



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio del cambio en la concentración intracelular de cloruro ($[Cl^-]_i$)
de ovocitos de *Xenopus laevis* que sobreexpresan NKCC,
en condiciones de depleción de este ion

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:
XOCHIQÚETZAL GONZÁLEZ RODRÍGUEZ

TUTOR PRINCIPAL
DR. JOSÉ DE JESÚS GARCÍA VALDÉS
[Facultad de Química, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DR. GERARDO GAMBA AYALA
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

DRA. CONSUELO PLATA RAMOS
[Instituto de Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán](#)

Ciudad Universitaria, Ciudad de México. 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.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia. A mi madre Blanca, por su infinita paciencia y amor. A mis hermanas Dama, Lucre y Gabi. A mis sobrinos Sebastián y Leonardo.

A mi otra familia: mis amigos. A los telerines por seguir juntos a pesar del paso de los años: Chayo, Gus, Salo, Abi, Bety, Manuel, Juanín, Dona, Angie, Chío, José.

A Paty y Nora, por el apoyo, las porras y las largas horas de charla. Por enseñarme dentro y fuera del aula.

A los compañeros de las milongas: Ricardo, Anaité, Anel, Isabel, Enrique, Servan, Gaby, Vic, Alma, Ulises, Jess, Meribet, Ralf, Víctor.

A las chicas de las clases de idiomas: Frida L, Nancy, Melanie, Ana, Frida H.

A los compañeros del laboratorio 113: Rox, Adán, Karen, Abel, Alonso, María Elena, Emmanuel. A mi queridísimo Iván, por brindarme su apoyo espontáneo cuando más lo necesité.

A los chicos de las estancias: Fernando y Rodrigo, por su trascendente contribución a este trabajo.

A los compañeros de la maestría Francisco y Quetzal.

A Ángel, por el tiempo pasado, aunque breve. Por siempre en mi corazón.

A los miembros del comité tutorial el Dr. Gerardo Gamba y la Dra. Consuelo Plata por sus valiosas observaciones y comentarios.

A Norma Vázquez, quien proporcionó los ovocitos usados en este proyecto.

A las valientes ranitas.

A los miembros del jurado Dr Antonio Peña, Dr Ignacio López, Dr León Islas, Dra Herminia Pasantes y Dr Carlos Muñoz por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y sus invaluable observaciones y comentarios.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo otorgado para asistir al XXIV Congreso de la Sociedad Mexicana de Electroquímica.

A CONACYT por la beca otorgada número 215220 para los estudios de posgrado de maestría.

A mis alumnos, por dejarme compartir lo poco que sé con ellos y por ayudarme a mantener mi fe en la humanidad, la mayoría de las veces.

A mi tutor, el Dr Jesús por permitirme trabajar en su laboratorio y su gran paciencia y generosidad durante este tiempo.

A los profesores Adolfo y Silvia.

Al pequeño Emmanuel, por dejarme guiarlo y compartir lo poco que sé.

A todos aquellos que, de alguna forma, contribuyeron a que pudiera concluir este proyecto.

A los que perdí en el camino.

A los que se me están olvidando.

A la UNAM, con todos sus defectos y cualidades, por seguir cobijándome.

ÍNDICE

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS _____	3
RESUMEN _____	4
1. INTRODUCCIÓN _____	6
2. ANTECEDENTES _____	24
3. JUSTIFICACIÓN _____	29
4. HIPÓTESIS _____	29
5. OBJETIVOS _____	30
6. METODOLOGÍA	
6.1. Construcción y caracterización de los microelectrodos	
6.1.1. Microelectrodo selectivo a Cl^- (MES-Cl)	
6.1.1.1. Construcción_____	31
6.1.1.2. Caracterización	
6.1.1.2.1. Determinación del intervalo de $[\text{Cl}^-]$ de respuesta lineal	32
6.1.1.2.2. Estudio del tiempo de estabilización de la lectura_____	33
6.1.1.2.3. Estudio de interferentes_____	33
6.1.2. Microelectrodo de referencia (μRef)	
6.1.2.1. Construcción_____	34
6.1.2.2. Caracterización_____	34
6.2. Mediciones intracelulares en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	35
6.2.1. Caracterización del sistema intracelular	
6.2.1.1. Monitoreo en continuo_____	36
6.2.1.2. Incubaciones_____	36
6.2.1.3. Inyecciones de soluciones estándar de Cl^- _____	38
6.3. Estudios de función de cotransportadores electroneutros $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ _____	38
7. RESULTADOS	
7.1 Caracterización de los microelectrodos	
7.1.1 Microelectrodo selectivo a Cl^- (MES-Cl)	
7.1.1.1 Determinación del intervalo de $[\text{Cl}^-]$ de respuesta lineal_____	39
7.1.1.2 Estudio del tiempo de estabilización de la lectura_____	40
7.1.1.3 Estudio de interferentes_____	42

7.1.2 Microelectrodo de referencia (μRef)	44
7.2 Mediciones intracelulares en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	
7.2.1 Caracterización del sistema intracelular	48
7.2.1.1 Monitoreo en continuo	50
7.2.1.2 Incubaciones	51
7.2.1.3 Inyecciones de soluciones de Cl^-	53
7.2.2 Estudios de función de cotransportadores electroneutros $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$	
7.2.2.1 Medio hipotónico sin Cl^-	54
7.2.2.2 Coexpresión del cotransportador KCC2	58
8. CONCLUSIONES	61
9. ANEXOS	
A. PREPARACIÓN DE LOS OVOCITOS DE <i>Xenopus laevis</i>	62
B. CÁLCULO DE CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE Cl^- ($[\text{Cl}^-]_i$)	63
C. CONSTANTES DE SELECTIVIDAD ($k_{A,B}$)	64
D. ARTÍCULO	66
10. BIBLIOGRAFÍA	72

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARNc	Ácido ribonucleico complementario
BSC	Cotransportador sensible a bumetanida (“ B umetanide– S ensitive C otransporter”)
CCC	Cotransportador de Cation Cloruro (“ C ation C hloride C otransporter”)
$[\text{Cl}^-]$	Concentración de cloruro
$[\text{Cl}^-]_i$	Concentración intracelular de cloruro
E	Diferencia de potencial o voltaje
ESI	Electrodo sensible a ion
mM	Concentración milimolar (mmol/L)
M	Concentración molar (mol/L)
KCC	Cotransportador K^+/Cl^- (“ K ⁺ / Cl ⁻ C otransporter”)
MES-Cl	Microelectrodo selectivo a Cl^-
MESI	Microelectrodo sensible a ion
NCC	Cotransportador Na^+/Cl^- (“ N a ⁺ / Cl ⁻ C otransporter”)
NKCC	Cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ (“ N a ⁺ / K ⁺ / Cl ⁻ C otransporter”)
pCl	Logaritmo negativo de la concentración molar de cloruro ($-\log[\text{Cl}^-]$)
μRef	Electrodo de micro-referencia

RESUMEN

Los cotransportadores de catión cloruro (CCC) forman parte del mecanismo que media la salida y entrada de Cl^- a la célula. Se ha encontrado que la concentración intracelular de cloruro ($[\text{Cl}^-]_i$) regula la actividad de estos cotransportadores, así, por ejemplo, los NKCC (que dirigen la entrada de dicho ion) aumentan su actividad al disminuir el cloruro intracelular.

La principal técnica usada para estudiar la actividad de estas proteínas es medir la captación de $^{86}\text{Rb}^+$ radiactivo. Alternativamente se ha probado la medición de entrada de TI^+ por fluorescencia con colorantes, y determinar cambios en el pH intracelular inducidos por NH_4^+ . No obstante, estas técnicas no cuantifican directamente los cambios que ocurren en la $[\text{Cl}^-]_i$ cuando las células se someten a las diferentes condiciones de incubación utilizadas en dichos estudios.

Es por ello que el presente trabajo tuvo como uno de sus objetivos la construcción y caracterización de un sistema de microelectrodos para la medición intracelular de Cl^- en ovocitos de *X. laevis*. Posteriormente se probaron disoluciones con distintas de tonicidades con ovocitos nativos y finalmente se estudió el efecto de la sobre expresión los cotransportadores NKCC1 y NKCC2 sobre la concentración de este ion.

En la caracterización del sistema de medición, previo a los ensayos en células, se evaluó la reproducibilidad de la lectura de los microelectrodos, estableció el intervalo de concentraciones de Cl^- que tienen respuesta lineal, determinó el tiempo de estabilización de la lectura, y evaluó el efecto de diversos aniones de interés biológico con posible interferencia sobre la respuesta del electrodo. En estos ensayos se mostró que los microelectrodos eran adecuados y confiables para las mediciones intracelulares.

En los estudios con ovocitos se midió la $[\text{Cl}^-]_i$ después de la incubación en medio isotónico, hipotónico e hipertónico. Asimismo, se hizo la medición mientras se modificaba la concentración de iones del medio. En todos los casos se detectaron cambios en la $[\text{Cl}^-]_i$ relacionados con las modificaciones en la concentración de sales de medio de incubación, esto es: hubo un aumento en la $[\text{Cl}^-]_i$ por exposición a un medio hipertónico y disminución en medio hipotónico, con respecto al medio isotónico.

Posteriormente se cuantificó este ion en ovocitos con sobreexpresión de dos cotransportadores de la familia de los CCC: NKCC1 (presente de forma ubicua en los tejidos) y NKCC2 (presente sólo en riñón). Los ovocitos transfectados con NKCC1 y NKCC2 tuvieron una concentración de Cl^- en medio isotónico ligeramente mayor que los nativos (12.55 % y 17.42 %, respectivamente), debido a que ambos cotransportadores tienen una pequeña actividad basal en medio isotónico.

En seguida se probaron las condiciones de depleción de Cl^- usadas para el estudio de los NKCC: incubación en medio hipotónico bajo en Cl^- y coexpresión de KCC2 (cotransportador de la familia de CCC que media la salida de Cl^-). La incubación en medio hipotónico sin Cl^- ocasionó que la concentración intracelular del mismo disminuyera en promedio 57.9%, mientras que con la coexpresión de KCC2 la disminución fue de 22.98 % y 29.86 % para NKCC1 y NKCC2, respectivamente en relación con los ovocitos nativos.

Finalmente se midió la $[\text{Cl}^-]_i$ después incubar en el medio de retoma de este ion. Para el caso de los ovocitos incubados inicialmente en medio hipotónico sin Cl^- , aquellos con sobreexpresión de NKCC1 presentaron un aumento en la $[\text{Cl}^-]_i$ de 10.89% mayor que en el caso de NKCC2. En la recaptura de Cl^- para las células con coexpresión de KCC2, no se encontró una diferencia significativa en la $[\text{Cl}^-]_i$ entre los grupos de ovocitos.

1. INTRODUCCIÓN

COTRANSPORTADORES CATIÓN-CLORURO

Las proteínas integrales de membrana son un componente esencial y sumamente importante de la célula. Realizan una gran cantidad de funciones muy variadas como la absorción de nutrientes, regulación de la concentración de metabolitos, remoción de toxinas, mantenimiento de gradientes químicos y iónicos, secreción de macromoléculas y ácidos nucleicos; participan también en las transformaciones de la energía como la síntesis de ATP, por citar sólo unas pocas de sus múltiples actividades. La importancia de ellas es tal que alrededor de un tercio de las proteínas celulares se encuentran embebidas en las membranas biológicas. La caracterización bioquímica y el análisis funcional del flujo de sustratos en la primera mitad del siglo veinte, llevó a la clonación de los primeros transportadores hace menos de 20 años (Quick, 2002). Desde entonces se han hecho avances importantes en la identificación molecular y caracterización de un tipo particular de proteínas de membrana: los acarreadores de solutos (SLC por su nombre en inglés: **Solute Carriers**).

De acuerdo con la Base de Datos del Comité de Nomenclatura de la Organización del Genoma Humano (HUGO por su nombre en inglés: Human Genome Organization) existen 43 familias de acarreadores de solutos, y un total de 298 genes. Éstos codifican para transportadores que incluyen uniportadores (transportadores pasivos), cotransportadores (transportadores acoplados), antiportadores (intercambiadores), transportadores vesiculares y transportadores mitocondriales. La cantidad de genes de SLC representa ~1% del total de los genes que se ha calculado componen el genoma humano (Gamba, 2005).

Una de las familias que fue identificada a nivel molecular en las últimas dos décadas contiene todos los genes que codifican para los cotransportadores catión-cloruro (CCC por sus iniciales en inglés **Cation-Chloride Cotransporter**) y que se conoce como la familia SLC12, identificada primero en peces y posteriormente en mamíferos (Hebert, Mount and Gamba, 2004; Gamba, 2005; Mount *et al*, 1998; Kahle *et al*, 2006). En la década de 1980 se describieron por primera vez estos cotransportadores y desde entonces se ha generado una notable cantidad de información a partir de su caracterización en diferentes células y condiciones experimentales, así como de su

identificación molecular. Con la identificación de los primeros miembros estuvieron disponibles muchas herramientas para aislar los miembros restantes y estudiar estas proteínas a partir de la organización molecular de sus genes, hasta su papel en enfermedades monogénicas y poligénicas (Haas and Forbush, 1994; Gamba, 2005).

Hasta la fecha se han identificado nueve genes de la familia SLC12 (*SLC12A1-9*), de éstos se han caracterizado claramente siete miembros, mientras que los otros dos permanecen huérfanos.

De acuerdo con la dirección del transporte de Cl^- los miembros de la familia SLC12 se agrupan en dos ramas principales: una media la salida de Cl^- de la célula y la otra permite la entrada de dicho ion.

El transporte vía los CCC es de tipo secundario, puesto que el movimiento neto de los iones ocurre a favor del gradiente electroquímico. En ellos no hay consumo de energía en forma de ATP como ocurre con los transportadores primarios, que mueven iones contra su gradiente electroquímico, de los cuales el más importante es la ATPasa Na^+/K^+ . Por ello, en los CCC el catión es la especie que dicta la dirección global del flujo de iones: aquellos que transportan Cl^- junto con Na^+ utilizan la fuerza que proporciona su gradiente electroquímico para movilizar Cl^- al interior de la célula (puesto que se encuentra en mayor concentración en el exterior); mientras que otros CCC aprovechan que el K^+ se encuentra en mayor concentración dentro de la célula para mover Cl^- al exterior.

Se han descrito 3 tipos de CCC de acuerdo con la estequiometría de los iones transportados: K^+/Cl^- (llamados KCCs, por K^+/Cl^- Cotransporter), Na^+/Cl^- (nombrado NCC por Na^+/Cl^- Cotransporter]) y $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ (conocidos como NKCCs por $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ Cotransporter) (Mount *et al*, 1998; Hebert *et al* 2004; Gamba, 2005; Kahle *et al*, 2006).

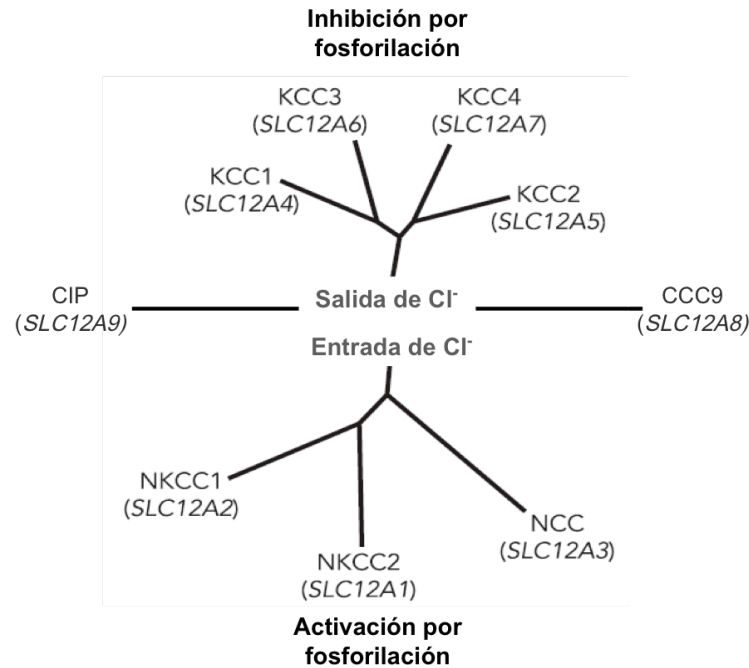


Figura 1.1. Familia SLC12 de cotransportadores catión-cloruro (CCC)

CIP: cation-chloride cotransporter interacting protein (proteína que interactúa con cotransportador catión-cloruro)

Modificado de: Kahle *et al*, 2006

Se han identificado cuatro acarreadores KCC (KCC1 a KCC4) codificados por cuatro genes separados (*SLC12A4* a *SLC12A7*). KCC1 y KCC4 son de expresión ubicua, KCC2 se encuentra restringido a neuronas y KCC3 es abundante en músculo, cerebro, médula espinal, riñón, corazón, páncreas y placenta. El gen *SLC12A3* codifica para el cotransportador NCC, que se expresa exclusivamente en riñón en el túbulo contorneado distal. Respecto a NKCCs se han identificado dos genes: NKCC1, (*SLC12A2*) presente en células no epiteliales y en la membrana basolateral de las células epiteliales, y NKCC2 (*SLC12A1*), expresado exclusivamente en la porción ascendente gruesa del asa de Henle en riñón. Los iones transportados y funciones de los miembros más nuevos, CCC9 y CCC8 o CIP (*SLC12A8* y *SLC12A9*, respectivamente), no se han determinado todavía (Gamba, 2005; Ganong *et al*, 2004; Caron *et al*, 2000; Mount *et al*, 2000; Hebert *et al*, 2004; Mount *et al*, 2002).

La estequiometría del transporte de los CCC es mover un catión (Na^+ o K^+) junto con cada Cl^- acarreado, de tal forma que no hay movimiento neto de carga asociado al movimiento de iones, así que una característica de estos cotransportadores es ser eléctricamente silentes. Por ello se les conoce como cotransportadores electroneutros (Russell, 2000; Mercado, Mount and Gamba, 2004).

Se sabe que la actividad de todos los miembros de esta familia se regula por su estado de fosforilación mediado por proteínas cinasas. Para la rama de cotransportadores que dirige la entrada de Cl^- a la célula (NCC y NKCCs) la fosforilación incrementa la actividad, en tanto que la desfosforilación los inhibe. La fosforilación tiene un efecto inhibitorio para los cotransportadores que regulan la salida de Cl^- (KCCs) en tanto que la desfosforilación muestra el efecto contrario. Se ha propuesto que ambas ramas de cotransportadores están reguladas por un sistema común de sensores (sensibles a cambios en la concentración intracelular de Cl^- , volumen celular y/o a la tonicidad extracelular) y transductores que finalmente lleguen a la fosforilación y desfosforilación de los mismos. Hasta el momento, los componentes de la vía de señalización y los mecanismos de regulación aún se desconocen en su mayoría. En años recientes se ha encontrado evidencia que sugiere que las cinasas de serina y treonina de dos diferentes familias de genes son componentes de la vía de señalización. Una es la familia WNK (“With No lysine”=K), la otra, las cinasas tipo Ste20, SPAK/OSR1 (SPAK= “Ste20-related proline–alanine–rich kinase”; OSR1= “oxidative stress response 1”). Se ha establecido un vínculo entre estas dos familias de cinasas al encontrar que WNK interactúan y fosforilan a SPAK/OSR1, que, posteriormente, fosforilan y activan a los cotransportadores (Haas, Forbush, 2000; Khale *et al*, 2003; Kahle *et al*, 2005; Gamba, 2005; Kahle *et al*, 2006; Ponce *et al*, 2008; Russell, 2000).

Estas proteínas de membrana están involucradas en varias actividades fisiológicas incluyendo la absorción y secreción transepitelial de iones, la regulación del volumen celular en células epiteliales y no epiteliales y el mantenimiento y modulación de la concentración intracelular de Cl^- ($[\text{Cl}^-]_i$) por debajo o por arriba de su potencial de equilibrio electroquímico. Debido a que poseen una importante capacidad de eflujo o influjo y algunos se encuentran expresados de manera ubicua, su activación es uno de los mecanismos que usan diversas células

para ajustar su osmolaridad interna cuando se encuentran expuestas a cambios en la osmolaridad externa. También se encuentran involucrados en la homeostasis de la presión y pH sanguíneos. Recientemente está emergiendo una nueva variedad de papeles fisiológicos para los cotransportadores electroneutros. Un ejemplo es la regulación de $[Cl^-]_i$ en las neuronas, y con ello, la modulación de la excitabilidad neuronal (Delpire, 2000; Russell, 2000; Gamba, 2005; Kahle *et al*, 2005).

Debido a los múltiples papeles fisiológicos que desempeñan estos cotransportadores es de esperarse que los cambios en sus funciones, causadas por mutaciones en los genes que los codifican, se manifiesten como patologías. Se han reportado tres enfermedades genéticas mendelianas asociadas directamente con mutaciones con pérdida de función de tres cotransportadores de la familia SLC12. Los cotransportadores involucrados son: NKCC2 (síndrome de Bartter tipo I), NCC (síndrome de Gitelman), ambos de expresión exclusiva en riñón y que se caracterizan por hipotensión debido a la pérdida renal de NaCl y alcalosis hipocalémica; y el KCC3 (síndrome de Anderman), una severa neuropatía periférica heredada asociada a agénesis del cuerpo caloso. Además, los ratones nulos para varios miembros de esta familia han generado nueva información importante respecto a sus papeles fisiológicos, por ejemplo los ratones nulos para KCC4 desarrollan acidosis renal en túbulo distal y sordera (Hebert *et al*, 2004; Kahle *et al*, 2006; Mercado *et al*, 2004).

Estos cotransportadores son blanco de distintos fármacos que inhiben su actividad. El NCC es bloqueado específicamente por los diuréticos tipo tiazida, como la hidroclorotiazida. Los KCCs se bloquean por estilbenos de ácido sulfónico, como DIDS (ácido 4,4'-diisotiocianoestilbeno-2,2'-disulfónico). Los diuréticos de asa (bumetanida, furosemida) inhiben tanto a NKCC como a KCC, pero son mucho más potentes en su acción sobre el primero. Hay algún traslape en la sensibilidad a los inhibidores en los últimos dos grupos porque concentraciones altas de DIDS o diuréticos de asa pueden tener efecto sobre los cotransportadores NKCC y KCC, respectivamente, sin embargo, existe una clara diferencia entre cada grupo de cotransportador en la afinidad por los inhibidores (Russell, 2000; Kahle *et al*, 2006).

El presente trabajo se centró en estudiar los miembros de tipo NKCC, que median la entrada de Cl^- a la célula.

COTRANSPORTADORES NKCC

Los cotransportadores Na-K-Cl mueven iones Na^+ , K^+ y Cl^- hacia dentro de la célula en una amplia variedad de células epiteliales y no epiteliales. Se encuentran en muchos tejidos distintos de una amplia variedad de especies, donde tienen una serie de funciones fisiológicas vitales (Ganong *et al*, 2002).

El NKCC tiene un papel importante en el mantenimiento de agua y contenido de electrolitos en las células y promueve el movimiento de sal y agua a través de células polarizadas. Se trata de la principal vía de influjo de Cl^- a la célula, por lo que se encarga de regular la concentración intracelular de este ion junto con otros transportadores de solutos (Ganong *et al*, 2002).

Los NKCC movilizan Cl^- junto con Na^+ y K^+ manteniendo el requerimiento de electroneutralidad con una estequiometría de $1\text{Na}^+:1\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ en la mayoría de las células; la única excepción documentada es en el axón gigante de calamar, donde la estequiometría es $2\text{Na}^+:1\text{K}^+:3\text{Cl}^-$ (Haas, Forbush 1994; Russell, 2000). El término de electroneutralidad, como se emplea aquí, significa que el proceso de transporte global de iones vía el cotransportador no es guiado por el potencial de membrana celular; y que el proceso de transporte tampoco genera directamente una corriente de membrana por lo que no afecta el potencial transmembranal (Russell, 2000).

