la Na⁺/K⁺ ATPasa, una proteína que se encuentra en la membrana basolateral de los epitelios renales. En la figura 23 se aprecia la colocalización del HCN3 y la Na⁺/K⁺ ATPasa en la membrana basolateral del asa de Henle ascendente gruesa en la capa interior de la médula externa.

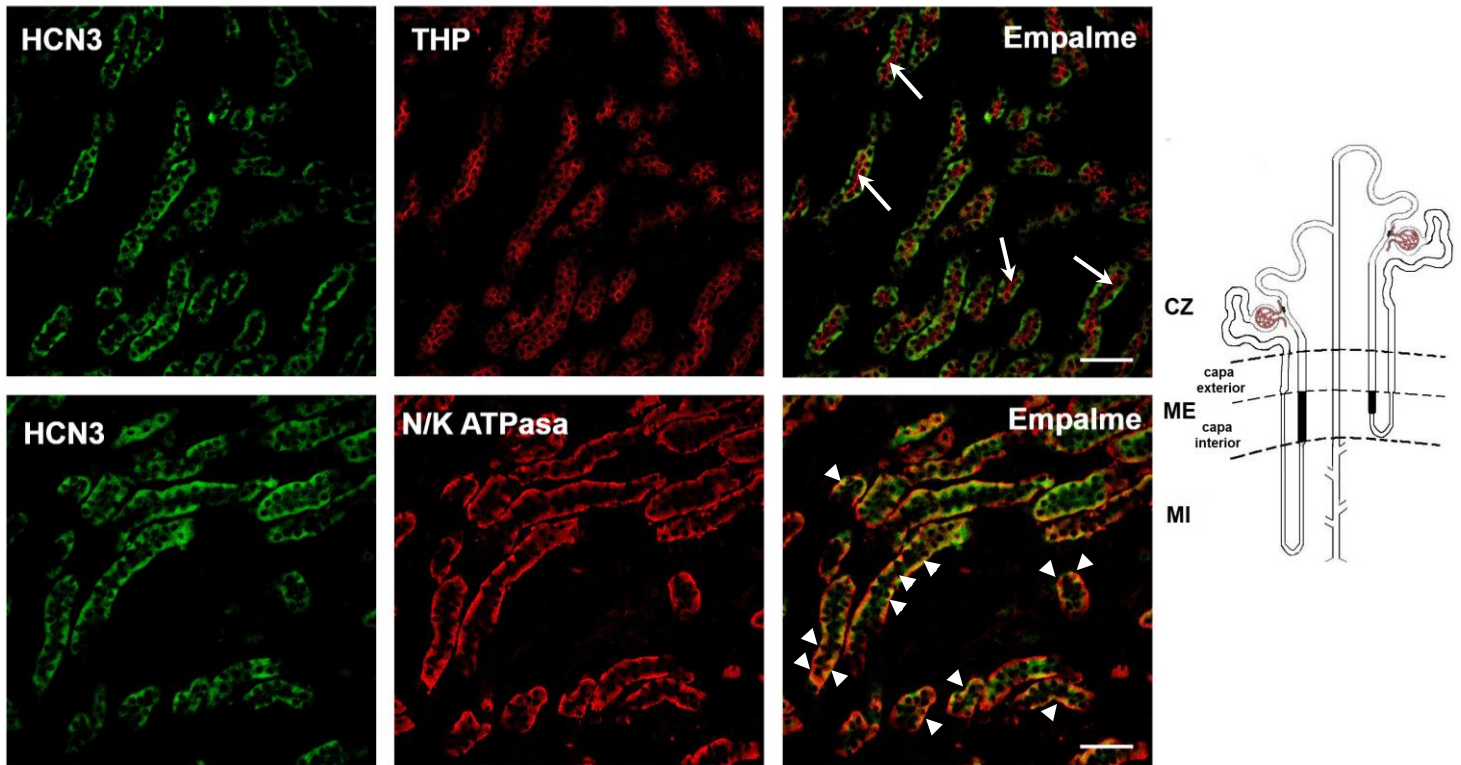


Figura 23. Localización del HCN3 en la membrana basolateral del asa de Henle ascendente gruesa medular (AHAGm). En el panel superior se muestra la inmunoreactividad fluorescente para el canal HCN3 (verde) y la glicoproteína Tam Horsfall (THP, rojo) en la membrana basolateral y apical del AHAGm, respectivamente. Las *flechas* indican la localización apical de la THP. En el panel inferior se muestra la colocalización (amarillo, *cabezas de flecha*) del HCN3 y la subunidad $\alpha 1$ -de la Na⁺/K⁺ ATPasa en la membrana basolateral del AHAGm. Barra de escala=50 μ m. El dibujo de la nefrona esquematiza los segmentos tubulares que se visualizan en las fotografías (capa interior de la médula externa, ME), donde colocalizan el HCN3 y la THP (negro).

10.7 Ausencia del HCN3 en la nefrona distal de ratas en condiciones fisiológicas basales

El HCN3 no colocalizó en ninguna región del riñón ni con la calbindina (CaBP, Fig. 24), ni con la Acuaporina 2 (AQP2, Fig. 25), lo cual indica que el HCN3 no se expresa en la nefrona distal (túbulo contorneado distal, túbulo conector y conductos colectores) en condiciones basales.

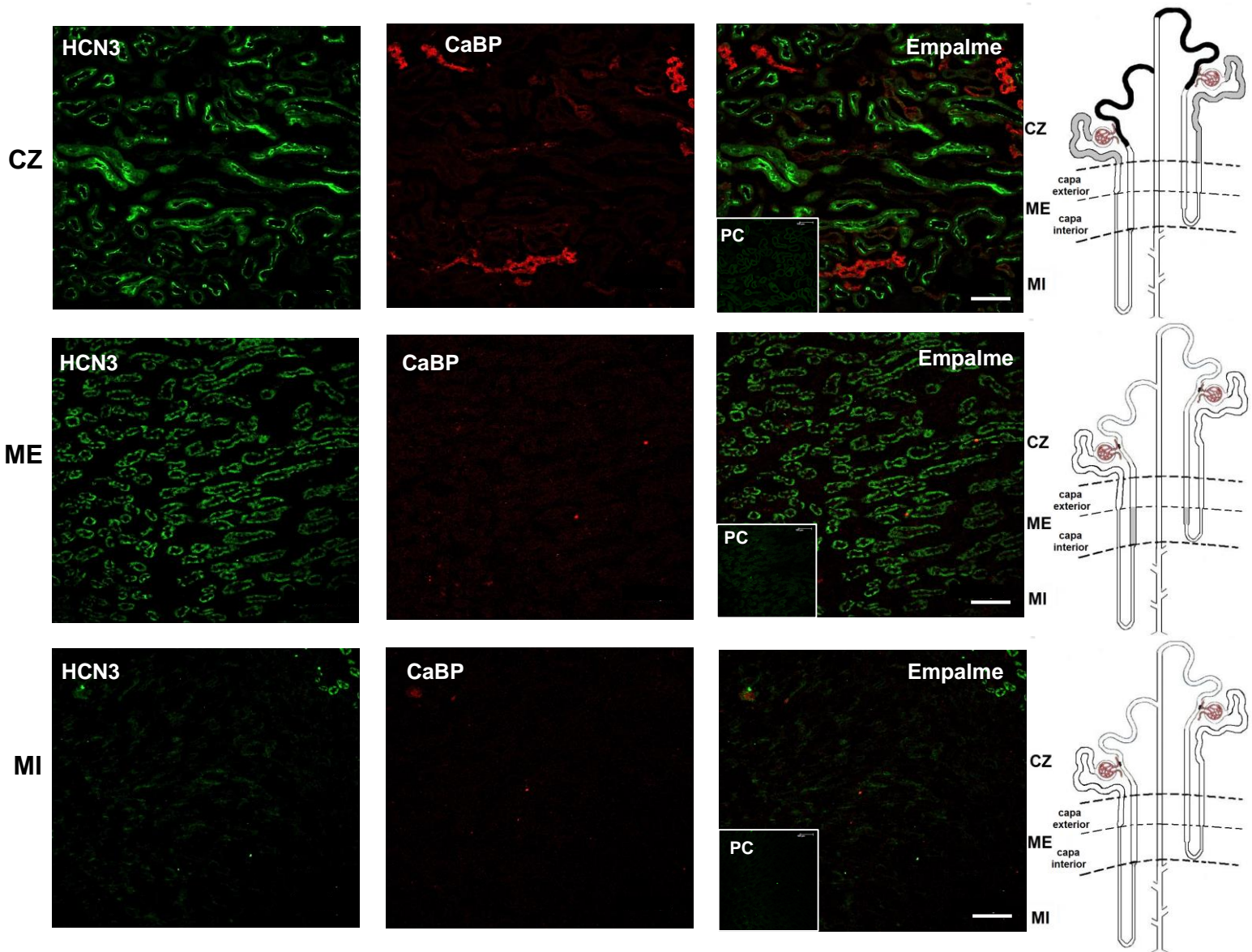


Figura 24. Doble inmunofluorescencia marcada con el canal HCN3 y la proteína Calbindina (CaBP). Cortes sagitales del riñón de rata inmunomarcados con anticuerpos anti-HCN3 (floróforo verde) anti-CaBP (floróforo rojo). Aunque hay inmunorreactividad para ambas proteínas en la corteza (CZ) y/o médula externa (ME), no hay colocalización. Ni el HCN3 ni la CaBP se localizaron en la médula interna (MI). La inmunorreactividad desapareció cuando los anticuerpos primarios fueron pre-adsorbidos por su péptido control (PC). Barra de escala, 100 μ m. Los dibujos de las nefronas esquematizan los segmentos tubulares que se visualizan en las fotografías y en donde se expresa la CaBP (negro) y el HCN3 (gris). En la MI no se encontró inmunorreactividad para estas proteínas (blanco).

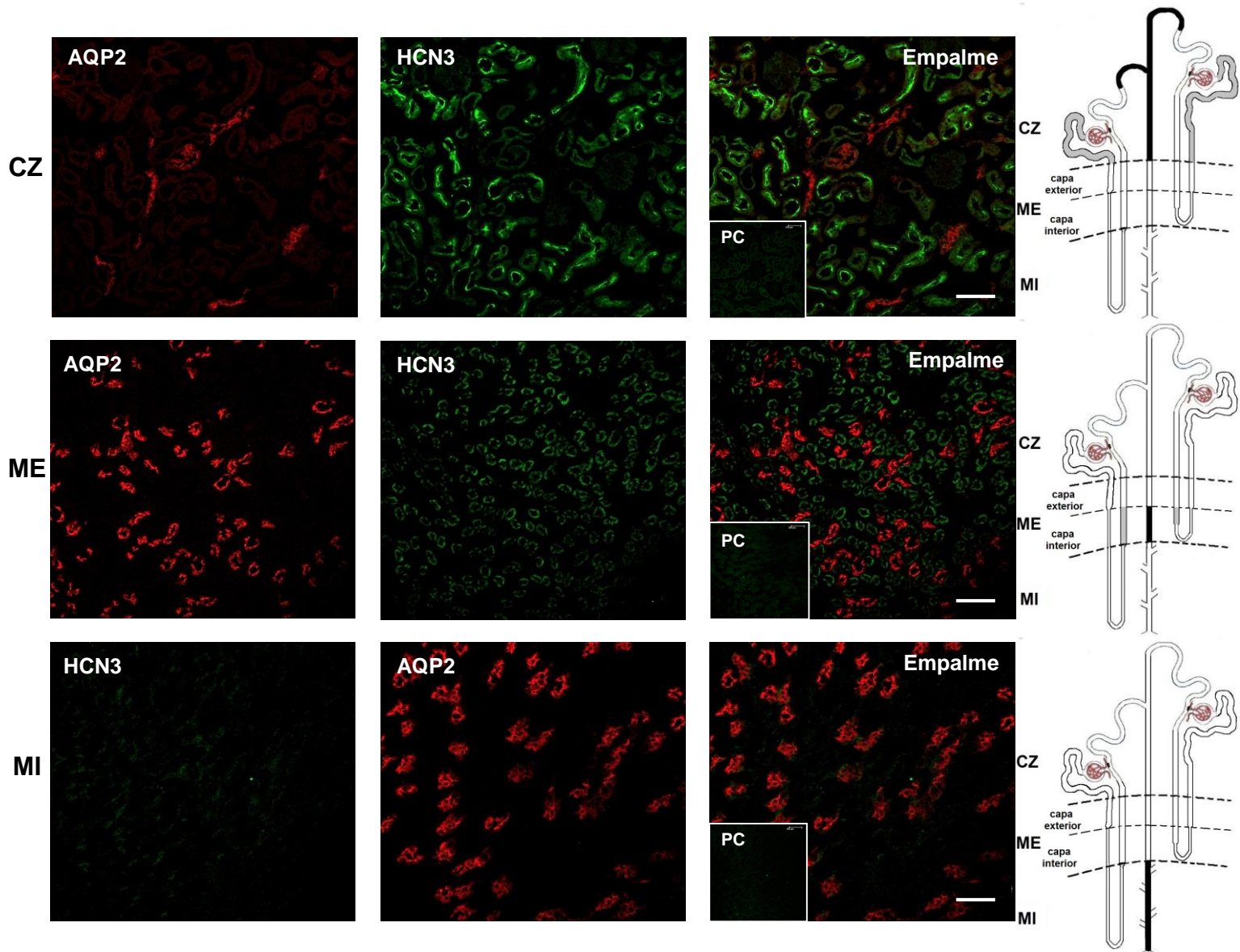


Figura 25. Doble inmunofluorescencia marcada con los canales HCN3 y Acuaporina 2 (AQP2). Cortes sagitales de riñón de rata inmunomarcados con anticuerpos anti-HCN3 (fluoróforo verde) anti-AQP2 (fluoróforo rojo). La AQP2 se localizó tanto en la corteza (CZ), como en la médula externa (ME) y la médula interna (MI). No se encontró colocalización de la AQP2 con el HCN3 en ninguna región del riñón aunque sí se observa inmunorreactividad para el HCN3 en la CZ y la ME. La inmunorreactividad desapareció cuando los anticuerpos primarios fueron pre-adsorbidos por su péptido control (PC). Barra de escala, 100 μ m. Los dibujos de las nefronas esquematizan los segmentos tubulares que se visualizan en las fotografías, donde se expresa la AQP2 (negro) o el HCN3 (gris).

En la Tabla 4 se resumen los comarcajes fluorescentes que se realizaron con el HCN1 y HCN3, mientras que en la Figura 26 se resume la localización de estos canales en la nefrona de la rata.

Tabla 4. Ensayos de doble inmunofluorescencia.

Segmento tubular	Marcador	Colocalización con:	
		HCN1	HCN3
TP	AQP1	+	+
AHAG	THP	-	+
TCN y TCD	CaBP	-	-
CC	AQP2	-	-

El HCN1 y HCN3 se comarcaron con proteínas localizadas en los diferentes segmentos de la nefrona. Colocalización (+), no colocalización (-). TP=túbulo proximal, AHAG=asa de Henle ascendente gruesa, TCN=túbulo conector, TCD=túbulo contorneado distal, CC=conducto colector. AQP1=acuaporina 1, THP=glucoproteína Tam Horsfall, CaBP=calbindina, AQP2=acuaporina 2.

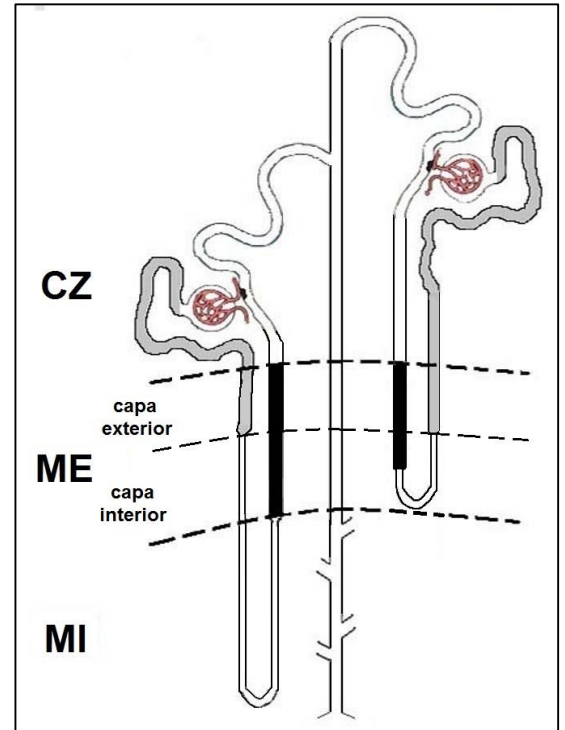


Figura 26. Localización del canal HCN1 y HCN3 en la nefrona de la rata en condiciones basales. El HCN1 y HCN3 se encontraron en la membrana del borde en cepillo del túbulo proximal (TP) cortical (gris). En el TP de la capa exterior de la médula externa (ME) son principalmente citoplásmicos. Sólo el HCN3 se localizó adicionalmente en la membrana basolateral del asa de Henle ascendente gruesa (negro). Ninguno de estos canales se detectó en la nefrona distal.

10.8 Determinación de electrolitos en las ratas sometidas a dietas crónicas y a acidosis metabólica

Al igual que en estudios previos (Wang et al., 1997; Amlal et al., 2000), en este trabajo los animales sometidos durante 15 días a una dieta depletada de K⁺ (DK), desarrollaron hipocalemia (2.76±0.07 mEq/L de K⁺ plasmático), en comparación al grupo control (3.74±0.11 mEq/L; Tabla 5). En consecuencia, la excreción fraccional urinaria de K⁺ (EF_K) en las ratas con dieta DK disminuyó ~5 veces (2.86±0.21%) con respecto a los animales con dieta control (NK; 14.68±1.95%), la cual contenía 0.54% de K⁺ (Tabla 6).

En los animales alimentados de manera crónica (15 días) con una dieta alta en K⁺ (10%; AK) la concentración plasmática de K⁺ fue mayor (5.43±0.41 mEq/L) que en el grupo control (3.973±0.13

mEq/L), cuya dieta contenía 0.6% de K⁺ (NK; Tabla 5). La EF_K en las ratas con dieta AK aumentó ~9 veces (153.41±16.73%) con respecto a la del grupo control (17.73±1.63%, Tabla 6). A pesar de este incremento en la excreción urinaria de K⁺, los animales sometidos a dieta AK no lograron adaptarse sino que desarrollaron hipercalemia. La excreción fraccional urinaria de cloro (EF_{Cl}) también aumentó ~8 veces (4.82±1.21%) bajo la dieta AK, con respecto al control (0.61±0.10%), debido al enriquecimiento de Cl⁻ en la dieta (10% KCl, Tabla 6). Las concentraciones de Na⁺ en el plasma u orina no se vieron afectadas en los animales sometidos a dietas DK y AK.

Las ratas alimentadas con una dieta deficiente de NaCl (DS) durante 7 días, mantuvieron sus niveles basales de Na⁺ en plasma (144.57±0.37 mM vs 144±1.95 mM del grupo control; Tabla 5). Los mecanismos homeostáticos para lograr esto se reflejaron en una disminución de la excreción fraccional urinaria de Na⁺ (EF_{Na}, 0.06±0.01%), así como de la EF_{Cl} (0.49±0.02%), en comparación con el grupo control (NS; 0.32±0.03% y 0.80±0.09%, respectivamente, Tabla 6). El balance de K⁺ no se afectó en los animales sometidos a dieta DS.

Tabla 5. Niveles plasmáticos de electrolitos en ratas sometidas a dietas deficientes de K⁺ (DK), con alto K⁺ (AK) y deficientes de Na⁺ (DS).

Electrolito (mmol/L)	NK (0.54%)	DK (0%)	NK (0.6%)	AK (10%)	NS (0.13%)	DS (0%)
Na ⁺	143.57 ± 1.11	143.86 ± 1.42	142.86 ± 1.10	145.86 ± 1.14	144 ± 1.95	144.57 ± 0.37
K ⁺	3.74 ± 0.11	2.76 ± 0.07 *	3.97 ± 0.13	5.43 ± 0.41 *	3.95 ± 0.08	3.68 ± 0.26
Cl ⁻	103.57 ± 0.90	100 ± 1.29	106 ± 0.65	108.57 ± 1.36	97.43 ± 1.09	92.71 ± 3.17

Los valores representan la media ± el error estándar. * P<0.001, n=7. NK=dieta normal de potasio, NS=dieta normal de sodio.

Tabla 6. Excreción fraccional urinaria (EF) de electrolitos en ratas sometidas a dietas deficientes de K⁺ (DK), con alto K⁺ (AK) y deficientes de Na⁺ (DS).

Excreción fraccional (%)	NK (0.54%)	DK (0%)	NK (0.6%)	AK (10%)	NS (0.13%)	DS (0%)
EF _{Na}	0.13 ± 0.02	0.15 ± 0.03	0.19 ± 0.03	0.21 ± 0.08	0.32 ± 0.03	0.06 ± 0.01*
EF _K	14.68 ± 1.95	2.86 ± 0.21*	17.73 ± 1.63	153.41 ± 16.73*	18.15 ± 1.78	18.77 ± 1.55
EF _{Cl}	0.62 ± 0.09	0.70 ± 0.07	0.61 ± 0.10	4.82 ± 1.21*	0.80 ± 0.09	0.49 ± 0.02*

Los valores representan la media ± el error estándar. * P<0.001, n=7. NK=dieta normal de potasio, NS=dieta normal de sodio.

Las ratas administradas con NH₄Cl 0.28 M durante 7 días en el agua de bebida, desarrollaron una acidosis metabólica crónica (AMC), evidenciada por una disminución del pH plasmático (7.87 vs 8.18) y urinario (5.68 vs 7.05), así como por un decremento en la concentración plasmática de HCO₃⁻ (23.5±0.64 vs 15.75±2.1 mmol/L), con respecto al grupo control. Además de que se alteró el balance ácido-base, estos animales experimentales presentaron una hipercloremia (una concentración elevada de Cl⁻) alcanzando una concentración plasmática de Cl⁻ de 114.83±1.33 mmol/L con respecto el grupo control (107.83± 0.70 mmol/L). Esto provocó un incremento en la excreción fraccional urinaria de Cl⁻ (EF_{Cl⁻}; 3.79±0.22% vs 1.09±0.11%; Tabla 7). De la misma manera, las ratas con AMC presentaron una disminución de la concentración plasmática de K⁺ (3.55±0.06 mmol/L), respecto al grupo control (4.11±0.11 mmol/L).

Tabla 7. Determinación de electrolitos y pH en ratas control (CT) y con acidosis metabólica crónica (AMC).

Electrolito	Plasma [mmol/L]		EF urinaria (%)	
	CT	AMC	CT	AMC
Na ⁺	148.33 ± 0.61	149.50 ± 0.56	0.36 ± 0.06	0.35 ± 0.08
K ⁺	4.11 ± 0.11	3.55 ± 0.06 *	26.79 ± 1.84	24.90 ± 4.15
Cl ⁻	107.83 ± 0.70	114.83 ± 1.33 *	1.09 ± 0.11	3.79 ± 0.22 *
HCO ₃ ⁻	23.5 ± 0.64	15.75 ± 2.1 †	ND	ND
pH	8.18 ± 0.05	7.87 ± 0.07 *	7.05 ± 0.22	5.68 ± 0.04 *

Se indujo AMC administrando NH₄Cl 0.28M en el agua de bebida durante 7 días. Los valores representan la media ± el error estándar. * P<0.01, n=6; †, P<0.05, n=4. EF=excreción fraccional; ND=No determinado.

10.9 La dieta deficiente de K⁺ (DK) incrementó la abundancia proteica del HCN3 en el asa de Henle ascendente gruesa medular y disminuyó la abundancia del HCN3 N-truncado en el túbulo proximal

Las ratas sometidas a una dieta crónica deficiente de K⁺ o hipocalémicas (DK) presentaron un incremento en la abundancia proteica del canal HCN3 (258%) en las membranas plasmáticas de la médula externa renal (asa de Henle ascendente gruesa medular) comparado con las ratas control (dieta NK, Fig. 27A). En contraste, se observó una disminución del canal HCN3 N-truncado (68%) solo en la corteza (túbulo proximal; Fig. 27B). Esta diferencia sugiere la estabilización del HCN3 de longitud completa y/o la inhibición de la proteólisis del canal.

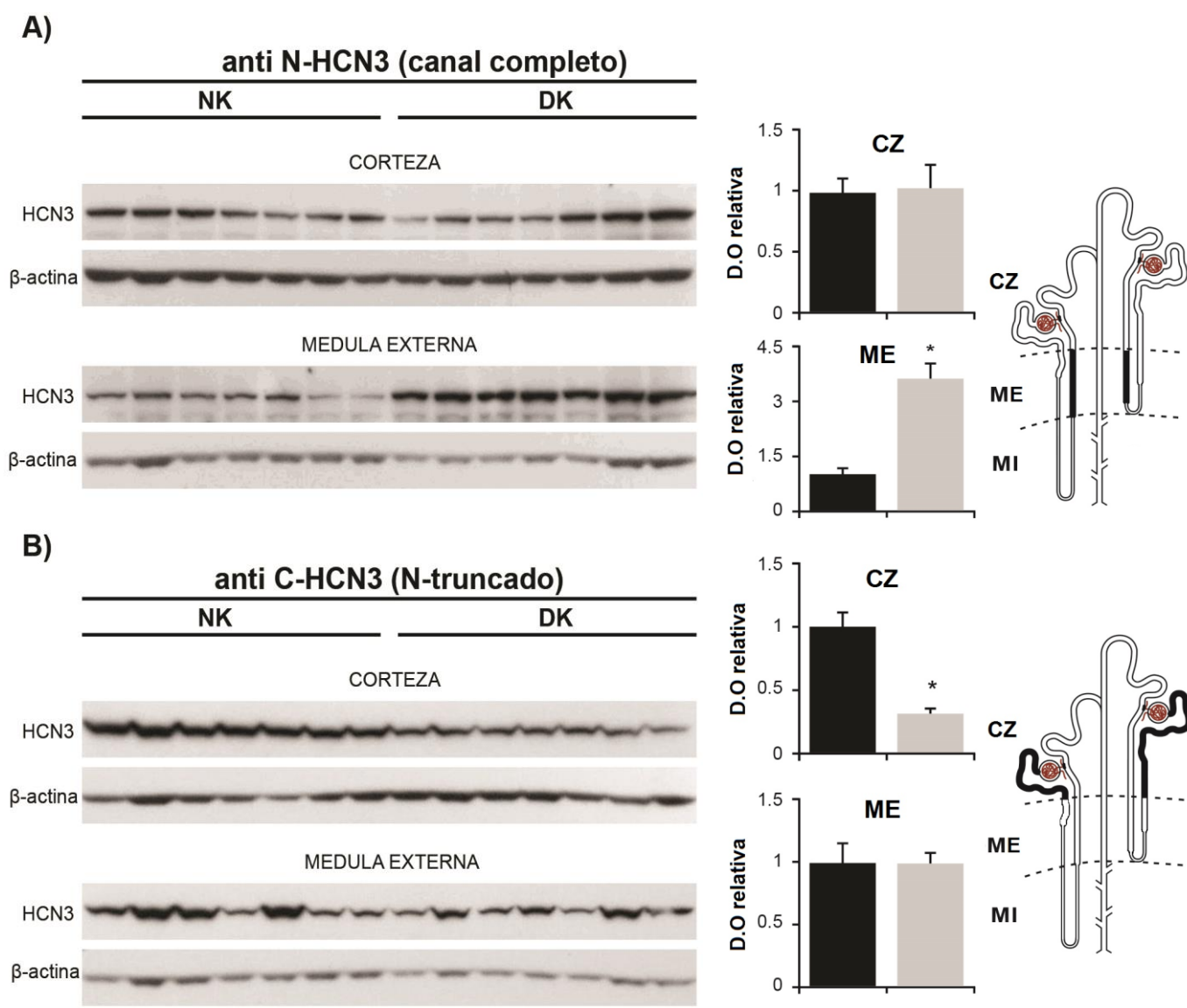


Figura 27. Efecto de la deficiencia de K^+ (DK) sobre la abundancia proteica del canal HCN3 completo y N-truncado en las membranas plasmáticas de la corteza (CZ) y médula externa (ME) renal. Los inmunoblots se llevaron a cabo con 25 μ g de proteína, utilizando anticuerpos dirigidos a epítopes en el extremo NH_2 (N-HCN3) y $COOH$ (C-HCN3) terminal del HCN3. Estos anticuerpos detectaron al canal HCN3 completo (90 kDa) y N-truncado (65 kDa), respectivamente. A) DK aumentó la expresión del canal HCN3 completo en la ME. B) En contraste, DK produjo una disminución del HCN3 N-truncado en la CZ, con respecto al grupo control (Normal K^+ , NK). Las gráficas muestran el análisis densitométrico de la abundancia proteica del canal HCN3 en ratas con dieta DK (barra gris) y dieta NK (barra negro). Los valores representan la media \pm el error estándar. * $P < 0.001$, $n=7$. En los dibujos de la nefrona se resaltan los segmentos tubulares donde se regula el canal HCN3 completo y HCN3 N-truncado por DK.

Se analizó por inmunofluorescencia si había algún cambio en la distribución del HCN3 en los túbulos renales de ratas con deficiencia de K^+ , sin embargo, este canal no modificó su distribución con respecto al control (Fig. 28).

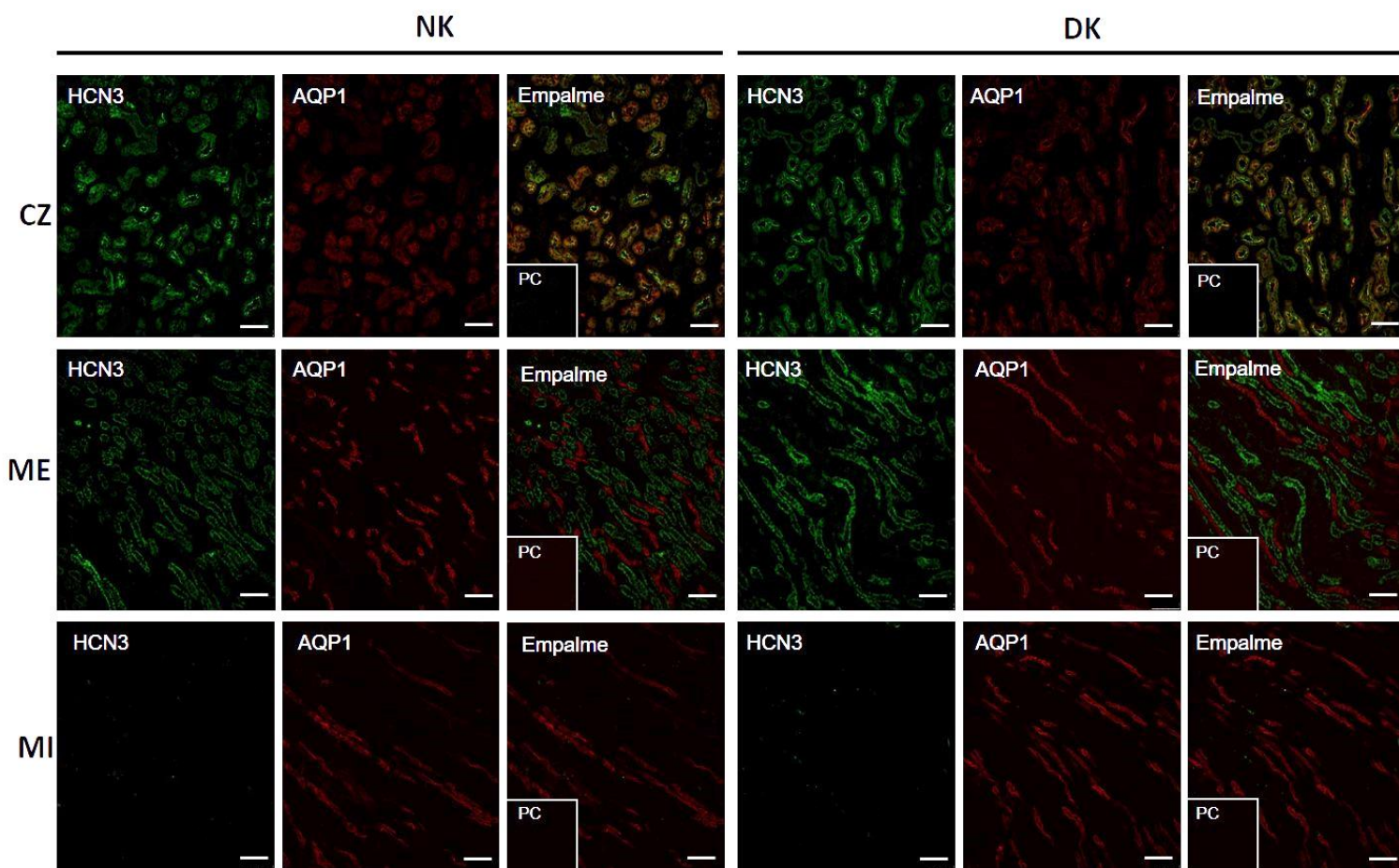


Figura 28. Inmunolocalización del HCN3 en el riñón de ratas hipocalémicas. Se realizó una doble inmunofluorescencia marcando cortes de tejido renal con anti-HCN3 y anti-AQP1. La deficiencia de K^+ (DK) no afecta la distribución del canal HCN3 en los segmentos tubulares de la corteza (CZ), médula externa (ME) o médula interna (MI), con respecto al control (NK). Tanto en ratas sometidas a dieta DK como NK, el HCN3 y la AQP1 colocalizaron (amarillo) en los túbulos proximales de la CZ. En la ME el HCN3 se localizó el asa de Henle ascendente gruesa, sin detectarse inmunorreactividad en la MI. La AQP1 marcó el asa de Henle descendente delgada, tanto en la ME como en la MI. La inmunorreactividad desapareció cuando los anticuerpos primarios fueron pre-adsorbidos por su péptido de control (PC) o el tejido fue incubado sólo con el anticuerpo secundario. Barra de escala, 100 μm .

10.10 La dieta alta en K^+ (AK) incrementó la abundancia proteica del HCN3 en los túbulos proximales y el asa de Henle ascendente gruesa medular, y disminuyó el HCN3 N-truncado en el asa de Henle ascendente gruesa medular

Una dieta crónica con alto K^+ (AK) o hipercalcemia incrementó la abundancia proteica del HCN3 completo, tanto en las membranas plasmáticas de la corteza (túbulo proximal, 83%) como de la médula externa (asa de Henle ascendente gruesa medular, 255%) renal de ratas. Asimismo, redujo la abundancia del HCN3 N-truncado (78%) sólo en la médula externa (asa de Henle ascendente gruesa medular), en comparación con sus correspondientes controles (NK, Fig. 29).

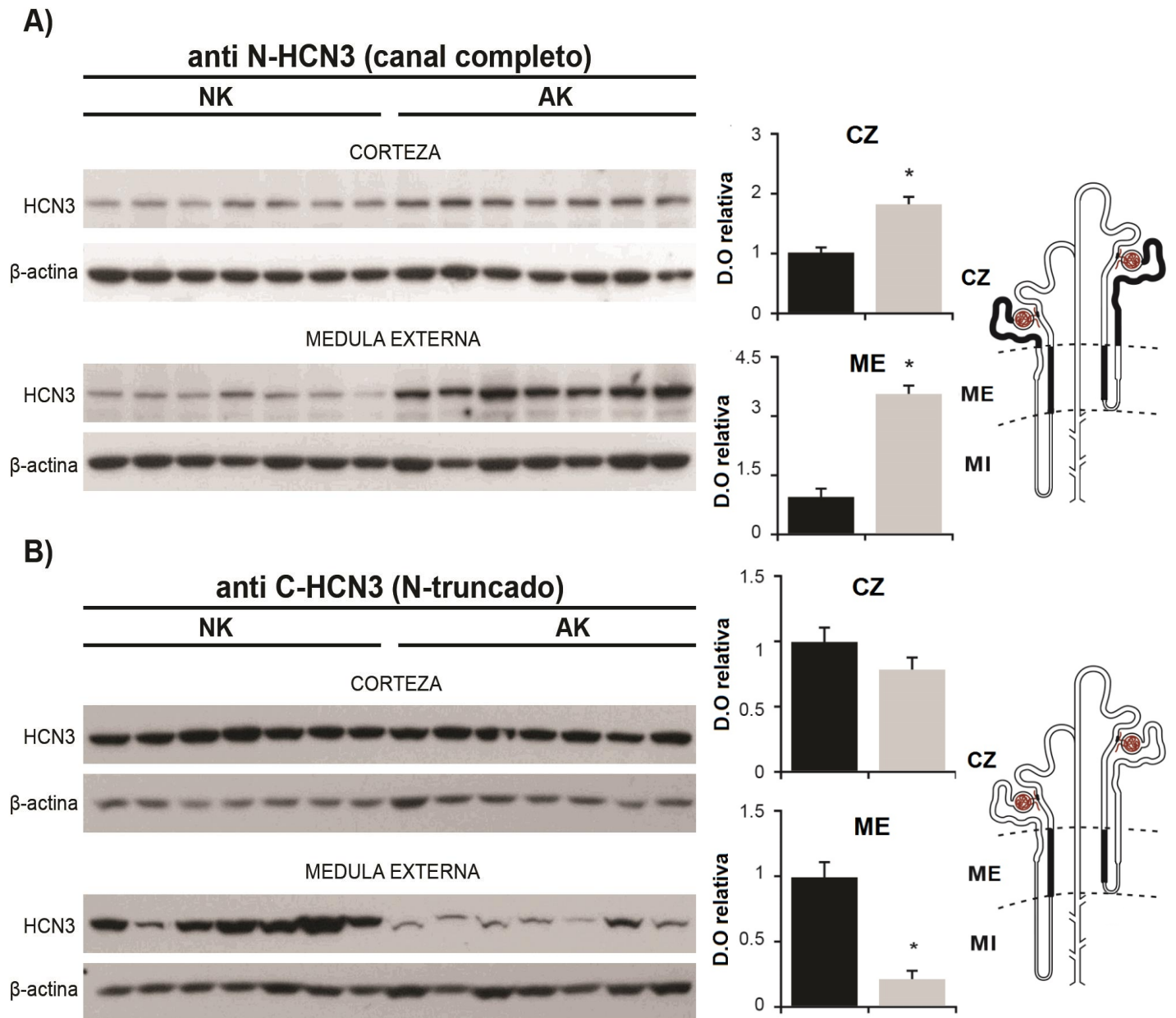


Figura 29. Efecto de una dieta crónica alta en K^+ (AK) sobre la abundancia proteica del canal HCN3 completo y N-truncado en las membranas plasmáticas de la corteza (CZ) y médula externa (ME) renal. Los inmunoblots se llevaron a cabo con 25 μ g de proteína, utilizando anticuerpos dirigidos a epítopos en el extremo NH_2 (N-HCN3) y $COOH$ (C-HCN3) terminal del HCN3. Estos anticuerpos detectaron al canal HCN3 completo (90 kDa) y N-truncado (65 kDa), respectivamente. A) AK aumentó la expresión del HCN3 completo tanto en la CZ como en la ME renal, con respecto al control (Normal K^+ , NK). B) AK disminuyó la abundancia del HCN3 N-truncado sólo en el CZ. Los gráficos de la derecha muestran el análisis densitométrico de la abundancia proteica del HCN3 en ratas con dieta AK (barra gris) y NK (barra negra). Los valores representan la media \pm error estándar. * $P < 0.001$, $n = 7$. En los dibujos de la nefrona se resaltan los segmentos tubulares donde se regula el canal HCN3 completo y HCN3 N-truncado por AK.

10.11 Expresión del canal HCN3 inducida por hipercalcemia en la nefrona distal

Se evaluó por inmunofluorescencia la distribución del canal HCN3 en ratas sometidas a dieta AK o hipercalémicas, con respecto al grupo control (dieta NK). Una doble inmunofluorescencia evidenció que en ratas hipercalémicas el HCN3 colocaliza con la AQP1 en muy pocos túbulos proximales de la corteza renal como lo hace en condiciones control. En la corteza renal de ratas hipercalémicas hay una expresión inducida del canal HCN3 en túbulos que no son proximales, sino muy probablemente distales (Fig. 30). Para verificar la expresión del HCN3 en los túbulos distales de ratas hipercalémicas se realizó un doble marcaje del HCN3 con la CaBP (marcador del túbulo contorneado distal y túbulo conector) y la AQP2 (marcador de las células principales del conducto colector). El HCN3 colocalizó en algunos túbulos distales con la CaBP (Fig. 31) y con la AQP2 en las células principales de los conductos colectores corticales (Figs. 31 y 32). Esta distribución del HCN3 se observó con predominancia en la membrana basolateral, sólo en túbulos distales de la corteza y bajo el efecto de la dieta AK, a diferencia del grupo control (NK).

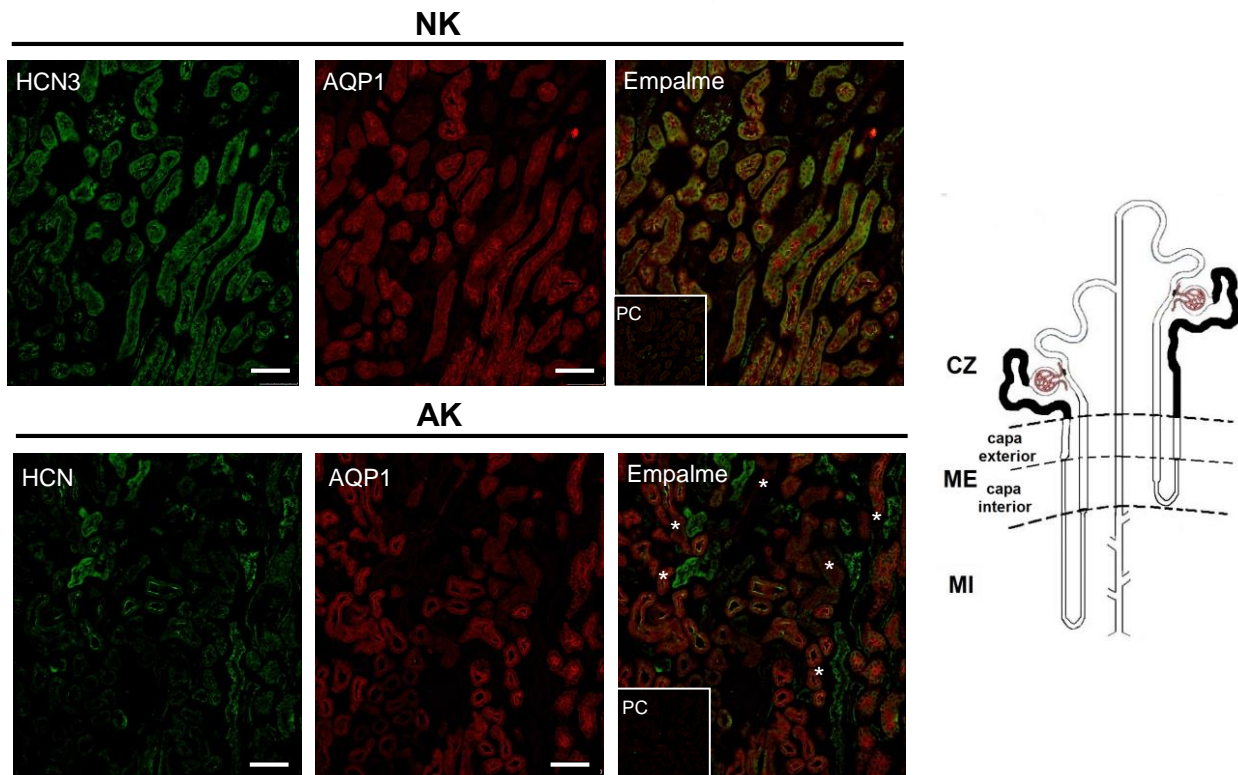


Figura 30. Inmunolocalización del HCN3 en el riñón de ratas hipercalémicas (AK). Se realizó un comarcaje del HCN3 con la AQP1 en secciones de tejido renal de ratas sometidas a dieta con alto K⁺ (AK) y normal K⁺ (NK). El HCN3 colocalizó con la AQP1 en todos los túbulos proximales corticales de ratas con dieta NK. En ratas con dieta AK el HCN3 colocalizó en muy pocos túbulos proximales con la AQP1 y se expresó en túbulos de diferentes segmentos (asteriscos). Las marcas inmunorreactivas desaparecieron cuando los anticuerpos primarios se pre-incubaron con su péptido control (PC) o el tejido fue incubado sólo con el anticuerpo secundario. Barra de escala, 100µm. El dibujo de la nefrona esquematiza los segmentos tubulares que se visualizan en las fotografías (corteza, CZ) y donde colocalizan la AQP1 y el HCN3 (negro).

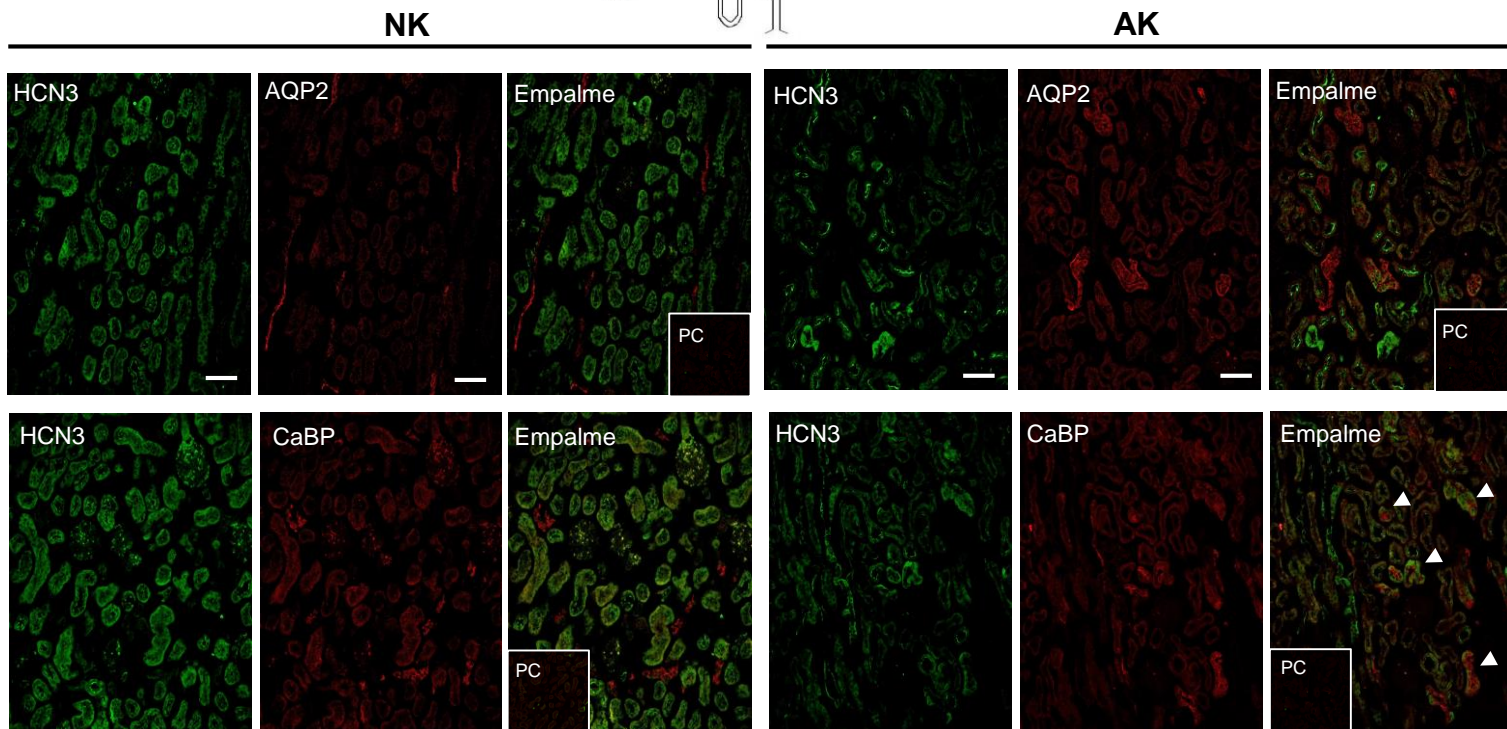
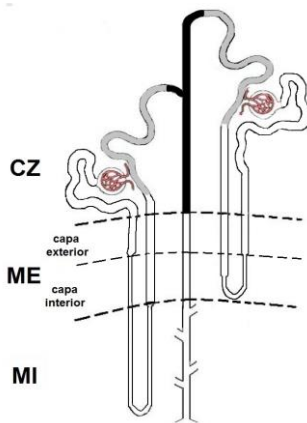


Figura 31. Expresión del HCN3 en la nefrona distal inducida por hipercalémia. Se comparó la distribución del HCN3 en la corteza renal (CZ) de ratas sometidas a una dieta alta en K^+ (AK) y con normal contenido de K^+ (NK). En ratas con dieta NK el HCN3 (verde) no colocalizó ni con la AQP2 (rojo) ni con la CaBP (rojo). En contraste, en el riñón de ratas con dieta AK se observó la colocalización del HCN3 y la AQP2 en algunos túbulos del conducto colector cortical y con la CaBP en los túbulos distales (*cabezas de flecha*). La inmunoreactividad desapareció cuando los anticuerpos primarios fueron pre-adsorbidos por su péptido control (PC) o el tejido fue incubado sólo con el anticuerpo secundario. Barra de escala, 100 μm . En el dibujo de la nefrona se esquematizan los segmentos tubulares que se visualizan en las fotografías y donde el HCN3 colocaliza con la AQP2 (negro) o la CaBP (gris).

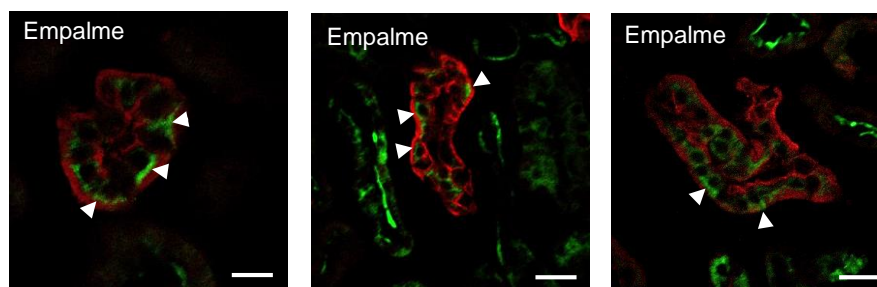


Figura 32. Colocalización del HCN3 y la AQP2 en las células principales del conducto colector del riñón de ratas hipercalémicas. Se realizó un comarcaje del HCN3 con la AQP2 en secciones de tejido renal de ratas sometidas a dieta con alto K^+ (AK). El HCN3 (verde) colocalizó con la AQP2 (rojo) en los conductos colectores corticales. Se observó una inmunoreactividad predominantemente basolateral para el HCN3 (*cabezas de flecha*). Barra de escala, 25 μm .

10.12 La deficiencia de Na⁺ en la dieta no regula la abundancia proteica del HCN3 en el riñón.

Los inmunoblots no revelaron ningún cambio en la abundancia proteica del HCN3 completo ni del HCN3 N-truncado en las fracciones de membranas plasmáticas del riñón de ratas sometidas a una dieta deficiente de NaCl (DS), con respecto al grupo control (NS; Fig. 33).

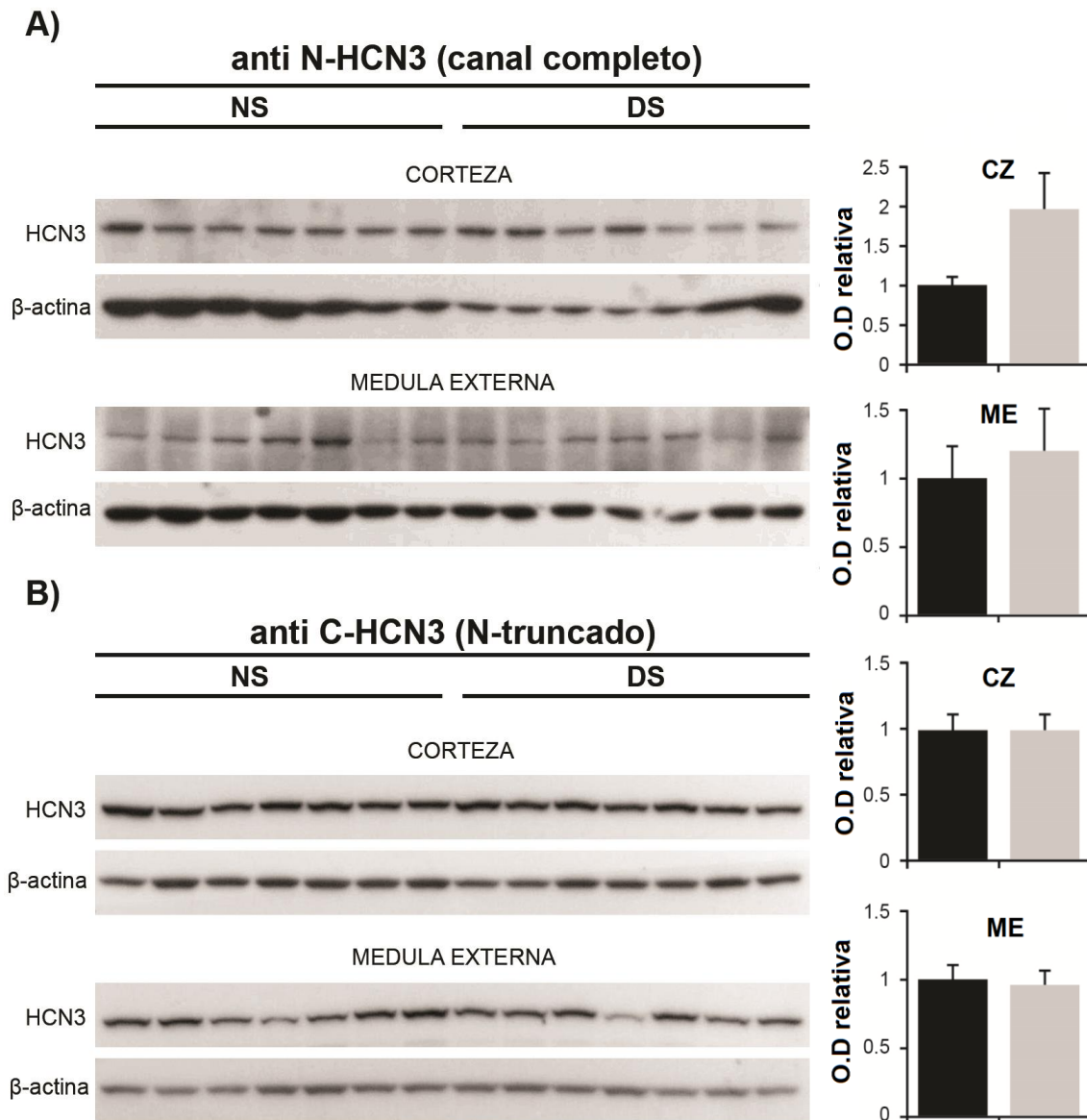


Figura 33. Efecto de una dieta deficiente de NaCl (DS) sobre la abundancia proteica del canal HCN3 completo y N-truncado en las membranas plasmáticas de la corteza (CZ) y médula externa (ME) renal. Los inmunoblots se llevaron a cabo con 25 µg de proteína, utilizando anticuerpos dirigidos a epítopes en el extremo NH₂ (N-HCN3) y COOH (C-HCN3) terminal del HCN3. Estos anticuerpos detectaron al canal HCN3 completo (90 kDa) y N-truncado (65 kDa), respectivamente. La dieta DS no alteró la abundancia proteica del canal HCN3 completo (A), ni del HCN3 N-truncado (B) en la CZ o ME renal con respecto al grupo control (dieta normal de Na⁺, NS). Los gráficos de la derecha muestran el análisis densitométrico de la abundancia proteica del canal HCN3 en ratas sometidas a dieta DS (barra gris) y NS (barra negra). Los valores representan la media ± el error estándar; n=7.

De la misma manera, los ensayos de inmunofluorescencia, no arrojaron evidencia de algún cambio en la distribución del HCN3 en la nefrona por efecto de la dieta DS, con respecto al control (NS; Fig. 34).