El transporte de cualquiera de los iones involucrados (Na^+ , K^+ y Cl^-) mediado por NKCC requiere la presencia simultánea de los tres en el mismo lado de la membrana y se inhibe cuando se omite del medio cualquiera de ellos (Haas, Forbush 1994; Russell, 2000).

En la mayoría de las células estudiadas hasta la fecha, NKCC es activado por el encogimiento celular y por ello tiene una función potencial en la regulación de su volumen. En algunas células la actividad de NKCC puede estar involucrada en la modulación de su crecimiento y desarrollo (Haas, Forbush, 2000; Delpire, 2000; Haas, Forbush 1994; Haas, Forbush, 1998).

La actividad de los NKCC se regula por procesos de fosforilación/desfosforilación de la proteína a través de cinasas específicas de reciente descubrimiento. Son activados por efecto de la fosforilación e inhibidos por desfosforilación. Un importante regulador de la actividad del

cotransportador es la $[\text{Cl}^-]$; la reducción de este ion en la célula incrementa la actividad de NKCC y está coordinada con los canales de Cl^- (Haas, Forbush, 1998).

La traslocación de los tres iones por estos cotransportadores se inhibe en todas las células por diuréticos de asa del ácido 5-sulfamoilbenzoico, que incluyen (en orden de incremento de potencia) furosemida, bumetanida y benzmetanida (Haas, Forbush, 2000; Russell, 2000).

A la fecha se han identificado dos isoformas de NKCC mediante la clonación y expresión de ADNc: NKCC1, de expresión ubicua y NKCC2, presente sólo en riñón. Cada isoforma es codificada por distintos genes de la familia SLC12: *SLC12A1* para NKCC2 y *SLC12A2* para NKCC1 y comparten alrededor de 60% de identidad en la secuencia de aminoácidos.

La isoforma NKCC1 se encuentra en casi en todos los tipos celulares, es especialmente predominante en la membrana basolateral de las células epiteliales secretoras, pero está presente también en las no epiteliales (Haas, Forbush, 1998). La isoforma NKCC2 se encuentra únicamente en la membrana apical de células epiteliales en la rama ascendente gruesa del asa de Henle de riñón (Isenring *et al*, 1998a; Russell, 2000).

Además de la nomenclatura NKCC, los cotransportadores electroneutros $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{Cl}^-$ también se conocen como BSC (por “**B**umetanide-**S**ensitive **C**otransporter”); cotransportador sensible a bumetanida), dada por Delpire *et al*, quienes identificaron inicialmente a NKCC2 en riñón de ratón y lo nombraron BSC1. Posteriormente este mismo grupo de investigación identificó NKCC1 y lo nombró BSC2. Así, el cotransportador codificado por el gen *SLC12A1* se conoce indistintamente como BSC1 o NKCC2, y el codificado por *SLC12A2*, NKCC1 o BSC2. (Delpire *et al*, 1994)

ISOFORMA NKCC1

El NKCC1 (BSC2) es la más ampliamente distribuida de las dos isoformas del cotransportador de $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{Cl}^-$ identificadas hasta el momento. En humano es codificada por el gen *SLC12A2*. Esta isoforma se encontró inicialmente en la membrana basolateral de la glándula rectal de tiburón y posteriormente se descubrió en otras especies (Russell, 2000).

El NKCC1 está presente en una amplia variedad de tipos celulares y se ha identificado a nivel molecular en muchas especies. Se encuentra en epitelios secretores, así como no secretores incluyendo células no epiteliales como neuronas y células endoteliales (Haas, Forbush, 2000). En las células polarizadas su expresión está confinada a la membrana basolateral. La única excepción es en el plexo coroide, en donde este cotransportador se expresa en la membrana apical (Isenring *et al*, 1998b). Debido a que se encuentra en la membrana basolateral de los tejidos epiteliales, esta forma se conoce como isoforma “secretora”. Sin embargo, cuando se encuentra en la membrana de células no polares, se refiere a ella como isoforma nativa (Russell, 2000).

Hay cierta evidencia de que NKCC1 presenta variantes específicas de tejidos. Por ejemplo, el músculo esquelético presenta un transcrito de ARNm algo más pequeño que el que se encuentra en otros tejidos. Por ensayos fisiológicos también se han observado ciertas diferencias en las características de transporte de NKCC1 para distintos tejidos (Isenring *et al*, 1998a).

El NKCC1 tiene un papel vital en la secreción de sal y fluidos por los epitelios secretores junto con otros mecanismos de transporte incluyendo canales de Cl^- y K^+ y la ATPasa de Na^+-K^+ . El NKCC1 también parece estar involucrado en la regulación del contenido de agua en algunas células durante su crecimiento y diferenciación, así que puede tener un papel importante en el ciclo celular. Es crucial en el mantenimiento y regulación del volumen celular ya que contrarresta el encogimiento ante estrés osmótico por medio del flujo de iones osmóticamente activos. Se trata de la principal vía para el influjo de Cl^- en las células y participa en el control y mantenimiento del gradiente intracelular de electrolitos. Se ha visto que en células neuronales participa en fijar potenciales sinápticos y, por lo tanto, influye en la excitabilidad neuronal (Russell, 2000; Isenring *et al*, 1998b).

Como es de esperarse, debido a su amplia expresión, los ratones con eliminación dirigida del gen de NKCC1 sufren daños en múltiples sistemas incluyendo la audición, percepción del dolor, salivación, espermatogénesis y control del volumen de fluidos extracelulares. Los ratones nulos en NKCC1 son hipertensos en parte por la ausencia de la vasoconstricción mediada por NKCC1. Datos recientes muestran que NKCC1 facilita ataques epilépticos durante el desarrollo del cerebro y que la bumetanida (inhibidor farmacológico de NKCC1) puede ser un fármaco novedoso y eficaz para el tratamiento de los ataques en neonatos (Kahle *et al*, 2006).

ISOFORMA NKCC2

El NKCC2 (BSC1) se expresa exclusivamente en riñón, en la membrana apical de las células epiteliales de la rama ascendente gruesa del asa de Henle y la mácula densa (Haas, Forbush, 1998; Ganong *et al*, 2004). Es codificado por el gen *SLC12A1* que pertenece a la familia SLC12 de cotransportadores electroneutros.

La isoforma NKCC2 es una proteína clave para la reabsorción de sal en el asa de Henle (Herbert *et al*, 2004). Alrededor del 20% del NaCl que se filtra en riñón se reabsorbe por este cotransportador y actúa en conjunto con canales de K⁺, canales de Cl⁻ y la ATPasa de Na⁺-K⁺ (Hannemann *et al*, 2009). Está involucrado en la regulación del metabolismo ácido-base y de cationes minerales divalentes (Ca²⁺ y Mg²⁺) (Plata *et al*, 2002; Haas, Forbush, 2000; Hebert *et al*, 1992; Mount *et al*, 1998). También juega un papel crítico en dos de las funciones homeostáticas cruciales del riñón: la regulación de los niveles de sal del organismo y presión arterial (Hannemann *et al*, 2009), puesto que controla el volumen del fluido extracelular y su osmolaridad (Russell, 2000).

La proteína NKCC2 es blanco principal de diuréticos de asa, como furosemida y bumetanida que inhiben su actividad, que se usan extensamente en el tratamiento de hipertensión y estados de edema y retención de sodio. (Plata *et al*, 2002; Hannemann *et al*, 2009).

El NKCC2 presenta procesamiento alternativo, y en humano tiene tres variantes: A, B y F. Este mecanismo de procesamiento se debe a la presencia de tres casetes de exones mutuamente excluyentes, llamados A, B y F (Plata *et al*, 2002). Las diferencias entre la secuencia de exones de las isoformas son mínimas; por lo tanto, la mayoría de los residuos de aminoácidos son idénticos. Estas variantes se encuentran distribuidas a lo largo de este segmento de la nefrona de la siguiente forma: A en la corteza y médula, B en las células de la mácula densa y F en médula, por lo que la heterogeneidad en el transporte de sal a lo largo de esta porción del asa de Henle se atribuye a la distribución de las variantes (Ganong *et al*, 2002). Cada una de las variantes presenta diferentes afinidades por los iones que acarrea y también en las velocidades de transporte (Hannemann, 2009). Las principales diferencias entre ellas son: 1) la isoforma B es la que tiene la mayor afinidad por la bumetanida, mientras que para las A y F son muy similares; 2) la isoforma A es la variante molecular con la mayor capacidad de transporte; 3) la isoforma F exhibe la mayor sensibilidad a la osmolaridad extracelular. (Ganong *et al*, 2004; Haas, Forbush, 2000; Isenring *et al*, 1998b; Plata *et al*, 2002).

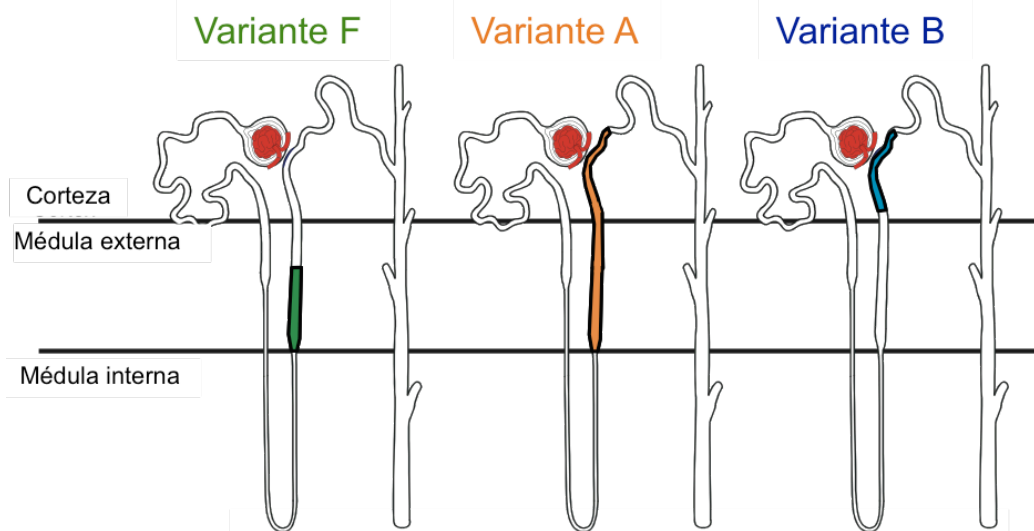


Figura 1.2. Distribución de las variantes de NKCC2 en la rama ascendente gruesa del asa de Henle.

Modificado de: Gamba, 2005

Las mutaciones en el gen *SLC12A1* se han relacionado con el desarrollo de una patología conocida como síndrome de Bartter. En esta patología se encuentran implicados al menos cinco genes diferentes en la rama ascendente gruesa del asa de Henle. Existen cinco tipos de este padecimiento; los primeros cuatro se deben a mutaciones inactivantes, mientras que el tipo V es resultado de mutaciones activantes. Algunas formas del tipo I del síndrome de Bartter involucran mutaciones en *SLC12A1* con pérdida de la función de NKCC2. Se trata de una severa nefropatía con pérdida de sal acompañada con poliuria, alcalosis metabólica hipocalémica e hipertrofia del complejo yuxtaglomerular. Es un desorden genético autosómico recesivo en el cual se presenta ausencia o reducción severa en la capacidad de reabsorción de sal de la rama gruesa ascendente del asa de Henle. Los síntomas de esta enfermedad se presentan durante el primer año de vida o incluso en el periodo prenatal como una acumulación excesiva de líquido amniótico (polihidramnios). Dentro de los síntomas se presenta un estado de pérdida de sal con baja presión sanguínea, alcalosis metabólica hipocalémica y reducción severa de volumen. La mayoría de los pacientes también exhiben pérdida de Ca^{2+} y Mg^{2+} y algunos desarrollan nefrocalcinosis (Haas, Forbush, 1998; Russell, 2000; Plata *et al*, 2002; Kahle *et al*, 2006).

Además de su efecto en el desarrollo del síndrome de Bartter, debido a su papel en la homeostasis de la presión sanguínea, la desregulación de NKCC2 puede contribuir en la hipertensión (Hannemann *et al*, 2009; Herbert *et al*, 2004).

POTENCIOMETRÍA

La técnica electroquímica de análisis conocida como potenciometría, consiste en medir la diferencia de potencial o voltaje (E) generado entre dos electrodos sumergidos en una misma disolución, en la que no se producen corrientes apreciables (Harvey, 2001; Skoog, 1994; Dimeski *et al*, 2010). En esta técnica el E de uno de los electrodos está en función de la concentración del analito o sustancia de interés y se llama *electrodo de trabajo o indicador* (Harvey, 2001). Cuando el electrodo de trabajo es sensible y responde a los cambios en las concentraciones de un ion en particular, se le nombra *electrodo selectivo a iones* (ESI) (Solsky, 1988).

El segundo electrodo, que es llamado *electrodo de referencia* sirve para completar el circuito eléctrico. Dado que el potencial de este segundo electrodo permanece constante, estable e insensible a la composición de la disolución en que se encuentra sumergido, proporciona un potencial de referencia con respecto al cual se mide la respuesta del otro electrodo. Es así que cualquier cambio en el valor medido de la celda se atribuye al electrodo sensor y, por tanto, a los cambios en la concentración del analito (Harvey, 2001; Skoog, 1994; Shinwari *et al*, 2010). Otras características deseables del electrodo de referencia son que el cambio en su E con respecto a la corriente, el tiempo u otras variables sea lo suficientemente pequeño como para que las mediciones no se vean afectadas. Asimismo, no debe sufrir cambios entre experimentos ni contaminar el medio en que se introduce.

En la técnica de potenciometría ambos electrodos se sumergen en la misma disolución y la diferencia de potencial generada entre ellos se mide con un potenciómetro al que ambos se encuentran conectados, como se muestra en la figura 1.3.

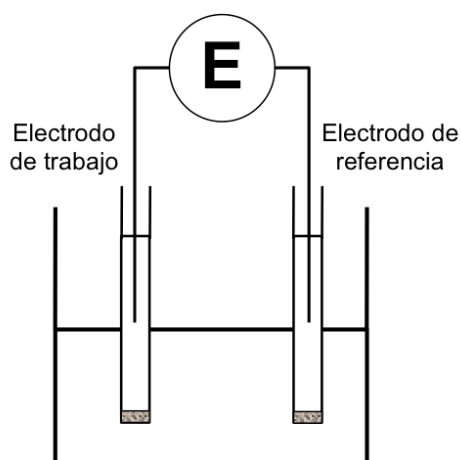


Figura 1.3. Diagrama de una celda potenciométrica.

El potencial medido en la celda es proporcional al logaritmo base 10 de la concentración del analito ($\log[A]$) (Harvey, 2001). Frecuentemente se utiliza el logaritmo negativo de la concentración del analito ($-\log$), al que se le conoce como función **p** ($p = -\log$), así que las curvas de calibración potenciométricas de una sustancia **A** también se pueden trazar como potencial medido en función de **pA**.

El potencial medido de una serie de soluciones de concentración conocida de **A**, usando un electrodo selectivo, se grafica en función de $-\log[A]$ (IUPAC, 1994). A esto se le conoce como curva de respuesta o calibración y tiene la forma que se muestra en la figura 1.4. Como el potencial medido en la celda es reflejo de la concentración del analito, se puede cuantificar y medir cambios en la concentración de la especie de interés para la que está diseñado el ESI.

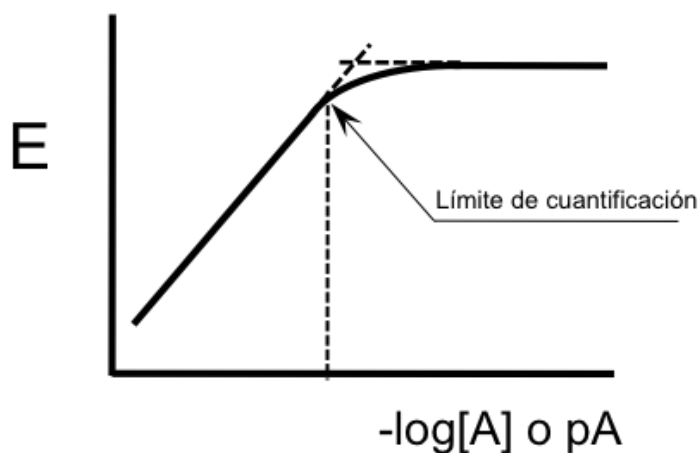


Figura 1.4. Curva de calibración para un ESI y determinación del límite de cuantificación.

Se observa que la curva de calibración tiene dos partes: una en la que la respuesta es proporcional a $-\log[A]$ (pA) y otra en la que se desvía de este comportamiento. La **pendiente de la parte lineal** de la curva de calibración es un parámetro que caracteriza a los electrodos. El valor teórico, de acuerdo con la ecuación de Nernst, es $59.16 \text{ mV}/-\log[A]$ a 298.15 K (25°C) para un catión monocargado, y cuando se observa este comportamiento se dice que el electrodo presenta una respuesta nernstiana (IUPAC, 1994). Se considera que una pendiente es útil si su valor se encuentra entre 50 y 60 mV por década de concentración. Sin embargo, en ciertas aplicaciones, el valor de la pendiente no es crítico y también se emplean si son menores.

Todos los electrodos selectivos tienen un intervalo de concentraciones en el que se pueden hacer las mediciones del analito con certeza sobre el valor. A esto se le llama **intervalo de trabajo o de cuantificación** y corresponde a la porción lineal de la curva de calibración. La respuesta del ESI se desvía de la linealidad a concentraciones de ion muy bajas o muy altas. La mayoría de los electrodos selectivos pueden medir desde una concentración máxima de 0.1 a 1 M (10^{-1} a 10^0 mol/L) hasta una concentración mínima de 10^{-5} a 10^{-10} M (Harvey, 2001). La concentración mínima de analito que se puede determinar con certeza se conoce como **límite de cuantificación** y en la curva de calibración corresponde a la porción de la gráfica donde se comienza a perder el comportamiento lineal (figura 1.4).

La señal medida por los ESI se debe, idealmente, sólo al cambio en las concentraciones del ion primario para el que están diseñados y el resto de los iones presentes en la muestra no tendrá efecto sobre la respuesta. Sin embargo, en la práctica no existen electrodos completamente selectivos para un ion único ni por completo insensibles a todos los demás y con frecuencia también suelen detectar la presencia de otras sustancias en la disolución.

Las interferencias ocurren cuando una sustancia o proceso lleva a un resultado falso en una técnica de medición. Cualquier especie diferente del ion de interés cuya presencia en la disolución afecte el valor del potencial medido, se considera un interferente. Pueden ser iones de la misma carga que el ion primario que dan una respuesta similar a éste; cuando esto ocurre, al estar presentes, generalmente parece haber un incremento en la concentración del ion a determinar. Otras sustancias pueden interactuar con la membrana del

electrodo selectivo, bloqueando la superficie de contacto. Por ejemplo, las proteínas se pueden adsorber provocando un cambio en el valor medido de 0.3-0.5 mV, aunque se han reportado cambios de 10-15 mV. En las muestras biológicas hay muchos interferentes debido a la complejidad de la matriz, como son las proteínas, metabolitos y otros iones, por lo que es crítico entender el impacto de los interferentes sobre las mediciones (Dimeski *et al*, 2010; Burnett *et al*, 2000).

La capacidad de un electrodo selectivo para distinguir el ion de interés o primario de los iones interferentes se conoce como **coeficiente de selectividad** ($k_{A,B}$), también llamado constante de selectividad o factor de selectividad, donde **A** es el ion primario y **B** el interferente. (Dimeski *et al*, 2010; Burnett *et al*, 2000). Mientras más pequeño sea el valor de $k_{A,B}$, mayor es la preferencia del electrodo por el ion primario con respecto al interferente. Con frecuencia estas constantes se expresan como su logaritmo. Los valores negativos de este último indican una preferencia del electrodo por el ion principal sobre el interferente, en tanto que los positivos indican que se prefiere al interferente sobre el ion de interés.

La selectividad es una de las características más importantes de un electrodo, ya que con frecuencia determina si la medición en una muestra es confiable o no. La IUPAC sugiere dos métodos para evaluar el valor de las constantes de selectividad: el de interferencias mezcladas y el de disoluciones separadas. El método de interferencias mezcladas consiste en medir la respuesta del electrodo selectivo en disoluciones que contienen tanto al ion interferente como el ion primario manteniendo constante la concentración de alguno de los dos y el otro a concentración variable. El método de disoluciones separadas consiste en medir el potencial de cada ion (interferente y primario) a distintas concentraciones, pero en ausencia del otro ion (Umezawa *et al*, 2000). El método que se utiliza con mayor frecuencia es el de interferente fijo, que es un método de soluciones mezcladas, en que se mantiene constante la concentración del ion interferente y se varía la del ion primario, y se prefiere porque refleja mejor el efecto que presentan los interferentes sobre las mediciones del electrodo (Burnett *et al*, 2000).

Cada uno de los métodos para determinar los coeficientes de selectividad tiene diferentes ventajas y desventajas y en general no hay reglas que puntualicen cuál proporciona el resultado verdadero, no obstante, dan información significativa sobre el comportamiento del electrodo.

Otro parámetro que caracteriza a los ESI es el **tiempo de respuesta práctico**. Se define como el tiempo que tarda entre el momento en que los electrodos se ponen en contacto con la solución muestra (o el momento en que cambia la concentración del ion de interés) y se alcanza el 95% del valor de la lectura cuando el potencial se estabiliza (Burnett *et al*, 2000; IUPAC, 1994). Es deseable que el tiempo de respuesta sea corto para que la detección de los cambios no se vea limitado por esta variable. Por lo general para los ESI el tiempo de respuesta es del orden de segundos (Solsky, 1988).

Es importante caracterizar los ESI para conocer los parámetros mencionados con anterioridad, porque pueden restringir su empleo en cierto tipo de muestras, por ejemplo, si la concentración esperada del ion se encuentra fuera del intervalo de cuantificación del electrodo.

Cuando se desarrollan electrodos destinados a usarse en sistemas biológicos, la caracterización es crucial. Es de suma importancia caracterizar el funcionamiento y detección de la especie de interés en el sistema biológico de estudio, ya que la complejidad de la matriz puede afectar el desempeño, estabilidad y tiempo de vida de ambos electrodos (selectivo y de referencia).

Un ESI ideal para mediciones en sistemas biológicos será aquel que no modifique sus propiedades por efecto de los componentes de la matriz; sea inerte, esto es no introduzca sustancias tóxicas ni contamine, así como que no modifique la concentración de alguna especie. Un ESI diseñado para mediciones intracelulares también deberá ser de un tamaño apropiado para insertarse y que no provoque daño considerable a la célula.

ELECTRODOS SELECTIVOS A IONES BASADOS EN IONÓFOROS

Existen diferentes tipos de ESI, como los de estado sólido y los de membrana de vidrio. En particular, desde finales de la década de 1960 ha habido un gran auge en la investigación y desarrollo de ESI basados en membranas selectivas con ionóforos inmovilizados en ellas. El uso de estos ionóforos ha permitido desarrollar ESI para cuantificar múltiples cationes y aniones y establecer la potenciometría como una técnica rutinaria para la detección selectiva y directa de especies iónicas en muestras complejas (Skoog, 1994).

Los electrodos de membrana de unión líquida constan de una membrana selectiva al ion que se encuentra en contacto con una solución interna de concentración fija en la cual se encuentra sumergido un electrodo que transduce la señal generada por los iones.

La parte esencial de un ESI basado en acarreadores es la membrana polimérica que contiene varios componentes, comúnmente un ionóforo o acarreador, una sal lipofílica, plastificante y una matriz polimérica. La función de la matriz es servir como soporte para el ionóforo, que es un agente complejante orgánico líquido cuyo exterior es hidrofóbico y su interior es hidrofílico, y que confieren la selectividad a la membrana hacia un ion dado, puesto que lo acarrea hacia la solución interna. La sal lipofílica y el plastificante son aditivos que mejoran las propiedades de la membrana; por ejemplo, disminuyendo la interferencia debida a otros iones. Existen diversos soportes poliméricos para la construcción de la membrana, el más empleado por sus características es el cloruro de polivinilo o PVC (Harvey, 2001).

El uso de acarreadores de iones ha permitido la miniaturización de los electrodos debido al interés por hacer mediciones intracelulares, así que actualmente existen microelectrodos selectivos a iones (MESI). Es recomendable que el ESI y el electrodo de referencia estén en contacto en el mismo medio, por ello también se ha buscado miniaturizar los electrodos de referencia (microelectrodos de referencia) para que su tamaño sea adecuado para insertarlos en células.

Una característica importante de cualquier electrodo destinado para uso intracelular o en sistemas biológicos, es que no contamine el medio que se mide, y también es de suma relevancia que continúe funcionando a pesar de la complejidad de los componentes presentes dentro de la célula (que no se inactive o disminuya su función).

ELECTRODOS SELECTIVOS A Cl^-

El primer electrodo selectivo que se empleó para determinar Cl^- fue el de plata/cloruro de plata ($\text{Ag}|\text{AgCl}$) que consiste de un alambre de plata recubierto de cloruro del mismo metal. Tiene las desventajas de contaminarse e inactivarse por adsorción de proteínas y tener baja selectividad, pues presenta interferencia por múltiples aniones. Por otra parte, es difícil de miniaturizar para poder insertarlo en células y también puede contaminar los sistemas biológicos. Todo esto limita su uso en la detección de Cl^- en estos sistemas, razón que llevó al desarrollo de otro tipo de electrodos para cuantificar este ion.

Durante la década de 1980 se usaron ionóforos líquidos que permitieron construir electrodos de tamaño adecuado para insertarlos en células, pero la compañía que los fabricaba discontinuó su producción a mediados de la década de 1990. Surgieron también otro tipo de ionóforos selectivos a Cl^- . Actualmente los más utilizados son ionóforos basados en complejos mercuriales e inclusive se comercializan mezclas preparadas y listas para usar en los electrodos.

Estos ionóforos, en combinación con sales lipofílicas, han permitido desarrollar electrodos selectivos a Cl^- con mejores propiedades de selectividad y detección. Por otra parte, el método de construcción de los MESI permite fabricar un número grande de electrodos con poco gasto de reactivos, lo cual hace que el precio por electrodo sea bajo.

2. ANTECEDENTES

El cotransporte electroneutro de Na^+ , K^+ y Cl^- sensible a diuréticos mediado por NKCC fue descrito por primera vez por Geck y colaboradores en 1980 (Geck *et al*, 1980). Desde el descubrimiento de los CCC y a partir de la identificación y clonación del ADNc que codifica para todos los miembros de la familia SLC12, se ha logrado la caracterización a fondo de las principales propiedades funcionales, farmacológicas y algunas regulatorias, incrementando la comprensión del proceso de cotransporte. La caracterización funcional de cada miembro de la familia SLC12 de cotransportadores electroneutros se ha realizado por medio de ensayos de expresión funcional del ADNc clonado en sistemas de expresión tanto de mamíferos (por ejemplo, células HEK-293, células MDCK, etc) como no mamíferos (por ejemplo, expresión de ARNm en ovocitos de *X. laevis*) (Mount *et al*, 1998).

Los CCC tienen un papel relevante en el control del volumen celular. Se ha visto que las modificaciones en la osmolaridad del medio en el que se encuentran expuestas las células provocan la activación o inactivación de diferentes miembros de la familia SLC12 para mantener constante el volumen celular (Haas, Forbush, 1998).

Se sabe que la actividad de todos los CCC es regulada por cinasas. En el caso particular de los NKCC, que median la entrada de sal a la célula, la fosforilación provoca un aumento en su actividad cuando se exponen a diversos estímulos.

Lytle y Forbush, y posteriormente otros grupos de investigación han reportado que después de la incubación en medios hipertónicos los NKCC se encuentran más fosforilados y por lo tanto más activos, sugiriendo que ello ocurre como respuesta al encogimiento celular. Así, se propone que esta respuesta es un mecanismo de defensa para mantener el volumen de la célula y de este modo ajustar la osmolaridad intracelular por medio de la entrada de electrolitos (Lytle, Forbush, 1992; Russell, 2000; Ganong *et al*, 2002; Lytle, McManus, 2002).

Por otro lado, la incubación de células en medios ausentes de Cl^- (inclusive manteniendo la concentración extracelular de Na^+ y K^+), también ocasiona un aumento en el estado de fosforilación y por lo tanto de la actividad de NKCC (Haas, Forbush, 1994; Ganong *et al*, 2002).

La exposición a estas condiciones provoca la salida de Cl^- de la célula y, por lo tanto, la disminución de su concentración. Estas observaciones llevaron a establecer que la $[\text{Cl}^-]_i$ es un importante regulador de la actividad de los NKCC (Haas, Forbush, 1994; Lytle, McManus, 2002; Haas, Forbush, 1998).

Diversos grupos de investigación han mostrado que en varias de líneas celulares la $[\text{Cl}^-]_i$ es un estímulo clave para la regulación de la actividad de todos los miembros de la familia SLC12. De este modo se propone que la $[\text{Cl}^-]_i$ puede ser la señal principal percibida por las cinasas que controlan la actividad de los CCC por medio de fosforilación, ya que se ha encontrado que la actividad de dichas cinasas aumenta ante la disminución de $[\text{Cl}^-]_i$ (Ponce *et al*, 2008).

La respuesta de la actividad de los NKCC a estos dos estímulos (osmolaridad del medio externo y $[\text{Cl}^-]_i$) se ha utilizado como estrategia para su estudio (Ponce *et al*, 2008; Lytle, McManus, 2002; Kahle *et al*, 2006; Isenring, 1998a). Para estudiar los NKCC, las células que sobreexpresan dichos cotransportadores se preincuban en condiciones que incrementen su actividad: en medios hiperosmóticos o bien, en otros que provoquen la disminución de la $[\text{Cl}^-]_i$ y, en ambos casos, posteriormente se mide la captura de radioisótopos en medios adecuados.

Para la depleción del Cl^- intracelular existen reportadas dos estrategias, una de ellas es la exposición de las células a medios hipotónicos sin Cl^- y la otra, la coexpresión del cotransportador KCC2 (otro miembro de la familia de SLC12, que se expresa en tejido neuronal). La incubación en un medio hipotónico y bajo en Cl^- ocasiona la apertura de los canales de Cl^- que median la salida de este ion de la célula y causan la disminución de $[\text{Cl}^-]_i$. El cotransportador KCC2 media la salida de Cl^- y tiene la característica de estar activo incluso bajo condiciones de isotonicidad.

Para el estudio de CCC, los ensayos de conteo de radiactividad son los más utilizados, pues el carácter electroneutro de los cotransportadores impide el uso de técnicas electrofisiológicas en las que se mide la corriente causada por el flujo iónico. Un formato de ensayo usado comúnmente es la entrada de $^{86}\text{Rb}^+$ como congénere de K^+ (Xu *et al*, 2001). En estos estudios las células que sobreexpresan el cotransportador se incuban en un medio que contiene $^{86}\text{Rb}^+$. Posteriormente

se lavan y lisan y se mide la radiactividad del lisado celular. Se prefiere el uso de $^{86}\text{Rb}^+$ puesto que tiene un tiempo de vida media corto (18 días). Ocasionalmente también se emplea el radioisótopo $^{22}\text{Na}^+$, cuya vida media es de 3 años. Existen pocos estudios en los que se utiliza $^{36}\text{Cl}^-$, pues su vida media es muy larga (300 mil años) y su costo considerablemente mayor que $^{86}\text{Rb}^+$ y $^{22}\text{Na}^+$. (Xu *et al*, 2001).

Recientemente, como técnicas alternativas, se ha probado cuantificar la entrada de Ti^+ por medición de la fluorescencia con colorantes, así como la medición de los cambios en el pH intracelular dependientes de la entrada NH_4^+ también con indicadores fluorescentes (Carmosino *et al*, 2013).

Los ensayos por conteo de radiactividad dan alta tasa de transferencia y son robustos contra artefactos; tienen alta especificidad ya que sólo se mide la señal generada por el radioisótopo, además de ser altamente sensibles (orden de pmol) (Xu *et al*, 2001). Estos presentan los inconvenientes asociados al manejo de material radiactivo, no se pueden monitorear de manera continua los cambios iónicos y tampoco se cuantifica la concentración intracelular de iones (Xu *et al*, 2001).

Para la cuantificación de iones se han empleado microelectrodos selectivos a iones (MESI), que son versiones miniaturizadas de los ESI, principalmente aquellos basados en membranas selectivas. Para estudiar los cambios en la actividad de una amplia cantidad de iones de interés biológico, se han desarrollado MESI de tamaño tal que es posible insertarlos en células. Los MESI son una estrategia para medir directamente la actividad extra o intracelular de un ion y para hacer mediciones prolongadas del mismo, así como para cuantificar la concentración libre de los constituyentes citosólicos de las células. También se han empleado para la detección de flujos muy pequeños de iones a través de la membrana plasmática cerca de células y entre tejidos, debidos a bombas, intercambiadores y canales iónicos.

Los MESI tienen varias ventajas, por una parte, miden directamente la actividad del ion de interés que detecta el electrodo; su fabricación es sencilla y barata. De igual forma la instrumentación requerida es de bajo costo. Además, miden sólo las actividades de los iones presentes en el citoplasma dado que el tamaño de la punta del MESI impide romper o ensartar organelos.

Es posible detectar cambios en la concentración intracelular de iones usando MESI durante el tiempo que se mantengan insertados en la célula (inclusive horas). Dependiendo el tamaño de la célula, incluso es posible medir de manera simultánea dos iones con los MESI. Muchos cambios en las concentraciones intracelulares de los iones ocurren en una escala de tiempo de segundos a minutos y los tiempos de respuesta de los microelectrodos selectivos a iones son adecuados para detectar dichos cambios. Sin embargo, algunos eventos iónicos intracelulares ocurren mucho más rápido y se precisan otras técnicas para su detección.

Esta técnica presenta también ciertas desventajas: se requiere que la punta de dos electrodos esté dentro de la célula al mismo tiempo, lo que hace que la inserción se vuelva difícil cuando disminuye el tamaño de la misma, así que se requieren células cuyo tamaño sea de alrededor de $50 \times 10 \mu\text{m}$, que son las células más pequeñas que se pueden utilizar cuando se emplean MESI. A pesar de que por sí mismos no modifican la concentración del ion que se está probando (al adicionarlo o removerlo de la célula), por tratarse de un método invasivo, pueden dañarla. Otros iones y componentes celulares pueden causar interferencias y dar señales combinadas con la señal deseada, lo que dificulta detectar el cambio exacto en la actividad del ion de interés. En la práctica esto determina el límite de cuantificación del MESI. Por último, la lectura hecha con los MESI puede ser afectada por interferencias eléctricas, lo que se evita con el uso de cajas de Faraday. Entonces, con el fin de asegurar el buen funcionamiento de los MESI para la detección y cuantificación del ion de interés, es preciso caracterizar los mismos, así como al sistema de estudio (célula).

Dado que el Cl^- es el ion común a todos los cotransportadores de esta familia y debido al importante papel regulador que la concentración intracelular del mismo presenta sobre la actividad de NKCC, se propone entonces monitorear los cambios de la $[\text{Cl}^-]_i$ que ocurren en su concentración cuando se sobreexpresan estos cotransportadores en ovocitos de *Xenopus laevis* y en ausencia de ellos, empleando un microelectrodo selectivo a cloruro (MES-Cl).

El interés particular por estudiar los NKCC se debe que están encargados de la entrada de este ion y existen sólo dos isoformas. Por una parte, se tiene el NKCC1, que es ubicuo, presente en prácticamente todos los tipos celulares, principal mediador de la entrada de Cl^- y con un papel

relevante en la modulación del volumen celular por medio de la modificación en la concentración de este ion. Por otra parte, el NKCC2 que es específico de riñón, es importante para la reabsorción de sal en este órgano, y, al regular el líquido extracelular, tiene un papel en la homeostasis de la presión sanguínea. Es por ello que se espera que el transporte de Cl^- mediado por cada uno de estos cotransportadores sea distinto, debido a su papel y ubicación fisiológica. El estudio de ambos NKCC es relevante para entender mejor el papel regulador de la $[\text{Cl}^-]$ sobre ellos cada uno de ellos. Con esta información pretendemos tener mejores elementos que nos permitan entender su papel fisiológico en los distintos tejidos en que se expresan.

3. JUSTIFICACIÓN

Hasta el momento se tienen múltiples investigaciones en las que se ha observado un incremento en la actividad de los cotransportadores NKCC sobreexpresados en ovocitos de *Xenopus laevis* cuando se exponen a estrategias de depleción del Cl^- intracelular. A pesar de que se intuye que esto ocasiona la disminución de la $[\text{Cl}^-]_i$, hace falta medir en qué la magnitud se modifica la concentración de dicho ion por las estrategias para reducir el Cl^- intracelular en presencia y en ausencia de los cotransportadores NKCC sobre-expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*; así como estudiar el cambio en la concentración de este ion cuando las células se incuban en el medio de retoma.

El presente trabajo constituye una aproximación a la medición de la $[\text{Cl}^-]_i$ en ovocitos de *Xenopus laevis* utilizando microelectrodos selectivos a Cl^- (por la técnica de potenciometría), aplicando las estrategias de depleción de Cl^- que se utilizan para el estudio de estos cotransportadores. Para este propósito también se diseñarán los microelectrodos con tamaño adecuado para que sea posible su inserción en la célula sin que cause perturbación o daño a la misma.

4. HIPÓTESIS

Dado que la $[\text{Cl}^-]_i$ tiene efecto sobre la actividad de los cotransportadores electroneutros CCC, se espera encontrar que la concentración de Cl^- en los ovocitos sea distinta a causa de la diferente actividad de NKCC1 y NKCC2 al exponerlos a las estrategias de depleción de $[\text{Cl}^-]_i$.

5. OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

- Evaluar el efecto de la exposición a condiciones de depleción de Cl^- sobre la concentración intracelular de este ion ($[\text{Cl}^-]_i$) en ovocitos de *Xenopus laevis* control utilizando microelectrodos de fabricación propia.
- Evaluar el efecto de la $[\text{Cl}^-]_i$ sobre la actividad de los cotransportadores electroneutros NKCC1 y NKCC2 expresados y coexpresados con KCC2, en ovocitos de *Xenopus laevis*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Construir y caracterizar un microelectrodo selectivo a Cl^- (MES-Cl) y un microelectrodo de referencia (μRef) destinado a mediciones intracelulares.
- Medir la $[\text{Cl}^-]_i$ en ovocitos de *Xenopus laevis* nativos y con sobreexpresión de un cotransportador electroneutro $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$, por potenciometría utilizando los microelectrodos construidos.
- Medir la $[\text{Cl}^-]_i$ de ovocitos de *Xenopus laevis* nativos y que sobreexpresan cada uno de los cotransportadores electroneutros expuestos a dos distintas condiciones de depleción de $[\text{Cl}^-]_i$ (exposición a medio hipotónico sin Cl^- y coexpresión del cotransportador KCC2)

6. METODOLOGÍA

6.1 Construcción y caracterización de los electrodos

6.1.1 Microelectrodo selectivo a Cl^- (MES-Cl)

6.1.1.1 Construcción

Se obtuvo una micropipeta a partir de un capilar de borosilicato (TW1450-4 World Precision Instruments) alargado por calor con un estirador automático de láser (P-2000 Sutter Instruments), a dicha micropipeta se colocó en la punta la membrana selectiva a Cl^- . Ésta consta de un soporte polimérico de PVC (cloruro de polivinilo) adicionado con el ionóforo II a Cl^- ([4,5-dimetil-3,6-dioctiloxi-1,2-fenilén]-bis-(mercurio-trifluoroacetato)) y la sal lipofílica TDMACl (cloruro de tridodecilmetil amonio). Estos dos compuestos tienen por función hacer que la membrana sea sensible al ion Cl^- y disminuir la interferencia de otras especies, respectivamente. El soporte se formó disolviendo 4 mg del ionóforo, 30 mg de TDMACl y 40 mg de PVC en 1 mL de THF (tetrahidrofurano).

Se colocó una gota de la mezcla en un portaobjetos y se sumergió la punta del capilar estirado, para llenar una porción de ésta con la disolución. Posteriormente se dejó que el disolvente se evaporara a temperatura ambiente durante 5 horas y así la membrana quedó alojada sólo en el extremo de la punta. En seguida se activó la membrana, esto es, se saturó de iones para hacerla conductora, para ello se llenó el capilar con KCl 1M y sumergió la punta de éste en la misma disolución durante aproximadamente 5 horas.

Por último, se introdujo un transductor compuesto por un alambre de plata clorurada ($\text{Ag}|\text{AgCl}$) en la solución interna de KCl del capilar. Dicho transductor se preparó sumergiendo el alambre de Ag en una disolución de NaClO durante 5 minutos, con lo que se deposita una capa de AgCl sobre él.

A continuación se muestra un esquema de armado del electrodo.

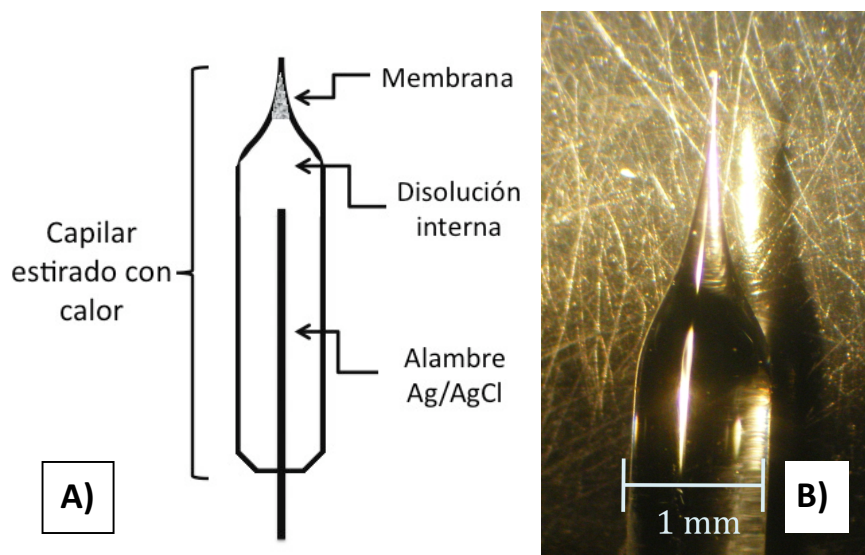


Figura 6.1. A) Esquema del microelectrodo B) Fotografía del microelectrodo

6.1.1.2 Caracterización

6.1.1.2.1 Determinación del intervalo de $[Cl^-]$ de respuesta lineal

Se prepararon 9 disoluciones estándar de KCl en agua destilada en un intervalo de concentraciones de 10^{-5} a 10^{-1} M. Se midió por triplicado el valor del potencial generado entre el MES-Cl y el microelectrodo de referencia (μ Ref) sumergidos en cada una de las disoluciones con un potenciómetro digital Conductronic pH 120. Por último, se trazó la gráfica de la respuesta medida (diferencia de potencial) en función del $-\log[Cl^-]$ (pCl). Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente.

6.1.1.2.2 Estudio del tiempo de estabilización de la lectura.

Se midió el tiempo en que el electrodo alcanza una lectura de potencial estable. Para ello se emplearon disoluciones estándar de KCl en agua destilada, de concentraciones 10^{-3} a 10^{-1} M, que corresponde al intervalo de respuesta lineal del MES-Cl, determinado a partir del experimento anterior. Se registró el potencial medido (potenciómetro digital Conductronic pH 120) para cada disolución durante 5 min. Primero se midieron las soluciones hacia concentraciones crecientes y posteriormente hacia valores decrecientes. Se obtuvieron los registros de E en función del tiempo.

6.1.1.2.3 Estudio de interferentes

Se evaluó el efecto sobre la lectura de E de las disoluciones de Cl^- , de aniones orgánicos producidos en el metabolismo celular y de aniones que se emplean como sustitutos de Cl^- en ensayos biológicos y cuya presencia durante las mediciones podría interferir en la lectura del electrodo selectivo. Se probaron 6 metabolitos: citrato, oxalato, lactato, piruvato, bicarbonato y acetato; y 2 sustituyentes de Cl^- : gluconato e isetionato.

Se empleó el método de interferente fijo que consiste en mantener constante la concentración del probable ion interferente, mientras que se varía la concentración del ion de interés que mide el MESI.

Se prepararon disoluciones estándar de KCl en agua destilada en todo el intervalo de concentraciones que se probaron para establecer la respuesta lineal (10^{-5} a 10^{-1} M). Se preparó una serie de disoluciones con $[\text{Cl}^-]$ variable para cada anión que se estudió. La concentración del posible ion interferente se mantuvo constante en cada una de las soluciones de la serie: 1 mM para los aniones provenientes del metabolismo celular y 10 mM para los sustituyentes de Cl^- . Se midió el valor de potencial generado entre el MES-Cl y el μRef sumergidos en cada una de las soluciones y finalmente se trazó la gráfica de la respuesta en función de pCl.

6.1.2 Microelectrodo de referencia (μ Ref)

6.1.2.1 Construcción

Para fabricar el microelectrodo de referencia (μ Ref) se utilizó la misma configuración del MES-Cl que se muestra en la figura 6.1 y el proceso para colocar la membrana en la punta del capilar fue igual que el descrito para el microelectrodo selectivo. A diferencia del MES-Cl, la membrana del μ Ref consistió únicamente de PVC sin ionóforo ni sal lipofílica. Asimismo, el capilar se llenó con KCl 1 M y la membrana pasó por el mismo proceso de activación con dicha disolución.

6.1.2.2 Caracterización

Se evaluó el funcionamiento del μ Ref a través de valoraciones potenciométricas ácido-base y se comparó con una referencia comercial de Ag|AgCl de un electrodo de vidrio selectivo a H^+ (electrodo de pH). Con esto se buscó evaluar la reproducibilidad del potencial de la microreferencia.

Se hicieron valoraciones de HCl 0.1 M con NaOH 0.1 M y se midió el potencial generado entre electrodo de pH y el microelectrodo de referencia. Posteriormente se repitió el procedimiento utilizando ahora el electrodo de referencia comercial interno del electrodo de pH. Se trazaron las gráficas de E en función del volumen agregado de base y se compararon entre ambas referencias (μ Ref de fabricación propia y electrodo de referencia comercial interno del electrodo de pH). Por último, también se trazó la gráfica de la primera derivada de la curva de valoración.

6.2 Mediciones intracelulares en ovocitos de *Xenopus laevis*

La medición de la $[Cl^-]_i$ se realizó en todos los casos por la técnica de potenciometría utilizando el sistema de microelectrodos, MES-Cl y μ Ref contruidos y caracterizados. Se insertaron ambos en el ovocito con micromanipuladores (Narishige) y se visualizó con un microscopio estereoscópico (Stereozoom 7, Bausch & Lomb) a un aumento de 33X.