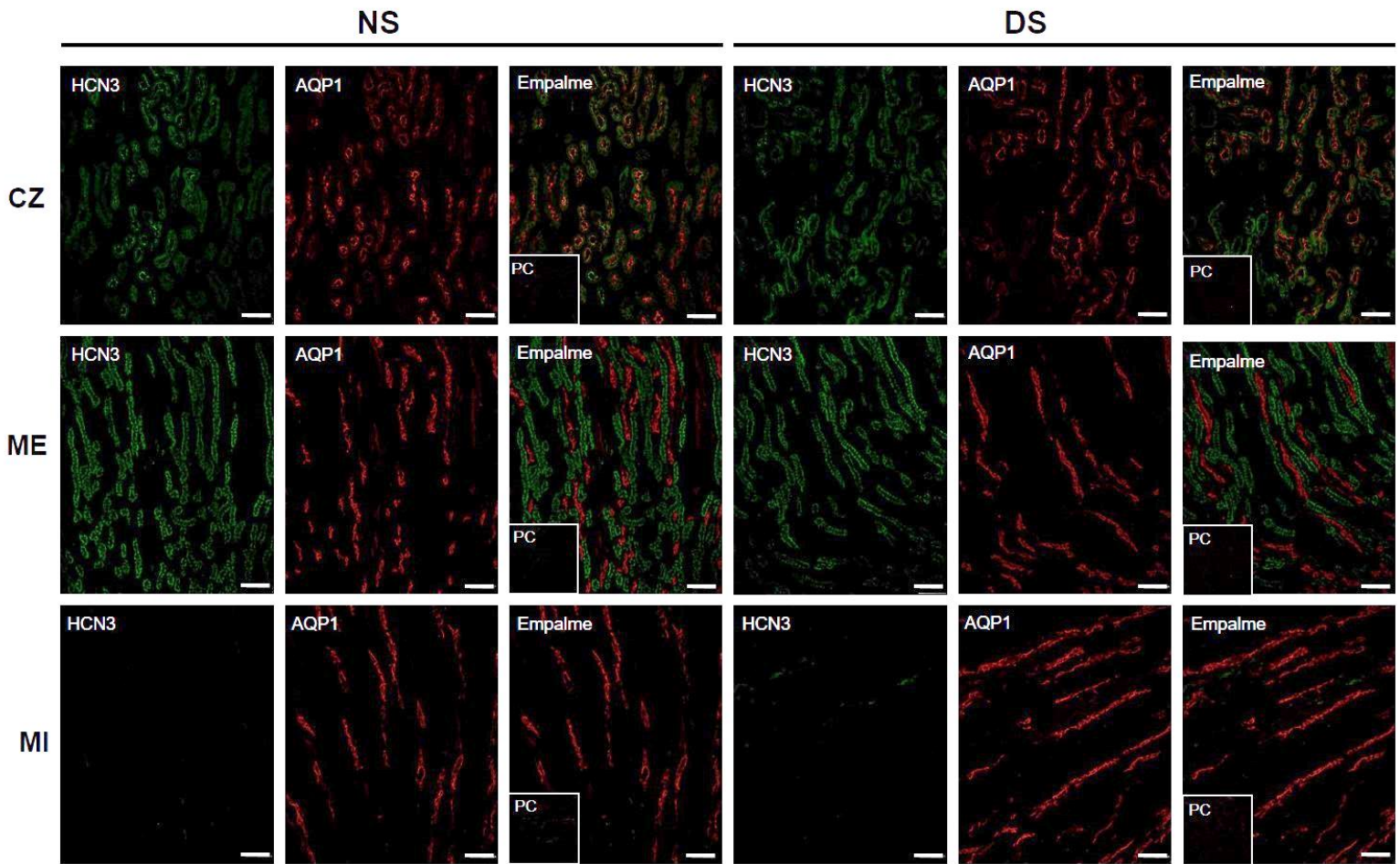


Figura 34. Inmunolocalización del HCN3 en el riñón de ratas sometidas a una dieta depletada de NaCl. Se realizó una doble inmunofluorescencia comarcando el tejido con anti-HCN3 (verde) y anti-AQP1 (rojo). La deficiencia de NaCl (DS) no afectó la distribución del canal HCN3 en los segmentos tubulares de la corteza (CZ), médula externa (ME) o médula interna (MI) con respecto al grupo control (NS). Tanto en ratas sometidas a dieta DS como NS, el HCN3 y la AQP1 colocalizaron (empalme) en los túbulos proximales de la CZ. En la ME el HCN3 se localizó en el asa de Henle ascendente gruesa, sin detectarse inmunorreactividad en la MI. La AQP1 marcó el asa de Henle descendente delgada, tanto en la ME como en la MI. La inmunorreactividad desapareció cuando los anticuerpos primarios fueron pre-adsorbidos por su péptido de control (PC) el tejido fue incubado sólo con el anticuerpo secundario. Barra de escala, 100 μ m.

10.13 La acidosis metabólica crónica (AMC) incrementó la abundancia proteica del HCN3 y disminuyó la del HCN3 N-truncado en el asa de Henle ascendente gruesa medular

Los inmunoblots revelaron un incremento del HCN3 completo (274%) en las membranas plasmáticas de la médula externa (asa de Henle ascendente gruesa medular) en el riñón de ratas con AMC, respecto al control. En contraste, el HCN3 N-truncado disminuyó su abundancia proteica por efecto de la AMC también en la médula externa renal (Fig. 35).

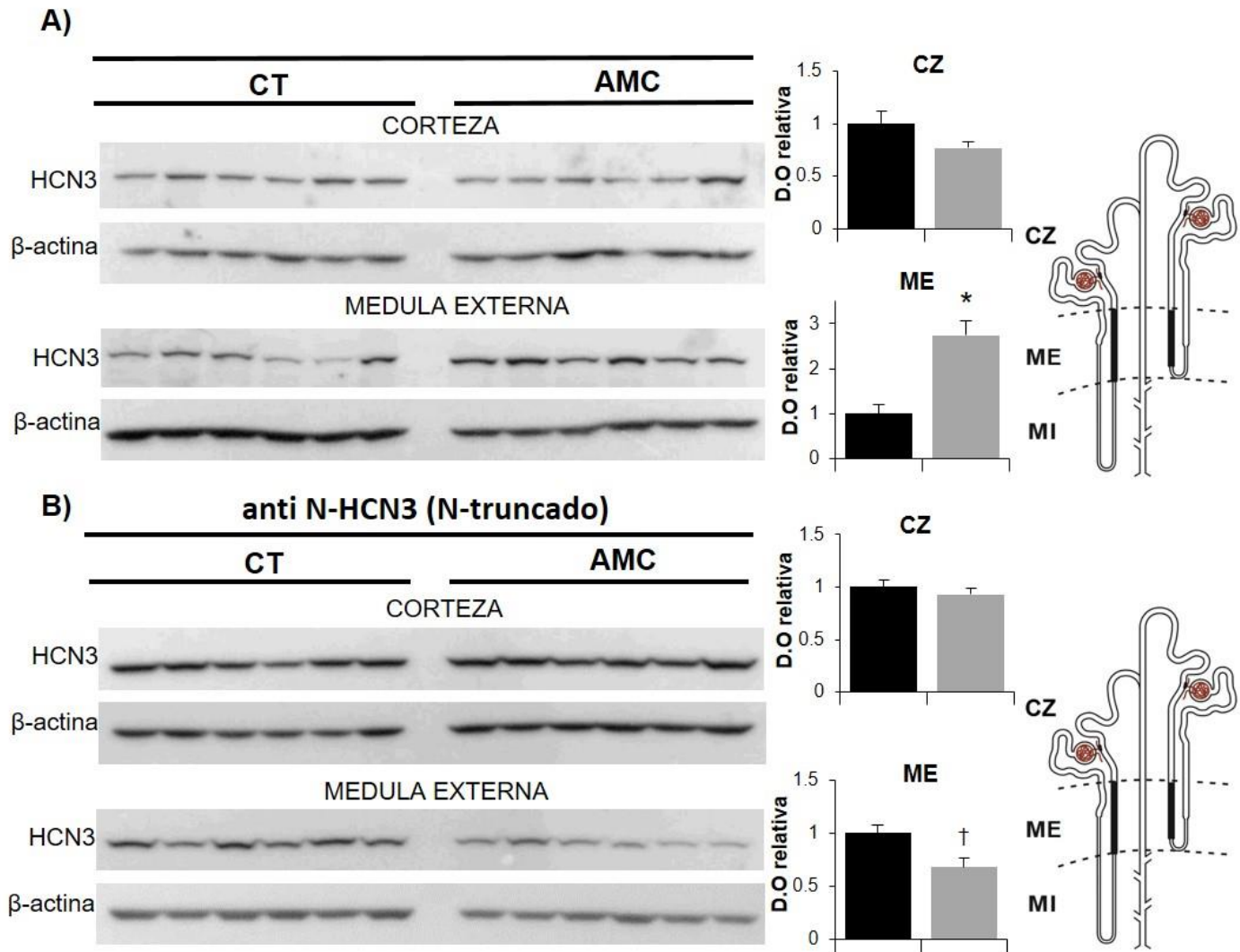


Figura 35. Efecto de la acidosis metabólica crónica (AMC) sobre la abundancia proteica del canal HCN3 completo y N-truncado en las membranas plasmáticas de la corteza (CZ) y médula externa (ME) renal. Los inmunoblots se llevaron a cabo en fracciones de membranas plasmáticas (25 µg) con anticuerpos primarios dirigidos a epítopes en el extremo NH₂ (N-HCN3) y COOH (C-HCN3) terminal del HCN3. Estos anticuerpos detectaron al canal completo y N-truncado, respectivamente. A) Se observó un incremento en la abundancia proteica del canal HCN3 completo en la ME de ratas con AMC, respecto al grupo control (CT). B) En contraste el HCN3 N-truncado disminuyó en la ME renal. Los gráficos de la derecha muestran los análisis densitométricos de la abundancia proteica del HCN3 en ratas sometidas a AMC (barra gris) con respecto al CT (barra negra). Los valores representan la media ± el error estándar. * P<0.001, † P<0.05, n=6. En los dibujos de la nefrona se resaltan los segmentos tubulares donde se regula el canal HCN3 completo y N-truncado por AMC.

11. DISCUSIÓN

11.1 Identificación de los canales HCN1 y HCN3 en el riñón de la rata

En este trabajo se detectó por western blot a los canales HCN1 y HCN3 completos, así como sus fragmentos proteolíticos de 93 y 65 kDa, respectivamente, en la corteza y la médula externa renal. En general, el HCN3 se inmunodetectó con mucho menos cantidad de proteína (20 µg) que el HCN1 (80-120 µg) en el tejido renal, lo que nos permite inferir que el HCN3 es más abundante que el HCN1. Recientemente se reportó que toda la familia de canales HCN presenta en su secuencia primaria sitios de corte a metaloendopeptidasas, las cuales se distribuyen de manera ubicua en los tejidos de mamíferos. El corte proteolítico que produce el fragmento de 93 kDa para el HCN1 sucede en los residuos Glu802-Val803 de su región COOH-terminal (HCN1 C-truncado), mientras que el fragmento de 65 kDa para el HCN3 es generado por un corte en los residuos Ala162-Ile163 del NH₂-terminal (HCN3 N-truncado; Calejo et al., 2014). Este procesamiento proteolítico en el extremo COOH del HCN1 y NH₂ del HCN3, se confirmó en el presente trabajo con la detección del HCN1 C-truncado sólo con el anticuerpo dirigido a un epítipo NH₂ terminal (anti N-HCN1), mientras que el HCN3 N-truncado sólo se detectó con un anticuerpo dirigido a un epítipo COOH-terminal (anti C-HCN3). Calejo y colaboradores predijeron que es altamente probable que los fragmentos proteolíticos mayores de 50 kDa se encuentren en la membrana plasmática. En nuestro trabajo detectamos a los canales HCN1 y HCN3 truncados en extractos proteicos enriquecidos con membranas plasmáticas así como en la purificación de BBMV. Los canales HCN1 C-truncado y HCN3 N-truncado fueron mucho más abundantes que los canales completos en el tejido renal, de hecho la detección del canal HCN1 completo fue casi imperceptible, aún con grandes cantidades de proteína (100 µg), mientras que el HCN3 completo presentó bastante inmunoreactividad cuando se detectó con un anticuerpo dirigido a un epítipo NH₂-terminal (anti N-HCN3). En el hipotálamo el HCN3 N-truncado fue menos abundante que en el riñón, lo cual sugiere que existe un menor procesamiento proteolítico del HCN3 en el hipotálamo.

Existe una expresión elevada de metaloendopeptidasas unidas a la membrana en el riñón que están involucradas en la regulación de péptidos biológicamente importantes (Turner y Tanzawa, 1997). Una de las principales metaloendopeptidasas en las membranas lumbales del túbulo proximal es la endopeptidasa neutral-24.11 (NEP). En este trabajo se observó que la NEP colocaliza con el HCN3 en las BBM del TRP o S3, esto sugiere que dicha metaloproteasa u otras que se encuentran en las BBM, como la meprina, podrían interactuar con el HCN3 para modular su

actividad, sin embargo, esto requiere de más investigación. La NEP degrada péptidos vasoactivos como el péptido natriurético, la angiotensina II y la endotelina-1 (Kenny y Stephenson, 1988), los cuales están involucrados en la reabsorción de Na⁺ a nivel renal. No sería de extrañar que algunas condiciones metabólicas que alteran el transporte de Na⁺ o vías relacionadas puedan modular también este tipo de metaloproteasas. La abundancia de los HCN truncados en el riñón, así como su regulación ante diferentes condiciones fisiológicas (hipocalemia, hipercalemia o acidosis y/o la acidosis metabólica), sugiere la gran relevancia que tiene el procesamiento proteolítico para la función y/o expresión de los canales HCN. Esto abre una línea de investigación interesante al respecto.

11.1 Distribución del HCN3 en la nefrona de rata y la colocalización con el HCN1 en las BBM

En este trabajo los canales HCN1 y HCN3 se encontraron en la membrana apical de los túbulos proximales corticales (BBM), sólo el HCN3 se localizó adicionalmente en la membrana basolateral del asa de Henle ascendente gruesa medular la nefrona. La colocalización del HCN1 y HCN3 en las BBM del túbulo proximal, podría favorecer la posibilidad de que estos canales formen un heteromultímero funcional con propiedades electrofisiológicas diferentes a la de los HCN1 y HCN3 individuales. Se sabe que los diferentes isotipos HCN pueden formar canales homoméricos o heteroméricos funcionales tanto en sistemas de expresión heteróloga como en sus tejidos nativos (Chen et al., 2001; Whitaker et al., 2007). Much y colaboradores (2003) realizaron construcciones quiméricas de los cuatro integrantes de la familia de canales HCN y demostraron que la heteromultimerización es posible en cualquier combinación entre dos diferentes canales, excepto para la combinación HCN2-HCN3. En nuestro laboratorio demostramos a través de registros electrofisiológicos que los canales HCN1 C-truncados son funcionales en sistemas de expresión heteróloga y no descartamos la posibilidad de que también los canales completos puedan formar heteromultímeros en combinaciones diferentes con los HCN1 C-truncados y HCN3 N-truncados en el túbulo proximal y el asa de Henle ascendente gruesa. El general, ha sido difícil lograr la expresión del canal HCN3 en sistemas heterólogos. Sin embargo, este hecho no significa que el canal HCN3 no sea funcional en sus tejidos nativos, es posible que requiera de algunas proteínas accesorias para mejorar su nivel expresión. Por ejemplo, la KCTD3 es una proteína perteneciente a la familia de canales de K⁺ que presenta un dominio de unión al canal HCN3, la interacción de ambas proteínas incrementa la expresión funcional del HCN3. La KCTD3 se encuentra en hipotálamo, pero

es mucho más abundante en el riñón de la rata (Cao-Ehlker et al., 2013). Sería interesante poder coexpresar en un sistema de expresión heteróloga este tipo de proteínas accesorias con el HCN3 para estudiar cómo regulan su expresión y/o función.

Por otro lado, se ha demostrado que la proteólisis puede favorecer la heteromerización entre los diferentes subtipos de canales HCN. Por ejemplo, la proteólisis específica en la región COOH-terminal del HCN2 favorece su coensamblaje con el HCN4 en el miocardio del ratón adulto para formar heterómeros funcionales (Ye y Nerbonne, 2009). Por lo tanto, al igual que el HCN2 de corazón, el HCN1 y HCN3 renal podrían sufrir esta modificación postraduccional (procesamiento proteolítico) para formar canales heteromultiméricos. En algunos casos la formación de heteromultímeros HCN les permite adquirir modulación por AMPc a aquellos isotipos que tienen una regulación débil por nucleótidos cíclicos y se combinan con un isotipo que es altamente sensible a esta regulación, como en el caso del HCN2 y HCN4 en el corazón (Ye y Nerbonne, 2009). Sin embargo, en el caso del HCN1 y HCN3, ambos son débilmente regulados por AMPc. Es posible que la formación de un heteromultímero entre estos dos canales le ayude a mejorar el nivel de expresión funcional al HCN3. En nuestro laboratorio, hemos iniciado una serie de estudios a través de técnicas electrofisiológicas que nos permitan ver la funcionalidad de esta combinación de canales: HCN1/ HCN3/ HCN1 C-truncado/ HCN3 N-truncado en sistemas de expresión heteróloga.

Por otro lado, en cuanto a la distribución del HCN1 y HCN3, ambos canales se encontraron en las membranas apicales de los túbulos proximales corticales. El túbulo proximal es una región muy importante para el transporte de Na^+ debido a que reabsorbe casi todos los sustratos del filtrado glomerular (aminoácidos, glucosa, solutos y proteínas de bajo peso molecular) de manera acoplada a la reabsorción de Na^+ . Este segmento tubular también juega un papel clave en la regulación del equilibrio ácido-base mediante la reabsorción del 80% del HCO_3^- filtrado, también de manera acoplada a la reabsorción de Na^+ . Por lo tanto, los canales HCN1 y HCN3 podrían ser una nueva ruta transcelular para la reabsorción de Na^+ que contribuye a la homeostasis ácido-base y que puede ser regulada sin comprometer la reabsorción de otros solutos orgánicos e inorgánicos. En condiciones basales ni el HCN1, ni el HCN3 se encontraron en los túbulos distales de la nefrona. Sin embargo, el HCN3 amplió su distribución a los túbulos distales y conductos colectores corticales en ratas hipercalémicas. La expresión en otros segmentos de la nefrona (diferente a la distribución basal) por efecto de alguna condición metabólica, se ha observado en otros miembros de la familia HCN. Tal es el caso del HCN2, que en condiciones basales no se localiza en el asa de Henle descendente delgada, pero su expresión en este segmento de la nefrona es inducida por efecto de

la acidosis metabólica crónica (Carrisoza- Gaytán et al., 2011). La nefrona distal cortical es la región más importante para la regulación fina de la reabsorción de Na^+ y la secreción de K^+ . La secreción K^+ es dependiente de Na^+ , y en hipercalemia la excreción de K^+ incrementa hasta un 180%. Por lo tanto, la expresión inducida del HCN3 en la nefrona distal cortical por efecto de la hipercalemia, podría deberse a su participación en la reabsorción de Na^+ , como se discutirá más adelante, contribuyendo de esta manera a la excreción de K^+ en esta región de la nefrona.

11.2 Regulación de la expresión del HCN3 y su papel en la reabsorción de HCO_3^-

Los canales HCN conducen iones Na^+ y K^+ con una tasa de permeabilidad $\sim 1:4$, sin embargo, a pesar de esta preferencia por el K^+ , los canales HCN generan una corriente entrante de Na^+ en condiciones fisiológicas debido a que el gradiente electroquímico de Na^+ es mayor (Pape, 1996; Wahl-Schott y Biel, 2009). A pesar de esto, una característica de estos canales es que su conductancia es altamente sensible a los niveles externos de K^+ . Una reducción de K^+ debajo de los niveles extracelulares normales (3-4 mM) resulta en una dramática disminución en la magnitud de las corrientes entrantes HCN, mientras que un aumento del K^+ externo las incrementa (Frace et al., 1992; Ludwig et al., 1998). El metabolismo del K^+ también puede modificar los gradientes electroquímicos de NH_4^+ y, más importante, modular las corrientes de los canales de HCN con el fin de mantener la homeostasis de electrolitos y/o ácido-base en los epitelios renales.

En un intento por dilucidar el papel de los canales de HCN en la homeostasis de Na^+ , K^+ y/o ácido base, evaluamos la adaptación en la abundancia proteica del HCN3 en el tejido renal ante cuatro condiciones metabólicas, estrechamente relacionadas entre sí: la hipocalemia, la hipercalemia, la restricción de Na^+ y la acidosis metabólica.

En este trabajo la dieta deficiente de K^+ (DK) aumentó la abundancia del HCN3 sólo en las membranas plasmáticas de la médula externa renal (asa de Henle ascendente gruesa medular). Es conocido que la hipocalemia producida por la deficiencia de K^+ (DK) induce alcalosis metabólica en ratas y seres humanos debido a un incremento en la reabsorción de NaHCO_3 a lo largo de toda la nefrona. La reabsorción de NaHCO_3 ocurre a través del intercambiador luminal NHE-2/NHE-3 y los cotransportadores basolaterales NBCe1 y NBCn1. DK incrementa la expresión y/o actividad de estas proteínas en el asa de Henle ascendente gruesa medular, en especial induce la expresión del cotransportador NBCe1 en casi todos los segmentos de la nefrona: el túbulo proximal, asa de Henle ascendente gruesa medular, túbulo contorneado distal, conducto colector de la médula externa y

conducto colector de la médula interna (Nakamura et al, 1998a; Nakamura et al 1998b, Amlal et al., 2000; Elkjær et al., 2002).

Por otro lado, DK también altera el transporte de Na^+ en la nefrona. Disminuye la reabsorción de Na^+ y NH_4^+ hacia el espacio intersticial en la médula externa (Amlal et al., 1998) debido a un decremento en la expresión del cotransportador apical NKCC2 en el asa de Henle ascendente gruesa, lo cual provoca una alteración en la concentración urinaria (Amlal et al., 2000; Elkjaer et al., 2002). Aunque la capacidad para reabsorber NaCl por las membranas lumbales del asa de Henle ascendente gruesa se reduce notablemente en DK (Gutsche et al., 1984; Unwin et al., 1994), la reabsorción de NaHCO_3 en las membranas basolaterales no se abate, al contrario, incrementa. La reabsorción de NaHCO_3 es energizada por la Na^+/K^+ ATPasa basolateral en las células del asa de Henle ascendente gruesa. Durante la DK, la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa incrementa para mantener la reabsorción de NaHCO_3 (Linas et al., 1979; Greger, 1985; Hayashi y Katz, 1987; Buffin-Meyer et al., 1996; Elkjaer et al., 2002). Por lo tanto, es probable que el incremento en la expresión del HCN3 en el asa de Henle ascendente gruesa medular por DK observada en este trabajo, se deba a que la entrada basolateral de Na^+ por el HCN3 en este segmento contribuya a mantener la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa para energizar la reabsorción de NaHCO_3 durante la hipocalcemia, produciendo y/o manteniendo la alcalosis metabólica (Fig. 36B).

Con base en nuestros resultados, la dieta crónica alta en K^+ (AK, 10%) causó hipercalemia en los animales experimentales. Generalmente se ha observado que la hipercalemia se desarrolla bajo dietas agudas con alto K^+ (hrs), porque a largo plazo los animales logran adaptarse, aumentando la secreción y excreción urinaria de K^+ (Palmer y Frindt, 1999). Sin embargo, también se ha demostrado que altos porcentajes de K^+ en la dieta (10%) administrada de forma crónica (10-14 días) produce una hipercalemia sin ocasionar daño renal (DuBose y Good, 1991, 1992). Es sabido que un aumento en la ingesta de K^+ incrementa la tasa de secreción de este ion en la nefrona distal (Stanton y Giebisch, 1982; Najjar, 2005). Esto lo vimos reflejado, al encontrar en nuestros resultados que la excreción fraccional urinaria promedio de K^+ (EF_K) fue ~9 veces mayor en los animales sometidos a dieta AK con respecto al grupo control (NK).

La dieta AK también incrementó la abundancia proteica del HCN3 en la corteza renal, es decir en la membrana apical de los túbulos proximales, como se visualizó a través de los ensayos de inmunofluorescencia. En estudios previos se demostró que una carga elevada de K^+ plasmático inhibe el transporte de NaHCO_3 y la reabsorción pasiva de NaCl en el túbulo proximal (Stokke et al., 1993). Por lo tanto, el incremento del HCN3 que observamos en los túbulos proximales corticales

podría originarse para compensar la entrada de Na^+ que es inhibida en este segmento de la nefrona por la dieta AK. La entrada de Na^+ es muy importante para mantener la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa, y a su vez, el potencial de la membrana en los túbulos proximales. El potencial de la membrana de las células del túbulo proximal se encuentra entre -50 y -70 mV (Frömter, 1984; Bello-Reuss y Weber, 1986; Merot et al., 1988), sin embargo, es muy susceptible a despolarizarse debido a la gran carga de Na^+ que se reabsorbe de manera acoplada a moléculas orgánicas (glucosa, aminoácidos, citratos etc). Ante esta entrada de Na^+ al túbulo proximal y, por lo tanto, la despolarización de la membrana, se activan varios canales de K^+ dependientes de voltaje (Kv), así como la Na^+/K^+ ATPasa, los cuales hiperpolarizan la membrana y regresan al potencial electroquímico basal de la célula. Los umbrales de activación del canal HCN3 son muy cercanos al potencial de membrana de las células del túbulo proximal, y esas ligeras fluctuaciones en el potencial eléctrico de la membrana podrían lograr la activación de estos canales. Por lo tanto, es posible que el aumento en la expresión del HCN3 en los túbulos proximales corticales esté acoplada a la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa y canales Kv para mantener el potencial de la membrana (Fig. 36A).

Es conocido que un efecto regulador importante de la hipercalemia es la disminución de la transferencia de NH_4^+ y el incremento del transporte de K^+ de las asas de Henle hacia los conductos colectores de la médula renal. De esta manera, en una dieta AK, la acumulación medular y la secreción de NH_4^+ disminuye, mientras que la concentración medular y la secreción de K^+ aumenta en los conductos colectores (DuBose y Good, 1991). Paradójicamente al igual que en la deficiencia de K^+ , la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa se incrementa en el asa de Henle ascendente gruesa medular por efecto del alto K^+ (Silva et al., 1973; Garg et al., 1982), sin embargo en este caso, la Na^+/K^+ ATPasa favorece la absorción y el reciclaje de K^+ en la médula externa (mecanismo de contracorriente), lo cual determina la osmolaridad de la orina.

Con base en nuestros resultados, AK incrementó la abundancia proteica del HCN3 en la médula externa renal (membranas plasmáticas del asa de Henle ascendente gruesa medular). Es posible que el incremento en la expresión del HCN3 en esta región de la nefrona permita una mayor reabsorción de Na^+ para estimular y/o retroalimentar la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa, contribuyendo de esta forma al reciclaje medular de K^+ y a la generación del gradiente electroquímico necesario para la secreción de K^+ por los canales secretores del conducto colector durante AK (Fig. 35B). AK indujo la expresión del HCN3 en la membrana basolateral de las células principales de los túbulos distales y del conducto colector cortical. Las células principales son las

secretoras de K^+ en la nefrona distal, esta secreción incrementa en AK y depende de la entrada de Na^+ , el cual genera el gradiente electroquímico para que los canales secretores de K^+ se activen. Nosotros proponemos que la expresión del HCN3 en las células principales de la nefrona distal en AK, se debe a que bajo esta condición metabólica se necesita una mayor entrada de Na^+ para estimular la secreción de K^+ .

Pareciera paradójico que tanto en AK como en DK, se observen resultados similares en cuanto al incremento del HCN3 en la nefrona. Sin embargo, la expresión de algunas proteínas de membrana en el epitelio renal, como la bomba de Na^+/K^+ ATPasa y el cotransportador NCC, también está regulada en la misma dirección, tanto en la hipocalcemia como en la hipercalcemia (Silva et al., 1973; Elkjaer et al., 2002; Frindt y Palmer, 2010). Por lo tanto, no es sorprendente que la regulación del HCN3 en el asa de Henle ascendente gruesa medular por DK y en el túbulo proximal y asa de Henle ascendente gruesa medular por AK, responda aparentemente igual pero a diferentes condiciones metabólicas.