El valor de potencial dentro de la célula se registró durante al menos 1 min a partir de que se alcanzó una lectura estable. Todas las mediciones se realizaron con un potenciómetro digital Conductronic pH 120 y se utilizó el programa de adquisición Axoscope 10.1 y una interfase MiniDigi 1A, ambos de Axon Instruments, para grabar los registros.

Todas las lecturas se midieron en unidades de potencial (E en mV) y posteriormente se convirtieron a concentración de Cl^- en mM para su correspondiente análisis. El procedimiento para el cálculo de la concentración a partir de los valores de potencial se detalla en el anexo B.

Las mediciones se dividieron en dos:

- Caracterización del sistema celular
- Mediciones aplicando protocolos para el estudio de función de cotransportadores electroneutros $Na^+ - K^+ - 2Cl^-$

6.2.1 Caracterización del sistema intracelular

En los ensayos preliminares a las mediciones con cotransportadores se caracterizó el sistema de estudio (los ovocitos) exponiéndolo a condiciones que provocaran cambios significativos sobre su $[Cl^-]_i$ y de ese modo evaluar el funcionamiento de ambos electrodos dentro de las células durante el proceso.

6.2.1.1 Monitoreo en continuo

Se monitoreó la $[Cl^-]_i$ de un ovocito manteniendo ambos microelectrodos insertados en él, al tiempo que se modificaba la concentración de sales del medio externo. En la sección de resultados se explica con más detalle en qué consistieron y cómo se realizaron los cambios en el medio externo.

6.2.1.2 Incubaciones

Se incubaron diferentes grupos de ovocitos en una de 3 condiciones de tonicidad, y después de las incubaciones midió la $[Cl^-]_i$ utilizando el sistema de electrodos:

Isotonicidad: se empleó medio ND96 regular en que se mantienen los ovocitos: 96.0 mM NaCl, 2.0 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂ y 5.0 mM HEPES (pH 7.4), ~210 mosm/kg H₂O.

Hipotonicidad: se utilizó ND96 diluido al 50% con agua destilada: 48.0 mM NaCl, 1 mM KCl, 0.9 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂ y 2.5 mM HEPES (pH 7.4), ~105 mosm/kg H₂O. El tiempo de incubación en este medio fue de 3h.

Hipertonicidad: al medio ND96 se adicionó 50% más de NaCl para una concentración final de 163.0 mM, 2.0 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂ y 5.0 mM HEPES (pH 7.4), ~315 mosm/kg H₂O. El tiempo de incubación en este medio fue de 6h.

6.2.1.3 Inyecciones de soluciones estándar de KCl

Se inyectaron en los ovocitos 100 nL de soluciones de KCl de concentraciones crecientes (en un intervalo de 10^{-4} a 10^{-1} M [0.1 a 100 mM]) y se hizo la medición intracelular inmediatamente después de la inyección para medir los cambios que provocó esta operación sobre la $[Cl^-]_i$. Se inyectaron 5 ovocitos para cada solución estándar.

Se trazó la gráfica del valor de potencial medido en función de la $[Cl^-]_i$ que se alcanzó por efecto de la inyección; determinado por el cálculo del volumen promedio de un ovocito. Para el cálculo del volumen se consideró que se trata de una esfera con un diámetro de ~ 1 mm y también se tomó en cuenta el aumento de volumen por la inyección.

6.3 Estudios de función de cotransportadores electroneutros $Na^+:K^+:2Cl^-$

La actividad de los cotransportadores NKCC2 y NKCC1 se determinó por la expresión funcional en ovocitos de *Xenopus laevis*. Los ovocitos se inyectaron con agua o el ARNc correspondiente de los cotransportadores NKCC1 o NKCC2 (10 ng/ovocito).

La expresión funcional de NKCC1 y NKCC2 se realizó midiendo el cambio en la $[Cl^-]_i$ al aplicar los protocolos establecidos con los cuales se estudian estos cotransportadores. En estos protocolos inicialmente se disminuye la $[Cl^-]_i$ por exposición a dos diferentes condiciones: coexpresión del cotransportador KCC2, por la inyección de su ARNc correspondiente (10 ng/ovocito); y estrés hipotónico sin Cl^- . Posteriormente se incubaron durante 1 h en un medio de recaptura adecuado dependiendo de la estrategia de depleción empleada.

Los medios de recaptura para cotransportadores $Na^+:K^+:2Cl^-$ contienen 2 mCi del radioisótopo $^{86}Rb^+$, dado que el protocolo está diseñado para medir la actividad del cotransportador por conteo de este marcador radiactivo. En los estudios que se realizaron durante de este proyecto se omitió el radioisótopo puesto que la función de los cotransportadores se siguió por medición de los cambios en la $[Cl^-]_i$.

Además del medio ND96 regular también se emplearon los siguientes:

Medio hipotónico sin Cl^- . Constituido por 79 mM de isetionato de Na^+ , 2.0 mM gluconato de K^+ , 1.8 mM gluconato de Ca^{2+} , 1.0 mM gluconato de Mg^{2+} , 5.0 mM HEPES, a pH 7.4, y con una osmolalidad de ~ 170 mosm/kg H_2O . En este medio los ovocitos se dejaron en incubación la noche previa al ensayo de recaptura.

Estrés hipotónico de retoma. Compuesto por 40 mM de NaCl, 36 mM de N-metil-D-gluamina [NMDG]-Cl, 10 mM KCl, 1.8 mM CaCl_2 , 1.0 mM MgCl_2 , 5.0 mM HEPES, a pH 7.4 y ~ 170 mosm/kg H_2O . Este es el medio de recaptura correspondiente para después de la incubación en medio hipotónico sin Cl^- .

Recaptura isotónica. Constituido por 40 mM NaCl, 46 mM N-metil-D- gluamina [NMDG]-Cl, 10 mM KCl, 1.8 mM CaCl_2 , 1.0 mM MgCl_2 , 5.0 mM HEPES, a pH 7.4 y ~ 210 mosm/kg H_2O . Este es el medio de retoma para los ovocitos coinyectados con KCC2.

Se midió la $[\text{Cl}^-]_i$ de los ovocitos expuestos a cada una de las estrategias que promueven la salida de este ion de la célula y también después del ensayo de recaptura, como se describe anteriormente.

7. RESULTADOS

7.1 Caracterización de los microelectrodos

7.1.1 Microelectrodo selectivo a Cl^- (MES-Cl)

7.1.1.1 Determinación del intervalo de $[\text{Cl}^-]$ de respuesta lineal

Se evaluó la respuesta del MES-Cl con soluciones estándar de KCl y se trazaron las curvas de calibración graficando la respuesta del electrodo (E medido en mV) en función de pCl ($-\log[\text{Cl}^-]$, concentración en mol/L). Se obtuvieron gráficas como la que se presenta a continuación.

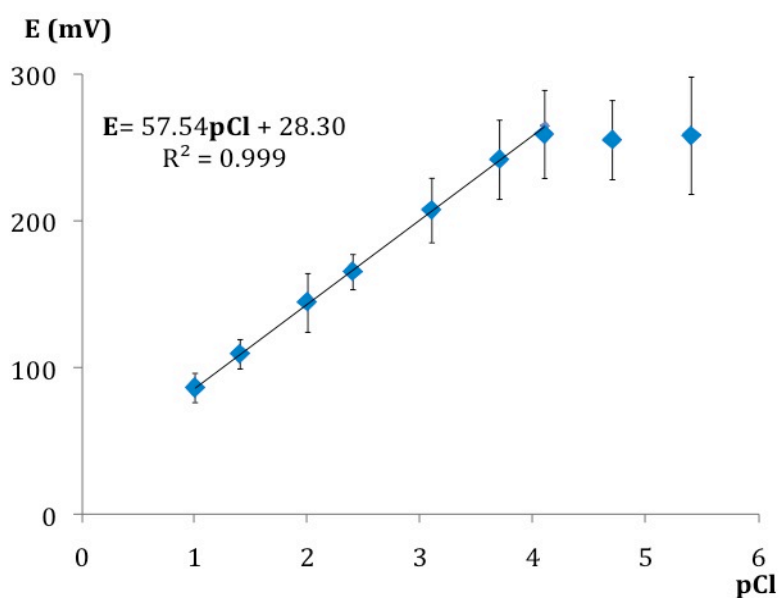


Figura 7.1. Curva de calibración potenciométrica de Cl^- utilizando el sistema de microelectrodos. Se muestra la desviación estándar de cada punto. n=5 réplicas por concentración

En la gráfica se advierten dos partes: en la primera, la respuesta del electrodo es directamente proporcional con $-\log[\text{Cl}^-]$, después, a concentraciones menores ($<10^{-4}$ M), el cambio en la respuesta es poco marcado.

La respuesta lineal de los microelectrodos selectivos tuvo una pendiente aproximada de 60 mV (57.6 ± 0.2 mV), en el intervalo de $[\text{Cl}^-]$ de 10^{-1} a 10^{-4} M, de tal forma que estos son los valores en los que se puede cuantificar el ion. Debido a que a concentraciones menores la respuesta del electrodo no es proporcional con el valor de pCl, sino que las lecturas resultan similares entre sí,

no es adecuado el uso del MESI diseñado en este trabajo para realizar mediciones a esos valores de concentración.

La $[Cl^-]_i$ de los ovocitos de *Xenopus laevis* reportada es de 0.025 a 0.065 M ($10^{-1.6}$ a $10^{-1.2}$ M), valores que se encuentran dentro del intervalo apropiado de cuantificación del microelectrodo selectivo diseñado por nosotros.

7.1.1.2 Estudio del tiempo de estabilización de la lectura

En las pruebas del tiempo que el MES-Cl requiere para alcanzar una lectura estable, éste mostró un tiempo inferior a 60 s en cada disolución ensayada. Asimismo, se alcanzó alrededor del mismo valor de potencial para una concentración dada cuando la prueba se realizó hacia cantidades crecientes y decrecientes del ion, como se observa en la figura 7.2 del monitoreo de potencial.

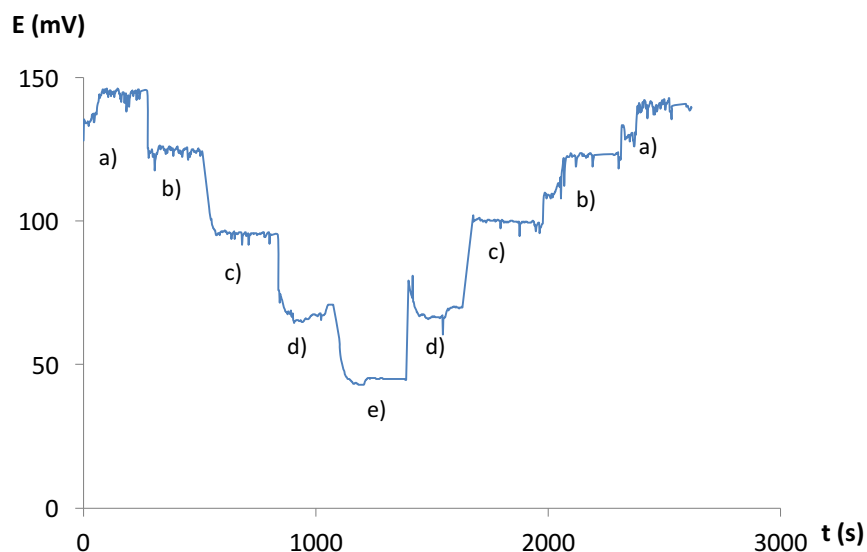


Figura 7.2. Tiempo de estabilización del MES-Cl a los cambios en la $[Cl^-]$
Concentración de las disoluciones: a) 1 mM b) 6.3 mM c) 20 mM d) 63 mM e) 100 mM

El ensayo anterior se realizó en 5 ocasiones con el mismo microelectrodo y los potenciales medidos de cada disolución presentaron la siguiente variación:

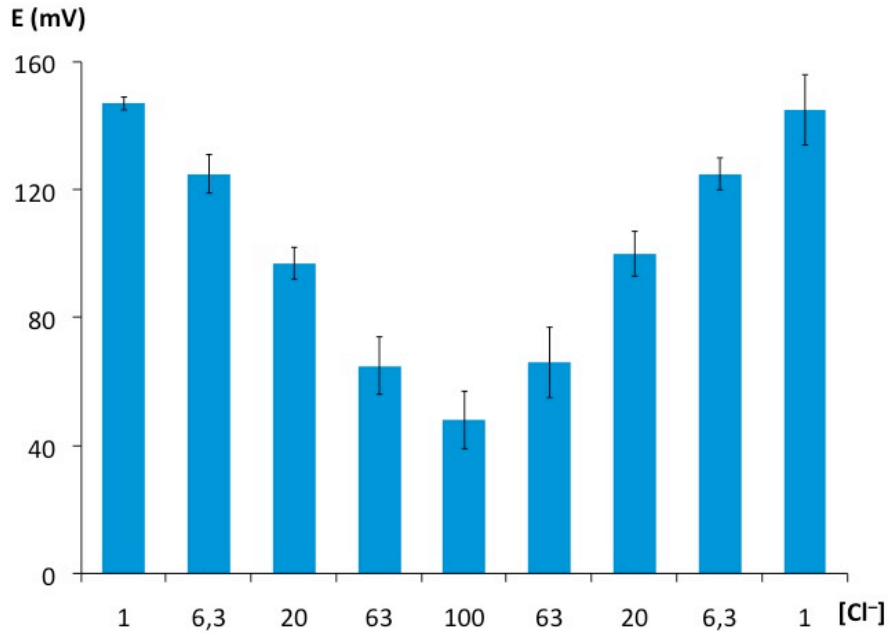


Figura 7.3. Variación de las lecturas de potencial medido en soluciones de diferente concentración de Cl⁻. N=5 réplicas por concentración

Aquí la desviación estándar es mayor cuando se pasa de concentraciones mayores a menores, puesto que era necesario hacer más lavados a los electrodos entre cada medición.

De acuerdo con esto, el sistema de microelectrodos es suficientemente rápido para considerar que se obtiene una lectura en tiempo real, ya que el valor se estabiliza en un tiempo corto (en promedio 20 segundos). Por otra parte, es significativo que la lectura de la misma solución en dos momentos distintos tenga valores de potencial cercanos entre sí. Esto indica que el tiempo de respuesta no será la limitante para la detección de los cambios intracelulares.

7.1.1.3 Estudio de iones interferentes

Dado que se busca utilizar el MES-Cl para la cuantificación dentro de células, donde el citoplasma contiene una gran cantidad de sustancias que podría interferir con la detección del Cl^- , se estudió el efecto sobre el potencial medido ante la presencia de 6 aniones que se producen durante el metabolismo celular; y de 2 sustituyentes de Cl^- empleados en medios fisiológicos de incubación. La figura 7.4 muestra el efecto de estos aniones sobre la curva de calibración de Cl^- .

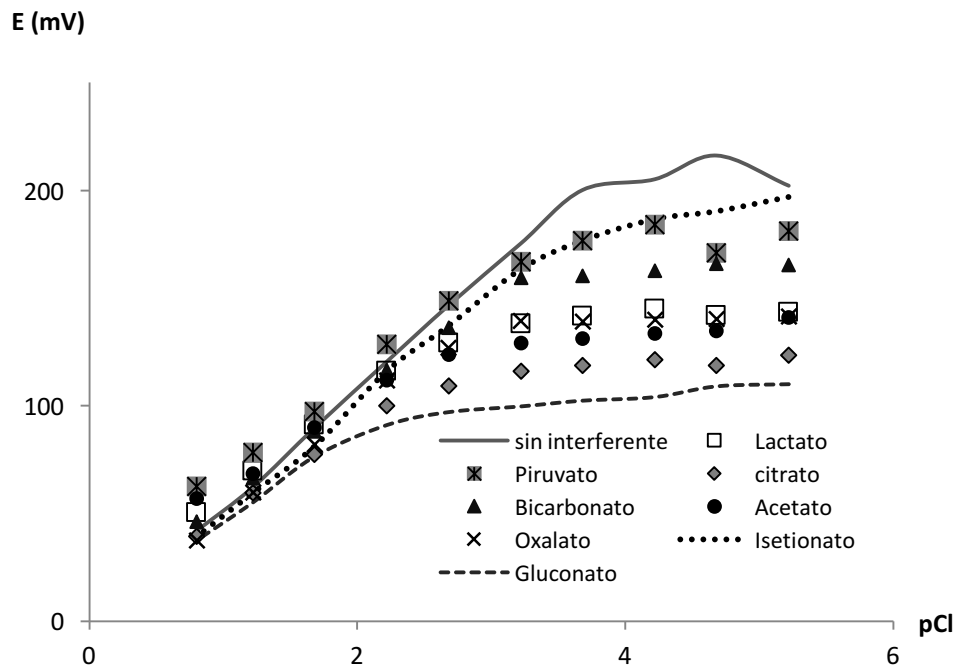


Figura 7.4. Curvas de calibración de Cl^- en presencia de iones interferentes.

El microelectrodo detectó, en mayor o menor proporción, la presencia de todos los aniones probados, lo que se observa como un valor de potencial menor con respecto a la curva sin interferentes, sobre todo a concentraciones bajas de Cl^- (valores de pCl altos). Esto, por consiguiente, provoca un error por exceso pues aparentemente hay mayor cantidad del ion respecto al valor real. De los sustituyentes de Cl^- , el gluconato presentó mayor interferencia ya que abate la respuesta a concentraciones mayores de Cl^- . De los aniones producto del metabolismo, el piruvato tuvo menor efecto sobre la curva de calibración, mientras que el citrato interfirió más sobre la medición. Adicionalmente, se advierte también que los interferentes ocasionan que menos concentraciones tengan respuesta lineal lo que, por consiguiente,

reduce el intervalo efectivo de cuantificación, así por ejemplo, para el ion gluconato que es el que presenta mayor interferencia, la cuantificación queda limitada a concentraciones mayores que 10 mM.

No obstante lo anterior, incluso a la concentración relativamente alta que se trabajó de los metabolitos (1 mM), el microelectrodo selectivo continúa presentando una respuesta lineal en la $[Cl^-]$ en el intervalo de interés: $10^{-1.6}$ a $10^{-1.2}$ M, $[Cl^-]_i$ reportado para ovocitos de *Xenopus laevis*. Se espera entonces que dichos iones no interfieran de manera substancial sobre la cuantificación del ion de interés, pues se asume que dentro de las células se encuentran en concentraciones menores.

Adicionalmente, para la caracterización del MES-Cl se calcularon las constantes de selectividad, $k_{A,B}$, que define la capacidad de un electrodo selectivo para distinguir el ion de interés de iones interferentes en la misma solución (Dimeski *et al*, 2010; Burnett, *et al*, 2000). El cálculo de las constantes de selectividad se detalla en el anexo correspondiente.

7.1.2 Microelectrodo de referencia (μ Ref)

Se estudió la respuesta de los μ Ref (preparados únicamente con membrana de PVC) a las diferentes concentraciones de las disoluciones de la curva de calibración usadas para determinar el intervalo de respuesta lineal los microelectrodos selectivos. Se midió el valor de potencial generado entre la μ Ref de construcción propia y una referencia comercial de Ag|AgCl, sumergidas en cada una de las soluciones estándar de Cl^- .

Se encontró que el microelectrodo de referencia (cuya membrana no contiene el ionóforo a Cl^- ni la sal lipofílica TDMACl) no detecta los cambios en la concentración de Cl^- del medio, como se muestra en la figura 7.5 a), en comparación con el microelectrodo selectivo b).

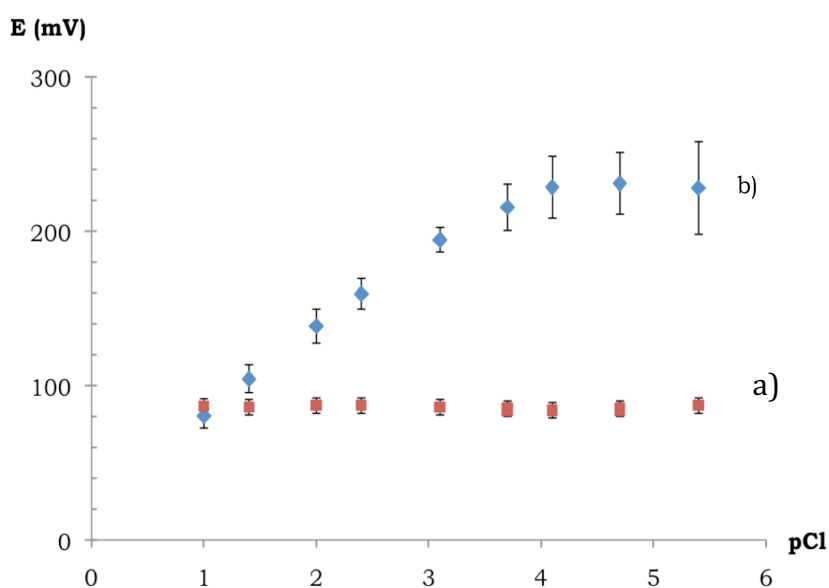


Figura 7.5. a) Respuesta del μ Ref, b) Curva de calibración potenciométrica de Cl^- con MES-Cl
n= 3 mediciones para cada microelectrodo.

La curva de calibración utilizando el MES-Cl exhibe el comportamiento observado anteriormente en la caracterización del mismo. En contraste, al hacer las mediciones con el μ Ref, la respuesta es prácticamente una línea horizontal, lo cual indica que es insensible a los cambios en la $[\text{Cl}^-]$ de las disoluciones estándar. Dado que la membrana del microelectrodo de referencia no contenía los compuestos responsables de la sensibilidad al Cl^- (el ionóforo y sal lipofílica), era de esperarse que el μ Ref mostrara este comportamiento. Por lo tanto, el μ Ref de fabricación propia cumple con una característica básica de los electrodos de referencia, que es la indiferencia a los cambios en

la concentración de las especies del medio. Por otra parte, también se muestra que el ionóforo es esencial para que el microelectrodo detecte el ion Cl^- , por lo que el valor de E que se mida se deberá a la respuesta del MES-Cl.

Para evaluar la reproducibilidad y estabilidad del valor de potencial de la μRef durante su uso en tiempos cortos, se hicieron valoraciones potenciométricas ácido-base (que consisten en seguir el potencial de la neutralización de un ácido al que se le adiciona una base, con un electrodo selectivo a protones) y se comparó con la respuesta obtenida al utilizar la referencia interna de $\text{Ag}|\text{AgCl}$ del electrodo de pH. La figura 7.6 muestra las gráficas obtenidas en cada caso.