La carga plasmática de K^+ está estrechamente relacionada con el balance ácido-base. La hipocalcemia se asocia con el desarrollo de alcalosis metabólica, mientras que la hipercalcemia produce acidosis metabólica (Tannen, 1970; Tanen, 1987). La actividad de los canales HCN depende del pH intracelular (pH_i). Los H^+ intracelulares desplazan su dependencia del voltaje de activación hacia potenciales más hiperpolarizados, disminuyendo su velocidad de apertura. Los H^+ inhiben a los canales HCN mediante la unión a una histidina titulable que se encuentra en el asa citoplásmica entre los segmentos S4-S5. El pK_a para el sitio de unión de H^+ en el HCN2 es de 7.6 (Zong et al., 2001). Dado que en los animales hipocalémicos se desarrolla una acidificación intracelular, se esperaría una disminución en las corrientes catiónicas del canal HCN3, aunado a esto, se encuentra el hecho de que el K^+ externo por debajo de los niveles normales (3-4 mM) también reduce la magnitud de las corrientes HCN. Por lo tanto, el incremento de la abundancia proteica para el canal HCN3 que observamos durante las dietas DK, sugiere una respuesta compensatoria ante la disminución de la actividad del canal en este segmento. Aunque la sensibilidad de los canales HCN al pH_i depende de las concentraciones intracelulares de AMPc, el HCN1 HCN3 son débilmente afectados por AMPc (Wahl-Schott y Biel, 2009). El pH intracelular (pH_i) no se ha determinado en las células epiteliales renales proximales bajo condiciones de alto K^+ o hipercalcemia. Sin embargo, en las células epiteliales el pH aumenta de 7.12 a 7.3 cuando la concentración de K^+ peritubular llega a 50 mEq/L en el túbulo contorneado proximal de la rata

(Alpern, 1985). En AK, el K^+ plasmático alcanzó 5.43 mE/L, por lo tanto, el pHi bajo esta condición metabólica será casi el mismo que el pHi en condiciones control (pHi 7.12).

La acidosis metabólica crónica (AMC) inducida en nuestras ratas experimentales por la administración de NH_4Cl se confirmó por una reducción del pH plasmático y urinario, con respecto al grupo control. El modelo se ajustó a la conservación de la electroneutralidad, por lo que una ingesta elevada de Cl^- produjo la pérdida de HCO_3^- plasmático. Por lo tanto, las ratas con AMC presentaron una hipercloremia y una concentración plasmática de HCO_3^- significativamente menor que la del grupo control. Se ha demostrado que en respuesta y para compensar la disminución del pH, en las ratas con AMC hay un aumento en la expresión del intercambiador NHE3 y el cotransportador NBCn1 en el asa de Henle ascendente gruesa, incrementando a su vez la reabsorción de HCO_3^- . Aunque, el cotransportador de Na^+/HCO_3^- del túbulo proximal (NBCe1) no se regula por AMC (Ambühl et al., 1996; Kwon et al., 2002). En el presente trabajo encontramos que el HCN3 incrementó su abundancia en las membranas plasmáticas de la médula externa (asa de Henle ascendente gruesa medular). Esto podría deberse a la necesidad de incrementar la entrada de Na^+ para permitir una mayor reabsorción de HCO_3^- . Este hallazgo, apoyaría el papel fisiológico del HCN3 en la reabsorción de Na^+ acoplada a la del HCO_3^- , al igual que en DK, donde también se observó un incremento de este canal en la médula externa.

Por otro lado, los animales experimentales sometidos a una dieta deficiente de NaCl (DS) compensaron esta condición fisiológica con una disminución en la excreción urinaria de Na^+ y Cl^- , manteniendo así las concentraciones plasmáticas de estos iones en los niveles basales. La dieta DS no tuvo ningún efecto sobre la expresión del canal HCN3 en el riñón de la rata, lo que sugiere que hay otras vías que están siendo reguladas para mantener la homeostasis de Na^+ . Muy posiblemente sean cotransportadores o canales de la nefrona distal como el NCC o el ENaC, pues esta región de la nefrona es la encargada de regular la reabsorción fina de Na^+ . Además se ha reportado que cambios en la ingesta de Na^+ regulan la abundancia proteica de estas proteínas en los epitelios renales (Frindt y Palmer, 2009; Lai et al., 2012).

Finalmente, con base en nuestros resultados proponemos que los canales HCN1 y HCN3 constituyen una vía de entrada de Na^+ en los epitelios renales, que no participan directamente en la adaptación renal crónica a la disminución en la ingesta de NaCl, pero que sí podrían contribuir a la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa para mantener el potencial de la membrana, así como a la reabsorción de HCO_3^- para mantener la homeostasis ácido-base en el riñón de la rata (Fig. 36A yB).

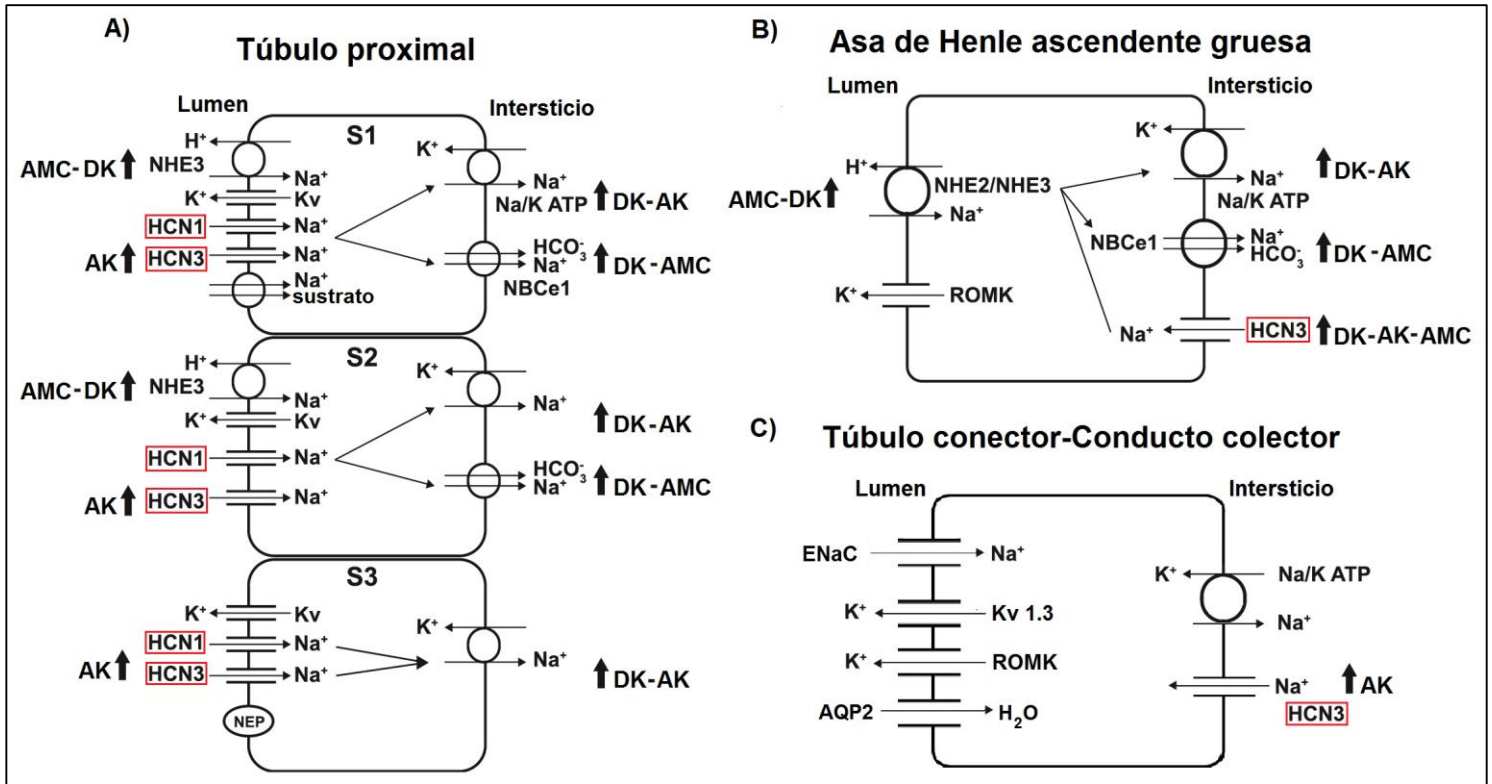


Figura 35. Representación esquemática de la regulación del HCN3 en el riñón de la rata bajo la depleción de K⁺ (DK), alto K⁺ (AK) y acidosis metabólica crónica (AMC). Se indica el aumento (↑) o disminución (↓) en la expresión de las diferentes proteínas involucradas en el transporte de Na⁺, K⁺ y HCO₃⁻ en los distintos segmentos tubulares donde se localizan los canales HCN1 y/o HCN3. El incremento en la expresión del HCN3 en la membrana apical de los túbulos proximales (A) y en la membrana basolateral del asa gruesa ascendente de Henle (B) por AK, podría deberse a que la entrada de Na⁺ por los canales HCN se encuentra acoplada a la actividad de la Na/K ATPasa, cuya expresión aumenta tanto en AK como en DK. (B) DK y AMC incrementan la expresión del HCN3 en la membrana basolateral del asa de Henle ascendente gruesa medular, probablemente debido a que permiten la entrada de Na⁺ acoplada a la reabsorción de HCO₃⁻ a través del NBCe1, la expresión de este cotransportador también aumenta bajo estas dos condiciones metabólicas. El incremento en la reabsorción de NaHCO₃ contribuye a mantener la alcalosis metabólica en DK o a mitigar la disminución del pH en la AMC. (C) AK induce la expresión del canal HCN3 en la membrana basolateral de las células principales del túbulo conector y conducto colector cortical, posiblemente para incrementar la reabsorción de Na⁺ en la nefrona distal y contribuir a la secreción de K⁺ a través de los canales Kv 1.3 y ROMK.

12. CONCLUSIONES

- Los canales HCN1 y HCN3 se detectaron en la corteza y la médula externa renal, donde sufren un procesamiento proteolítico dirigido al extremo COOH-terminal (HCN1-C truncado) y NH₂-terminal (HCN3-N truncado). Los HCN-truncados fueron más abundantes que los canales completos en el tejido renal.
- El canal HCN3 se encontró en mayor abundancia que el HCN1 en el riñón de la rata. Ambos canales colocalizaron en las membranas del borde en cepillo del túbulo proximal, mientras que sólo el HCN3 se localizó adicionalmente en la membrana basolateral del asa de Henle ascendente gruesa.
- Tanto la dieta deficiente de K⁺ (DK) como la acidosis metabólica crónica (AMC) incrementaron la abundancia proteica del HCN3 en el asa de Henle ascendente gruesa medular.
- La dieta con alto K⁺ (AK) incrementó la abundancia proteica del HCN3 en los túbulos proximales corticales y el asa de Henle ascendente gruesa medular.
- La dieta AK indujo la expresión del canal HCN3 en la membrana basolateral de los túbulos distales y del conducto colector cortical.
- La depleción de Na⁺ no tuvo ningún efecto sobre la expresión del canal HCN3 en el riñón de la rata, lo que sugiere que estos canales no participan directamente en la adaptación renal crónica a la disminución en la ingesta de NaCl.
- Nuestros resultados contribuyen a la identificación de nuevos canales de Na⁺ en los epitelios renales, la regulación de su abundancia proteica por condiciones metabólicas asociadas como la hipocalcemia, la hipercalemia y la AMC, nos ayudan a dilucidar su papel fisiológico en la homeostasis del Na⁺, K⁺ y el balance ácido-base en el riñón de la rata.
- Con base en nuestros resultados proponemos que el papel fisiológico de los canales HCN en los epitelios renales es permitir la entrada de Na⁺ necesaria para la reabsorción de HCO₃⁻, la cual incrementa bajo DK y AMC. De esta manera, los canales HCN contribuirían a mantener la alcalosis metabólica o a compensar la disminución de pH en la AMC. En AK

permiten una mayor reabsorción de Na⁺ para estimular y/o retroalimentar la actividad de la Na⁺/K⁺ ATPasa, contribuyendo de esta forma al reciclaje medular de K⁺ y a la generación del gradiente electroquímico necesario para la secreción de K⁺.

13. LITERATURA CITADA

- Adam, W. R., Koretsky, A. P., & Weiner, M. W. (1986). 31P-NMR in vivo measurement of renal intracellular pH: effects of acidosis and K⁺ depletion in rats. *The American Journal of Physiology*, 251(5 Pt 2), F904-10.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, Raff M., Roberts K., & Walker P. (2006). *Introducción a la Biología Celular*. Ed. Panamericana. Edición en castellano. España.
- Alpern, R. J. (1985). Mechanism of basolateral membrane H⁺/OH⁻/HCO₃⁻ transport in the rat proximal convoluted tubule. A sodium-coupled electrogenic process. *The Journal of General Physiology*, 86(5), 613–36.
- Altomare, C., Terragni, B., Brioschi, C., Milanesi, R., Pagliuca, C., Viscomi, C., Moroni, A., Baruscotti, M., & DiFrancesco, D. (2003). Heteromeric HCN1-HCN4 channels: a comparison with native pacemaker channels from the rabbit sinoatrial node. *The Journal of Physiology*, 549 (Pt 2), 347–359.
- Ambühl, P., Amemiya, M., Danczkay, M., Lötscher, M., Kaissling, B., Moe, O., Preisig, P.A., & Alpern, R. (1996). Chronic metabolic acidosis increases NHE3 protein abundance in rat kidney. *The American Journal of Physiology*, 271(4 Pt 2), 25.
- Amlal, H., Habo, K., & Soleimani, M. (2000). Potassium deprivation upregulates expression of renal basolateral Na(+)-HCO₃⁻ cotransporter (NBC-1). *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 279(3), F532-43.
- Amlal, H., Wang, Z., & Soleimani, M. (1998). Potassium depletion downregulates chloride-absorbing transporters in rat kidney. *J Clin Invest*, 101(5), 1045–54.
- Aronson, P. S., & Giebisch, G. (1997). Mechanisms of chloride transport in the proximal tubule. *The American Journal of Physiology*, 273(2 Pt 2), F179-92.
- Attmane-Elakeb, A., Chambrey, R., Tsimaratos, M., Leviel, F., Blanchard, A., Warnock, D. G., Paillard, M., & Podgevin, R. A. (1996). Isolation and characterization of luminal and basolateral plasma membrane vesicles from the medullary thick ascending loop of Henle. *Kidney International*, 50(3), 1051–7.
- Bello-Reuss, E., & Weber M.R. (1986). Electrophysiological studies on primary cultures of proximal tubule cells. *Am J Physiol*, 251(3 Pt 2), F490–8.
- Bia, M. J., & DeFronzo, R. A. (1981). Extrarenal potassium homeostasis. *The American Journal of Physiology*, 240(4), F257-68.
- Biagi, B. A., & Sohtell, M. (1986). Electrophysiology of basolateral bicarbonate transport in the rabbit proximal tubule. *The American Journal of Physiology*, 250(2 Pt 2), F267-72.
- Biel, M., Wahl-Schott, C., Michalakakis, S., & Zong, X. (2009). Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiological Reviews*, 89(3), 847–85.
- Boettger, T., Hübner, C. A., Maier, H., Rust, M. B., Beck, F. X., & Jentsch, T. J. (2002). Deafness and renal tubular acidosis in mice lacking the K-Cl co-transporter Kcc4. *Nature*, 416(6883), 874–878.
- Bois, P., Renaudon, B., Baruscotti, M., Lenfant, J., & DiFrancesco, D. (1997). Activation of f-channels by cAMP analogues in macropatches from rabbit sino-atrial node myocytes. *The Journal of Physiology*, 501(Pt 3), 565–71.

- Bolívar, J. J., Tapia, D., Arenas, G., Castañón-Arreola, M., Torres, H., & Galarraga, E. (2008). A hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated, (Ih-like) cationic current and HCN gene expression in renal inner medullary collecting duct cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 294(4), C893–C906.
- Booth, A.G., & Kenny, A.J. (1974). A rapid method for the preparation of microvilli from rabbit kidney. *Biochem J*, 142(3), 575–81.
- Boron, A., & Boulpaep, E.L. (2009). *Medical physiology: a cellular and molecular approach*. 2nd edn. Editorial, Saunders Elsevier.
- Bourgeois, S., Meer, L. Van, Wootla, B., Bloch-Faure, M., Chambrey, R., Shull, G. E., Gawenis, L.R., & Houillier, P. (2010). NHE4 is critical for the renal handling of ammonia in rodents. *Journal of Clinical Investigation*, 120(6), 1895–1904.
- Brandis, M., Keyes, J., & Windhager, E. E. (1972). Potassium-induced inhibition of proximal tubular fluid reabsorption in rats. *The American Journal of Physiology*, 222(2), 421–7.
- Brown, D., Hirsch, S., & Gluck, S. (1988). Localization of a proton-pumping ATPase in rat kidney. *Journal of Clinical Investigation*, 82(6), 2114–2126.
- Brown, R. S. (1986). Extrarenal potassium homeostasis. *Kidney International*, 30(1), 116–27.
- Buffin-Meyer B., Marsy S., Barlet-Bas C., Cheval, L., Younes-Ibrahim, M., Rajerison, R., & Doucet, A. (1996). Regulation of renal Na⁺/K⁺-ATPase in rat thick ascending limb during K⁺ depletion: evidence for modulation of Na⁺ affinity. *J Physiol*, 490(Pt 3), 623–32.
- Calejo, A. I., Reverendo, M., Silva, V. S., Pereira, P. M., Santos, M. A. S., Zorec, R., & Gonçalves, P. P. (2014). Differences in the expression pattern of HCN isoforms among mammalian tissues: Sources and implications. *Molecular Biology Reports*, 41(1), 297–307.
- Camici, P. G., Gloekler, S., Levy, B. I., Skolidis, E., Tagliamonte, E., Vardas, P., & Heusch, G. (2016). Ivabradine in chronic stable angina: Effects by and beyond heart rate reduction. *International Journal of Cardiology*, 215, 1–6.
- Cao-Ehlker, X., Zong, X., Hammelmann, V., Gruner, C., Fenske, S., Michalakakis, S., Wahl-Schott, C., & Biel, M. (2013). Up-regulation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 3 (HCN3) by specific interaction with K⁺ channel tetramerization domain-containing protein 3 (KCTD3). *Journal of Biological Chemistry*, 288(11), 7580–7589.
- Carraro-Lacroix, L. R., & Malnic, G. 2010). Acid-base transport by the renal distal nephron. *Journal of Nephrology*, 23 Suppl 16, S19-27.
- Carrisoza-Gaytán, R., Rangel, C., Salvador, C., Saldaña-Meyer, R., Escalona, C., Satlin, L. M., Liu, W., Zvilowitz, B., Trujillo, J., Bobadilla, N.A., & Escobar, L. I. (2011). The hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated HCN2 channel transports ammonium in the distal nephron. *Kidney International*, 80(8), 832–840.
- Carrisoza-Gaytan, R., Salvador, C., Satlin, L. M., Liu, W., Zvilowitz, B., Bobadilla, N. A., Trujillo, J., & Escobar, L. I. (2010). Potassium secretion by voltage-gated potassium channel Kv1.3 in the rat kidney. *AJP: Renal Physiology*, 299(1), F255–F264.
- Chen, S., Wang, J., & Siegelbaum, S. A. (2001). Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of HCN1 and HCN2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotide. *The Journal of General Physiology*, 117(5), 491–504.
- Curthoys, N. P., & Moe, O. W. (2014). Proximal tubule function and response to acidosis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 9(9), 1627–1638.
- DiFrancesco, D. (1986). Characterization of single pacemaker channels in cardiac sino-atrial node cells. *Nature*, 324(6096), 470–473.

- DiFrancesco, D. (1993). Pacemaker Mechanisms in Cardiac Tissue. *Annual Review of Physiology*, 55(1), 455–472.
- DiFrancesco, D., & Mangoni, M. (1994). Modulation of single hyperpolarization-activated channels (i(f)) by cAMP in the rabbit sino-atrial node. *The Journal of Physiology*, 474(3), 473–82.
- Dinour, D., Chang, M.-H., Satoh, J., Smith, B. L., Angle, N., Knecht, A., Serban, I., Holtzman, E.J., & Romero, M. F. (2004). A Novel Missense Mutation in the Sodium Bicarbonate Cotransporter (NBCe1/SLC4A4) Causes Proximal Tubular Acidosis and Glaucoma through Ion Transport Defects. *Journal of Biological Chemistry*, 279(50), 52238–52246.
- Doucet, A., & Marsy, S. (1987). Characterization of K-ATPase activity in distal nephron: stimulation by potassium depletion. *The American Journal of Physiology*, 253(3 Pt 2), F418-23.
- DuBose, T. D., & Good, D. W. (1991). Effects of chronic hyperkalemia on renal production and proximal tubule transport of ammonium in rats. *The American Journal of Physiology*, 260(5 Pt 2), F680-7.
- DuBose, T. D., & Good, D. W. (1992). Chronic hyperkalemia impairs ammonium transport and accumulation in the inner medulla of the rat. *Journal of Clinical Investigation*, 90(4), 1443–1449.
- DuBose, T.D., & Alpern, R.J. (2001). *Renal tubular acidosis*. In: The metabolic and molecular bases of inherited disease. New York: McGraw-Hill; p. 4983–5021.
- Edwards, R.M., Pullen M., & Nambi P. (1999). Distribution of neutral endopeptidase activity along the rat and rabbit nephron. *Pharmacology*, 59(1),45–50.
- Eiam-Ong, S., Hilden, S. A., Johns, C. A., & Madias, N. E. (1993). Stimulation of basolateral Na(+)-HCO₃⁻ cotransporter by angiotensin II in rabbit renal cortex. *The American Journal of Physiology*, 265(2 Pt 2), F195-203.
- 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. (2007). Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channels in Pancreatic β -Cells. *Molecular Endocrinology*, 21(3), 753–764.
- Elkjær, M.-L., Kwon, T.-H., Wang, W., Nielsen, J., Knepper, M. A., Frøkiær, J., & Nielsen, S. (2002). Altered expression of renal NHE3, TSC, BSC-1, and ENaC subunits in potassium-depleted rats. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 283(6), F1376–F1388.
- Escobar, L., Mejía, N., Gil, H., & Santos, F. (2013). Distal renal tubular acidosis: a hereditary disease with an inadequate urinary H⁺ excretion. *Nefrología : Publicacion Oficial de La Sociedad Espanola Nefrología*, 33(3), 289–96.
- Esteva-Font, C., Torra Balcells, R., & Fernández-Llama, P. (2007). Sodium transporters and aquaporins: future renal biomarkers?. *Medicina Clínica*, 129(11), 433–7.
- Férraille, E., Mordasini, D., Gonin, S., Deschênes, G., Vinciguerra, M., Doucet, A., Vandewalle, A., Summa, V., Verrey, F., & Martin, P.-Y. (2003). Mechanism of control of Na,K-ATPase in principal cells of the mammalian collecting duct. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 986, 570–8.
- Frace, A.M., Maruoka, F., & Noma, A. (1992). External K⁺ increases Na⁺ conductance of the hyperpolarization-activated current in rabbit cardiac pacemaker cells. *Pflugers Arch*, 421(1), 94–6.
- Frère, S. G. A., Kuisle, M., & Lüthi, A. (2004). Regulation of Recombinant and Native Hyperpolarization-Activated Cation Channels. *Molecular Neurobiology*, 30(3), 279–306.
- Frindt, G., Houde, V., & Palmer, L. G. (2011). Conservation of Na⁺ vs. K⁺ by the rat cortical collecting duct. *AJP: Renal Physiology*, 301(1), F14–F20.
- Frindt, G., & Palmer, L. G. (1987). Ca-activated K channels in apical membrane of mammalian CCT, and their role in K secretion. *The American Journal of Physiology*, 252(3 Pt 2), F458-67.
- Frindt, G., & Palmer, L. G. (2009). Surface expression of sodium channels and transporters in rat kidney: effects of

- dietary sodium. *AJP: Renal Physiology*, 297(5), F1249–F1255.
- Frindt, G., & Palmer, L. G. (2010). Effects of dietary K on cell-surface expression of renal ion channels and transporters. *AJP: Renal Physiology*, 299(4), F890–F897.
- Frömter, E. (1984). Viewing the kidney through microelectrodes. *Am J Physiol*, 247(5), F695–705.
- Garvin, J. L. (1991). Angiotensin stimulates bicarbonate transport and Na⁺/K⁺ ATPase in rat proximal straight tubules. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 1(10), 1146–52.
- Garg, L.C., Mackie S., & Tisher C.C. (1982). Effect of low potassium-diet on Na-K-ATPase in rat nephron segments. *Pflugers Arch*, 394(2), 113–7.
- Gasparini, S., & DiFrancesco, D. (1997). Action of the hyperpolarization-activated current (I_h) blocker ZD 7288 in hippocampal CA1 neurons. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, 435(1), 99–106.
- Gennari, F. J., & Cohen, J. J. (1975). Role of the kidney in potassium homeostasis: lessons from acid-base disturbances. *Kidney International*, 8(1), 1–5.
- Giebisch, G. H., & Wang, W.H. (2010). Potassium transport--an update. *Journal of Nephrology*, 23 Suppl 16, S97-104.
- Good, D. W. (1987). Effects of potassium on ammonia transport by medullary thick ascending limb of the rat. *Journal of Clinical Investigation*, 80(5), 1358–1365.
- Good, D. W., & Burg, M. B. (1984). Ammonia production by individual segments of the rat nephron. *Journal of Clinical Investigation*, 73(3), 602–610.
- Good, D. W., & Watts, B. A. (1996). Functional roles of apical membrane Na⁺/H⁺ exchange in rat medullary thick ascending limb. *The American Journal of Physiology*, 270(4 Pt 2), F691-9.
- Good, D. W. (1988). Active absorption of NH₄⁺ by rat medullary thick ascending limb: inhibition by potassium. *American Journal of Physiology*, 255(1 Pt 2), F78-87
- Gravante, B., Barbuti, A., Milanesi, R., Zappi, I., Viscomi, C., & DiFrancesco, D. (2004). Interaction of the Pacemaker Channel HCN1 with Filamin A. *Journal of Biological Chemistry*, 279(42), 43847–43853.
- Greenlee, M., Wingo, C. S., McDonough, A. A., Youn, J.-H., & Kone, B. C. (2009). Narrative review: evolving concepts in potassium homeostasis and hypokalemia. *Annals of Internal Medicine*, 150(9), 619–25.
- Greger, R. (1985). Ion transport mechanisms in thick ascending limb of Henle's loop of mammalian nephron. *Physiol Rev*, 65(3), 760–97.
- Gutsche, H.U., Peterson, L.N., Sauerwald, K.H., & Levine, D.Z. (1984). Impaired diluting capacity of the thick ascending limb during loop bicarbonate and nitrate perfusion in vivo. *Can J Physiol Pharmacol*, 62(11), 1416–22.
- Guyton, A.C., & Hall, J. E. (2011). *Textbook of Medical Physiology*. 11th edn. Editorial Elsevier.
- Hayashi, M., & Katz, A.I. (1987) The kidney in potassium depletion. I. Na⁺-K⁺-ATPase activity and [3H]ouabain binding in MCT. *Am J Physiol*, 252 (3 Pt 2), F437–46.
- He, P., Deng, J., Zhong, X., Zhou, Z., Song, B., & Li, L. (2012). Identification of a hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel and its subtypes in the urinary bladder of the rat. *Urology*, 79(6), 1411.e7-13.
- Horwitz, G. C., Lelli, A., Géléoc, G. S. G., & Holt, J. R. (2010). HCN channels are not required for mechanotransduction in sensory hair cells of the mouse inner ear. *PLoS ONE*, 5(1), 1–7.
- Hulter, H. N., Toto, R. D., Ilnicki, L. P., & Sebastian, A. (1983). Chronic hyperkalemic renal tubular acidosis induced by KCl loading. *The American Journal of Physiology*, 244(3), F255-64.

- Hurtado, R., Bub, G., & Herzlinger, D. (2010). The pelvis-kidney junction contains HCN3, a hyperpolarization-activated cation channel that triggers ureter peristalsis. *Kidney International*, 77(6), 500–8.
- Jamison, R. L., Lacy, F. B., Pennell, J. P., & Sanjana, V. M. (1976). Potassium secretion by the descending limb or pars recta of the juxtamedullary nephron in vivo. *Kidney International*, 9(4), 323–32.
- Jones, J. W., Sebastian, A., Hulter, H. N., Schambelan, M., Sutton, J. M., & Biglieri, E. G. (1982). Systemic and renal acid-base effects of chronic dietary potassium depletion in humans. *Kidney International*, 21(2), 402–10.
- Kamm, D. E., & Strobe, G. L. (1973). Glutamine and glutamate metabolism in renal cortex from potassium-depleted rats. *The American Journal of Physiology*, 224(6), 1241–8.
- Karet, F. E., Gainza, F. J., Györy, A. Z., Unwin, R. J., Wrong, O., Tanner, M. J., Nayir, A., Alpay, H., Santos, F., Hulton, S.A., Bakaloglu, A., Ozen, S., Cunningham, M.J., Di Pietro, A., Walker, W.G., & Lifton, R. P. (1998). Mutations in the chloride-bicarbonate exchanger gene AE1 cause autosomal dominant but not autosomal recessive distal renal tubular acidosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(11), 6337–42.
- Kellum, J. A., Song, M., & Li, J. (2004). Science review: extracellular acidosis and the immune response: clinical and physiologic implications. *Critical Care (London, England)*, 8(5), 331–6.
- Kenny, A. J., & Stephenson, S. L. (1988). Role of endopeptidase-24.11 in the inactivation of atrial natriuretic peptide. *FEBS Lett*, 232(1), 1–8.
- Khazel, A. H., McLaughlin, J. S., Suddhimondala, C., Atar, S., & Cowley, R. A. (1969). The effects of acidosis and alkalosis on cardiac output and peripheral resistance in humans. *The American Surgeon*, 35(9), 600–5.
- Kim, Y. H., Kwon, T. H., Frische, S., Kim, J., Tisher, C. C., Madsen, K. M., & Nielsen, S. (2002). Immunocytochemical localization of pendrin in intercalated cell subtypes in rat and mouse kidney. *AJP: Renal Physiology*, 283(4), F744–F754.
- Kinne, R., Kinne-Saffran, E., Schütz, H., & Schölermann, B. (1986). Ammonium transport in medullary thick ascending limb of rabbit kidney: involvement of the Na⁺,K⁺,Cl⁻-cotransporter. *The Journal of Membrane Biology*, 94(3), 279–84.
- Kinsella, J. L., & Aronson, P. S. (1981). Interaction of NH₄⁺ and Li⁺ with the renal microvillus membrane Na⁺-H⁺ exchanger. *The American Journal of Physiology*, 241(5), C220-6.
- Knepper, M. A., Kim, G.-H., & Masilamani, S. (2003). Renal tubule sodium transporter abundance profiling in rat kidney: response to aldosterone and variations in NaCl intake. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 986, 562–9.
- Knepper, M. A., Packer, R., & Good, D. W. (1989). Ammonium transport in the kidney. *Physiological Reviews*, 69(1), 179–249.
- Knöpfel, T., Guatteo, E., Bernardi, G., & Mercuri, N. B. (1998). Hyperpolarization induces a rise in intracellular sodium concentration in dopamine cells of the substantia nigra pars compacta. *The European Journal of Neuroscience*, 10(5), 1926–9.
- Koeppen, B. M. (2009). The kidney and acid-base regulation. *AJP: Advances in Physiology Education*, 33(4), 275–281.
- Koeppen, B. M., & Stanton, B. A. (2005). *Renal physiology*. 3rd edn. Editorial, Mosby.
- Kraut, J. A., & Madias, N. E. (2010). Metabolic acidosis: pathophysiology, diagnosis and management. *Nature Reviews. Nephrology*, 6(5), 274–85.
- Kriz, W., & Kaissling, B. (2013). Structural organization of mammalian kidney. In O. W. M. y C. M. Robert J. Alpern (Ed.), *Seldin and Giebisch's The Kidney: Physiology and Pathophysiology . Volumen 1*. Estados Unidos de América: Elsevier.

- Kunau, R. T., Frick, A., Rector, F. C., & Seldin, D. W. (1968). Micropuncture study of the proximal tubular factors responsible for the maintenance of alkalosis during potassium deficiency in the rat. *Clinical Science*, 34(2), 223–31.
- Kwon, T. H., Fulton, C., Wang, W., Kurtz, I., Frokiaer, J., Aalkjaer, C., & Nielsen, S. (2002). Chronic metabolic acidosis upregulates rat kidney Na-HCO cotransporters NBCn1 and NBC3 but not NBC1. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 282(2), F341-51.
- Laghmani, K., Borensztein, P., Ambühl, P., Froissart, M., Bichara, M., Moe, O. W., Alpern, R.J., & Paillard, M. (1997). Chronic metabolic acidosis enhances NHE-3 protein abundance and transport activity in the rat thick ascending limb by increasing NHE-3 mRNA. *Journal of Clinical Investigation*, 99(1), 24–30.
- Lai, L., Feng, X., Liu, D., Chen, J., Zhang, Y., Niu, B., ... Cai, H. (2012). Dietary salt modulates the sodium chloride cotransporter expression likely through an aldosterone-mediated WNK4-ERK1/2 signaling pathway. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 463(3), 477–485.
- Lazar, T. (2003). Taiz, L. & Zeiger, E. Plant physiology. 3rd edn. *Annals of Botany*, 91(6), 750–751.
- Lee Hamm, L., Hering-Smith, K. S., & Nakhoul, N. L. (2013). Acid-Base and potassium homeostasis. *Seminars in Nephrology*, 33(3), 257–264.
- Lin, D. H. (2004). Protein tyrosine kinase is expressed and regulates ROMK1 location in the cortical collecting duct. *AJP: Renal Physiology*, 286(5), F881–F892.
- Linas, S. L., Peterson, L. N., Anderson, R. J., Aisenbrey, G. A., Simon, F. R., & Berl, T. (1979). Mechanism of renal potassium conservation in the rat. *Kidney International*, 15(6), 601–11.
- Ludwig, A., Zong, X., Jeglitsch, M., Hofmann, F., & Biel, M. (1998). A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature*, 393(6685), 587–91.
- Mackenzie, B., & Erickson, J. D. (2004). Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*, 447(5), 784–95.
- McSherry, E., & Morris, R. C. (1978). Attainment and Maintenance of Normal Stature with Alkali Therapy in Infants and Children with Classic Renal Tubular Acidosis. *Journal of Clinical Investigation*, 61(2), 509–527.
- Martinez, F., Manganel, M., Montrose-Rafizadeh, C., Werner, D., & Roch-Ramel, F. (1990). Transport of urate and p-aminohippurate in rabbit renal brush-border membranes. *Am J Physiol* 258(5 Pt 2), F1145–53.
- Mennitt, P. A., Frindt, G., Silver, R. B., & Palmer, L. G. (2000). Potassium restriction downregulates ROMK expression in rat kidney. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 278(6), F916-24.
- Merot, J., Bidet M., Gachot B., Le Maout, S., Tauc, M., & Poujeol, P. (1988). Patch clamp study on primary culture of isolated proximal convoluted tubules. *Pflugers Arch*, 413(1), 51–61.
- Michels, G., Er, F., Khan, I. F., Endres-Becker, J., Brandt, M. C., Gassanov, N., Johns, D. C., & Hoppe, U. C. (2008). K⁺ Channel Regulator KCR1 Suppresses Heart Rhythm by Modulating the Pacemaker Current I_f. *PLoS ONE*, 3(1), e1511.
- Mitch, W. E. (2006). Metabolic and clinical consequences of metabolic acidosis. *Journal of Nephrology*, 19 Suppl 9, S70-5.
- Mitchell, J. H., Wildenthal, K., & Johnson, R. L. (1972). The effects of acid-base disturbances on cardiovascular and pulmonary function. *Kidney International*, 1(5), 375–89.
- Moe, O. W., Miller, R. T., Horie, S., Cano, A., Preisig, P. A., & Alpern, R. J. (1991). Differential regulation of Na/H antiporter by acid in renal epithelial cells and fibroblasts. *Journal of Clinical Investigation*, 88(5), 1703–1708.
- Momin, A., Cadiou, H., Mason, A., & McNaughton, P. A. (2008). Role of the hyperpolarization-activated current I_h in

- somatosensory neurons. *The Journal of Physiology*, 586(24), 5911–5929.
- Much, B., Wahl-Schott, C., Zong, X., Schneider, A., Baumann, L., Moosmang, S., Ludwig, A., & Biel, M. (2003). Role of Subunit Heteromerization and N-Linked Glycosylation in the Formation of Functional Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated Channels. *Journal of Biological Chemistry*, 278(44), 43781–43786.
- Najjar, F. (2005). Dietary K⁺ regulates apical membrane expression of maxi-K channels in rabbit cortical collecting duct. *AJP: Renal Physiology*, 289(4), F922–F932.
- Nakamura, S., Amlal, H., Galla, J. H., & Soleimani, M. (1998a). Colonic H⁺-K⁺-ATPase is induced and mediates increased HCO₃⁻ reabsorption in inner medullary collecting duct in potassium depletion. *Kidney International*, 54(4), 1233–9.
- Nakamura, S., Wang, Z., Galla, J. H., & Soleimani, M. (1998b). K⁺ depletion increases HCO₃⁻ reabsorption in OMCD by activation of colonic H⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase. *The American Journal of Physiology*, 274(4 Pt 2), F687–92.
- Nakhoul, N. L., Chen, L. K., & Boron, W. F. (1990). Intracellular pH regulation in rabbit S3 proximal tubule: basolateral Cl⁻-HCO₃⁻ exchange and Na⁻-HCO₃⁻ cotransport. *The American Journal of Physiology*, 258(2 Pt 2), F371-81.
- Nakhoul, N. L., Hering-Smith, K. S., Abdalnour-Nakhoul, S. M., & Hamm, L. L. (2001). Ammonium interaction with the epithelial sodium channel. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 281(3), F493-502.
- Nguyen, M. T. X., Yang, L. E., Fletcher, N. K., Lee, D. H., Kocinsky, H., Bachmann, S., Delpire, E., & McDonough, A. A. (2012). Effects of K⁺-deficient diets with and without NaCl supplementation on Na⁺, K⁺, and H₂O transporters' abundance along the nephron. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 303(1), F92-104.
- Notomi, T., & Shigemoto, R. (2004). Immunohistochemical Localization of Ih Channel Subunits, HCN1-4, in the Rat Brain. *Journal of Comparative Neurology*, 471(3), 241–276.
- Orchard, C. H., & Cingolani, H. E. (1994). Acidosis and arrhythmias in cardiac muscle. *Cardiovascular Research*, 28(9), 1312–9.
- Pácha, J., Frindt, G., Sackin, H., & Palmer, L. G. (1991). Apical maxi K channels in intercalated cells of CCT. *The American Journal of Physiology*, 261(4 Pt 2), F696-705.
- Paillard, M. (1998). H⁺ and HCO₃⁻ transporters in the medullary thick ascending limb of the kidney: molecular mechanisms, function and regulation. *Kidney International, Suppl 65*, S36-41.
- Pajor, A. M. (1995). Sequence and functional characterization of a renal sodium/dicarboxylate cotransporter. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(11), 5779–85.
- Palmer, L.G., & Frindt, G. (1999). Regulation of apical K channels in rat cortical collecting tubule during changes in dietary K intake. *The American Journal of Physiology*, 277(5 Pt 2), F805-12.
- Pape, H. C. (1996). Queer Current and Pacemaker: The Hyperpolarization-Activated Cation Current in Neurons. *Annual Review of Physiology*, 58(1), 299–327.
- Pian, P., Bucchi, A., Robinson, R. B., & Siegelbaum, S. A. (2006). Regulation of Gating and Rundown of HCN Hyperpolarization-activated Channels by Exogenous and Endogenous PIP₂. *The Journal of General Physiology*, 128(5), 593–604.
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Katz, L. C., LaMantia, A. S., McNamara, J. O., & Williams, S. M. (2001). *Neuroscience*. Ed. Sinauers Associates Inc.
- Quentin, F., Eladari, D., Cheval, L., Lopez, C., Goossens, D., Colin, Y., Cartron, J. P., Paillard, M., & Chambrey, R. (2003). RhBG and RhCG, the putative ammonia transporters, are expressed in the same cells in the distal nephron. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 14(3), 545–54.
- Rector, F. C., Bloomer, H. A., & Seldin, D. W. (1964). Effect of Potassium Deficiency on the Reabsorption of Bicarbonate

in the Proximal Tubule of the Rat Kidney*. *Journal of Clinical Investigation*, 43(10), 1976–1982.

- Riquier-Brison, A. D. M., Leong, P. K. K., Pihakaski-Maunsbach, K., & McDonough, A. A. (2010). Angiotensin II stimulates trafficking of NHE3, NaPi2, and associated proteins into the proximal tubule microvilli. *AJP: Renal Physiology*, 298(1), F177–F186.
- Robinson, R. B., & Siegelbaum, S. A. (2003). Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function. *Annual Review of Physiology*, 65(4), 453–480.
- Sachs, A. N., Pisitkun, T., Hoffert, J. D., Yu, M. J., & Knepper, M. A. (2008). LC-MS/MS analysis of differential centrifugation fractions from native inner medullary collecting duct of rat. *AJP: Renal Physiology*, 295(6), F1799–F1806.
- Saldaña, M. R. (2009). Caracterización del papel fisiológico de los canales catiónicos activados por hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos en el riñón de la rata. *Tesis de maestría*, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Santoro, B., Chen, S., Luthi, A., Pavlidis, P., Shumyatsky, G. P., Tibbs, G. R., & Siegelbaum, S. A. (2000). Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(14), 5264–75.
- Santoro, B., Grant, S. G., Bartsch, D., & Kandel, E. R. (1997). Interactive cloning with the SH3 domain of N-src identifies a new brain specific ion channel protein, with homology to eag and cyclic nucleotide-gated channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(26), 14815–20.
- Santoro, B., Liu, D. T., Yao, H., Bartsch, D., Kandel, E. R., Siegelbaum, S. A., & Tibbs, G. R. (1998). Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell*, 93(5), 717–29.
- Santoro, B., & Tibbs, G. R. (1999). The HCN gene family: molecular basis of the hyperpolarization-activated pacemaker channels. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 868, 741–64.
- Santoro, B., Wainger, B. J., & Siegelbaum, S. A. (2004). Regulation of HCN Channel Surface Expression by a Novel C-Terminal Protein-Protein Interaction. *Journal of Neuroscience*, 24(47), 10750–10762.
- Schlatter, E., Haxelmans, S., Hirsch, J., & Leipziger, J. (1994). pH dependence of K⁺ conductances of rat cortical collecting duct principal cells. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, 428(5–6), 631–40.
- Shayakul, C., Kanai, Y., Lee, W. S., Brown, D., Rothstein, J. D., & Hediger, M. A. (1997). Localization of the high-affinity glutamate transporter EAAC1 in rat kidney. *The American Journal of Physiology*, 273(6 Pt 2), F1023–F1029.
- Silva, P., Hayslett, J. P., & Epstein, F. H. (1973). The role of Na K activated adenosine triphosphatase in potassium adaptation. Stimulation of enzymatic activity by potassium loading. *Journal of Clinical Investigation*, 52(11), 2665–2671.
- Silver, R. B., Breton, S., & Brown, D. (2000). Potassium depletion increases proton pump (H⁺)-ATPase activity in intercalated cells of cortical collecting duct. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 279(1), F195–202.
- Silver, R. B., Mennitt, P. A., & Satlin, L. M. (1996). Stimulation of apical H-K-ATPase in intercalated cells of cortical collecting duct with chronic metabolic acidosis. *The American Journal of Physiology*, 270(3 Pt 2), F539–47.
- Silver, R. B., & Soleimani, M. (1999). H⁺-K⁺-ATPases: regulation and role in pathophysiological states. *The American Journal of Physiology*, 276(6 Pt 2), F799–811.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150(1), 76–85.
- Soleimani, M., Bergman, J. A., Hosford, M. A., & McKinney, T. D. (1990). Potassium depletion increases luminal Na⁺/H⁺ exchange and basolateral Na⁺:CO₃⁼:HCO₃⁻ cotransport in rat renal cortex. *Journal of Clinical Investigation*, 86(4),

1076–1083.

- Soleimani, M., & Singh, G. (1995). Physiologic and molecular aspects of the Na⁺/H⁺ exchangers in health and disease processes. *Journal of Investigative Medicine: The Official Publication of the American Federation for Clinical Research*, 43(5), 419–30.
- Stanton, B. A., & Giebisch, G. H. (1982). Potassium transport by the renal distal tubule: effects of potassium loading. *The American Journal of Physiology*, 243(5), F487-93.
- Stevens, D. R., Seifert, R., Bufe, B., Müller, F., Kremmer, E., Gauss, R., Meyerhof, W., Kaupp, U. B., & Lindemann, B. (2001). Hyperpolarization-activated channels HCN1 and HCN4 mediate responses to sour stimuli. *Nature*, 413(6856), 631–5.
- Stieber, J., Stöckl, G., Herrmann, S., Hassfurth, B., & Hofmann, F. (2005). Functional expression of the human HCN3 channel. *Journal of Biological Chemistry*, 280(41), 34635–34643.
- Stokke, E.S., Naess P.A., Ostensen J., Langberg, H. C., & Kiil, F. (1993). Plasma potassium concentration as a determinant of proximal tubular NaCl and NaHCO₃ reabsorption in dog kidneys. *Acta Physiol Scand*, 148(1), 45–54.
- Stover, E. H., Borthwick, K. J., Bavalia, C., Eady, N., Fritz, D. M., Rungroj, N., Giersch, A. B., Morton, C. C., Axon, P. R., Akil, I., Al-Sabban, E. A., Baguley, D. M., Bianca, S., Bakaloglu, A., Bircan, Z., Chauveau, D., Clermont, M. J., Guala, A., Hulton, S. A., Kroes, H., Li Volti, G., Mir, S., Mocan, H., Nayir, A., Ozen, S., Rodriguez Soriano, J., Sanjad, S. A., Tasic, V., Taylor, C. M., Topaloglu, R., Smith, A. N., & Karet, F. E. (2002). Novel ATP6V1B1 and ATP6V0A4 mutations in autosomal recessive distal renal tubular acidosis with new evidence for hearing loss. *Journal of Medical Genetics*, 39(11), 796–803.
- Takasu, K., Ono, H., & Tanabe, M. (2010). Spinal hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channels at primary afferent terminals contribute to chronic pain. *Pain*, 151(1), 87–96.
- Tannen, R. L. (1970). The effect of uncomplicated potassium depletion on urine acidification. *Journal of Clinical Investigation*, 49(4), 813–827.
- Tannen, R. L. (1987). Effect of potassium on renal acidification and acid-base homeostasis. *Seminars in Nephrology*, 7(3), 263–73.
- Tannen, R. L., Wedell, E., & Moore, R. (1973). Renal Adaptation to a High Potassium Intake. *Journal of Clinical Investigation*, 52(9), 2089–2101.
- Taylor, L., & Curthoys, N. P. (2004). Glutamine metabolism: Role in acid-base balance. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 32(5), 291–304.
- Turban, S., Beutler, K. T., Morris, R. G., Masilamani, S., Fenton, R. A., Knepper, M. A., & Packer, R. K. (2006). Long-term regulation of proximal tubule acid–base transporter abundance by angiotensin II. *Kidney International*, 70(4), 660–668.
- Turner, A. J., & Tanzawa, K. (1997). Mammalian membrane metallopeptidases: NEP, ECE, KELL, and PEX. *FASEB Journal*, 11(5), 355–364.
- Unwin, R., Capasso, G., & Giebisch, G. (1994). Potassium and sodium transport along the loop of Henle: effects of altered dietary potassium intake. *Kidney International*, 46(4), 1092–9.
- Unwin, R. J., Luft, F. C., & Shirley, D. G. (2011). Pathophysiology and management of hypokalemia: a clinical perspective. *Nature Reviews. Nephrology*, 7(2), 75–84.
- Van der Lubbe, N., Zietse, R., & Hoorn, E. J. (2013). Effects of angiotensin II on kinase-mediated sodium and potassium transport in the distal nephron. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 22(1), 120–6.
- Virkki, L. V., Biber, J., Murer, H., & Forster, I. C. (2007). Phosphate transporters: a tale of two solute carrier families.

AJP: Renal Physiology, 293(3), F643–F654.

- Wahl-Schott, C., & Biel, M. (2009). HCN channels: Structure, cellular regulation and physiological function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(3), 470–494.
- Wainger, B. J., DeGennaro, M., Santoro, B., Siegelbaum, S. A., & Tibbs, G. R. (2001). Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels. *Nature*, 411(6839), 805–10.
- Wall, S. M., Fischer, M. P., Mehta, P., Hassell, K. A., & Park, S. J. (2001). Contribution of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter NKCC1 to Cl⁻ secretion in rat OMCD. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 280(5), F913-21.
- Wall, S. M., & Lazo-Fernandez, Y. (2015). The Role of Pendrin in Renal Physiology. *Annual Review of Physiology*, 77(1), 363–378.
- Wang, Z., Baird, N., Shumaker, H., & Soleimani, M. (1997). Potassium depletion and acid-base transporters in rat kidney: differential effect of hypophysectomy. *The American Journal of Physiology*, 272(6 Pt 2), F736-43.
- Watanabe, T. (2005). Proximal renal tubular dysfunction in primary distal renal tubular acidosis. *Pediatric Nephrology*, 20(1), 86–88.
- Weiner, I. D., & Hamm, L. L. (2007). Molecular Mechanisms of Renal Ammonia Transport. *Annual Review of Physiology*, 69(1), 317–340.
- Weiner, I. D., & Verlander, J. W. (2011). Role of NH₃ and NH₄ transporters in renal acid-base transport. *AJP: Renal Physiology*, 300(1), F11–F23.
- Whitaker, G. M., Angoli, D., Nazzari, H., Shigemoto, R., & Accili, E. A. (2007). HCN2 and HCN4 isoforms self-assemble and co-assemble with equal preference to form functional pacemaker channels. *Journal of Biological Chemistry*, 282(31), 22900–22909.
- Wingo, C. S. (1986). Effect of acidosis on chloride transport in the cortical thick ascending limb of Henle perfused in vitro. *Journal of Clinical Investigation*, 78(5), 1324–1330.
- Wright, F. S., Strieder, N., Fowler, N. B., & Giebisch, G. (1971). Potassium secretion by distal tubule after potassium adaptation. *The American Journal of Physiology*, 221(2), 437–48.
- Xue, L., Li, Y., Han, X., Yao, L., Yuan, J., Qin, W., Liu, F., & Wang, H. (2012). Investigation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels in interstitial cells of Cajal of human bladder. *Urology*, 80(1).
- Yanagihara, K., & Irisawa, H. (1980). Inward current activated during hyperpolarization in the rabbit sinoatrial node cell. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 385(1), 11–9.
- Yang, L. E., Sandberg, M. B., Can, A. D., Pihakaski-Maunsbach, K., & McDonough, A. A. (2008). Effects of dietary salt on renal Na⁺ transporter subcellular distribution, abundance, and phosphorylation status. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 295(4), F1003-16.
- Ye, B., & Nerbonne, J. M. (2009). Proteolytic processing of HCN2 and co-assembly with HCN4 in the generation of cardiac pacemaker channels. *Journal of Biological Chemistry*, 284(38), 25553–25559.
- Yeh, J., Kim, B. S., Gaines, L., Peresie, J., Page, C., & Arroyo, A. (2008). 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. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 6, 35.
- Youn, J. H., & McDonough, A. A. (2009). Recent advances in understanding integrative control of potassium homeostasis. *Annual Review of Physiology*, 71, 381–401.
- Yu, H., Wu, J., Potapova, I., Wymore, R. T., Holmes, B., Zuckerman, J., Pan, Z., Wang, H., Shi, W., Robinson, R. B., El-Maghrabi, M. R., Benjamin, W., Dixon, J., McKinnon, D., Cohen, I. S., & Wymore, R. (2001). MinK-related peptide 1: A beta subunit for the HCN ion channel subunit family enhances expression and speeds activation. *Circulation*

Research, 88(12), E84-7.

- Zagotta, W. N., Olivier, N. B., Black, K. D., Young, E. C., Olson, R., & Gouaux, E. (2003). Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. *Nature*, 425(6954), 200–205.
- Zha, Q., Brewster, A. L., Richichi, C., Bender, R. A., & Baram, T. Z. (2008). Activity-dependent heteromerization of the hyperpolarization-activated, cyclic-nucleotide gated (HCN) channels: Role of N-linked glycosylation. *Journal of Neurochemistry*, 105(1), 68–77.
- Zong, X., Eckert, C., Yuan, H., Wahl-Schott, C., Abicht, H., Fang, L., Li, R., Mistrik, P., Gerstner, A., Much, B., Baumann, L., Michalakis, S., Zeng, R., Chen, Z., & Biel, M. (2005). A Novel Mechanism of Modulation of Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated Channels by Src Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 34224–34232.
- Zong, X., Stieber, J., Ludwig, A., Hofmann, F., & Biel, M. (2001). A Single Histidine Residue Determines the pH Sensitivity of the Pacemaker Channel HCN2. *Journal of Biological Chemistry*, 276(9), 6313–6319.

14. ANEXO (Artículo requisito)

- López-González, Z., Ayala-Aguilera, C., Martínez-Morales, F., Galicia-Cruz, O., Salvador-Hernández, C., Pedraza-Chaverri, J., Medeiros, M., Hernández, A. M., & Escobar, L. I. (2016). Immunolocalization of hyperpolarization-activated cationic HCN1 and HCN3 channels in the rat nephron: regulation of HCN3 by potassium diets. *Histochem Cell Biol*, 145, 25-40.

Immunolocalization of hyperpolarization-activated cationic HCN1 and HCN3 channels in the rat nephron: regulation of HCN3 by potassium diets

Zinaeli López-González¹ · Cosete Ayala-Aguilera¹ · Flavio Martínez-Morales² · Othir Galicia-Cruz² · Carolina Salvador-Hernández¹ · José Pedraza-Chaverri³ · Mara Medeiros⁴ · Ana Maria Hernández⁴ · Laura I. Escobar¹

Accepted: 15 October 2015 / Published online: 29 October 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract Hyperpolarization-activated cationic and cyclic nucleotide-gated channels (HCN) comprise four homologous subunits (HCN1–HCN4). HCN channels are found in excitable and non-excitable tissues in mammals. We have previously shown that HCN2 may transport ammonium (NH_4^+), besides sodium (Na^+), in the rat distal nephron. In the present work, we identified HCN1 and HCN3 in the proximal tubule (PT) and HCN3 in the thick ascending limb of Henle (TALH) of the rat kidney. Immunoblot assays detected HCN1 (130 kDa) and HCN3 (90 kDa) and their truncated proteins C-terminal HCN1 (93 kDa) and N-terminal HCN3 (65 kDa) in enriched plasma membranes from cortex (CX) and outer medulla (OM), as well as in brush-border membrane vesicles. Immunofluorescence assays confirmed apical localization of HCN1 and HCN3 in the PT. HCN3 was also found at the basolateral membrane of TALH. We evaluated chronic changes in mineral dietary on HCN3 protein abundance. Animals were fed with three different diets: sodium-deficient (SD) diet, potassium-deficient (KD) diet, and high-potassium (HK) diet. Up-regulation of HCN3 was observed in OM by KD

and in CX and OM by HK; the opposite effect occurred with the N-terminal truncated HCN3 in CX (KD) and OM (HK). SD diet did not produce any change. Since HCN channels activate with membrane hyperpolarization, our results suggest that HCN channels may play a role in the Na^+ – K^+ –ATPase activity, contributing to Na^+ , K^+ , and acid–base homeostasis in the rat kidney.