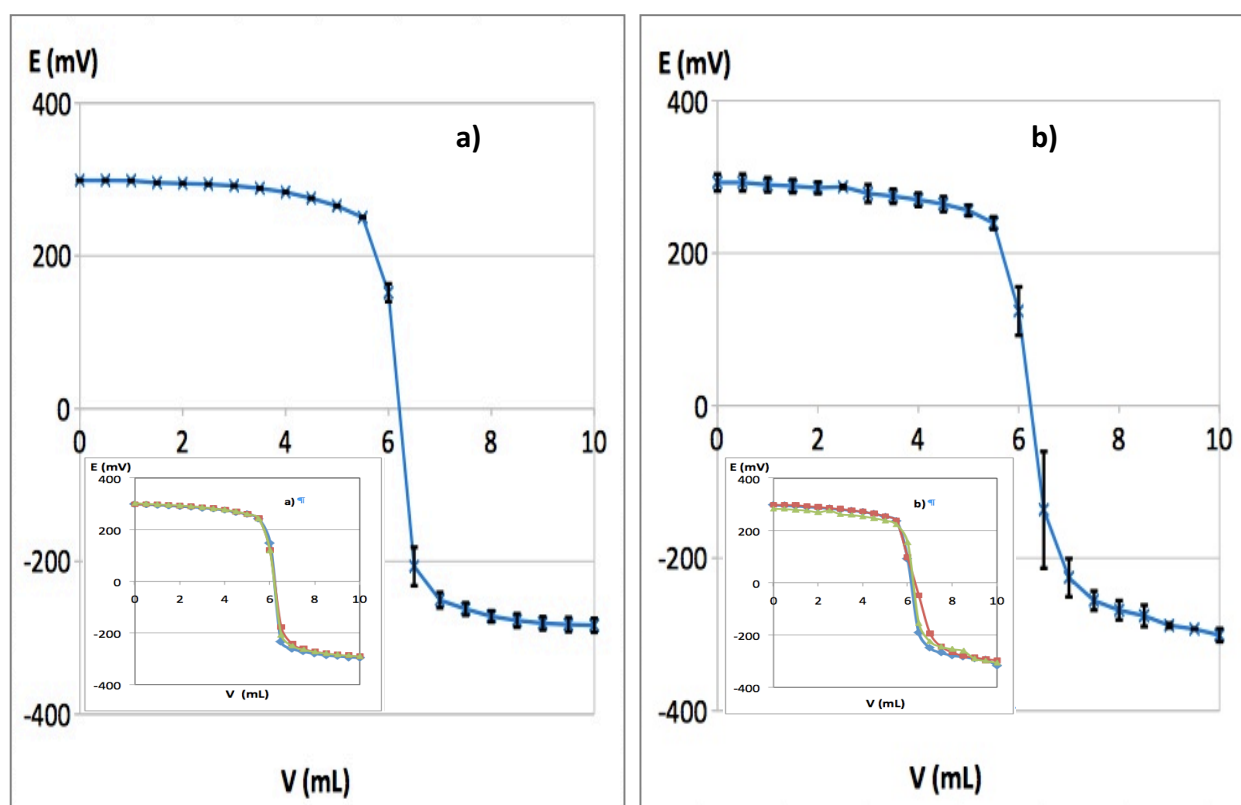


Figura 7.6. Valoración potenciométrica de 5.0 mL de HCl ~0.1 M con NaOH ~0.1 M
a) Referencia interna de Ag/AgCl del electrodo de vidrio; b) Microelectrodo de referencia (μRef)
Inserto: series de las 3 valoraciones hechas utilizando cada referencia.

Las gráficas de las valoraciones en que se utilizó el μ Ref presentaron la misma forma que al utilizar la referencia comercial y el volumen de punto final (que corresponde a la zona de cambio acentuado de potencial) en ambos casos se encontró alrededor del mismo volumen de base agregada, ~ 6.0 mL (lo que se confirmó al trazar la gráfica de la primera deriva que se presenta más adelante). Por otra parte, las gráficas que se obtuvieron con la referencia comercial presentan mayor reproducibilidad entre sí en comparación con el caso del μ Ref, sin embargo, la variación de este último electrodo es aceptable.

Con los datos de las valoraciones anteriores se obtuvo la gráfica de la primera derivada con la cual se determina de forma exacta el volumen en que se neutralizó por completo el HCl con el NaOH agregado. Se presenta a continuación:

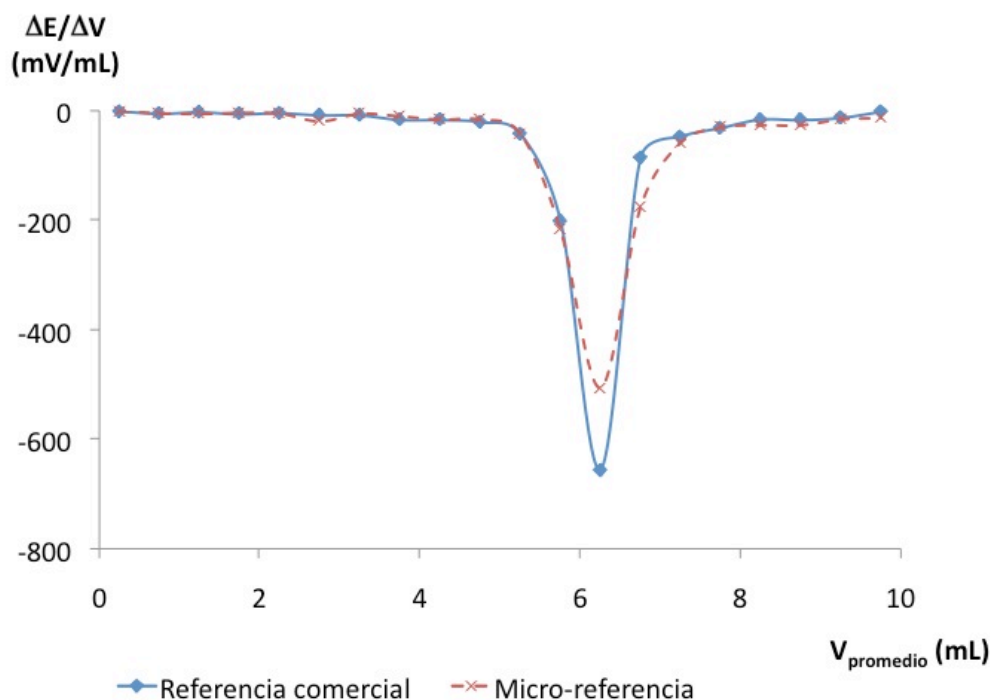


Figura 7.7. Gráficas de la primera derivada de las valoraciones potenciométricas de HCl con NaOH medidas utilizando ambos electrodos de referencia

En la gráfica de la primera derivada se advierte que el volumen de neutralización tuvo el mismo valor (6.25 mL de NaOH) cuando se midió el potencial con respecto a la referencia comercial y cuando se empleó la micro-referencia, a pesar de que al usar la última el potencial medido presentó más variación entre las réplicas.

Los resultados anteriores muestran que la μRef posee un potencial lo suficientemente constante y reproducible en tiempos cortos, condición necesaria para un electrodo de referencia. Esto lo hace adecuado para emplearlo como referencia del sistema micropotenciométrico para las mediciones de Cl^- intracelular.

Para determinar el valor del potencial de un electrodo de referencia se mide el valor que se genera con respecto a otra referencia. En este caso se midió la diferencia de potencial establecida entre la μRef de construcción propia y el electrodo de referencia comercial de $\text{Ag}|\text{AgCl}$, sumergidos en agua destilada durante 5 minutos.

Se encontró un valor de 2 ± 2 mV para $n=5$ microelectrodos. Este valor indica que el potencial de ambas referencias es parecido, lo que tiene sentido pues la composición de ellas es básicamente la misma: un alambre de Ag recubierto de AgCl sumergido en una solución de KCl 1M. Cabe precisar que una diferencia de potencial mayor sólo indicaría que los electrodos son diferentes entre sí, no obstante la microreferencia de construcción propia podría usarse de igual forma para las mediciones, ya que lo relevante es que su potencial sea constante con el tiempo.

7.2 Mediciones intracelulares en ovocitos de *Xenopus laevis*

7.2.1 Caracterización del sistema intracelular

Las mediciones intracelulares se realizaron insertando ambos microelectrodos en los ovocitos y registrando el valor del potencial medido de manera continua. La siguiente imagen muestra la disposición del sistema.

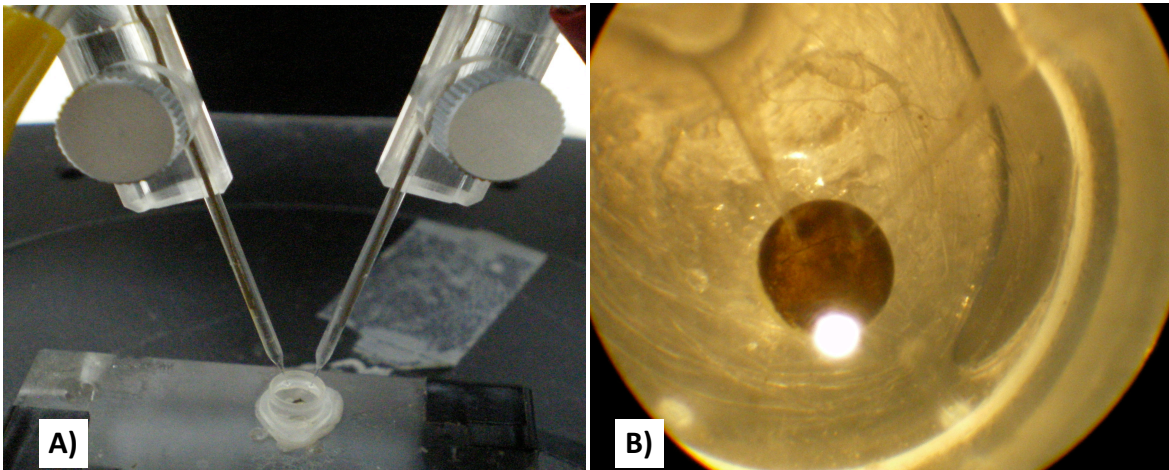


Figura 7.8. A) Sistema de electrodos y celda (volumen de 80 μL)
 B) Sistema de electrodos insertados en el ovocito

Primero se monitoreó el potencial del medio extracelular; en seguida se insertaron los electrodos y se registró durante al menos un minuto después de que se alcanzó una lectura estable. Por último, se extrajeron los electrodos y se midió nuevamente la solución del baño. El siguiente esquema ilustra la secuencia del monitoreo:

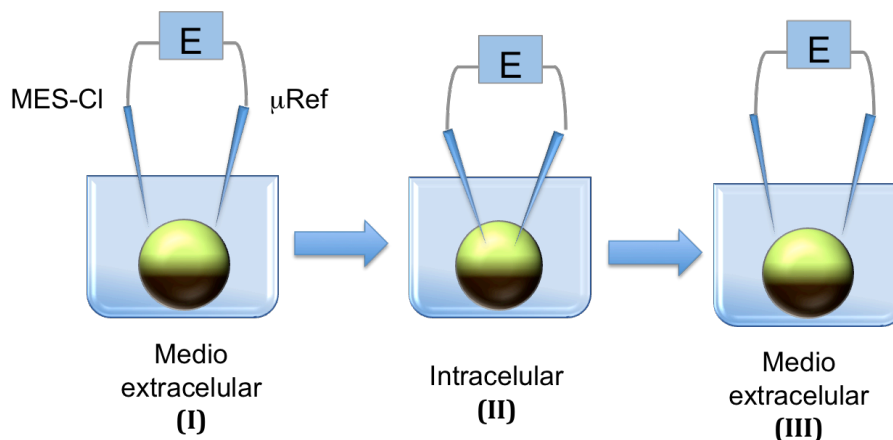


Figura 7.9 Secuencia de monitoreo de la concentración de Cl^- utilizando el sistema de microelectrodos

Los registros que se obtuvieron al hacer el monitoreo como se describe anteriormente fueron como el que se presenta a continuación:

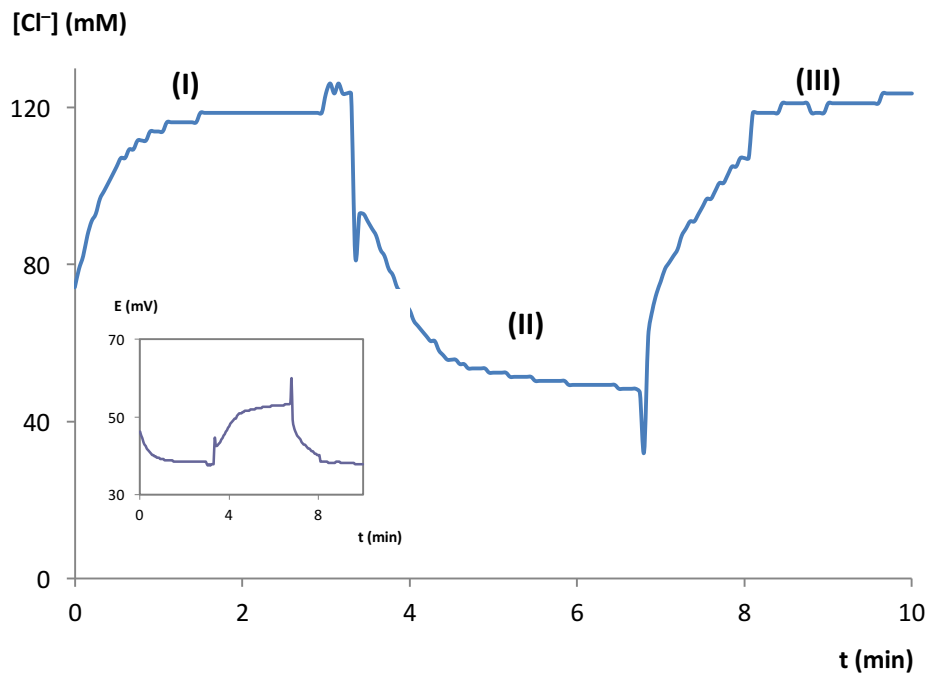


Figura 7.10 Registro del monitoreo de la $[Cl^-]$ para un ovocito incubado en medio ND96.
Inserto: Registro original del potencial monitoreado.

La gráfica presenta tres partes, la primera **(I)** corresponde a la medición de la solución del medio externo, la siguiente **(II)** es la medición intracelular y por último **(III)** es nuevamente el monitoreo del medio. En el inserto se puede observar el registro original en unidades de potencial en función del tiempo antes de la conversión a su equivalente de $[Cl^-]$.

En la gráfica se observa que el valor medido de la solución externa, al extraer los electrodos de la célula, fue similar al inicial. Esto se usó como una forma de control de la actividad del sistema de electrodos, porque el hecho de que se mida nuevamente el mismo valor, indica que el conjunto de sustancias presentes dentro de la célula (proteínas, metabolitos, por ejemplo) no modificaron de manera significativa el funcionamiento de ambos electrodos.

La $[Cl^-]_i$ reportada para ovocitos de *Xenopus laevis* es de 25 – 65 mM (Weber, 1999), menor que la concentración de este ion en el medio ND96 (100 mM). Para este caso se verifica que la concentración del ion detectada dentro el ovocito es menor que el valor registrado del

medio, lo que indica que la inserción de los electrodos no ocasiona daño significativo a la membrana que cause la entrada de Cl^- por difusión, que se detectaría con los electrodos.

La concentración promedio de cloruro determinada en los ovocitos fue de 42 ± 11 mM para una n de 25 ovocitos (durante el tiempo que se realizó el presente estudio). Cabe mencionar que durante la temporada de reproducción de las ranas (verano), la concentración de este ion mostró una tendencia a ser mayor que en otros meses puesto que en este periodo se incrementa la actividad de los canales de Cl nativos de los ovocitos.

7.2.1.1 Monitoreo continuo

Se monitoreó la $[\text{Cl}^-]_i$ de un ovocito al tiempo que se modificaba la concentración de sales del medio externo en que se encontraba sumergida la célula. Para ello se adicionaron $20 \mu\text{L}$ KCl 1 M al baño y perfundió con medio ND96, alternadamente. Los registros obtenidos fueron como el que aparece enseguida:

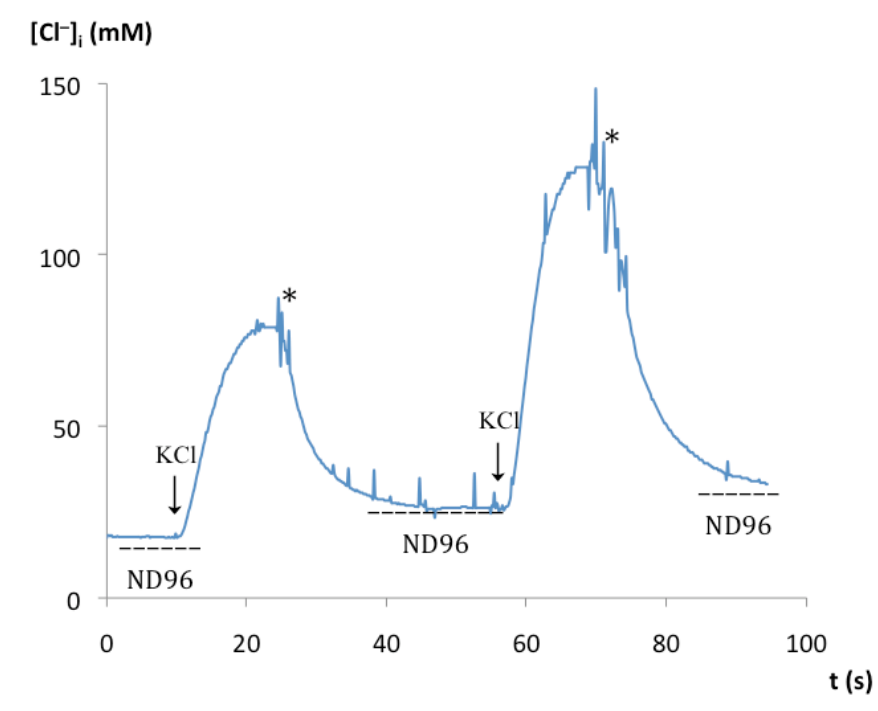


Figura 7.11 Monitoreo en continuo de $[\text{Cl}^-]_i$ de un ovocito ante modificaciones al medio externo.

↓ adición de KCl 1 M, * perfusión con ND96

En la gráfica se observa que la $[Cl^-]_i$ del ovocito sumergido en el medio isotónico ND96 permaneció constante antes de la adición de KCl 1 M. Al momento de aumentar la concentración de este ion de 96 mM a 207 mM en la disolución del baño (cuando se agregó KCl 1M) la $[Cl^-]_i$ del ovocito aumentó hasta alcanzar un valor estable. En seguida se perfundió con medio ND96 y la concentración disminuyó hasta un valor cercano al inicial. Nuevamente se adicionó una alícuota de KCl 1M y el ovocito incrementó su $[Cl^-]_i$ otra vez. Por último, se lavó de nuevo con ND96 y se observó una disminución en la concentración intracelular.

En este ensayo se advierte que con el microelectrodo selectivo se detectaron los cambios en la $[Cl^-]_i$ asociados a modificaciones en la concentración de los iones en el medio externo prácticamente en tiempo real, por lo que se puede inferir que los componentes intracelulares no interfirieron sobre la medición de los electrodos.

7.2.1.2 Incubaciones

Se incubaron grupos de ovocitos nativos en tres condiciones de tonicidad (isotonicidad, hipotonicidad e hipertonicidad) y posteriormente se midió la $[Cl^-]_i$ correspondiente. El monitoreo se hizo como se describe en la sección 7.2.1 y la siguiente figura muestra los registros de tres ovocitos incubados en cada condición.

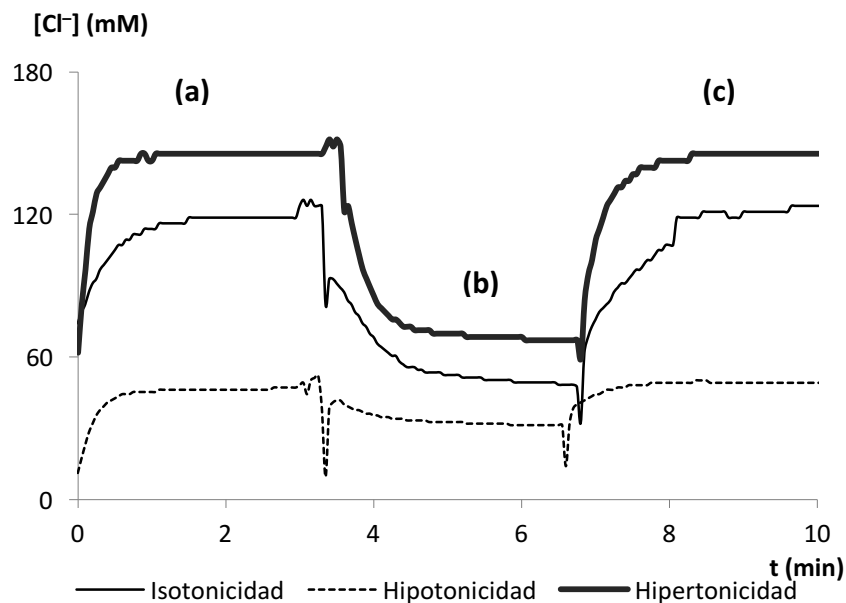


Figura 7.12. Registros de $[Cl^-]$ de ovocitos incubados en diferentes condiciones de osmolaridad. (a) Medición del medio externo, (b) Medición intracelular, (c) Medición del medio externo

RESULTADOS

Se observa que la concentración de Cl^- medido de cada medio de incubación fue distinto ((a) y (c)). Para el medio hipertónico resultó mayor y en el hipotónico fue menor con respecto al medio isotónico ND96, lo que concuerda con la concentración de sales que se estableció en la preparación de cada uno. Asimismo, en (b) se advierte que la $[\text{Cl}^-]_i$ de los ovocitos incubados en cada condición también fue diferente: disminuyó por efecto de la incubación en medio hipotónico, mientras que hubo un incremento ante la exposición al medio hipertónico, con respecto a los ovocitos mantenidos en condiciones de isotonicidad. Es relevante notar que en todos los casos la concentración intracelular de este ion fue menor a la del medio de incubación, lo que es un indicador que de la integridad de la membrana del ovocito.

Los valores de $[\text{Cl}^-]_i$ medidos de cada grupo de ovocitos se normalizaron para efectos de comparación con respecto a la $[\text{Cl}^-]_i$ de los ovocitos en medio isotónico ND96. En la siguiente gráfica se muestra el resultado:

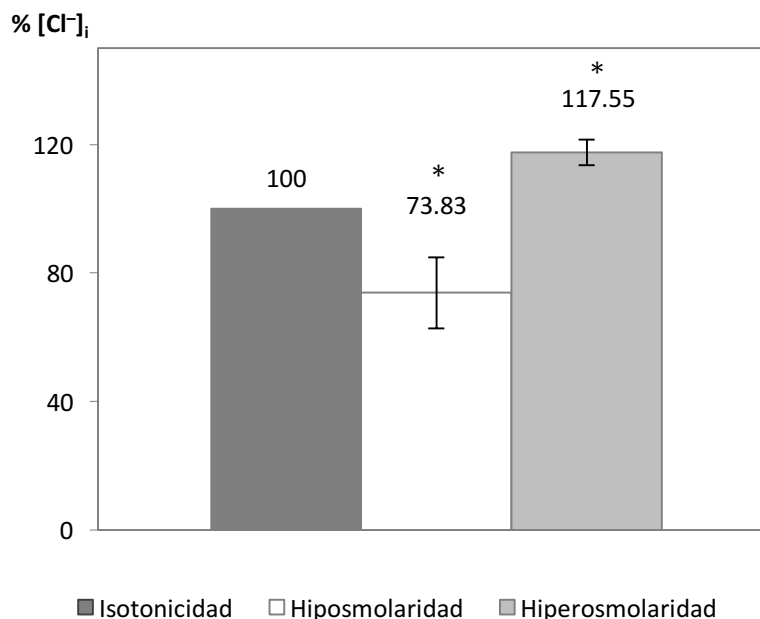


Figura 7.13. Porcentaje de la $[\text{Cl}^-]_i$ de ovocitos nativos incubados en diferentes condiciones de tonicidad
Datos normalizados con respecto a $[\text{Cl}^-]_i$ en isotonicidad. N=3 ovocitos
(* significativamente distinto del control en isotonicidad, $p=0.05$)

La $[\text{Cl}^-]_i$ de los ovocitos expuestos a medio hipotónico mostró una disminución del 26.17% con respecto a la condición de isotonicidad, mientras que por incubación a medio hipertónico aumentó un 17.55%.

La salida de Cl^- de las células es mediada por canales selectivos a este ion, mientras que la entrada es mediada por cotransportadores cuya cinética de transporte es menor que los canales, por lo cual era de esperarse encontrar un cambio mayor en la $[\text{Cl}^-]_i$ para los ovocitos expuestos en hipotonicidad que aquellos incubados en hipertonicidad, con respecto al medio isotónico después del mismo tiempo de incubación. Sin embargo, no se midió la osmolaridad de cada uno de los medios, para establecer si había la misma diferencia en el valor de la osmolaridad con respecto a la del medio isotónico.

Con este ensayo se concluye que la incubación durante pocas horas, en medios de distinta tonicidad, ocasionan cambios significativos en la $[\text{Cl}^-]_i$ de los ovocitos y que el MES- Cl^- de fabricación propia puede detectar y distinguir dichos cambios.

7.2.1.3 Inyecciones de soluciones de Cl^-

En estos experimentos se inyectó en los ovocitos, 100 nL de soluciones de KCl en concentraciones crecientes y se midió el valor de potencial (E) dentro de las células con el electrodo selectivo, inmediatamente después de la inyección. El valor de E se graficó en función de la $[\text{Cl}^-]_i$ calculada para el volumen de un ovocito, como se muestra en la siguiente figura:

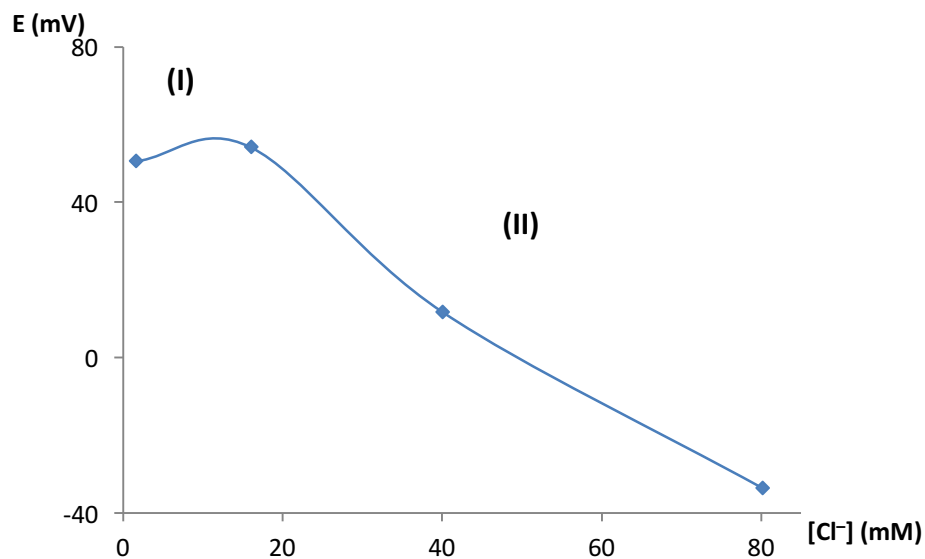


Figura 7.14. Efecto de inyecciones de KCl sobre el valor de potencial medido dentro de un ovocito

La gráfica presenta dos zonas: en la primera **(I)**, a concentraciones de Cl^- bajas no se detecta un cambio significativo en el valor medido, puesto que la $[\text{Cl}^-]_i$ del ovocito es mayor que la cantidad de Cl^- inyectado, así que la solución de KCl no modifica la concentración intracelular de forma importante. En la segunda porción **(II)** se observa que el valor de potencial cambió proporcionalmente con la concentración de Cl^- debido a la inyección de la solución puesto que en esta parte la concentración impuesta por el KCl supera la $[\text{Cl}^-]_i$ del ovocito. Lo que se observa en esta porción es entonces el reflejo del incremento en la concentración de KCl debido a la solución inyectada.

7.2.2 Estudios de función de cotransportadores electroneutros $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$

Se midió del cambio en la $[\text{Cl}^-]_i$ de ovocitos nativos y transfectados, expuestos a dos estrategias de depleción de este ion que se emplean para el estudio de la actividad de cotransportadores de cloruro $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ (Ponce-Coria *et al*, 2008). La primera consiste en la exposición de ovocitos a estrés hipotónico sin Cl^- , que induce la apertura de canales de Cl^- promoviendo la salida de este ion. La segunda estrategia usa la coexpresión de KCC2, un cotransportador de la misma familia de los NKCC que mueve Cl^- hacia el exterior la célula en condiciones de isotonicidad.

7.2.2.1 Medio hipotónico sin Cl^-

Se midió la $[\text{Cl}^-]_i$ de grupos de ovocitos nativos, transfectados con NKCC1 y otros con NKCC2 en condiciones de isotonicidad en medio ND96. Se detectó una diferencia significativa (12.55% para ovocitos transfectados con NKCC1 y 17.42% para aquellos con NKCC2) entre la $[\text{Cl}^-]_i$ de los ovocitos nativos y aquellos sobrepresando un NKCC en medio ND96 como se muestra en la figura 7.15, ya que estos cotransportadores presentan algo de actividad en condiciones de isotonicidad, que resultó detectable con el MES-Cl.

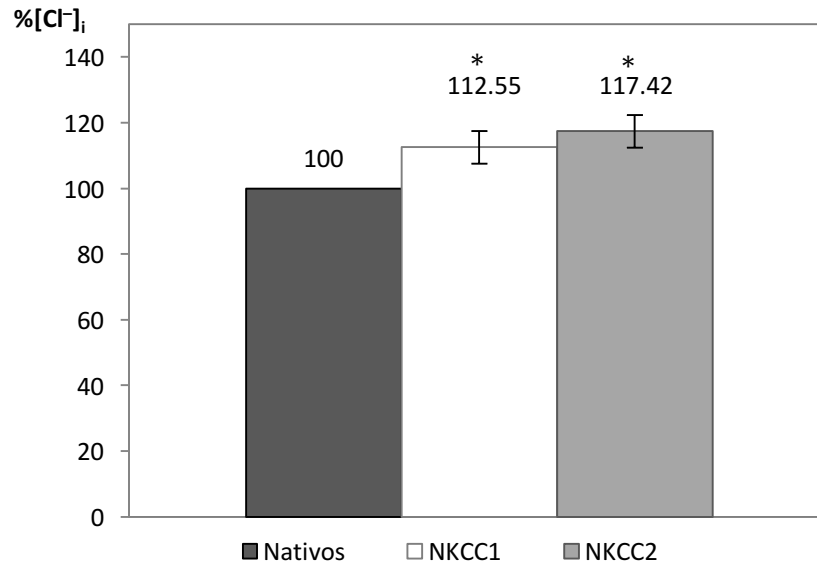


Figura 7.15 Porcentaje de la [Cl⁻]_i de ovocitos nativos y expresando NKCC1 o NKCC2. Medio ND96 regular. Datos normalizados con respecto a [Cl⁻]_i de ovocitos nativos. N=5 ovocitos (* significativamente distinto de los ovocitos nativos, p=0.05)

El grupo transfectado con NKCC2 mostró mayor actividad basal (que se expresa como mayor %[Cl⁻]_i), que los ovocitos expresando NKCC1, no obstante, entre ellos la diferencia no fue significativa.

Ovocitos de cada grupo (nativos y transfectados) se incubaron en medio hipotónico sin Cl⁻ durante la noche, y posteriormente se calculó el %[Cl⁻]_i.

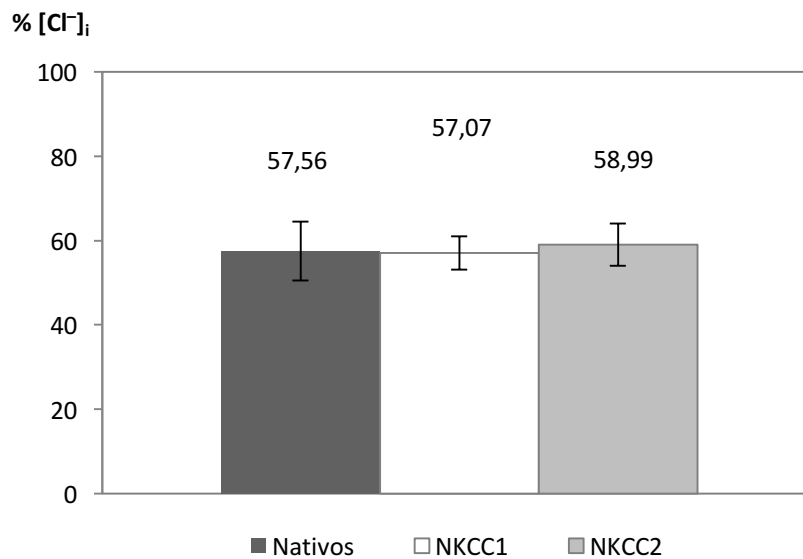
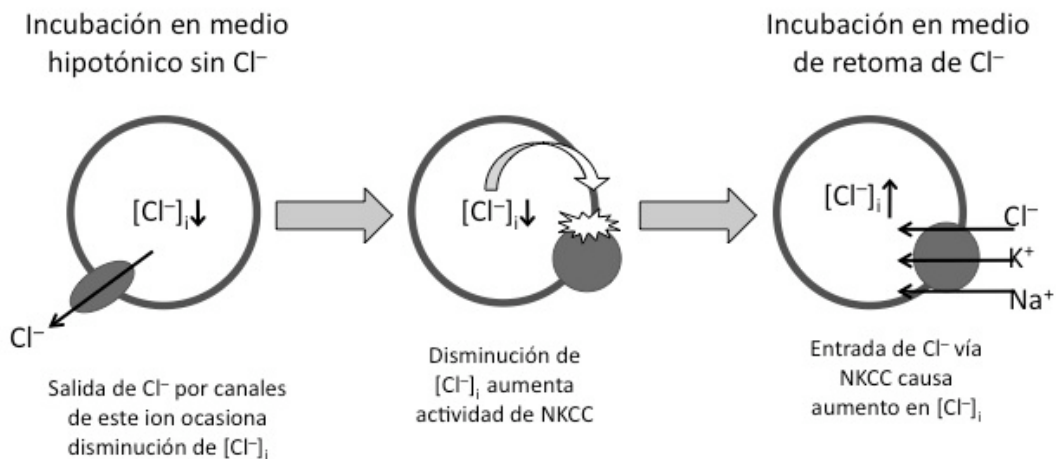


Figura 7.16 Porcentaje de la [Cl⁻]_i de ovocitos nativos y expresando NKCC1 o NKCC2. Incubación en medio hipotónico. Datos normalizados con respecto a [Cl⁻]_i en ND96 de cada grupo de ovocitos N=6 ovocitos para cada grupo.

Como respuesta al estrés hipotónico la célula mueve solutos osmóticamente activos hacia el exterior para mantener constante su volumen. Uno de estos solutos es el Cl^- , cuya salida es mediada principalmente por canales selectivos al mismo, y como consecuencia la concentración intracelular de este ion disminuye. El efecto es más pronunciado debido a que el medio de incubación, además, no contiene Cl^- .

Se encontró que la reducción en la $[\text{Cl}^-]_i$ fue de alrededor del 40% (42.44%, 42.93% y 41.01% para ovocitos nativos, con NKCC1 y NKCC2, respectivamente) con respecto a la concentración inicial en condiciones de isotonicidad y similar en todos los grupos de ovocitos evaluados.

Se sabe que la disminución en $[\text{Cl}^-]_i$ es una señal que incrementa la actividad de los NKCC. Este hecho se ha aprovechado para estudiar el funcionamiento de estos cotransportadores a través de la captura de isótopos radiactivos utilizando medios de incubación adecuados. En vista de que el cotransportador mueve Cl^- hacia el interior de la célula en el proceso de retoma, en estos estudios se decidió medir el cambio en la concentración de este ion como medida de la actividad de NKCC.



Los ovocitos mantenidos en hipotonicidad durante la noche se incubaron por 1 hora en el medio de retoma correspondiente y en seguida se hizo la medición intracelular. Se obtuvieron los siguientes datos:

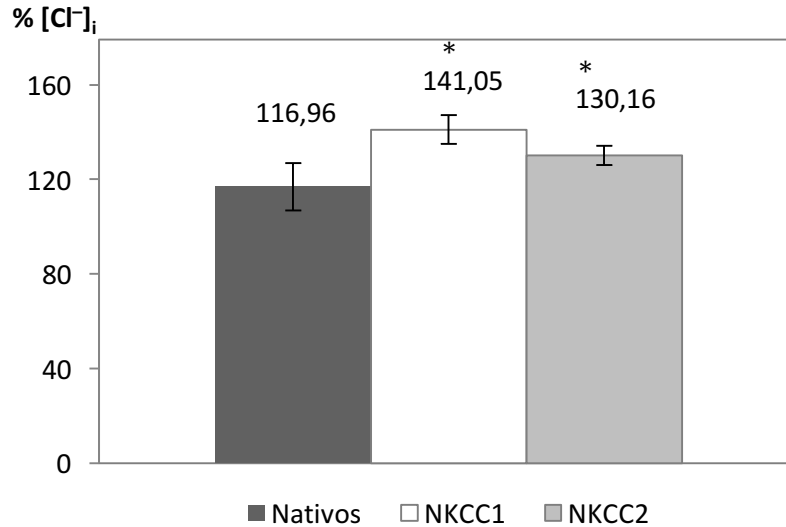


Figura 7.17 Porcentaje de la [Cl⁻]_i de ovocitos nativos y transfectados con NKCC1 o NKCC2 en retoma de Cl⁻, posterior a incubación en medio hipotónico
 Datos normalizados con respecto a [Cl⁻]_i de cada grupo de ovocitos en medio hipotónico. N=5 ovocitos (* significativamente distinto de los ovocitos nativos, p=0.05)

Aquí se encontró que la [Cl⁻]_i después de la retoma se incrementó en mayor proporción para los ovocitos transfectados con NKCC1 que para aquellos expresando NKCC2, con respecto al valor alcanzado en el medio hipotónico. Se esperaba que en las células con NKCC2 la concentración de cloruro fuese mayor, pues se encuentra reportado que dicho cotransportador presenta mayor actividad. Esto podría deberse que NKCC1 se encuentra más expresado que NKCC2 en los ovocitos. Los ovocitos nativos también mostraron un aumento en [Cl⁻]_i después de la exposición al medio de retoma, ya que expresan endógenamente una isoforma del cotransportador NKCC1, por lo que se observa la actividad de éste y que es distinta a la actividad de los otros dos.

7.2.2.2 Coexpresión del cotransportador KCC2.

Se evaluó el efecto de la coexpresión de KCC2 sobre la $[Cl^-]_i$ de ovocitos transfectados con NKCC1 o NKCC2. Se hizo la medición intracelular de ovocitos nativos y cotransfectados en medio ND96 regular y también después de 1 hora de incubación en el medio de retoma adecuado.

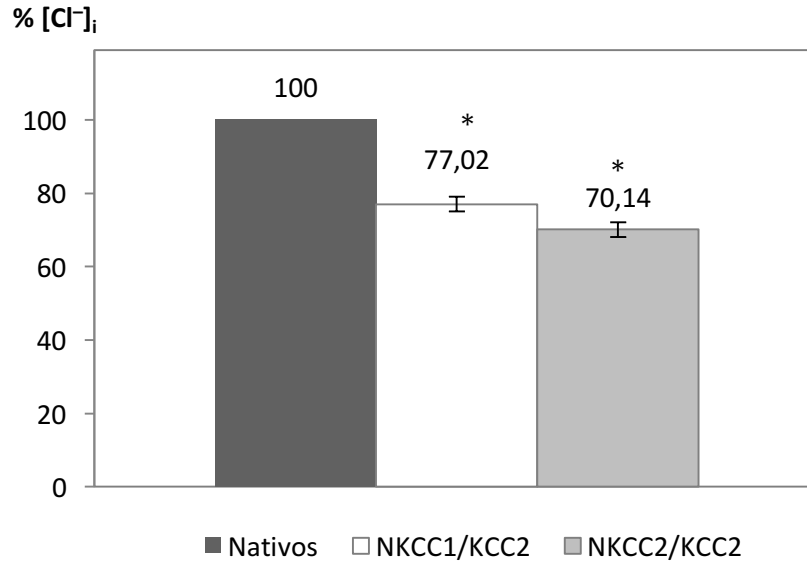


Figura 7.18 Porcentaje de la $[Cl^-]_i$ de ovocitos nativos y coexpresando un NKCC y KCC2. Medio ND96 regular. Datos normalizados con respecto a $[Cl^-]_i$ de ovocitos nativos en ND96. N=3 lotes, 5 ovocitos por lote. (* significativamente diferentes de los ovocitos nativos, $p=0.05$)

Los ovocitos coexpresando KCC2 y un cotransportador NKCC presentaron, en medio ND96 regular, un $\%[Cl^-]_i$ menor que los ovocitos nativos en las mismas condiciones (en promedio 22.98% para aquellos con NKCC1 y 29.86% con NKCC2). En vista de que los estudios previos mostraron que en medio isotónico la $[Cl^-]_i$ de los ovocitos se incrementa cuando se expresa sólo NKCC1 o NKCC2, esta disminución se debe a la acción del cotransportador KCC2, que media salida de Cl^- de la célula y se encuentra activo en condiciones de isotonicidad. Monitoreos posteriores mostraron que la $[Cl^-]_i$ en los ovocitos no se redujo más con el paso de los días, debido al aumento de la expresión de KCC2 (figura 7.19).

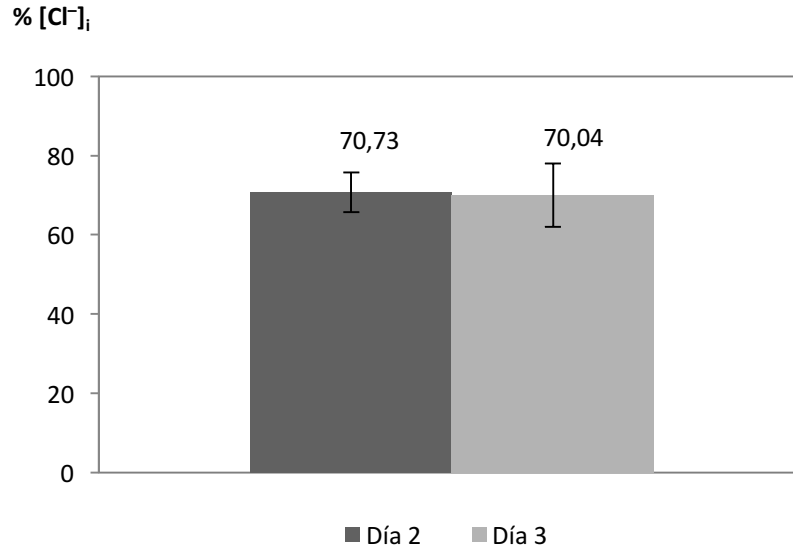
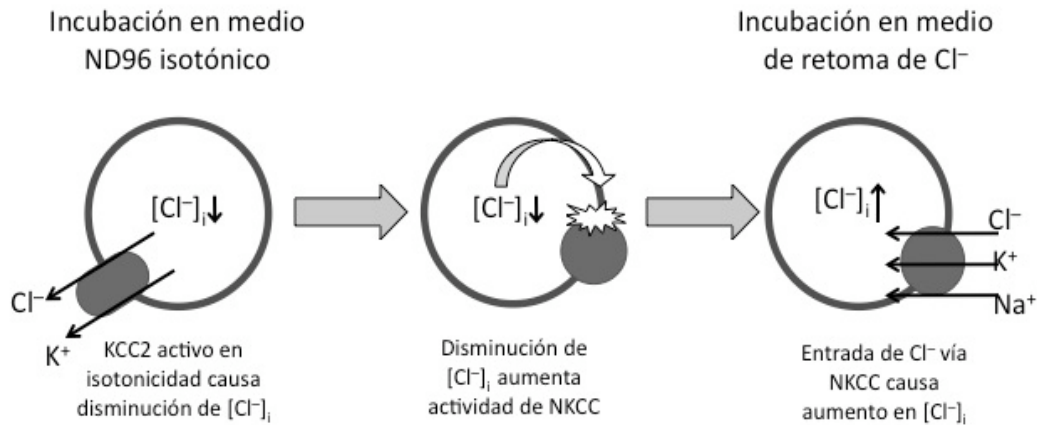


Figura 7.19. Porcentaje de la $[Cl^-]_i$ de ovocitos coexpresando con NKCC2 y KCC2 en medio ND96 con respecto a los días transcurridos después de la transfección del cotransportador. Datos normalizados con respecto a $[Cl^-]_i$ de ovocitos nativos. N= 4 ovocitos

En este caso, nuevamente se aprovecha que la actividad de NKCC se incrementa debido a la disminución de la $[Cl^-]_i$, pero ahora causado por efecto de KCC2, para estudiar la retoma de Cl^- incubando los ovocitos en el medio adecuado, como muestra la siguiente figura:



Ovocitos nativos y transfectados con ambos cotransportadores se incubaron en el medio de retoma correspondiente para estas condiciones durante 1 hora y se procedió a medir la $[Cl^-]_i$ de cada grupo. En la gráfica 7.20 se muestran los resultados de la retoma.

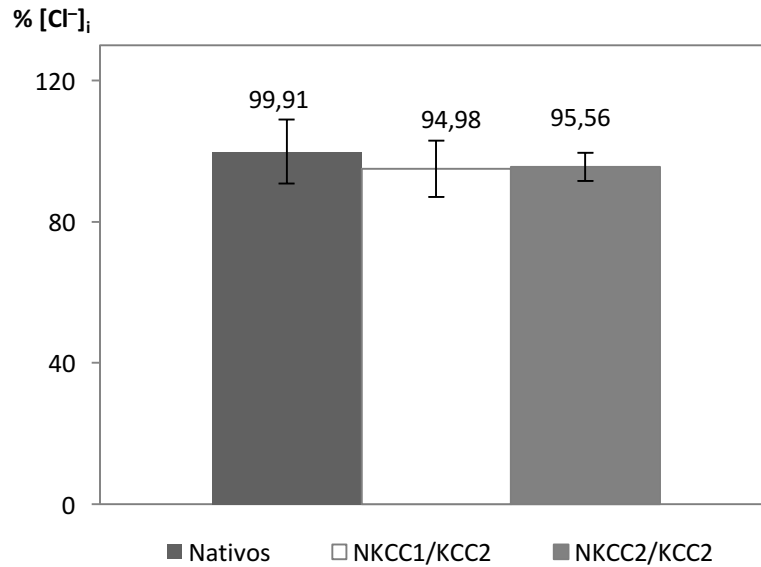


Figura 7.20 Porcentaje de la [Cl⁻]_i de ovocitos nativos y coexpresando un NKCC y KCC2. Medio de retoma. Datos normalizados con respecto al mismo grupo antes de la retoma. N=3 lotes, 5 ovocitos por lote. No hay diferencia significativa entre cada grupo de ovocitos

No se detectó una diferencia significativa en el cambio en la [Cl⁻]_i después de la exposición de los ovocitos al medio de retoma. Esto puede deberse a que los cambios en la concentración de este ion son pequeños como para diferenciarlos utilizando potenciometría.

La actividad de los cotransportadores se evalúa regularmente por conteo de radioisótopos, que es una técnica más sensible pues se detectan cantidades de pmol, en comparación con la técnica de potenciometría que mide mV. Por ello, entonces habría que adecuar los medios de retoma para que sea posible medir cambios notables al monitorear la [Cl⁻]_i con el microelectrodo selectivo, por ejemplo, utilizando un medio hipertónico en vez de uno isotónico.