Keywords Hyperpolarization-activated cationic HCN channel · Potassium restriction · Potassium diet · Sodium bicarbonate absorption · Kidney · Sodium channel

Introduction

Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels (HCN) have widely been characterized in excitable tissues, where they play a key role in the initiation and regulation of the rhythmic activity (DiFrancesco 1993; Pape 1996). Four mammalian HCN channels subtypes exist (HCN1–HCN4) and, unlike other members of the voltage-gated channel superfamily, they are activated upon hyperpolarization, near the membrane resting potential of excitable cells. HCN channels display a weak cation selectivity but under physiological conditions, due to the electrochemical gradient, carry a Na^+ inward current when they open (Ludwig et al. 1999). Although all HCN channels contain a conserved cyclic nucleotide-binding domain (CNBD), they are modulated quantitatively differently by cAMP. Binding of cAMP to HCN2 and HCN4 channels shifts their activation curve to more depolarized potentials (DiFrancesco 1993; Pape 1996; Wainger et al. 2001); in contrast, HCN1 and HCN3 are weakly affected by cAMP (Wahl-Schott and Biel 2009).

The HCN gene family is also expressed in the rat kidney (Bolívar et al. 2008; Carrisoza-Gaytán et al. 2011; Calejo

✉ Laura I. Escobar
laurae@unam.mx

¹ Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico, DF, México

² Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México

³ Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF, México

⁴ Laboratorio de Investigación en Nefrología y Metabolismo Mineral Óseo, Hospital Infantil de México Federico Gómez, México, México

et al. 2014). HCN inward cationic currents (Ivti) have been recorded in inner medullary collecting duct cells (Bolívar et al. 2008). In particular, HCN3 has been found in the bladder and the junction of the renal pelvis (Hurtado et al. 2010; Xue et al. 2012). Although HCN3 has been implicated in ureteral peristaltic activity (Hurtado et al. 2010), nothing is known about its role in the kidney.

Previously, we demonstrated that HCN2 participates in the acid–base homeostasis, by NH_4^+ uptake at the basolateral membrane of principal and alpha-intercalated cells in the rat kidney (Carrisoza-Gaytán et al. 2011).

The kidney regulates the amount and composition of the extracellular fluid and is involved in the systemic acid–base balance through elimination of ammonium (NH_4^+) in the urine and reclamation and production of plasma HCO_3^- . To maintain normal pH, the kidney has to reabsorb all the filtered HCO_3^- and excrete the daily free hydrogen ion (H^+) and NH_4^+ (Good and Burg 1984).

About 80 % of the filtered load of HCO_3^- is reabsorbed in the proximal tubule, indirectly by the activity of the luminal Na^+/H^+ exchanger NHE3 (Soleimani and Singh 1995). The exit of HCO_3^- across the basolateral membrane of the proximal tubule is via the electrogenic $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$ cotransporter (NBCe1; Alpern 1985; Biagi and Sohtell 1986). The medullary thick ascending limb (MTAL) reabsorbs 10–15 % of filtered HCO_3^- . The Na^+/H^+ exchangers NHE2 and NHE3 are responsible for most of the apical HCO_3^- reabsorption in MTAL (Good 1996; Attmane-Elakeb et al. 1996). The basolateral HCO_3^- efflux may occur via NBCe1, the $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger (Paillard 1998), and the electroneutral $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$ cotransporter (NBCn1) as a buffering mechanism during the transcellular transport of NH_4^+ (Jakobsen et al. 2004).

Changes in plasma K^+ have an important influence on acid–base balance (Tannen 1987). Hyperkalemia induced by chronic high K^+ intake (HK) is associated with a striking increase in K^+ excretion, a reduced renal NH_4^+ production and urinary excretion of NH_4^+ (Tannen et al. 1973) and metabolic acidosis (Hulter et al. 1983). The reduction in NH_4^+ excretion is due to a diminished transfer of NH_4^+ from the proximal tubule to the collecting duct (CD) in the renal medulla (DuBose and Good 1991, 1992). In contrast, K^+ depletion (KD) causes an increase in renal ammoniogenesis and urinary NH_4^+ and reduced K^+ excretion, leading to the development of hypokalemia and metabolic alkalosis (Tannen 1970; Kamm and Strobe 1973; Jones et al. 1982).

KD enhances and induces expression of the basolateral $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$ cotransporter NBCe1 in the proximal tubule, MTAL, and inner medullary CD, stimulating HCO_3^- reabsorption and thus generating metabolic alkalosis (Amlal et al. 2000). In KD, the transepithelial

absorption of NH_4^+ in TALH is increased (Buerkert et al. 1982; Jaeger et al. 1983). This effect may result in part from an increase in NH_4^+ concentration in the luminal fluid delivered to the MTAL and NH_4^+ transport by the Na^+-K^+ -ATPase and NHE1 (Laghmani et al. 2001), in spite of a down-regulation of NKCC2 (Unwin et al. 1994; Amlal et al. 1998).

Plasma K^+ levels also alter Na^+ reabsorption in the renal epithelia because Na^+ transport is generally coupled to K^+ reabsorption by the basolateral Na^+-K^+ -ATPase and to K^+ secretion by apical K^+ channels. For example, acute infusion of K^+ in rats produces natriuresis due to inhibition of NaCl reabsorption in the proximal tubule (Brandis et al. 1972; Jaeger et al. 1983). In HK, transport of Na^+ , K^+ , and Cl^- by NKCC2 is also diminished along the loop of Henle (Unwin et al. 1994). In contrast, active absorption of $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$ by the MTALH in vitro is markedly increased when the K^+ concentration in perfusion and bath solutions is increased over the physiological range (Krapf 1988).

The purpose of this work was to elucidate the distribution and role of HCN channels along the initial segments of the rat nephron and their molecular adaptive regulation in KD, HK, and Na^+ restriction (SD). Our results revealed that HCN1 and HCN3 were expressed in rat kidney as the full-length and truncated proteins; HCN1 and HCN3 were localized in luminal membranes of the proximal tubule and HCN3 at the basolateral membrane of MTALH. Furthermore, protein abundance of HCN3 and its N-terminal truncated form was regulated by changes in K^+ metabolism. These results contribute to the identification of a novel Na^+ influx and plasma K^+ -dependent pathway and then, to a better understanding of Na^+ , K^+ , and acid–base homeostasis in the rat nephron.

Materials and methods

Animals

Experiments were performed using adult male Wistar rats (220–280 g) raised free of viral infections (Harlan, Mexico). Animals were maintained at constant room temperature (22 ± 1 °C) under a 12-h light/dark cycle; they had free access to water and food in all protocols. Rats were anesthetized by intraperitoneal administration of pentobarbital sodium (50 mg/kg), and samples of blood were collected from the ocular artery by heparinized capillaries to separate the plasma. One kidney was excised for western blot assays. The contralateral kidney was perfused and fixed for immunofluorescence. Animals were treated in accordance with “Technical specifications for the production, use and care of laboratory animals” (NOM-062-ZOO-1999).

Mineral diets assays

Animals were randomly separated into three experimental groups: group 1 was fed with a NaCl-deficient diet (SD; MP Biomedicals, Solon, OH) for 7 days; groups 2 and 3 were fed with a K⁺ deficient diet (KD; MP Biomedicals, Solon, OH) or high-K⁺ diet (HK; 10 % KCl; Harlan-Teklad, Madison, WI) respectively, for 15 days. Each group (1–3) was matched with control diets containing NaCl 0.13 %, KCl 0.54 and KCl 0.6 %, respectively. Twenty-four hours prior to kill, the animals were housed individually in metabolic cages to collect the urine for 24 h. The urine and plasma electrolytes were measured using a selective ion electrode (Dimension[®] RxL Max[®], Siemens Healthcare, Mexico), and the fractional rates of Na⁺, K⁺, and Cl⁻ excretion were calculated.

Immunofluorescence assays

Animals were retrograde perfused via the aorta with 250 mL of cold PBS (20 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 7.4, buffer, 149 mM NaCl, 2 mM KCl, pH 7.4) followed by 250 mL of 4 % paraformaldehyde in PBS (PFA). The kidneys were quickly removed and fixed in PFA (overnight), and later were cryoprotected with 30 % sucrose/PFA (4 °C). Sagittal sections of 10 μm thickness were cut on a Leica cryostat (CM1100) at -20 °C. Samples were hydrated in PBS and incubated in 10–20 mM sodium citrate buffer, pH 8.5, for 30 min at 80 °C for antigen retrieval. Sections were allowed to cool and washed with PBS, then permeabilized with 0.3 % Triton X-100 (Tx) in PBS for 10 min. Blocking was performed with 0.5 % BSA, 10 % fetal bovine serum, and 0.1 % PBS-Tx for 1 h. Sections were incubated with rabbit anti-HCN3 (C-terminal epitope) and/or guinea pig anti-HCN1 (Alomone), mouse anti-neutral endopeptidase (NEP, Santa Cruz) diluted 1:100 for 19 h at 4 °C. To evaluate the localization of HCN channels along the nephron, double immunofluorescence staining was performed using one of the following primary antibodies (diluted 1:100; Santa Cruz Biotechnology): goat anti-aquaporin 1 (AQP1) for proximal tubules and thin descending limbs, anti-Tamm-Horsfall glycoprotein (THP) for the thick ascending limb, anti-calbindin D28 k (CaBP) for distal convoluted tubules and connecting tubule (CNT), anti-aquaporin 2 (AQP2) for principal cells in CNT and collecting ducts, rabbit anti-aquaporin 7 (AQP7) for straight proximal tubule (S3), and mouse anti-α1 Na⁺-K⁺-ATPase subunit (Sigma-Aldrich) for basolateral membranes. The secondary antibodies (diluted 1:200–500; Abcam and Molecular Probes) were donkey anti-goat, anti-mouse, anti-rabbit, or goat anti-guinea pig coupled to Alexa 594 (red) or Alexa 488 (green). Tissues were mounted on microscope cover slips with Vectashield (Vector Laboratories). Images

were obtained by confocal microscopy (Leica TCS-SP5; objective 20×) and analyzed with the Leica Application Suite Advance Fluorescence Lite program.

Immunoblotting

Hypothalamus and cerebellum from brain (positive controls) and cortex and outer medulla from kidney were dissected and homogenized (Tissue Tearor, Biospec) in cold buffer solution (250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 mM Tris-HCl) containing complete cocktail of inhibitors (Roche Diagnostic), pH 7.6. The homogenates were centrifuged at 1000g, 10 min at 4 °C to eliminate cellular debris and nuclear fragments. The supernatant was recovered and centrifuged at 17,000g, 20 min at 4 °C; the pellet obtained (enriched in plasma membranes) was resuspended in buffer solution. Protein concentration was measured by the Lowry method (Bio-Rad DC). The membrane fractions were electrophoretically separated in 6–8 % SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and electroblotted to a PVDF membrane. The membrane was blocked with 5 % nonfat dry milk (Bio-Rad) in TBS-T (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 0.1 % Tween 20, pH 7.6) at 4 °C overnight. Then, it was incubated with guinea pig anti-HCN1 (N-terminal epitope) or rabbit anti-HCN3 (C- and N-terminal epitopes; 1:500; Alomone and LSBio Inc) for 18 h at 4 °C. β-Actin expression was used as an internal control for standardization of the protein amount (rabbit anti-β-actin antibody 1:20000; Santa Cruz Biotechnology). Other antibodies used as control were mouse anti-α1 Na⁺-K⁺-ATPase (1:1500; Sigma-Aldrich) or mouse anti-AQP1 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology). Secondary antibodies were: goat anti-guinea pig IgG (1:5000; Molecular Probes), donkey anti-rabbit IgG (1:18000–23000; Abcam), or anti-mouse IgG (1:5000–15000; GE Healthcare) coupled to horseradish peroxidase (HRP) and incubated at room temperature for 1 h. Immunoreactive bands were detected using chemiluminescent HRP substrate (Immobilon, Millipore) and exposed to autoradiography films (Kodak).

Brush-border membrane vesicles (BBMV)

The assay was carried out at 4 °C according to a modification of the Booth and Kenny method (Booth and Kenny 1974; Martinez et al. 1990). Under phenobarbital sodium anesthesia (50 mg/kg), the kidneys of 5 male Wistar rats were removed and immediately chilled in ice-cold isolation buffer (300 mM mannitol, 12 mM Tris-H₂SO₄, pH 7.4). The cortex was dissected, minced, weighted, and suspended in a 20-fold volume of hypotonic homogenization buffer (100 mM mannitol, 12 mM Tris-H₂SO₄, pH 7.4). Four grams of cortex was homogenized for 2.5 min in 160 mL of homogenization buffer with a SDT homogenizer (Tekman

TR-10, Germany) on setting 7, for 1 min. A sample of this homogenate was withdrawn for protein and enzyme determinations. After addition of 10 mM MgCl₂, the homogenate was stirred for 15 min on ice and then centrifuged at 1,900g, 12 min in a SS34 rotor, Sorvall RC-5B centrifuge (DuPont Instruments). The supernatant was centrifuged at 20,000g, 12 min. The pellet was suspended in 20 mL of intravesicular buffer (300 mM mannitol, 20 mM HEPES–Tris, pH 7.4) and homogenized by hand with 10 strokes in a Dounce™ glass pestle homogenizer, left to equilibrate for 60 min and centrifuged at 30,000g, 20 min. This step was repeated, and the final pellet was suspended in intravesicular buffer by aspirating the suspension 10 times with a syringe through a 25-gauge needle. The protein content was determined according to the bicinchoninic acid method (Smith et al. 1985), using a micromethod of a commercial kit (BCA PIERCE® Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA). The purity of membrane vesicles was determined by measuring the specific activity of leucine aminopeptidase and alkaline phosphatase in the homogenate and the final BBMV preparation, as previously reported (Martinez et al. 1990).

Densitometry and statistical analysis

Relative quantification of the immunoblot bands densities was carried out by digital photo-documentation (Kodak EDAS 290). To facilitate comparisons and determine whether there was an effect of treatment on the protein expression, the densitometry values were normalized to the control, defining the mean for the control group as 100 %. Statistical comparisons of differences were performed using unpaired Student's *t* test.

Results

HCN1 and HCN3 channels are distributed in the proximal tubule

Immunoblotting analysis of HCN1 displayed immunoreactive bands of 130 kDa (glycosylated) and 110 kDa (unglycosylated) proteins (Much et al. 2003; Zha et al. 2008) in cerebellum (positive control). The apparent molecular mass of 93 kDa in the renal cortex and outer medulla (Fig. 1a) corresponds to the C-terminal HCN1 truncated protein (HCN1 has a cleavage site at the residues Glu802–Val803; Calejo et al. 2014).

Colabeling of HCN1 with AQP1 showed HCN1 at apical membranes of cortical proximal tubules (Fig. 1b–d). Low HCN1 immunoreactivity was detected at the apical membrane of straight proximal tubules from the outer stripe of the outer medulla, although abundant HCN1 was

observed in the cytoplasm (Fig. 1f–h). Immunocolocalization of HCN1 and AQP7 confirmed the high HCN1 expression in the S3 segment of cortical (Fig. 1j–l) and medullary (Fig. 1m–o) proximal tubules.

Immunoblotting of HCN3 was performed with polyclonal antibodies targeted against specific N- and C-terminal epitopes (N-HCN3 and C-HCN3, respectively). The N-HCN3 antibody detected the full-length protein (90 kDa) in hypothalamus (positive control), renal cortex, and outer medulla (Fig. 2a). In contrast, the C-HCN3 antibody detected only a low amount of the full-length protein (90 kDa) and a high level of the N-terminal truncated HCN3 of 65 kDa in plasma membrane fractions of the kidney cortex and outer medulla. Poor HCN3 immunoreactivity was detected in the inner medulla (Fig. 2b). Whereas in 25–30 µg of protein from hypothalamus, the full-length HCN3 was observed abundant (Fig. 2b), the N-terminal truncated HCN3 could be detected only with 100 µg of protein (data not shown). Double immunofluorescence labeling with AQP1 showed HCN3 in brush-border membranes (BBM; Fig. 2c–f), confirming that HCN3 is localized to the apical membranes of the proximal tubule.

HCN3 was also identified in the inner stripe of the outer medulla, but not in the same tubules than AQP1 (Fig. 2h–j). Therefore, HCN3 was absent in the thin descending limbs. Negative immunoreactivity for HCN3 was detected in the inner medulla (Fig. 2l–n).

Immunolocalization of HCN3 and the neutral endopeptidase (NEP) in the straight proximal tubule

One of the major metalloendopeptidases of renal BBM is the neutral endopeptidase-24.11 (NEP). In fact, a high activity of NEP has been registered in the proximal straight tubule S3 (Edwards et al. 1999). NEP hydrolyzes hydrophobic residues in several neuropeptides (Erdős and Skidgel 1989). In an attempt to understand the origin of the N-terminal truncated HCN3, we colabeled tissue sections with HCN3 and NEP. Colocalization of HCN3 and NEP in the cortical apical membrane of S3 (Fig. 2p–r) suggests that HCN3 could be a substrate for this protease and opens new questions about this regulatory function.

Immunodetection and colocalization of HCN1 and HCN3 in brush border membranes (BBM)

Isolation of brush-border membrane vesicles (BBMV) was evaluated. Table 1 summarizes enzyme activities in the BBMV and compares these values with those in the cortical homogenate. Alkaline phosphatase and leucine aminopeptidase displayed high activity in the BBMV. The specific activity of alkaline phosphatase increased ~9 times and that of leucine aminopeptidase ~10 times in

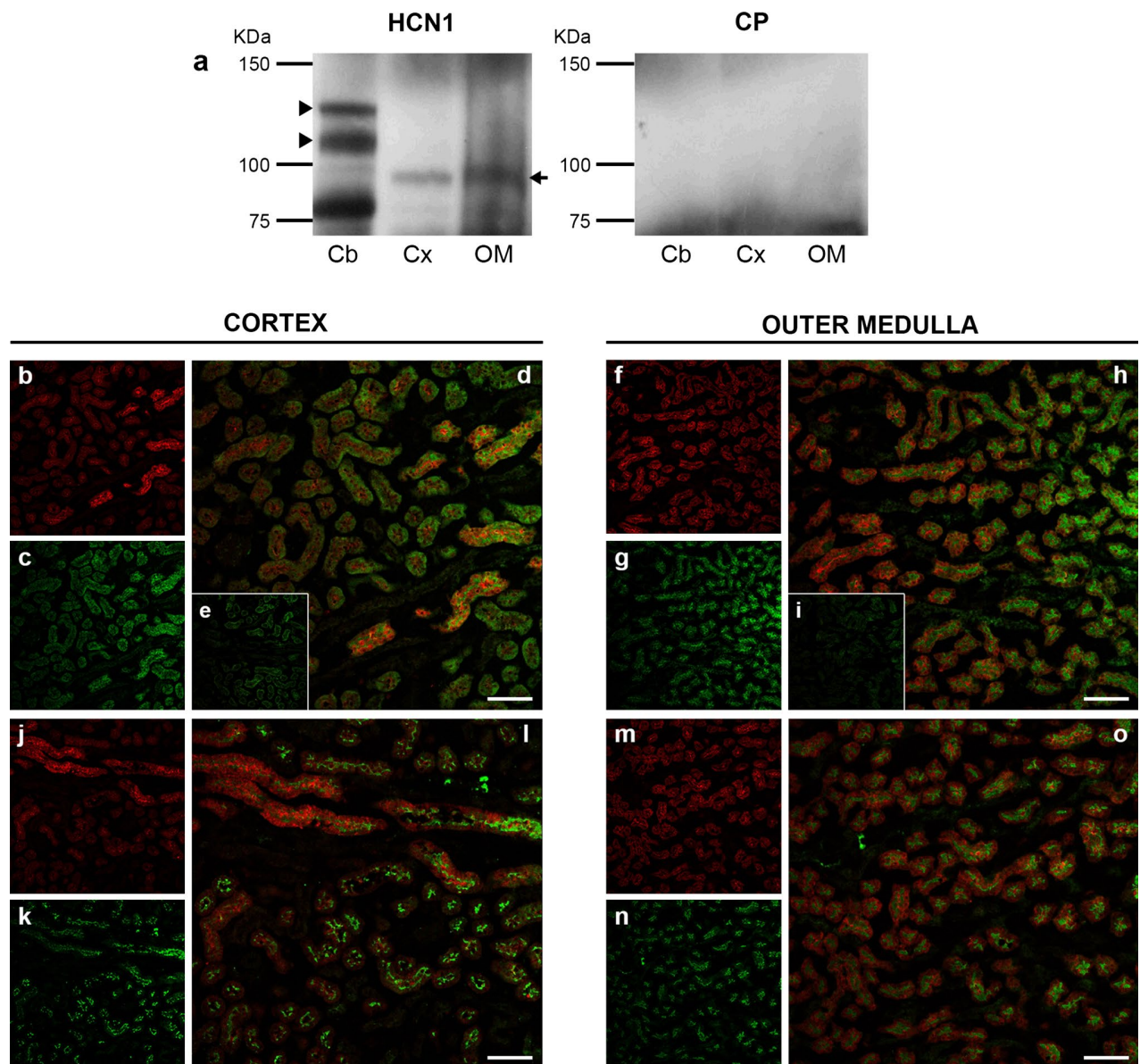


Fig. 1 Immunolocalization of HCN1 in the proximal tubule. Immunoblotting of HCN1 (**a**) from enriched plasma membranes fractions (50–100 μ g) of cerebellum (Cb), renal cortex (Cx), and outer medulla (OM). Positive control (Cb) displayed immunoreactive bands of 130 and 110 kDa of the glycosylated and unglycosylated proteins (*arrow-heads*), respectively. In renal tissue was detected a band of 93 kDa corresponding to a C-terminal truncated HCN1 (*arrow*). HCN1 (*red b, f, j, m*) and AQP1 (*green c, g*) or AQP7 (*green k, n*) double immu-

nofluorescence labeling. Merged images (*yellow*) show HCN1 at apical membranes of cortical proximal tubules (**d**) and at apical membranes and in the cytoplasm of proximal tubules from the outer stripe of the OM (OSOM; **h**). Merged images (*yellow*) of HCN1 and AQP7 show HCN1 in S3 of the proximal tubule in Cx (**l**) and the OSOM (**o**). No immunoreactivity was detected after adsorption of the anti-HCN1 antibody with its corresponding antigen (CP, **e, i**). *Scale bar* 100 μ m

BBMV, compared to the cortical homogenate. Immunoblot of AQP1 (35- and 25-kDa bands, corresponding to the glycosylated and unglycosylated protein, respectively) was a positive control of BBMV enrichment (Fig. 3a). α 1-Subunit of Na^+/K^+ -ATPase (negative control) was not detected in BBMV but in plasma membranes from cortex (100 kDa; Fig. 3a). Immunoblotting analyses

of HCN channels in BBMV revealed the expression of HCN1 (~120 kDa, glycosylated protein) and HCN3 (85–90 kDa) and the truncated proteins C-terminal HCN1 (93 kDa) and N-terminal HCN3 (65 kDa). HCN3 was detected with two antibodies that recognize N- and C-terminal epitopes, respectively, as previously described (Fig. 3a).

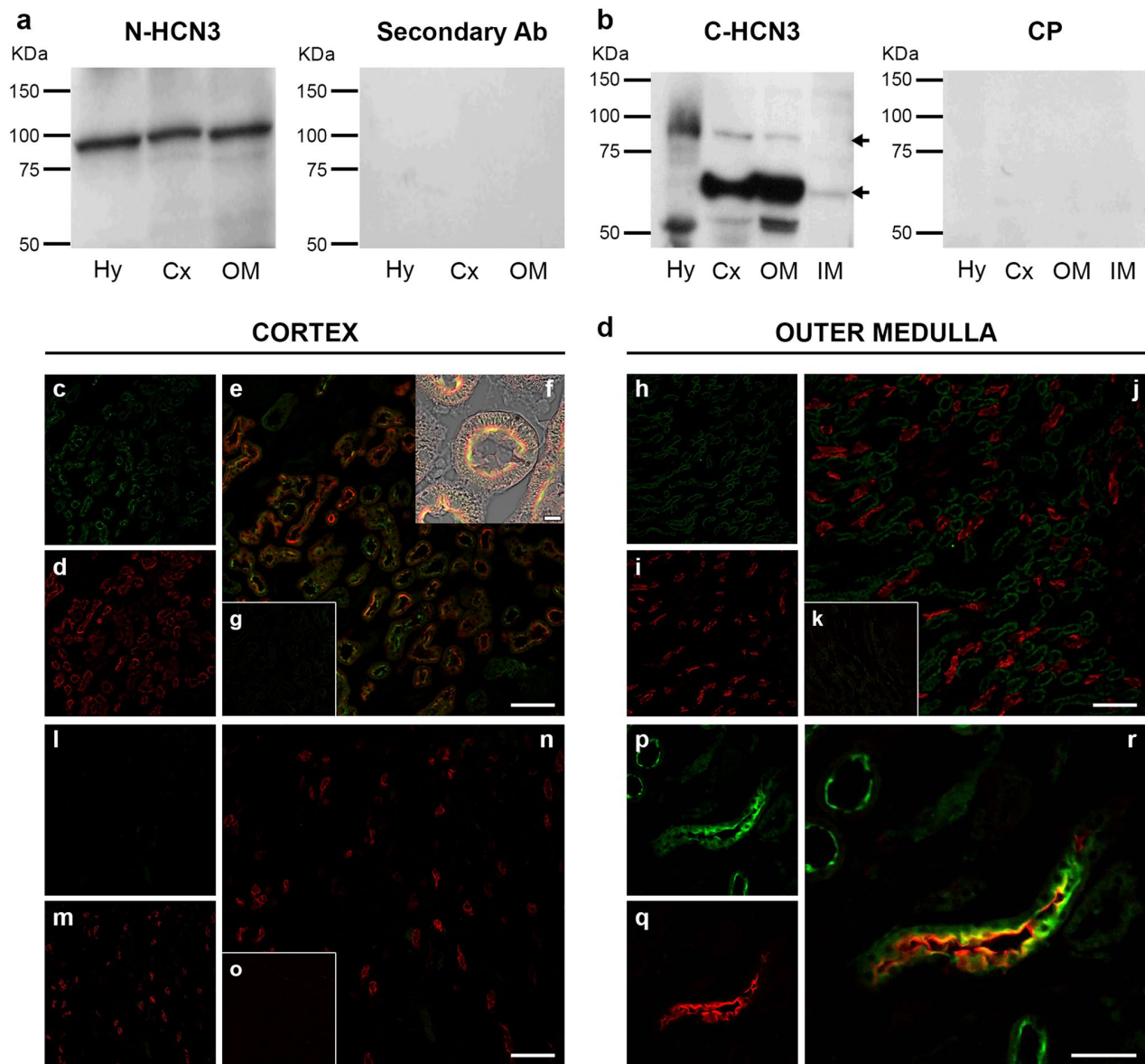


Fig. 2 Immunolocalization of HCN3 in the proximal tubule. Immunoblots of HCN3 (**a**, **b**) from enriched plasma membranes fractions (25–30 μ g) of hypothalamus (Hy; positive control), renal cortex (Cx), outer medulla (OM), and inner medulla (IM). Antibodies recognized specific N- and C-terminal epitopes: N-HCN3 and C-HCN3, respectively. N-HCN3 detected the full-length HCN3 (90 kDa) protein (**a**). C-HCN3 detected the 90-kDa band (*arrow*) in Hy, Cx, and OM, and a more abundant band of 65 kDa (N-terminal truncated HCN3; *arrow*) only in the kidney. Poor HCN3 immunoreactivity was detected in the IM (**b**). Double immunofluorescence labeling in tissue sections is shown with HCN3 (*green* **c**, **h**, **l**, **p**), AQP1 (*red* **d**, **i**, **m**), and neutral

endopeptidase (NEP; *red* **q**). Analysis of merged images of HCN3 and AQP1 labeling (*yellow* **e**, **f**, **j**, **n**) displayed HCN3 at luminal membranes of cortical proximal tubules (**e**). Higher magnification of an image in bright field shows HCN3 in brush-border membranes (BBM; **f**, *scale bar* 10 μ m). Colabeling identified HCN3 in the inner stripe of the OM (*green*), but not in the thin descending limbs (*red* **j**). HCN3 immunoreactivity was not detected in the inner medulla (**l**, **n**). Overlap in the distribution of HCN3 and NEP was observed in BBM (*merge yellow* **r**). Immunoreactive bands disappeared when the primary antibody was pre-adsorbed with the control peptide (CP, **g**, **k**, **o**). *Scale bar*, **e**, **j**, **n** = 100 μ m, **r** = 25 μ m

Double immunofluorescence labeling with HCN1 and HCN3 showed colocalization of both HCN channels in BBM of cortical proximal tubules (Fig. 3b–e) and in S3 of the proximal tubule in the outer stripe of the outer medulla, where the immunoreactivity was mostly cytoplasmic (Fig. 3g–i).

Immunolocalization of HCN3 in the outer medullary thick ascending limb of Henle (MTALH)

Immunofluorescence labeling of HCN3 and the Tamm–Horsfall glycoprotein (THP) confirmed the absence of

Table 1 Specific enzyme activities of BBMV from rat kidney

Enzyme	Specific activities BBMV/CH ratio		
	(mU/mg)		(enrichment)
	CH	BBMV	
Alkaline phosphatase	481.76	4097.3	8.5
Leucine aminopeptidase	66.64	655.11	9.83

CH cortical homogenate, BBMV brush-border membrane vesicles

HCN3 in the cortical TALH (Fig. 4a–c). In contrast, HCN3 was observed at the basolateral membrane of TALH in the inner stripe of the outer medulla (Fig. 4d–f), suggesting that HCN3 is expressed in medullary TALH of deep juxtamedullary nephrons. We confirmed the basolateral localization of HCN3 in the TALH by double labeling of HCN3 and the $\alpha 1$ Na⁺-K⁺-ATPase (Fig. 4g–i). Double immunofluorescence labeling with HCN1 or HCN3, and calbindin

protein (CaBP) for distal convoluted tubule (DCT) and connecting tubule (CNT), and aquaporin 2 (AQP2) for CNT and collecting duct (CD) revealed lack of HCN1 and HCN3 in distal tubules (data not shown). Table 2 summarizes immunolocalization of HCN1 and HCN3 in the rat nephron.

Rats with hypokalemia developed an increase in HCN3 protein in the outer medulla and a decrease in the N-terminal truncated HCN3 in the cortex

Similar to previous studies (Wang et al. 1997; Amlal et al. 2000), in Table 3, it can be seen that animals deprived of K⁺ (KD) for 15 days developed hypokalemia (serum K⁺ concentration 2.76 ± 0.07 mEq/L), compared to control animals (3.74 ± 0.11 mEq/L). Accordingly, the urinary fractional excretion of K⁺ (FE_K) diminished to 2.86 ± 0.21 % in KD group with respect to control diet 14.68 ± 1.95 %

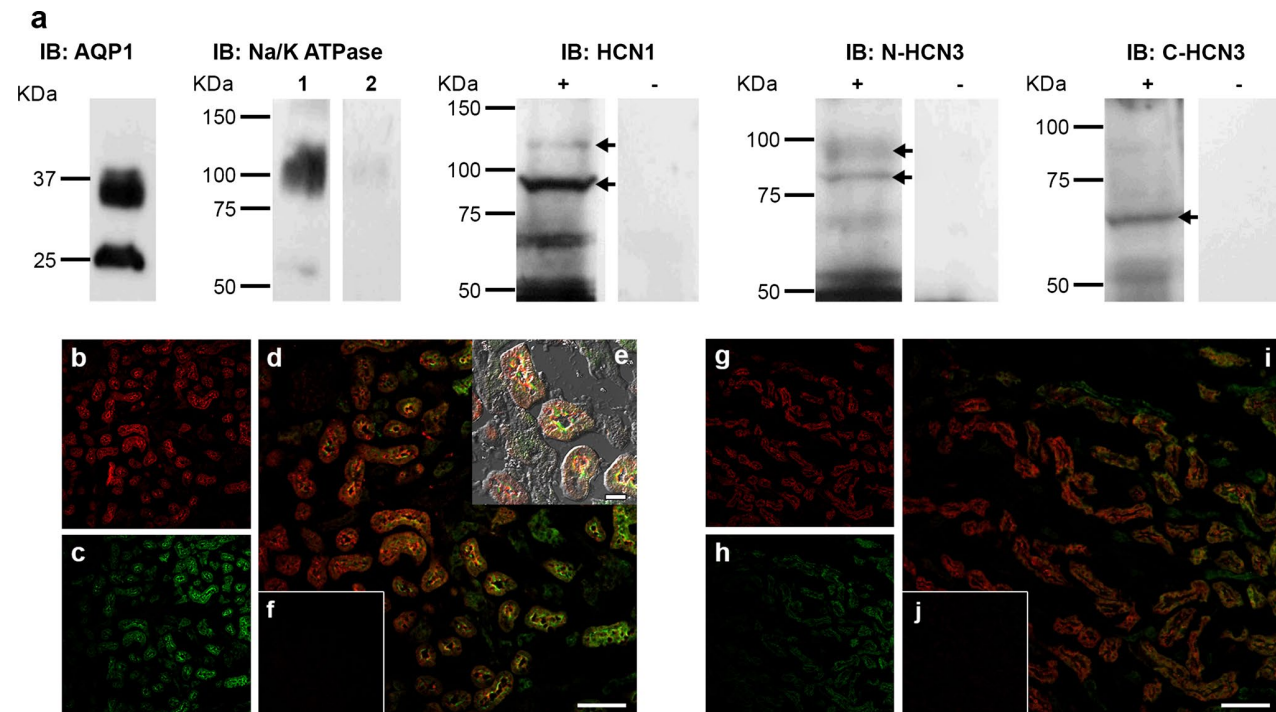


Fig. 3 Identification of HCN1 and HCN3 in brush-border membranes vesicles (BBMV). Immunoblot analysis (**a**) shows glycosylated (35 kDa) and unglycosylated (25 kDa) AQP1 proteins (positive control); $\alpha 1$ -subunit of Na–K-ATPase (negative control) was detected in plasma membranes of cortical homogenates (lane 1), but not in BBMVs (lane 2). Arrows denote the positions of specific immunoreactive bands corresponding to HCN1 (130 kDa, weak), C-terminal truncated HCN1 (93 kDa, strong), HCN3 (85–90 kDa), and N-terminal truncated HCN3 (65 kDa). The full-length and N-terminal truncated HCN3 proteins were detected with antibodies targeted against N-terminal (N-HCN3) and C-terminal (C-HCN3) epitopes, respectively. Immunofluorescence detection of HCN1 (red **b, g**) and

HCN3 (green **c, h**) in renal cortex tissue showed apical expression of HCN1 and HCN3 (yellow merge) in proximal tubules (**d**). Higher magnification (**e**) visualizes HCN1 and HCN3 channels in BBM (bright field, scale bar 25 μ m). HCN1 and HCN3 (yellow merge) were also colocalized in the S3 of proximal tubules in the outer stripe of the outer medulla, and the immunoreactivity was mainly cytoplasmic (**i**). Immunoreactivity of the HCN antibodies (+) disappeared when they were pre-adsorbed with the control peptide (**f, j**) or when the membrane was incubated only with the secondary antibody (–). BBMV control proteins = 50 μ g, BBMV HCN channels = 100 μ g, scale bar **d, i** = 100 μ m

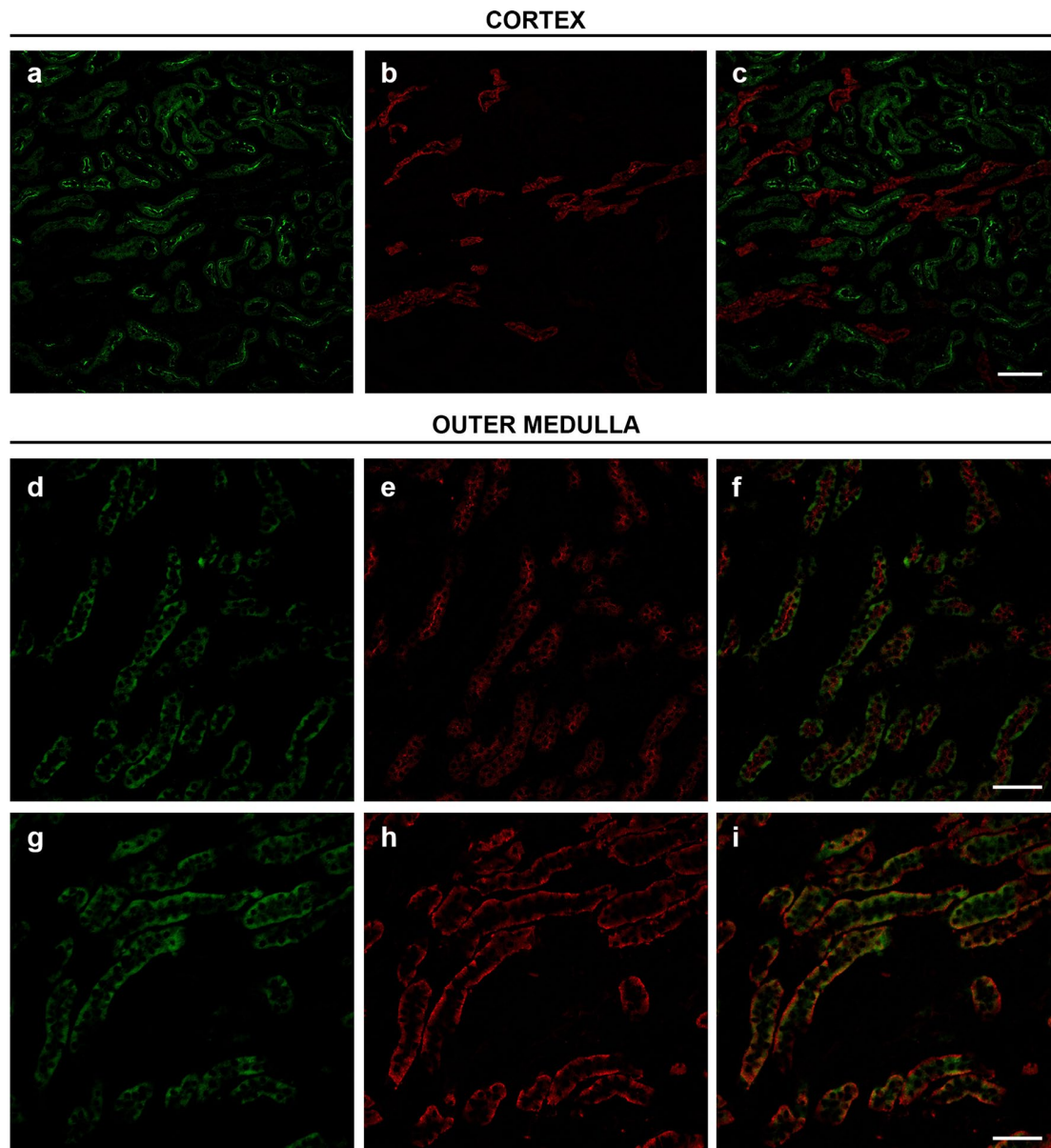


Fig. 4 Immunolocalization of HCN3 in the medullary thick ascending limbs of Henle (TALH). Kidney tissue sections were colabeled with antibodies directed against HCN3 (green **a**, **d**, **g**), the Tamm-Horsfall glycoprotein (THP, red **b**, **e**), and the $\alpha 1$ -subunit of Na-K-ATPase (red **h**). Merged images of HCN3 and THP labeling (**c**, **f**) show absence of HCN3 (green) in the cortical TALH (red **c**). HCN3

immunoreactivity was observed at the basolateral membrane of medullary TALH (inner stripe of the outer medulla; red **f**). Colabeling of HCN3 and the $\alpha 1$ -subunit of Na-K-ATPase confirmed the basolateral membrane location of HCN3 in the medullary TALH (yellow merge **i**). Scale bar **c** = 100 μm , **f**, **i** = 50 μm

(Table 4). Immunoblotting of plasma membranes from hypokalemic rat kidneys showed a significant increase in the protein level of HCN3 (258 %) in the outer medulla (TALH) compared to control (Fig. 5a). In contrast, protein abundance of the N-terminal truncated HCN3 decreased (68 %) only in the cortex (proximal tubules), suggesting stabilization of the full-length HCN3 and/or inhibition of channel proteolysis (Fig. 5b).

Rats fed with a high potassium load (HK) showed an increase in HCN3 in proximal tubules and MTALH and a decrease in the N-terminal truncated HCN3 in MTALH

As expected, plasma K^+ was higher in animals fed with high- K^+ diet (HK, 5.43 ± 0.41 mEq/L; Table 3) and the FE_{K} increased about nine times (153.41 ± 16.73 %) with

Table 2 Localization of HCN1 and HCN3 in the rat kidney

Immunolabeled segment	Marker	Colocalization with	
		HCN3	HCN1
PT	AQP1	+(Apical)	+(Apical and cytoplasmic)
TALH	THP	+(Basolateral)	–
CNT and DCT	CaBP	–	–
CD	AQP2	–	–

PT Proximal tubules, TALH thick ascending limb of Henle, CNT connecting tubules, DCT distal convoluted tubules, CD collecting ducts, AQP1 aquaporin 1, THP Tamm–Horsfall glycoprotein, CaBP Calcium-binding protein, AQP2 aquaporin 2

respect to the value of control animals (17.73 ± 1.63 %, Table 4). Urinary fractional excretion of chloride was also eight times higher (FE_{Cl} , 4.82 ± 1.21 vs 0.61 ± 0.10 %) due the diet enrichment in chloride (KCl). Serum Na^+ homeostasis was not affected in any of the K^+ diets. HK up-regulated HCN3 protein level in cortex (proximal tubule, 83 %) and outer medulla (TALH, 255 %) (Fig. 6a); in contrast, the N-terminal truncated HCN3 was down-regulated (78 %) only in TALH, compared to their corresponding controls (Fig. 6b).

Sodium chloride restriction does not regulate HCN3 expression

Rats fed with a sodium chloride-deficient diet (SD) for 7 days maintained their baseline levels of plasma sodium (144 mM; Table 3). Urinary fractional excretion of sodium (FE_{Na}) and FE_{Cl} significantly decreased (0.06 ± 0.01

and 0.49 ± 0.02 %, respectively) compared to control group (NS; 0.32 ± 0.03 and 0.80 ± 0.09 %, respectively; Table 4). We evaluated the effect of SD on HCN3 protein level in enriched plasma membranes fractions. Immunoblotting analysis revealed that the relative amount of the full-length and the N-terminal truncated HCN3 channels, in the renal cortex and outer medulla, did not changed by SD compared to the NS group (Fig. 7).

Discussion

We identified both HCN1 and HCN3 channels in cortical and medullary proximal tubules and only HCN3 in the medullary thick ascending limb of Henle (MTALH) of the rat nephron. HCN1 and HCN3 were found as the full-length, C-terminal truncated HCN1, and N-terminal truncated HCN3 proteins. All members of the HCN family present putative cleavage sites in their polypeptide chain for membrane-bound metalloendopeptidases, which are ubiquitously distributed in mammalian tissues. HCN1 has a potential cleavage site at the C-terminal between the amino acid residues Glu802–Val803, resulting in a proteolytic fragment of 93 kDa, whereas the HCN3 band protein of 65 kDa corresponds to the N-terminal proteolysis at the residues Ala162–Ile163 (Calejo et al. 2014). There is abundant expression of membrane-bound metalloendopeptidases in the kidney that are involved in the regulation of biologically important peptides (Turner and Tanzawa 1997). One of the major endopeptidases in luminal membranes of proximal tubules is the neutral endopeptidase-24.11 (NEP), which degrades vasoactive peptides, including the natriuretic peptides angiotensin II and endothelin-1 (Kenny and

Table 3 Plasma electrolytes levels from rats subjected to diets

Electrolyte (mmol/L)	NK (0.54 %)	KD (0 %)	NK (0.6 %)	HK (10 %)	NS (0.13 %)	SD (0 %)
Na^+	143.57 ± 1.11	143.86 ± 1.42	142.86 ± 1.10	145.86 ± 1.14	144 ± 1.95	144.57 ± 0.37
K^+	3.74 ± 0.11	$2.76 \pm 0.07^*$	3.97 ± 0.13	$5.43 \pm 0.41^*$	3.95 ± 0.08	3.68 ± 0.26
Cl^-	103.57 ± 0.90	100 ± 1.29	106 ± 0.65	108.57 ± 1.36	97.43 ± 1.09	92.71 ± 3.17

NS normal-sodium diet, SD sodium-deficient diet, NK normal-potassium diet, KD potassium-deficient diet, HK High-potassium diet
Values are average \pm SE * Student's *t* test $P < 0.001$, $n = 7$

Table 4 Urinary fractional excretion (FE) of electrolytes from rats subjected to diets

Fractional excretion (%)	NK (0.54 %)	KD (0 %)	NK (0.6 %)	HK (10 %)	NS (0.13 %)	SD (0 %)
FE_{Na}	0.13 ± 0.02	0.15 ± 0.03	0.19 ± 0.03	0.21 ± 0.08	0.32 ± 0.03	$0.06 \pm 0.01^*$
FEK	14.68 ± 1.95	$2.86 \pm 0.21^*$	17.73 ± 1.63	$153.41 \pm 16.73^*$	18.15 ± 1.78	18.77 ± 1.55
FE_{Cl}	0.62 ± 0.09	0.70 ± 0.07	0.61 ± 0.10	$4.82 \pm 1.21^*$	0.80 ± 0.09	$0.49 \pm 0.02^*$

NS normal-sodium diet, SD sodium-deficient diet, NK normal-potassium diet, KD potassium-deficient diet, HK high-potassium diet
Values are average \pm SE * Student's *t* test $P < 0.001$, $n = 7$

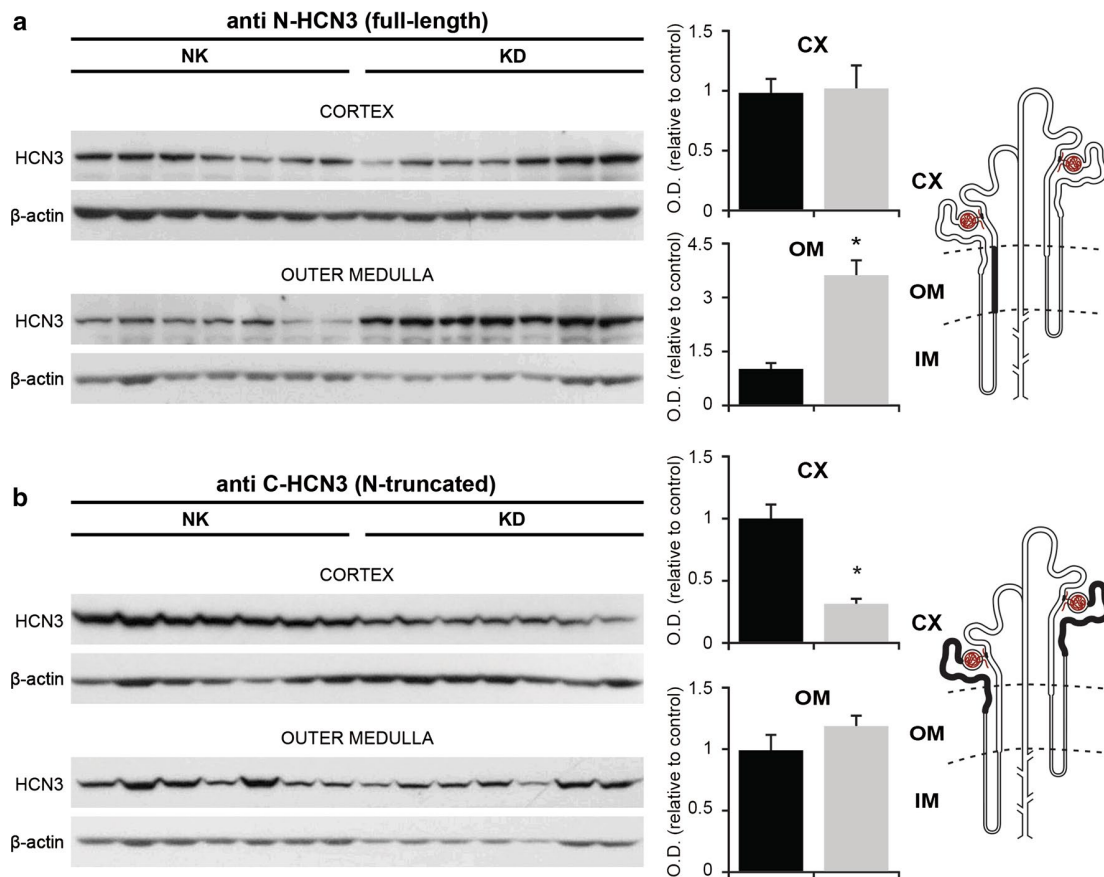


Fig. 5 Potassium depletion (KD) up-regulates HCN3 in the outer medulla (OM) and down-regulates the N-terminal truncated HCN3 in the cortex (CX). Immunoblots analysis detected HCN3 with an antibody targeted against an N-terminal (N-HCN3) or a C-terminal (C-HCN3) epitope in enriched plasma membranes fractions (25 μ g). KD increased HCN3 in the OM, but not in the CX (a). In contrast, KD decreased the protein abundance of the N-terminal truncated

HCN3 in the CX (b). The right panel displays the densitometric analyses of HCN3 channels abundance in rats subjected to KD (gray bar) with respect to the control group (NK, black bar). In the nephrons are highlighted the tubule segments where HCN3 and its N-terminal truncated protein are regulated by KD. Values are mean \pm SE; * $P < 0.001$, $n = 7$

Stephenson 1988; Stanović and Boranić 1998). Since we observed colocalization of HCN3 and NEP in the apical membrane of the straight proximal tubule (S3), we hypothesize that NEP, or another endopeptidase, interacts with HCN3 to modulate its activity. This finding needs further investigation.

It is known that HCN truncated channels can be functional. For example, the N-terminal truncated HCN2, with 129 amino acids deleted, displays similar biophysical properties to the full-length protein (Chen et al. 2000). Moreover, proteolysis can favor heteromerization among different HCN subtypes, changing their functional properties (Ye and Nerbonne 2009). The fact that several HCN isoforms and their corresponding truncated channels can be co-expressed in the same cell raises the possibility of coassembly among HCN1, HCN3, and their truncated channels in the proximal tubule and TALH. For example, targeted

proteolysis at the C-terminal end of HCN2 favors its coassembly with HCN4 to form functional heteromeric HCN channels in the myocardium of the adult mouse (Ye and Nerbonne 2009). Therefore, as the HCN2 in heart, renal HCN1 and HCN3 undergo proteolysis that could be producing functional heteromeric channels. However, functional studies of HCN1 and HCN3 together with their truncated channels are needed to elucidate the activity of these channel arrangements.

An I_h cationic current in a primary culture from the inner medulla was recorded at a holding potential of -50 mV; I_h activated faster toward more hyperpolarizing voltages (Bolívar et al. 2008). The proximal tubule cell and MTALH cells membrane voltages are between -50 and -70 mV (Frömter 1984; Bello-Reuss and Weber 1986; Merot et al. 1988), and -70 and -80 mV (Tsuruoka et al. 1993), respectively. Therefore, the membrane voltage from

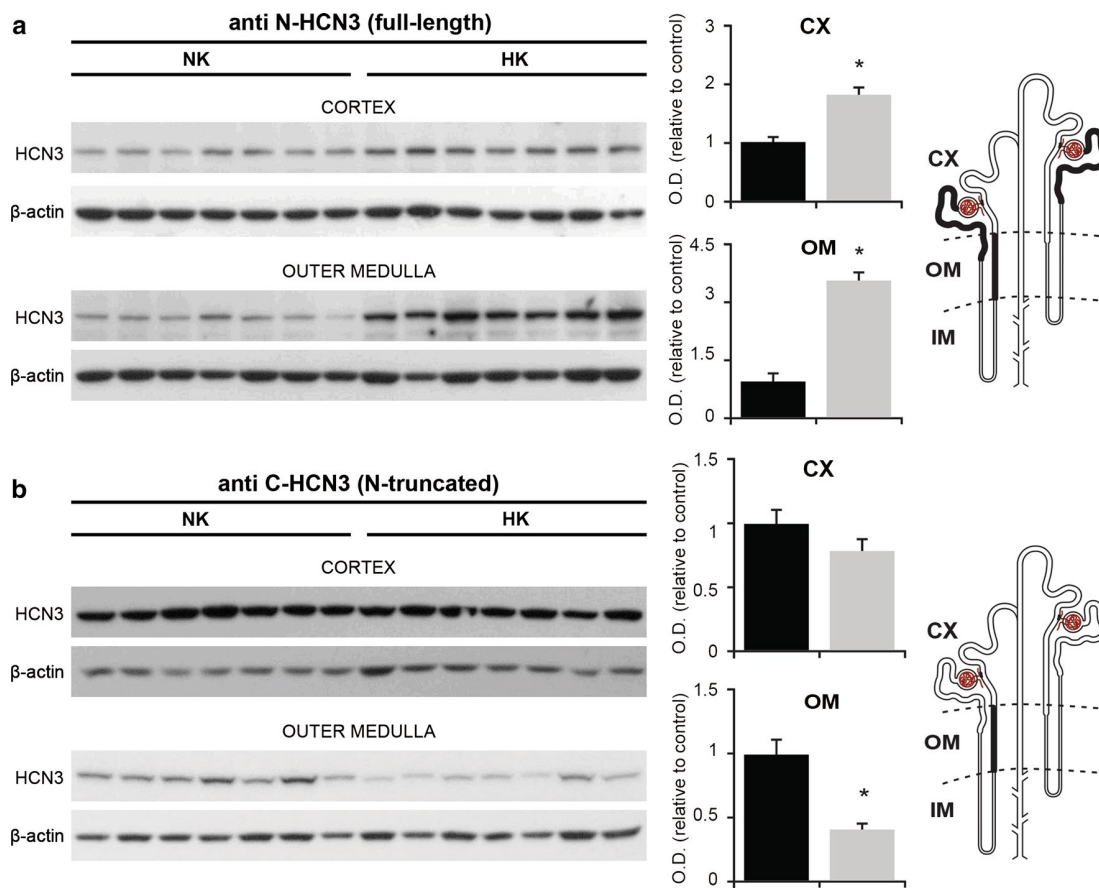


Fig. 6 High potassium loading (HK) up-regulates HCN3 in the cortex (CX) and outer medulla (OM), but down-regulates the N-terminal truncated HCN3 in OM. Immunoblots analysis of HCN3 was performed with antibodies targeted against N-terminal (N-HCN3) and C-terminal (C-HCN3) epitopes, in enriched plasma membranes fractions (25 μ g). HK increased HCN3 in both CX and OM (a),

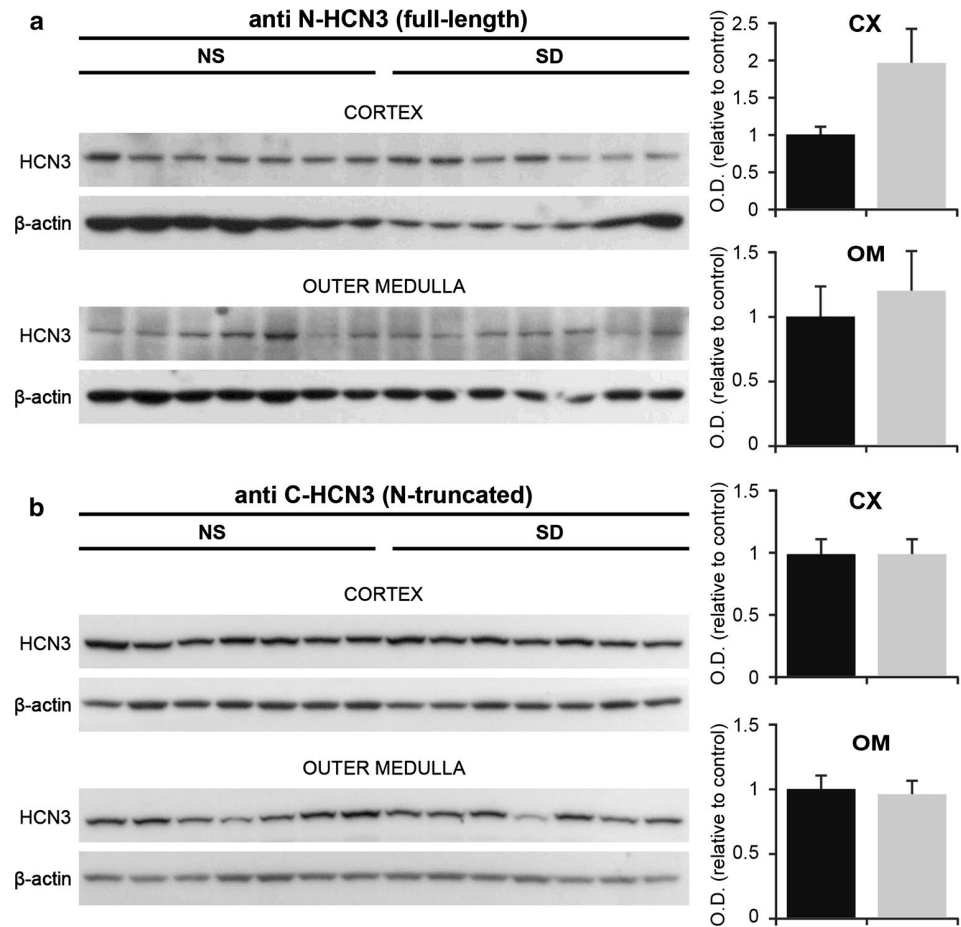
whereas HK decreased the N-terminal truncated HCN3 in the OM (b). Densitometric analyses of HCN3 protein level in rats subjected to HK (gray bar) with respect to the control group (NK, black bar). The nephron drawings show the tubule segments where HCN3 and its N-terminal truncated protein are regulated by HK. Values are mean \pm SE; * $P < 0.001$, $n = 7$

epithelia cells is similar to the resting membrane voltage of excitable cells. However, in epithelia cells transport depends on the transepithelial voltage.