Ambas estrategias de depleción mostraron ser capaces de disminuir la [Cl⁻]_i de los ovocitos en diferente magnitud. Se encontró una disminución de [Cl⁻]_i del 41.73% (con respecto a la concentración en condiciones de isotonicidad) en los ovocitos expuestos al medio hipotónico bajo en Cl⁻, mientras que la coexpresión de KCC2 disminuyó un 26.42%, con respecto a los ovocitos nativos en isotonicidad. La exposición al medio hipotónico bajo en Cl⁻ redujo en mayor proporción la concentración inicial de este ion que la coexpresión del cotransportador KCC2, puesto que la salida de cloruro en el primer caso es mediado por canales iónicos que son más rápidos que los cotransportadores.

8. CONCLUSIONES

- El tamaño al cual se diseñó el sistema de microelectrodos construidos (selectivo a Cl^- y de referencia) fue apropiado para su inserción en ovocitos de *X. laevis*, ya que los controles mostraron que la introducción de los mismos en las células no provocó daños que ocasionara cambios en la concentración intracelular.
- ya que los controles mostraron no daño ni cambio en las concentraciones celulares por la introducción de los electrodos.
- En la caracterización de ambos electrodos se determinó que el funcionamiento de los mismos es apto para mediciones intracelulares. El intervalo de respuesta lineal del electrodo selectivo fue de 0.1 a 100 mM (10^{-4} a 10^{-1} M) mientras que la concentración de Cl^- en ovocitos es de 25 a 65 mM, esto es, se encuentra en el intervalo de cuantificación del electrodo. Por otra parte, las micro-referencias presentaron un potencial reproducible y estable.
- Se detectaron diferencias significativas en $[\text{Cl}^-]_i$ de ovocitos incubados en distintas condiciones de tonicidad. En medio hiposmótico el valor disminuyó en un 73.83 % y en hipertonicidad aumentó en un 117.55 % con respecto a las condiciones de isotonicidad.
- Las diferencias medidas en la $[\text{Cl}^-]_i$ mostraron correlación con la concentración de iones del medio externo. Con respecto al medio isotónico, la $[\text{Cl}^-]_i$ de ovocitos expuestos a medio hipotónico tuvo un valor más bajo y en medio hipertónico un valor más alto.
- La exposición al medio hipotónico sin Cl^- disminuyó en mayor proporción la concentración intracelular de este ion (40%) con respecto a la coexpresión de KCC2 (28%). Este efecto se debe a que la salida de Cl^- en estrés hipotónico es mediado por la apertura de canales de Cl^- que tienen una velocidad de transporte de iones mayor que el cotransportador KCC2.
- Después de la recaptura de Cl^- de los ovocitos con coexpresión de KCC2 no se obtuvo evidencia suficientemente robusta para establecer si existe una diferencia entre la $[\text{Cl}^-]_i$ de los ovocitos con sobreexpresión de NKCC1 y de NKCC2, por lo que se sugiere buscar otras condiciones de incubación adecuadas para que se puedan advertir los cambios con los microelectrodos.

9. ANEXOS

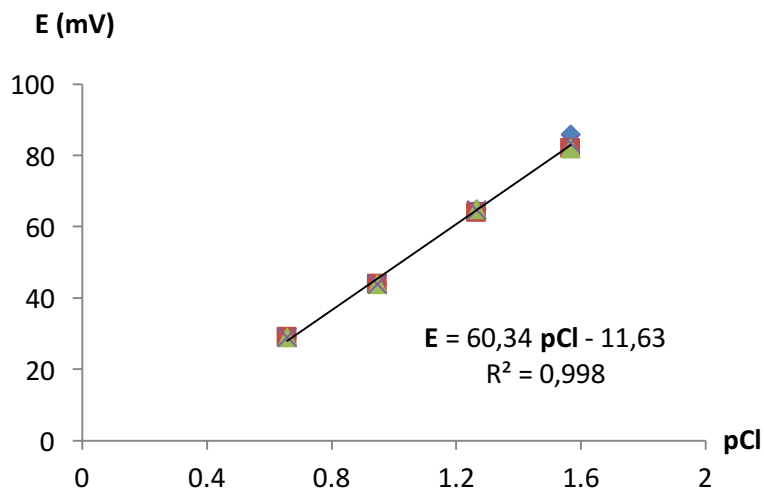
A. PREPARACIÓN DE LOS OVOCITOS DE *Xenopus laevis*

Los ovocitos se obtuvieron de ranas adultas *X. laevis* de Nasco por cirugía con 0.17% del anestésico triclaína. Se incubaron durante 1h en medio Ringer ND96 para ranas (en mM: 96 NaCl, 2 KCl, 1 MgCl₂, 5 HEPES/Tris, pH 7.4) en presencia de 2mg/mL de colagenasa B. Posteriormente los ovocitos se lavaron cuatro veces en medio ND96, se desfolicularon manualmente e incubaron en el mismo medio complementado con 5 mg/mL de gentamicina a 18°C durante la noche. Al día siguiente los ovocitos en estadio V-VI se inyectaron con 50 nL de agua o ARNc en una concentración de 0.5 mg/mL (25 ng de ARNc por ovocito). Después de la inyección, los ovocitos se incubaron 3-4 días en ND96 con gentamicina. El medio de incubación se cambió cada 24 h.

B. CÁLCULO DE CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE Cl^- ($[\text{Cl}^-]_i$)

El sistema de medición potenciométrico (compuesto por el microelectrodo selectivo y el de referencia) se calibró por triplicado a lo largo del día (en tres ocasiones) de mediciones: antes de comenzar las pruebas intracelulares, después de haber hecho 10 mediciones dentro de las células y al finalizar los experimentos. La calibración se hizo por soluciones estándar con 3 concentraciones de KCl en un intervalo de $10^{-1.6} - 10^{-0.7}$ M (0.0245 – 0.1995 M).

En la técnica de potenciometría lo que se mide es un valor de potencial generado entre los electrodos selectivo y de referencia, por lo cual es necesario convertir dicho valor de potencial a unidades de concentración. La $[\text{Cl}^-]_i$ se calculó a partir de la curva de calibración que se obtiene al trazar la gráfica de potencial en función de pCl, despejando el término de $[\text{Cl}^-]$, como se ejemplifica con la siguiente curva de calibración:



La ecuación despejada queda

$$[\text{Cl}^-] = 10^{-\left(\frac{E+11.63}{60.34}\right)}$$

y en ésta se introduce el valor de potencial medido en mV. La cantidad así calculada queda expresada en concentración molar (M).

C. CÁLCULO DE LAS CONSTANTES DE SELECTIVIDAD ($k_{A,B}$)

A partir de los datos generados de la curvas de calibración de la figura 7.3, se hizo el cálculo de la constante de selectividad, $k_{A,B}$, que se muestran en la tabla C.1.

Tabla C.1. Logaritmos de la constante de selectividad ($\log k_{A,B}$) de los aniones orgánicos estudiados

Ion interferente	$\log k_{A,B}$
Gluconato	-1.4
Acetato	-0.9
Bicarbonato	-1.5
Oxalato	-1.3
Piruvato	-1.2
Lactato	-1.2
Citrato	-1.5

Se empleó el método de disoluciones mezcladas que consiste en mantener constante la concentración del posible ion interferente y mientras que se varía la concentración del ion de interés o primario.

El valor de la constante de selectividad se calcula con la siguiente ecuación:

$$k_{A,B} = \left[\frac{[A]}{[B]} \right]^{z_A/z_B}$$

Donde:

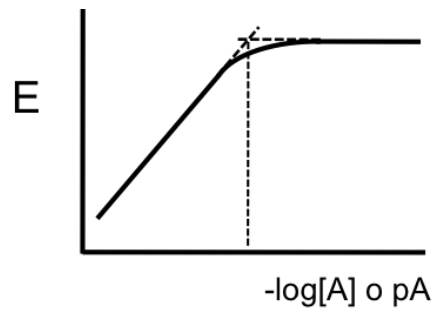
[A]= concentración del ion primario

[B]= concentración del ion interferente

z_A = carga del ion primario

z_B = carga del ion interferente

La concentración de ion primario que se sustituirá en la ecuación se determina a partir de la curva de calibración de éste en presencia de una concentración constante y conocida de interferente. La intersección de las dos porciones lineales de la curva de calibración, como se muestra en la siguiente figura, corresponde a la concentración del ion primario, (**A**) que se utilizará para el cálculo.



Como el cálculo de esta constante también considera la carga de cada uno de los iones involucrados en el cociente, aniones que mostraron una mayor interferencia sobre la lectura de potencial, tienen valores iguales de $\log k_{A,B}$.

Los valores de $\log k_{A,B}$ calculados por este método indican que el MES-Cl muestra mayor selectividad por el ion Cl^- (que es para el que está diseñado) que para todos los aniones probados.

D. ARTÍCULO

BRIEF COMMUNICATION

www.jasn.org

The Effect of WNK4 on the Na⁺-Cl⁻ Cotransporter Is Modulated by Intracellular Chloride

Silvana Bazúa-Valenti,^{*†} María Chávez-Canales,^{*†} Lorena Rojas-Vega,^{*†} Xochiquetzal González-Rodríguez,[‡] Norma Vázquez,^{*†} Alejandro Rodríguez-Gama,^{*†} Eduardo R. Argañiz,^{*†} Zesergio Melo,^{*†} Consuelo Plata,^{*†} David H. Ellison,[§] Jesús García-Valdés,[‡] Juliette Hadchouel,[¶] and Gerardo Gamba^{*†}

*Molecular Physiology Unit, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México and [†]Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Tlalpan, Mexico City, Mexico; [‡]Analytical Chemistry Department, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico; [§]Division of Nephrology and Hypertension, Department of Medicine, Oregon Health and Science University, Portland, OR; [¶]INSERM UMR970, Paris Cardiovascular Research Center, Paris, France; and [¶]Faculty of Medicine, University Paris-Descartes, Sorbonne Paris City, Paris, France

ABSTRACT

It is widely recognized that the phenotype of familial hyperkalemic hypertension is mainly a consequence of increased activity of the renal Na⁺-Cl⁻ cotransporter (NCC) because of altered regulation by with no-lysine-kinase 1 (WNK1) or WNK4. The effect of WNK4 on NCC, however, has been controversial because both inhibition and activation have been reported. It has been recently shown that the long isoform of WNK1 (L-WNK1) is a chloride-sensitive kinase activated by a low Cl⁻ concentration. Therefore, we hypothesized that WNK4 effects on NCC could be modulated by intracellular chloride concentration ([Cl⁻]_i), and we tested this hypothesis in oocytes injected with NCC cRNA with or without WNK4 cRNA. At baseline in oocytes, [Cl⁻]_i was near 50 mM, autophosphorylation of WNK4 was undetectable, and NCC activity was either decreased or unaffected by WNK4. A reduction of [Cl⁻]_i, either by low chloride hypotonic stress or coinjection of oocytes with the solute carrier family 26 (anion exchanger)-member 9 (SLC26A9) cRNA, promoted WNK4 autophosphorylation and increased NCC-dependent Na⁺ transport in a WNK4-dependent manner. Substitution of the leucine with phenylalanine at residue 322 of WNK4, homologous to the chloride-binding pocket in L-WNK1, converted WNK4 into a constitutively autophosphorylated kinase that activated NCC, even without chloride depletion. Elimination of the catalytic activity (D321A or D321K-K186D) or the autophosphorylation site (S335A) in mutant WNK4-L322F abrogated the positive effect on NCC. These observations suggest that WNK4 can exert differential effects on NCC, depending on the intracellular chloride concentration.

J Am Soc Nephrol 26: 1781–1786, 2015. doi: 10.1681/ASN.2014050470

Essential hypertension is a major risk factor for mortality worldwide. Salt reabsorption by the kidney plays a central role in its development. All monogenic diseases featuring high or low blood pressure are caused by mutations in genes encoding the renal salt transporters or their regulatory pathways.¹ Among those are disorders

affecting the activity of the renal Na⁺:Cl⁻ cotransporter (NCC). Inactivating mutations of NCC result in Gitelman's syndrome (OMIM 263800) featuring arterial hypotension. In contrast, NCC activation triggers familial hyperkalemic hypertension (OMIM 145260). This syndrome is caused in some patients by mutations in with

no lysine (K) kinase 4 (WNK4). The understanding of NCC regulation by WNK4 has been complicated by contradictory findings. Many groups have reported that WNK4 reduces activity, phosphorylation, and half-life of NCC *in vitro* and *in vivo*.^{2–7} However, evidence for WNK4-induced NCC activation has also been documented.^{8,9} In this regard, the WNK4 inhibitory effect could be reversed by angiotensin II,¹⁰ suggesting that WNK4 inhibitory and activating effects may coexist and be modulated by the renin-angiotensin system.^{8,10} A reduction of [Cl⁻]_i is associated with increased activity and phosphorylation of NCC¹¹ by Ste20-related proline-alanine rich kinase (SPAK),¹² which in turn is modulated by WNKs.¹³ It has been suggested that WNKs behave as chloride-sensitive kinases.¹⁴ Therefore, we hypothesized that

Received May 13, 2014. Accepted October 30, 2014.

Published online ahead of print. Publication date available at www.jasn.org.

Correspondence: Gerardo Gamba, Molecular Physiology Unit, Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan 14000, Mexico City, Mexico. Email: gamba@biomedicas.unam.mx

Copyright © 2015 by the American Society of Nephrology

$[Cl^-]_i$ could modulate the effect of WNK4 toward NCC, potentially explaining the dual effect of the kinase.

To test this hypothesis, the functional activity of NCC was assessed in oocytes exposed to control conditions or low chloride hypotonic stress (LCHS) that is known to increase NCC phosphorylation and activity.^{11,12} Coinjection of NCC and mouse WNK4 cRNA resulted in a slight but significant decrease in NCC-mediated Na^+ uptake. LCHS induced a significant increase in NCC

activity, which was further enhanced by coexpression with either mouse or human WNK4 (Figure 1, A and B).

The $[Cl^-]_i$ in control oocytes was 49.8 ± 0.7 mM, whereas it was 57.45 ± 0.8 and 58.58 ± 1.4 mM in oocytes injected with NCC or NCC plus WNK4 cRNAs, respectively. NCC probably caused this approximately 15% increase. In contrast, $[Cl^-]_i$ was significantly reduced by LCHS to a value of approximately 35 mM in all groups, representing a 30%–40% decrease (Figure 1C). The reduction of $[Cl^-]_i$

observed in this study is similar to that reported previously by Bertram *et al.*,¹⁵ using an identical LCHS protocol.¹⁶

We next assessed how time of exposure to LCHS altered the regulation of NCC by WNK4 because previous observations have shown that $[Cl^-]_i$ slowly decreases under these conditions.¹⁶ One hour of LCHS had no effect on Na^+ uptake in oocytes injected with NCC alone, whereas 16 hours resulted in a significant increase (Figure 1D). In contrast, WNK4 expression led to a significant activation of NCC

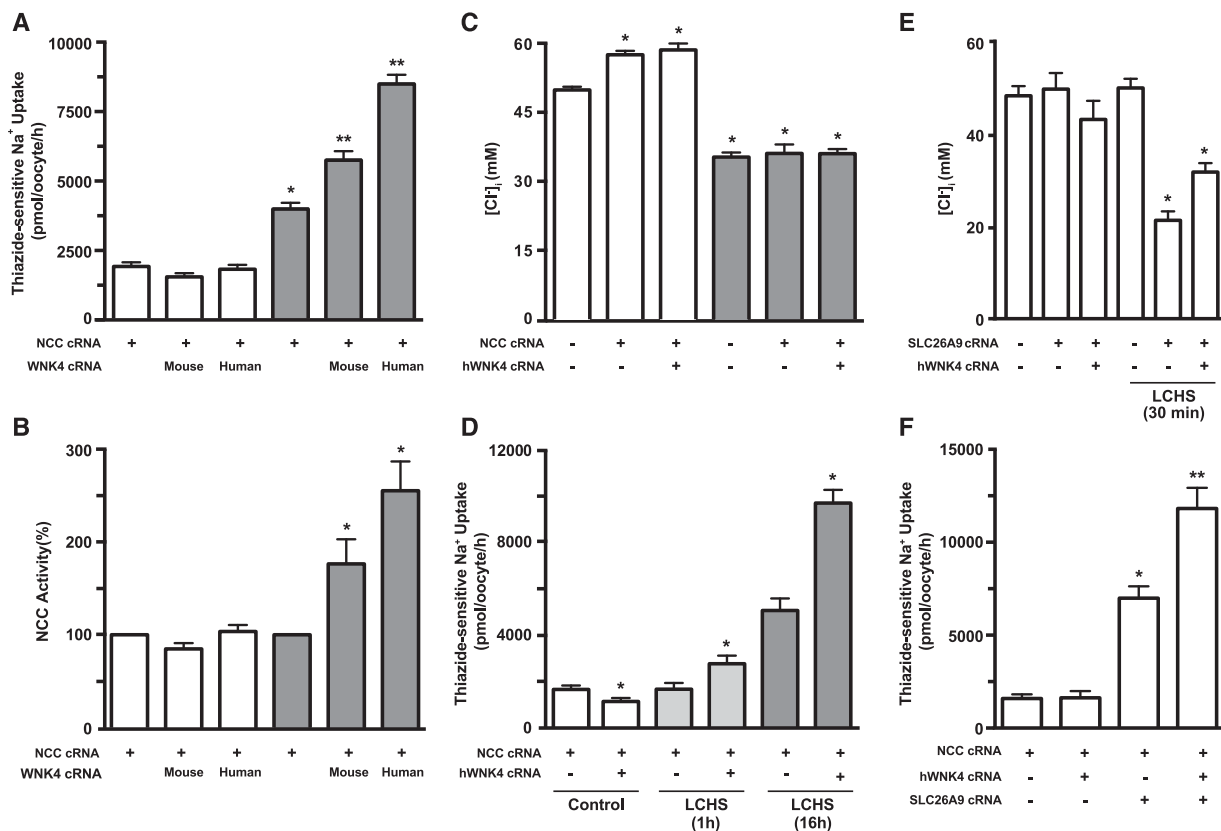


Figure 1. WNK4 effect on NCC is modulated by $[Cl^-]_i$. (A) Functional expression assay shows the thiazide-sensitive Na^+ uptake in groups of oocytes injected with NCC cRNA alone or together with mouse WNK4 or human WNK4 cRNA, as stated. Uptake was performed in control conditions (white bars) or after 16 hours of LCHS (gray bars) (see Supplemental Material). * $P < 0.01$ versus same group in control conditions. ** $P < 0.05$ versus NCC in LCHS. $n = 13$. (B) Uptake in oocytes injected with NCC alone, in control conditions (white bars) or LCHS (gray bars), was arbitrarily set to 100%, and the corresponding groups were normalized accordingly. * $P < 0.01$ versus any group in control conditions and versus NCC in LCHS. (C) The $[Cl^-]_i$ in oocytes was assessed with custom-made glass capillary ion selective microelectrodes 48 hours after injection of water, NCC, or NCC plus WNK4 cRNA, as stated, in control conditions (white bars) or after 16 hours of LCHS (gray bars). * $P < 0.05$ versus water injected in control conditions. $n = 2$ (six oocytes per group, per experiment). (D) Uptake was performed in control conditions (white bars) or in LCHS in 1 hour (light gray bars) and 16 hours (dark gray bars) in groups injected with NCC alone or NCC plus WNK4 group, as stated. * $P < 0.05$ versus own control. $n = 3$. (E) $[Cl^-]_i$ in oocytes injected with water, SLC26A9, or SLC26A9 plus WNK4 cRNA, as stated, after 48 hours of incubation in ND96 or after 30 minutes of LCHS. * $P < 0.05$ versus water in control conditions. $n = 3$. (F) Thiazide-sensitive Na^+ uptake in oocytes injected with NCC cRNA alone and NCC plus WNK4 cRNA in the absence or presence of SLC26A9 cRNA. * $P < 0.01$ versus NCC or NCC plus WNK4 groups. ** $P < 0.05$ versus NCC plus SLC26A9 cRNA injection.

after only 1 hour and was further increased after 16 hours. Therefore, the presence of WNK4 accelerated the effect of LCHS on NCC.

Because LCHS may have several effects on oocytes, we used an alternative method to reduce $[Cl^-]_i$ by coinjecting SLC26A9 cRNA, which in the absence of extracellular Cl^- performs as a chloride efflux pathway.¹⁷ Indeed, 2 days after injection, the $[Cl^-]_i$ was similar in water, SLC26A9, or SLC26A9 plus WNK4 injected oocytes, whereas LCHS for only 30 minutes significantly reduced the $[Cl^-]_i$ in SLC26A9 or SLC26A9 plus WNK4, but not in water oocytes (Figure 1E). As a consequence, NCC activity was increased, and this effect was dramatically potentiated by WNK4 (Figure 1F).

Activation of NCC under LCHS is associated with increased phosphorylation of key residues in the amino-terminal domain.^{11,12} To determine if the catalytic activity of WNK4 is required for NCC activation in these conditions, we used the catalytically inactive mutant WNK4-D321A.¹³ This mutant not only prevented the activation of NCC by WNK4, but it also decreased its activity below the level of oocytes injected with NCC alone in LCHS (Figure 2A). Because our previous experiments suggested basal NCC activity relies on the endogenous long isoform of WNK1 (L-WNK1),¹⁸ these results suggest WNK4-D321A may prevent the effect of endogenous L-WNK1 during LCHS.

Piala *et al.*¹⁹ showed that L-WNK1 autophosphorylation and activity is inhibited by $[Cl^-]_i$, therefore demonstrating that L-WNK1 is a chloride-sensitive kinase. They identified two leucine residues, conserved among WNKs, in the catalytic domain of L-WNK1 (L369 and L371) that serve as the Cl^- binding site. To test whether these residues display the same function in WNK4, we replaced the homologous residues (L322 and L324) by phenylalanine (WNK4-L322F, WNK4-L324F, and the double mutant WNK4-LL-FF). WNK4-LL-FF induced a remarkable activation of NCC in control conditions (Figure 2B). Mutation of L322 alone resulted in a greater increase in NCC activity, similar to what was observed for WNK4 in LCHS. Moreover, the activation

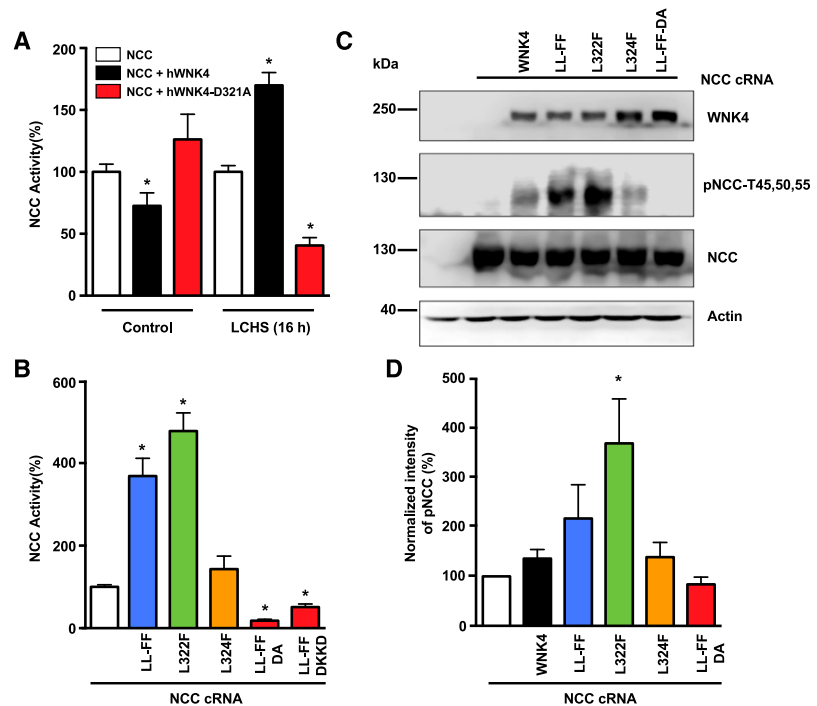


Figure 2. Elimination of the putative Cl^- -binding pocket turns WNK4 into a constitutive activator of NCC. (A) NCC activity in oocytes injected with NCC cRNA (white bars), NCC plus wild-type WNK4 (black bars), or NCC plus catalytically inactive WNK4-D321A (red bars), as stated. Oocytes were incubated in the control solution or LCHS for 16 hours before the measurement of Na^+ uptake. Uptake in oocytes injected with NCC alone and incubated in control or LCHS was arbitrarily set to 100%, and the NCC plus WNK4 or NCC plus WNK4-D321A groups were normalized accordingly. $*P < 0.05$ versus NCC corresponding control. $n = 3$. (B) Uptake in oocytes injected with NCC alone was arbitrarily set to 100% (white bar), and the rest of the groups were normalized accordingly (as stated, WNK4-LL-FF is the blue bar, WNK4-L322F is the green bar, WNK4-L324F is the orange bar, and WNK4-LL-FF-DA and WNK4-LL-FF-DKKD are the red bars). These series of experiments were performed in control conditions only. $*P < 0.01$ versus NCC alone. $n = 6$. (C) Representative Western blot showing the effect of wild-type or mutant WNK4, as stated, on NCC expression and phosphorylation in control conditions. Blot shows WNK4, pNCC, NCC, and actin expression, as stated. WNK4 is present only in oocytes injected with wild-type or mutant WNK4. (D) Densitometric analysis of data compiled from five different experiments. NCC basal phosphorylation (white bar) was arbitrarily set to 100% and the corresponding groups were normalized accordingly (as stated, WNK4 wild-type (black bar), WNK4-LL-FF (blue bar), WNK4-L322F (green bar), WNK4-L324F (orange bar) and catalytically inactive WNK4-LL-FF-DA (red bar). $*P < 0.05$ versus NCC.

of NCC by WNK4-LL-FF is kinase-dependent. The introduction of the D321A or the double-charge D321K-K186D mutations in WNK4-LL-FF not only prevented the activation of NCC, but also abolished most of its activity (Figure 2B). Therefore, elimination of the Cl^- binding site turned WNK4 into a constitutive activator of NCC, in a kinase-dependent manner. This was further confirmed by analysis of

NCC phosphorylation.¹² WNK4-LL-FF and WNK4-L322F stimulated NCC phosphorylation on all three residues tested, whereas WNK4-LL-FF-DA completely prevented it (Figure 2, C and D).