HCN channels conduct Na^+ and K^+ with permeability ratios of about 1:4, but despite this preference for K^+ conductance, HCN channels carry an inward Na^+ current under physiological conditions due to the higher Na^+ electrochemical gradient (Pape 1996; Wahl-Schott and Biel 2009). However, an unusual feature of these channels is that their conductance is highly sensitive to external K^+ levels: Reduction in K^+ below normal extracellular levels (2–4 mM) results in a dramatic decrease in current magnitude, whereas an increase in K^+ augments HCN inward currents (Frace et al. 1992; Ludwig et al. 1998). K^+ metabolism can also modify NH_4^+ electrochemical gradients and, more importantly, influence the activation of HCN channels in order to maintain electrolyte and acid–base homeostasis in the renal epithelia.

As an approach to elucidating the role of HCN channels in Na^+ and K^+ homeostasis, and since HCN3 was found in the proximal tubules and MTALH, we evaluated HCN3 protein adaptation to three metabolic conditions: hypokalemia, HK load, and Na^+ restriction in the renal tissue. K^+ depletion (KD) increased HCN3 abundance in the outer medulla, but had no effect on the cortex. KD induces metabolic alkalosis in rats and humans due to higher activity of the cortical luminal Na^+/H^+ exchanger (NHE3) and the basolateral $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$ cotransporter in the proximal tubule, distal convoluted tubule, outer medullary collecting duct, inner medullary collecting duct (Nakamura et al. 1998a, b; Amlal et al. 2000), and MTALH (Amlal et al. 2000; Elkjaer et al. 2002). Up-regulation of HCN3 expression by KD in the rat MTALH would favor Na^+ reabsorption by HCN3 coupled to the either basolateral NaHCO_3 efflux or $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ activity (Fig. 8b).

Fig. 7 Sodium depletion (SD) does not regulate HCN3 abundance. Immunoblots of HCN3 were developed with antibodies targeted against the N-terminal (N-HCN3; **a**) and the C-terminal HCN3 (C-HCN3; **b**) epitopes in enriched plasma membranes fractions (25 μg). SD did not alter the protein levels of the full-length and N-terminal truncated HCN3 in the renal cortex (CX) and outer medulla (OM). Right graphs display the densitometric analyses of HCN3 levels in rats subjected to SD (gray bar) with respect to the control group (NS, black bar). Values are mean \pm SE; $n = 7$



Furthermore, the activity of HCN channels depends on the intracellular pH (pHi). Intracellular protons shift the voltage dependence of HCN channel activation to more hyperpolarized potentials and slow down the speed of channel opening. Protons inhibit HCN channels by binding to a titratable histidine that faces the intracellular environment, at the cytoplasmic S4–S5 linker (Zong et al. 2000). Since intracellular acidification is developed in K-depleted animals, a down-regulation of cationic currents by HCN3 channel is expected. We observed up-regulation of the protein level of HCN3 only in the MTALH in K restriction, which suggests a compensation response for a lower channel activity in this segment. Although pHi–HCN channels sensitivity depends on cAMP intracellular concentrations, HCN1 and HCN3 are weakly affected by cAMP (Wahl-Schott and Biel 2009).

KD induces a urinary concentrating defect (Amlal et al. 2000) due to the impairment of Na^+ and NH_4^+ reabsorption in the interstitial space of the outer medulla (Amlal et al. 1998). The apical NKCC2 is down-regulated (Elkjaer et al. 2002); in contrast, NHE3 is up-regulated in MTALH by KD. The capacity of TALH to reabsorb NaCl by luminal membranes is markedly reduced (Gutsche et al.

1984; Luke et al. 1985; Unwin et al. 1994), but not that for NaHCO_3 . NaCl and NaHCO_3 reabsorption is energized by the basolateral $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase in MTALH cells. During KD, the $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase activity is increased to maintain the NaHCO_3 absorption (Linas et al. 1979; Greger 1985; Hayashi and Katz 1987; Buffin-Meyer et al. 1996; Elkjaer et al. 2002). Therefore, it is likely that Na^+ permeability by HCN3 contributes to keep the $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase activity and, then, NaHCO_3 reabsorption during hypokalemia (Fig. 8b).

In this work, chronic dietary K^+ loading was sufficient to cause hyperkalemia in rats (DuBose and Good 1991, 1992). It is well established that an increase in dietary K^+ enhances the rate of K^+ secretion in the distal nephron (Stanton and Giebisch 1982; Najjar et al. 2005). Accordingly, we found that the average daily urinary fractional excretion of K^+ (FE_K) was approximately nine times higher in K^+ -loaded animals than in the control animals. In these conditions HCN3 abundance in plasma membranes was increased in both cortex (proximal tubules) and outer medulla (MTALH). A major regulatory effect of chronic hyperkalemia is to diminish the transfer of NH_4^+ and increase the transfer of K^+ from the loops of Henle

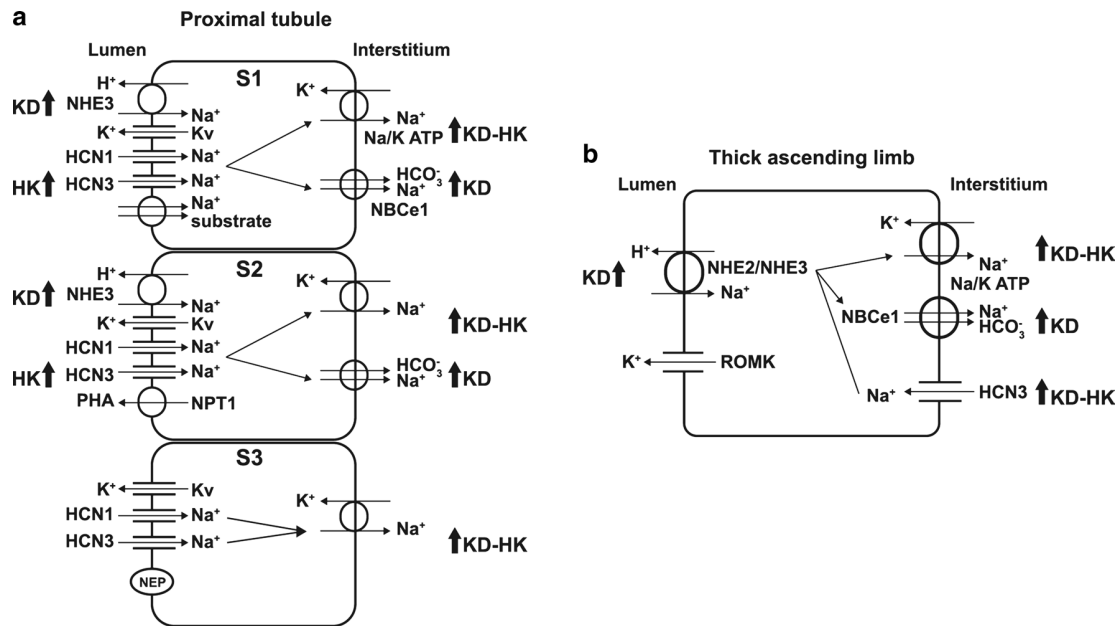


Fig. 8 Schematic diagram showing Na⁺ uptake by HCN1 and HCN3 and its coupling to the Na⁺-K⁺-ATPase to accomplish HCO₃⁻ reabsorption in the rat nephron. **a** High K⁺ loading (HK) enhances HCN3 abundance in the proximal tubule (PT) to favor Na⁺ reabsorption. Voltage depolarization after Na⁺ uptake at the apical membrane stimulates the Na⁺-K⁺-ATPase and electrogenic transport (for example, the organic anion transport NPT1). **b** K⁺ depletion (KD) and HK up-regulate HCN3 in the medullary thick ascending limb of Henle

(MTALH). In these metabolic conditions, Na⁺-K⁺-ATPase activity is stimulated at the basolateral membrane (Greger 1985; Hayashi and Katz 1987; Buffin-Meyer et al. 1996). NHE3 and NBCe1 protein levels are up-regulated in proximal tubules and MTALH by KD (Amlal et al. 2000; Elkjaer et al. 2002). Na⁺ uptake by HCN3 stimulates the Na⁺-K⁺-ATPase, enhancing Na⁺-HCO₃⁻ reabsorption by NBCe1 and then, metabolic alkalosis

to collecting ducts in the renal medulla. Therefore, both medullary NH₄⁺ accumulation and collecting duct NH₄⁺ secretion are impaired; in contrast, medullary K⁺ concentration and collecting K⁺ secretion are increased by dietary K⁺ loading (DuBose and Good 1991). Paradoxically, as in KD (Garg et al. 1982), the Na⁺-K⁺-ATPase activity is increased in MTALH by HK (Silva et al. 1973), but to favor K⁺ absorption and the countercurrent mechanism that determine the urine osmolarity. Based on our findings, Na⁺ uptake by HCN3 in MTALH would help to stimulate Na⁺-K⁺-ATPase activity, contributing to K⁺ medullary recycling and generation of the electrochemical gradient necessary for K⁺ secretion by distal K channels during HK (Fig. 8b).

K⁺ loading and hyperkalemia are associated with systemic metabolic acidosis due to a decrease in urinary ammonium excretion (DuBose and Good 1992). HK diets also develop metabolic acidosis because acute elevation of plasma K⁺ inhibits NaHCO₃ transport and passive NaCl reabsorption in the proximal tubule (Stokke et al. 1993). Simultaneous up-regulation of HCN3 in the proximal tubule and TALH suggests a K⁺-stimulating Na⁺ entry by HCN3, and then, coupling to basolateral Na⁺-K⁺-ATPase activity (Fig. 8).

The intracellular pH (pHi) has not been determined in the proximal renal epithelial cells during HK diets and hyperkalemia. However, epithelial cell pH increases from 7.12 to 7.3 when peritubular K⁺ concentration reaches 50 mEq/L in rat proximal convoluted tubules (Alpern 1985). Under HK, plasma K⁺ reached 5.43 mEq/L. Therefore, pHi in HK load will be almost the same as pHi in control conditions (pHi 7.12). The pKa for the proton-binding site in HCN2 is 7.6 (Zong et al. 2000); therefore, intracellular acidification would favor a down-regulation of HCN3 channel current by shifting the activation curve to the left and by slowing down the speed of channel activation. In control conditions and during HK, HCN3 channels should be protonated at this site in HK.

The issue that both maneuvers, potassium load and depletion, render similar results seem a paradox. It is also intriguing that both metabolic K⁺ conditions produce alkaline urines. The explanation most commonly accepted is that K⁺ depletion resulted in a primary defect in the ability to generate a normal transtubular hydrogen ion gradient. In contrast, acute administration of KCl suppresses net acid excretion and usually results in an alkali diuresis (Roberts et al. 1953). Also, the expression of some membrane proteins in renal epithelia, such as the Na⁺-K⁺-ATPase pump

and NCC cotransporter, is regulated in the same direction in hypokalemia and hyperkalemia (Silva et al. 1973; Elkjaer et al. 2002; Frindt and Palmer 2010). Therefore, it is not surprising that up-regulation of HCN3 in TALH in K depletion, and in both proximal tubules and TALH in high K⁺ loading, responds apparently equally but to different metabolic conditions. In K⁺ restriction, metabolic alkalosis provokes up-regulation of HCN3 in TALH, which suggests a role of HCN3 in stimulating Na⁺-K⁺-ATPase activity and then, NaHCO₃ efflux at the basolateral membrane, whereas in HK loading, HCN3 channels could contribute to Na⁺ reabsorption in proximal tubules and TALH, together with the electrogenic Na⁺ transporters and Na⁺-K⁺-ATPase since NaHCO₃, NaCl, and NH₄⁺ absorptions are impaired in these nephron segments (Fig. 8).

KD and HK diminished the relative abundance of the N-terminal truncated HCN3 in the proximal tubule and TAL, respectively (Figs. 5b, 6b). This differential regulation suggests stabilization of the full-length HCN3 and/or inhibition of channel proteolysis during chronic K⁺ diets. However, more studies are needed to elucidate the role of HCN channels proteolysis in the kidney.

Na⁺ restriction did not have any effect on the HCN3 expression in the rat kidney (Fig. 7), suggesting that in this condition Na⁺ homeostasis by HCN channels is conserved.

In conclusion, HCN channels appear strongly linked to K⁺ metabolism and, then, to Na⁺ and acid–base homeostasis in the rat nephron.

Acknowledgments We thank Rolando Carrisoza Gaytan, Maria Jose Gomora (confocal microscope, Macroproyecto SDI-PTID.05.01), Lucia Macias Rosales and Hector Rico Morales for their technical assistance; Lisa Satlin for reading an early draft of this manuscript and PhD program Ciencias Biologicas at the Universidad Nacional Autonoma de Mexico (UNAM). This work was supported by grants PAPIIT IN214613 (UNAM), Conacyt 166913 and scholarships from Conacyt (Zinaeli Lopez-Gonzalez, 175629) and PAPIIT IN214613 (Cosete Ayala-Aguilera, Zinaeli Lopez Gonzalez).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest All the authors declared no competing interests.

References

- Alpern RJ (1985) Mechanism of basolateral membrane H⁺/OH⁻/HCO⁻³ transport in the rat proximal convoluted tubule. A sodium-coupled electrogenic process. *J Gen Physiol* 86:613–636
- Amlal H, Wang Z, Soleimani M (1998) Potassium depletion down-regulates chloride-absorbing transporters in rat kidney. *J Clin Invest* 101:1045–1054. doi:10.1172/JCI686
- Amlal H, Habo K, Soleimani M (2000) Potassium deprivation upregulates expression of renal basolateral Na(+)-HCO(3)(-) cotransporter (NBC-1). *Am J Physiol Renal Physiol* 279:F532–F543
- Attmane-Elakeb A, Chambrey R, Tsimaratos M et al (1996) Isolation and characterization of luminal and basolateral plasma membrane vesicles from the medullary thick ascending loop of Henle. *Kidney Int* 50:1051–1057
- Bello-Reuss E, Weber MR (1986) Electrophysiological studies on primary cultures of proximal tubule cells. *Am J Physiol* 251:F490–F498
- Biagi BA, Sohtell M (1986) Electrophysiology of basolateral bicarbonate transport in the rabbit proximal tubule. *Am J Physiol* 250:F267–F272
- Bolívar JJ, Tapia D, Arenas G et al (2008) A hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated, (Ih-like) cationic current and HCN gene expression in renal inner medullary collecting duct cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 294:C893–C906. doi:10.1152/ajpcell.00616.2006
- Booth AG, Kenny AJ (1974) A rapid method for the preparation of microvilli from rabbit kidney. *Biochem J* 142:575–581
- Brandis M, Keyes J, Windhager EE (1972) Potassium-induced inhibition of proximal tubular fluid reabsorption in rats. *Am J Physiol* 222:421–427
- Buerkert J, Martin D, Trigg D (1982) Ammonium handling by superficial and juxtamedullary nephrons in the rat. Evidence for an ammonia shunt between the loop of Henle and the collecting duct. *J Clin Invest* 70:1–12
- Buffin-Meyer B, Marsy S, Barlet-Bas C et al (1996) Regulation of renal Na⁺, K(+)-ATPase in rat thick ascending limb during K⁺ depletion: evidence for modulation of Na⁺ affinity. *J Physiol* 490(Pt 3):623–632
- Calejo AI, Reverendo M, Silva VS et al (2014) Differences in the expression pattern of HCN isoforms among mammalian tissues: sources and implications. *Mol Biol Rep* 41:297–307. doi:10.1007/s11033-013-2862-2
- Carrisoza-Gaytán R, Rangel C, Salvador C et al (2011) The hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated HCN2 channel transports ammonium in the distal nephron. *Kidney Int* 80:832–840. doi:10.1038/ki.2011.230
- Chen J, Mitcheson JS, Lin M, Sanguinetti MC (2000) Functional roles of charged residues in the putative voltage sensor of the HCN2 pacemaker channel. *J Biol Chem* 275:36465–36471. doi:10.1074/jbc.M007034200
- Difrancesco D (1993) Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu Rev Physiol* 55:455–472. doi:10.1146/annurev.ph.55.030193.002323
- DuBose TD, Good DW (1991) Effects of chronic hyperkalemia on renal production and proximal tubule transport of ammonium in rats. *Am J Physiol* 260:F680–F687
- DuBose TD, Good DW (1992) Chronic hyperkalemia impairs ammonium transport and accumulation in the inner medulla of the rat. *J Clin Invest* 90:1443–1449. doi:10.1172/JCI116011
- Edwards RM, Pullen M, Nambi P (1999) Distribution of neutral endopeptidase activity along the rat and rabbit nephron. *Pharmacology* 59:45–50. doi:10.1159/000028304
- Elkjaer M-L, Kwon T-H, Wang W et al (2002) Altered expression of renal NHE3, TSC, BSC-1, and ENaC subunits in potassium-depleted rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 283:F1376–F1388. doi:10.1152/ajprenal.00186.2002
- Erdős EG, Skidgel RA (1989) Neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and related regulators of peptide hormones. *FASEB J* 3:145–151
- Frace AM, Maruoka F, Noma A (1992) External K⁺ increases Na⁺ conductance of the hyperpolarization-activated current in rabbit cardiac pacemaker cells. *Pflugers Arch* 421:97–99
- Frindt G, Palmer LG (2010) Effects of dietary K on cell-surface expression of renal ion channels and transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 299:F890–F897. doi:10.1152/ajprenal.00323.2010
- Frömter E (1984) Viewing the kidney through microelectrodes. *Am J Physiol* 247:F695–F705

- Garg LC, Mackie S, Tisher CC (1982) Effect of low potassium-diet on Na–K-ATPase in rat nephron segments. *Pflügers Arch* 394:113–117
- Good DW (1996) PGE2 reverses AVP inhibition of HCO₃[−] absorption in rat MTAL by activation of protein kinase C. *Am J Physiol* 270:F978–F985
- Good DW, Burg MB (1984) Ammonia production by individual segments of the rat nephron. *J Clin Investig* 73:602–610. doi:10.1172/JCI111250
- Greger R (1985) Ion transport mechanisms in thick ascending limb of Henle's loop of mammalian nephron. *Physiol Rev* 65:760–797
- Gutsche HU, Peterson LN, Sauerwald KH, Levine DZ (1984) Impaired diluting capacity of the thick ascending limb during loop bicarbonate and nitrate perfusion in vivo. *Can J Physiol Pharmacol* 62:1416–1422
- Hayashi M, Katz AI (1987) The kidney in potassium depletion. I. Na⁺–K⁺-ATPase activity and [3H] ouabain binding in MCT. *Am J Physiol* 252:F437–F446
- Hulter HN, Toto RD, Inicki LP, Sebastian A (1983) Chronic hyperkalemic renal tubular acidosis induced by KCl loading. *Am J Physiol* 244:F255–F264
- Hurtado R, Bub G, Herzlinger D (2010) The pelvis-kidney junction contains HCN3, a hyperpolarization-activated cation channel that triggers ureter peristalsis. *Kidney Int* 77:500–508. doi:10.1038/ki.2009.483
- Jaeger P, Bonjour JP, Karlmark B et al (1983) Influence of acute potassium loading on renal phosphate transport in the rat kidney. *Am J Physiol* 245:F601–F605
- Jakobsen JK, Odgaard E, Wang W et al (2004) Functional up-regulation of basolateral Na⁺-dependent HCO₃[−] transporter NBCn1 in medullary thick ascending limb of K⁺-depleted rats. *Pflügers Arch* 448:571–578. doi:10.1007/s00424-004-1303-4
- Jones JW, Sebastian A, Hulter HN et al (1982) Systemic and renal acid–base effects of chronic dietary potassium depletion in humans. *Kidney Int* 21:402–410
- Kamm DE, Strope GL (1973) Glutamine and glutamate metabolism in renal cortex from potassium-depleted rats. *Am J Physiol* 224:1241–1248
- Kenny AJ, Stephenson SL (1988) Role of endopeptidase-24.11 in the inactivation of atrial natriuretic peptide. *FEBS Lett* 232:1–8
- Krapf R (1988) Basolateral membrane H/OH/HCO₃ transport in the rat cortical thick ascending limb. Evidence for an electrogenic Na/HCO₃ cotransporter in parallel with a Na/H antiporter. *J Clin Investig* 82:234–241. doi:10.1172/JCI113576
- Laghmani K, Preisig PA, Moe OW et al (2001) Endothelin-1/endothelin-B receptor-mediated increases in NHE3 activity in chronic metabolic acidosis. *J Clin Investig* 107:1563–1569. doi:10.1172/JCI11234
- Linas SL, Peterson LN, Anderson RJ et al (1979) Mechanism of renal potassium conservation in the rat. *Kidney Int* 15:601–611
- Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M et al (1998) A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* 393:587–591. doi:10.1038/31255
- Ludwig A, Zong X, Hofmann F, Biel M (1999) Structure and function of cardiac pacemaker channels. *Cell Physiol Biochem* 9:179–186. doi:10.1159/000016315
- Luke RG, Booker BB, Galla JH (1985) Effect of potassium depletion on chloride transport in the loop of Henle in the rat. *Am J Physiol* 248:F682–F687
- Martinez F, Manganel M, Montrose-Rafizadeh C et al (1990) Transport of urate and *p*-aminohippurate in rabbit renal brush-border membranes. *Am J Physiol* 258:F1145–F1153
- Merot J, Bidet M, Gachot B et al (1988) Patch clamp study on primary culture of isolated proximal convoluted tubules. *Pflügers Arch* 413:51–61
- Much B, Wahl-Schott C, Zong X et al (2003) Role of subunit heteromerization and N-linked glycosylation in the formation of functional hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *J Biol Chem* 278:43781–43786. doi:10.1074/jbc.M306958200
- Najjar F, Zhou H, Morimoto T et al (2005) Dietary K⁺ regulates apical membrane expression of maxi-K channels in rabbit cortical collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 289:F922–F932. doi:10.1152/ajprenal.00057.2005
- Nakamura S, Amlal H, Galla JH, Soleimani M (1998a) Colonic H⁺–K⁺-ATPase is induced and mediates increased HCO₃[−] reabsorption in inner medullary collecting duct in potassium depletion. *Kidney Int* 54:1233–1239. doi:10.1046/j.1523-1755.1998.00105.x
- Nakamura S, Wang Z, Galla JH, Soleimani M (1998b) K⁺ depletion increases HCO₃[−] reabsorption in OMCD by activation of colonic H(+)-K(+)-ATPase. *Am J Physiol* 274:F687–F692
- Paillard M (1998) H⁺ and HCO₃[−] transporters in the medullary thick ascending limb of the kidney: molecular mechanisms, function and regulation. *Kidney Int Suppl* 65:S36–S41
- Pape HC (1996) Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu Rev Physiol* 58:299–327. doi:10.1146/annurev.physiol.58.1.299
- Roberts KE, Magida MG, Pitts RF (1953) Relationship between potassium and bicarbonate in blood and urine. *Am J Physiol* 172:47–54
- Silva P, Hayslett JP, Epstein FH (1973) The role of Na–K-activated adenosine triphosphatase in potassium adaptation. Stimulation of enzymatic activity by potassium loading. *J Clin Investig* 52:2665–2671. doi:10.1172/JCI107460
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT et al (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76–85
- Soleimani M, Singh G (1995) Physiologic and molecular aspects of the Na⁺/H⁺ exchangers in health and disease processes. *J Investig Med* 43:419–430
- Stanović S, Boranić M (1998) Membrane metalloendopeptidase (CD10/CALLA): distribution, physiologic and pathophysiologic functions and its inhibitors. *Liječnički Vjesnik* 120:131–137
- Stanton BA, Giebisch GH (1982) Potassium transport by the renal distal tubule: effects of potassium loading. *Am J Physiol* 243:F487–F493
- Stokke ES, Naess PA, Ostensen J et al (1993) Plasma potassium concentration as a determinant of proximal tubular NaCl and NaHCO₃ reabsorption in dog kidneys. *Acta Physiol Scand* 148:45–54. doi:10.1111/j.1748-1716.1993.tb09530.x
- Tannen RL (1970) The effect of uncomplicated potassium depletion on urine acidification. *J Clin Investig* 49:813–827. doi:10.1172/JCI106295
- Tannen RL (1987) Effect of potassium on renal acidification and acid–base homeostasis. *Semin Nephrol* 7:263–273
- Tannen RL, Wedell E, Moore R (1973) Renal adaptation to a high potassium intake. The role of hydrogen ion. *J Clin Investig* 52:2089–2101. doi:10.1172/JCI107394
- Tsuruoka S, Takeda M, Yoshitomi K, Imai M (1993) Cellular heterogeneity of ammonium ion transport across the basolateral membrane of the hamster medullary thick ascending limb of Henle's loop. *J Clin Investig* 92:1881–1888. doi:10.1172/JCI116780
- Turner AJ, Tanzawa K (1997) Mammalian membrane metallopeptidases: NEP, ECE, KELL, and PEX. *FASEB J* 11:355–364
- Unwin R, Capasso G, Giebisch G (1994) Potassium and sodium transport along the loop of Henle: effects of altered dietary potassium intake. *Kidney Int* 46:1092–1099
- Wahl-Schott C, Biel M (2009) HCN channels: structure, cellular regulation and physiological function. *Cell Mol Life Sci* 66:470–494
- Wainger BJ, DeGennaro M, Santoro B et al (2001) Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels. *Nature* 411:805–810. doi:10.1038/35081088

- Wang Z, Baird N, Shumaker H, Soleimani M (1997) Potassium depletion and acid–base transporters in rat kidney: differential effect of hypophysectomy. *Am J Physiol* 272:F736–F743
- Xue L, Li Y, Han X et al (2012) Investigation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels in interstitial cells of Cajal of human bladder. *Urology* 80(224):e13–e18. doi:[10.1016/j.urology.2012.04.005](https://doi.org/10.1016/j.urology.2012.04.005)
- Ye B, Nerbonne JM (2009) Proteolytic processing of HCN2 and co-assembly with HCN4 in the generation of cardiac pacemaker channels. *J Biol Chem* 284:25553–25559. doi:[10.1074/jbc.M109.007583](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.007583)
- Zha Q, Brewster AL, Richichi C et al (2008) Activity-dependent heteromerization of the hyperpolarization-activated, cyclic-nucleotide gated (HCN) channels: role of N-linked glycosylation. *J Neurochem* 105:68–77. doi:[10.1111/j.1471-4159.2007.05110.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05110.x)
- Zong X, Stieber J, Ludwig A et al (2000) A single histidine residue determines the pH sensitivity of the pacemaker channel HCN2. *J Biol Chem* 276:6313–6319. doi:[10.1074/jbc.M010326200](https://doi.org/10.1074/jbc.M010326200)