To analyze the effect of $[Cl^-]_i$ on WNK4 activity, we determined the autophosphorylation status of serine residue S335, known to be required for WNK activation. According to Piala *et al.*,¹⁹ phosphorylation of L-WNK1 homologous serine

(S382) is modulated by chloride. No phosphorylation of WNK4 was observed in control conditions, whereas it became evident in oocytes challenged with LCHS (Figure 3, A and B). The phosphorylation level of L-WNK1 S382 was also increased by LCHS, whereas it was similar in both conditions for WNK3 S308 (Figure 3C). Interestingly, WNK4-L322F was strong in basal conditions and was not affected by

LCHS (Figure 3, D and E). These findings suggest WNK3 and WNK4-L322F are less sensitive to $[Cl^-]_i$ than L-WNK1 and WNK4. Supporting that phosphorylation of WNK4-S335 is required for NCC activation; mutation of this residue to alanine in WNK4-LL-FF and WNK4-L322F abrogated their effect on NCC (Figure 3F).

Soon after the recognition that mutations in WNK4 cause familial hyperkalemic

hypertension,²⁰ it was reported that WNK4 reduces the activity of NCC in *Xenopus laevis* oocytes and mammalian cells.^{2–6,21} Animal models supported the *in vitro* observations because overexpression of WNK4 in transgenic mice resulted in decreased expression and phosphorylation of NCC.⁷ However, one study reported increased NCC activity by human WNK4 in *Xenopus* oocytes,²² and inactivation of WNK4 in mice resulted in a reduced NCC phosphorylation and expression.⁸ Moreover, both parameters were increased in a new model of WNK4 overexpression in mice.⁹ Therefore, there is evidence *in vitro* and *in vivo* for both inhibition and activation of NCC by WNK4.

Here we present data indicating that WNK4 is a chloride-sensitive kinase, potentially explaining the dual effects of WNK4 on NCC. In the presence of high Cl^- concentrations, WNK4 is inactive and may reduce basal activity of NCC by its inhibiting interaction with L-WNK1 and WNK3.^{18,21} When $[Cl^-]_i$ is low, WNK4 phosphorylation, and therefore activity, is stimulated, thereby activating the cotransporter (Figure 4). Our results suggest a similar mechanism to the one proposed by Piali *et al.*¹⁹ is probably involved in the switch of WNK4 behavior.

The apparent median inhibitory concentration of Cl^- (IC_{50}) for L-WNK1 is 20 mM. In oocytes and HEK293 cells, $[Cl^-]_i$ is around 40–50 mM,^{16,17,23} therefore allowing partial activity of L-WNK1. This is consistent with our recent observation that basal NCC activity in oocytes and HEK293 cells depends on endogenous L-WNK1.¹⁸ The increased NCC activity induced by LCHS in oocytes injected only with NCC is most likely caused by enhanced endogenous L-WNK1 activity. Coinjection of oocytes with SLC26A9 reduces $[Cl^-]_i$ to approximately 30 mM,¹⁷ leading to activation of NCC without LCHS. In oocytes in basal conditions, the most potent activator of NCC is WNK3,²⁴ followed by L-WNK1,¹⁸ whereas WNK4 may inhibit or have no effect on its basal activity. This difference in WNKs activity toward NCC could be a function of their sensitivity to chloride.¹⁸

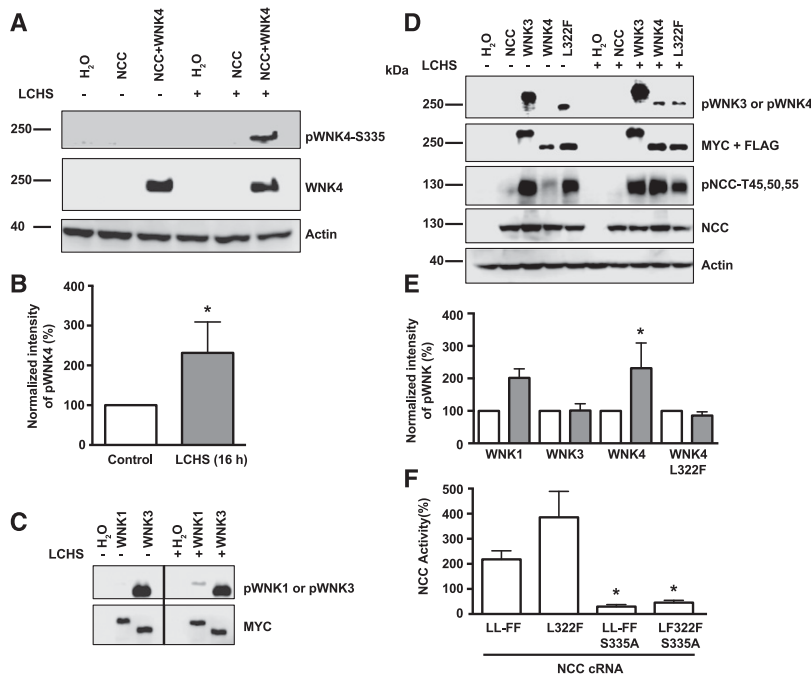


Figure 3. Modulation of WNK autophosphorylation by decrease of $[Cl^-]_i$ induced by LCHS. (A) Representative Western blot showing the effect of LCHS on wild-type WNK4 autophosphorylation, as stated, in control conditions or LCHS. Blot shows pWNK4, WNK4, and actin expression, as stated. Phosphoantibody recognizing S335 in WNK4 was developed and characterized by Thastrup *et al.*³⁰ (B) Densitometric analysis of compiled results from six different experiments. Phosphorylation level of WNK4 in control conditions was arbitrarily set to 100% (white bar), and the phosphorylation status in LCHS was normalized accordingly (gray bar). * $P < 0.05$ versus control (Wilcoxon signed-rank test). (C) L-WNK1 and WNK3 autophosphorylation at S382 and S308, respectively, in control and LCHS conditions, as stated. The upper blot depicts phospho-WNK, and the lower blot shows the total amount of L-WNK1 or WNK3 as detected using anti-Myc antibody. Original image was cropped to eliminate empty lanes and show the L-WNK1 and WNK3 lanes only. (D) Representative Western blot of phospho-WNKs (WNK3, WNK4, or mutant WNK4-L322F), total WNKs, phospho-NCC, NCC, and actin in control conditions and after LCHS, as stated. (E) Densitometric analysis of compiled results from six experiments for WNK4: three for WNK3, three for WNK4-L322F, and two for L-WNK1. White bars depict phosphorylation status in control conditions arbitrarily taken as 100%, and gray bars depict the phosphorylation status in LCHS, as normalized for its corresponding white bar. * $P < 0.05$ versus control (Wilcoxon signed-rank test). (F) NCC activity in oocytes injected with mutant WNK4-LL-FF, WNK4-L322F, WNK4-LL-FF-S335A, or WNK4-L322F-S335A, as stated. Uptake in oocytes injected with NCC alone was arbitrarily set to 100%, and the corresponding groups were normalized accordingly. These series of experiments were performed in control conditions only. $n = 4$. * $P < 0.001$ versus corresponding group without S335A substitution.

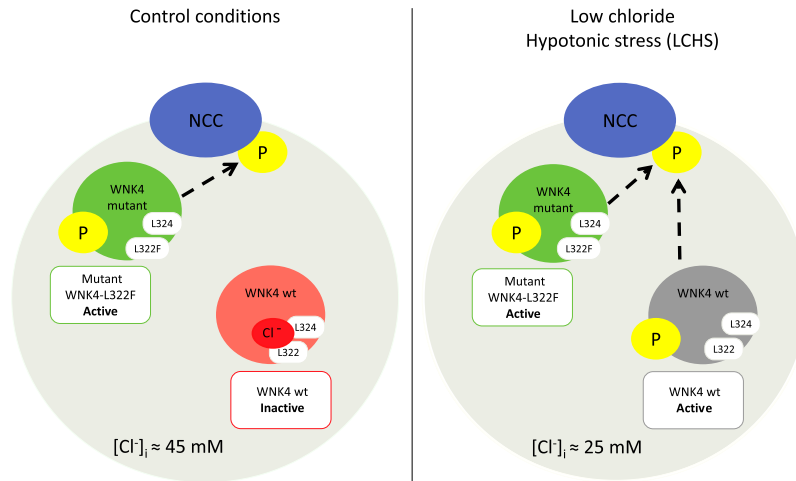


Figure 4. A cell scheme of a *X. laevis* oocyte illustrating the effect of intracellular chloride concentration on wild-type WNK4 and mutant WNK4-L322F effect on NCC. In control conditions, where intracellular chloride concentration fluctuates around 45 mM, wild-type (wt) WNK4 is inactive, resulting in a negative or neutral effect on NCC activity. Disruption of the chloride binding site in mutant WNK4-L322F turns it into a constitutively auto-phosphorylated activate kinase that has a positive effect on NCC activity even without chloride depletion. Reduction of intracellular chloride to around 25 mM (after LCHS) is sufficient to promote wt WNK4 auto-phosphorylation, turning it into an activator of NCC.

Further experiments are required to define the IC_{50} for each WNK. In this regard, the regulation of WNK4 activity by angiotensin II and $[Cl^-]_i$ may be linked because angiotensin II promotes the opening of chloride channels,²⁵ which would result in a decreased $[Cl^-]_i$. Moreover, a recent study suggests the reduced activity of NCC in EAST/SeSAME syndrome results from *Kcnj10* mutations that inhibit basolateral K^+ conductance, reducing the chloride exit from the cell.²⁶

$[Cl^-]_i$ of distal convoluted tubule cells ranges from 14 to 20 mM.^{27–29} Therefore, small changes in $[Cl^-]_i$ could have an important effect on NCC regulation by WNK4. Further experiments and mathematical modeling are required to explore this hypothesis and the role of $[Cl^-]_i$ in the regulation of NCC in physiologic conditions.

CONCISE METHODS

Mutagenesis and Constructs

All mutant WNK4 constructs were generated by site-directed mutagenesis, and their sequence was checked by automatic DNA sequencing.

Functional Expression of NCC

Our institutional committee on animal research approved the use of *X. laevis* frogs. The functional expression of NCC was assessed in *X. laevis* oocytes microinjected with NCC cRNA alone or together with wild-type WNK4, SLC26A9, or mutant WNK4. Two days later, the thiazide-sensitive $^{22}Na^+$ uptake was assessed in oocytes exposed to control conditions or to LCHS, following our previously published protocol.¹¹ In brief, the night before the uptake assay, groups of oocytes were incubated in two different osmolar conditions: isotonic (ND96, 210 mosm/kg H_2O) or low Cl^- hypotonic stress (Cl^- -free 170 mosm/kg H_2O). Then, tracer $^{22}Na^+$ uptake was assessed in oocytes exposed to isotonicity using our usual isotonic uptake solution or NaCl containing hypotonic uptake medium (see Supplemental Material for details).

Measurement of Intracellular Chloride Concentration

Intracellular chloride concentration was assessed using ion selective microelectrodes. All measurements were performed in a Faraday cage to avoid electromagnetic interference. Each ion selective microelectrode was calibrated

with 10^{-5} to 10^{-1} M KCl standard solution showing a nernstian behavior.

Western Blotting of *X. laevis* Oocyte Proteins

Flag-tagged NCC protein, human Flag-tagged WNK4, Myc-tagged WNK3, and Myc-tagged L-WNK1 protein extracts were analyzed by Western blot. The following commercial HRP-conjugated antibodies were used: anti-Flag 1:5000 (Sigma-Aldrich), anti-Myc 1:1000 (Sigma-Aldrich), and anti-beta-actin 1:2500 (Santa Cruz Biotechnology). The following sheep antibodies were used at a concentration of 1–2 $\mu g/ml$: anti-NCC (recognizing residues 906–925 of human NCC, CHTKRFEDMIAPFRLNDGFKD); anti-phosphorylated NCC at threonine 45, threonine 50, and threonine 55 (T44, 48, and 53 in rats); anti-WNK4 (recognizing residues 1221–1243 of human WNK4, SSTGSQEQRASKGVTFAGDVGRM); and anti-phosphorylated L-WNK1 at S382. The blots done with the sheep antibodies were incubated for 1.5 hour at room temperature with secondary anti-sheep HRP-conjugated antibody 1:5000 (Santa Cruz Biotechnology) in blocking solution. The signal was detected by chemiluminescence using the Luminata Forte Western HRP substrate (EMD Millipore).

Statistical Analysis

The significance of the difference between the two groups was tested with *t* test and for three or more groups by one-way ANOVA with multiple comparisons with Bonferroni correction, using GraphPad Prism version 6.00 for Mac (GraphPad Software, San Diego, CA).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dario Alessi, Dundee University, for the gift of the sheep antibodies.

This work was supported by grant 165815 from the Mexican Council of Science and Technology (CONACyT) and IN200513 from PAPIIT-DGAPA to G.G., and collaborative international grants 188712 from CONACyT and ANR-12-ISVS1-0001-01 from the Agence Nationale pour la Recherche (ANR, France) to G.G. and J.H. S.B.-V. was supported by a scholarship from CONACyT-Mexico and is

a graduate student in the Biochemical Science program of the Universidad Nacional Autónoma de México.

DISCLOSURES

None

REFERENCES

- Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS: Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell* 104: 545–556, 2001
- Wilson FH, Kahle KT, Sabath E, Lalioti MD, Rapson AK, Hoover RS, Hebert SC, Gamba G, Lifton RP: Molecular pathogenesis of inherited hypertension with hyperkalemia: The Na-Cl cotransporter is inhibited by wild-type but not mutant WNK4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 680–684, 2003
- Yang CL, Angell J, Mitchell R, Ellison DH: WNK kinases regulate thiazide-sensitive Na-Cl cotransport. *J Clin Invest* 111: 1039–1045, 2003
- Cai H, Cebotaru V, Wang YH, Zhang XM, Cebotaru L, Guggino SE, Guggino WB: WNK4 kinase regulates surface expression of the human sodium chloride cotransporter in mammalian cells. *Kidney Int* 69: 2162–2170, 2006
- Subramanya AR, Liu J, Ellison DH, Wade JB, Welling PA: WNK4 diverts the thiazide-sensitive NaCl cotransporter to the lysosome and stimulates AP-3 interaction. *J Biol Chem* 284: 18471–18480, 2009
- Ko B, Mistry AC, Hanson L, Mallick R, Cooke LL, Hack BK, Cunningham P, Hoover RS: A new model of the distal convoluted tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 303: F700–F710, 2012
- Lalioti MD, Zhang J, Volkman HM, Kahle KT, Hoffmann KE, Toka HR, Nelson-Williams C, Ellison DH, Flavell R, Booth CJ, Lu Y, Geller DS, Lifton RP: Wnk4 controls blood pressure and potassium homeostasis via regulation of mass and activity of the distal convoluted tubule. *Nat Genet* 38: 1124–1132, 2006
- Castañeda-Bueno M, Cervantes-Pérez LG, Vázquez N, Uribe N, Kantesaria S, Morla L, Bobadilla NA, Doucet A, Alessi DR, Gamba G: Activation of the renal Na⁺:Cl⁻ cotransporter by angiotensin II is a WNK4-dependent process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 7929–7934, 2012
- Wakabayashi M, Mori T, Isobe K, Sahara E, Susa K, Araki Y, Chiga M, Kikuchi E, Nomura N, Mori Y, Matsuo H, Murata T, Nomura S, Asano T, Kawaguchi H, Nonoyama S, Rai T, Sasaki S, Uchida S: Impaired KLHL3-mediated ubiquitination of WNK4 causes human hypertension. *Cell Rep* 3: 858–868, 2013
- San-Cristobal P, Pacheco-Alvarez D, Richardson C, Ring AM, Vazquez N, Rafiqi FH, Chari D, Kahle KT, Leng Q, Bobadilla NA, Hebert SC, Alessi DR, Lifton RP, Gamba G: Angiotensin II signaling increases activity of the renal Na-Cl cotransporter through a WNK4-SPAK-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 4384–4389, 2009
- Pacheco-Alvarez D, Cristóbal PS, Meade P, Moreno E, Vazquez N, Muñoz E, Díaz A, Juárez ME, Giménez I, Gamba G: The Na⁺:Cl⁻ cotransporter is activated and phosphorylated at the amino-terminal domain upon intracellular chloride depletion. *J Biol Chem* 281: 28755–28763, 2006
- Richardson C, Rafiqi FH, Karlsson HK, Moleleki N, Vandewalle A, Campbell DG, Morrice NA, Alessi DR: Activation of the thiazide-sensitive Na⁺:Cl⁻ cotransporter by the WNK-regulated kinases SPAK and OSR1. *J Cell Sci* 121: 675–684, 2008
- Vitari AC, Deak M, Morrice NA, Alessi DR: The WNK1 and WNK4 protein kinases that are mutated in Gordon's hypertension syndrome phosphorylate and activate SPAK and OSR1 protein kinases. *Biochem J* 391: 17–24, 2005
- Pacheco-Alvarez D, Gamba G: WNK3 is a putative chloride-sensing kinase. *Cell Physiol Biochem* 28: 1123–1134, 2011
- Bertram S, Cherubino F, Bossi E, Castagna M, Peres A: GABA reverse transport by the neuronal cotransporter GAT1: Influence of internal chloride depletion. *Am J Physiol Cell Physiol* 301: C1064–C1073, 2011
- Keicher E, Meech R: Endogenous Na⁺:K⁺ (or NH₄⁺):2Cl⁻ cotransport in Rana oocytes; anomalous effect of external NH₄⁺ on pHi. *J Physiol* 475: 45–57, 1994
- Chang MH, Plata C, Zandi-Nejad K, Sindić A, Sussman CR, Mercado A, Broumand V, Raghuram V, Mount DB, Romero MF: Slc26a9–anion exchanger, channel and Na⁺ transporter. *J Membr Biol* 228: 125–140, 2009
- Chavez-Canales M, Zhang C, Soukaseum C, Moreno E, Pacheco-Alvarez D, Vidal-Petiot E, Castaneda-Bueno M, Vazquez N, Rojas-Vega L, Meermeier NP, Rogers S, Jeunemaitre X, Yang CL, Ellison DH, Gamba G, Hadchouel J: WNK-SPAK-NCC cascade revisited: WNK1 stimulates the activity of the Na-Cl cotransporter via SPAK, an effect antagonized by WNK4. *Hypertension* 64: 1047–1053, 2014
- Piala AT, Moon TM, Akella R, He H, Cobb MH, Goldsmith EJ: Chloride sensing by WNK1 involves inhibition of autophosphorylation. *Sci Signal* 7: ra41, 2014
- Wilson FH, Disse-Nicodème S, Choate KA, Ishikawa K, Nelson-Williams C, Desitter I, Gunel M, Milford DV, Lipkin GW, Achard JM, Feely MP, Dussol B, Berland Y, Unwin RJ, Mayan H, Simon DB, Farfel Z, Jeunemaitre X, Lifton RP: Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science* 293: 1107–1112, 2001
- Yang CL, Zhu X, Ellison DH: The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter is regulated by a WNK kinase signaling complex. *J Clin Invest* 117: 3403–3411, 2007
- Wu G, Peng JB: Disease-causing mutations in KLHL3 impair its effect on WNK4 degradation. *FEBS Lett* 587: 1717–1722, 2013
- Cruz-Rangel S, Gamba G, Ramos-Mandujano G, Pasantes-Morales H: Influence of WNK3 on intracellular chloride concentration and volume regulation in HEK293 cells. *Pflugers Arch* 464: 317–330, 2012
- Rinehart J, Kahle KT, de Los Heros P, Vazquez N, Meade P, Wilson FH, Hebert SC, Gimenez I, Gamba G, Lifton RP: WNK3 kinase is a positive regulator of NKCC2 and NCC, renal cation-Cl⁻ cotransporters required for normal blood pressure homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 16777–16782, 2005
- Wu P, Wang M, Luan H, Li L, Wang L, Wang WH, Gu R: Angiotensin II stimulates basolateral 10-pS Cl⁻ channels in the thick ascending limb. *Hypertension* 61: 1211–1217, 2013
- Zhang C, Wang L, Zhang J, Su XT, Lin DH, Scholl UI, Giebisch G, Lifton RP, Wang WH: KCNJ10 determines the expression of the apical Na-Cl cotransporter (NCC) in the early distal convoluted tubule (DCT1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 11864–11869, 2014
- Beck FX, Dörge A, Rick R, Schramm M, Thureau K: The distribution of potassium, sodium and chloride across the apical membrane of renal tubular cells: Effect of acute metabolic alkalosis. *Pflugers Arch* 411: 259–267, 1988
- Boettger T, Hübner CA, Maier H, Rust MB, Beck FX, Jentsch TJ: Deafness and renal tubular acidosis in mice lacking the K-Cl cotransporter Kcc4. *Nature* 416: 874–878, 2002
- Weinstein AM: A mathematical model of rat distal convoluted tubule. I. Cotransporter function in early DCT. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F699–F720, 2005
- Thastrup JO, Rafiqi FH, Vitari AC, Pozo-Guisado E, Deak M, Mehellou Y, Alessi DR: SPAK/OSR1 regulate NKCC1 and WNK activity: Analysis of WNK isoform interactions and activation by T-loop trans-autophosphorylation. *Biochem J* 441: 325–337, 2012

This article contains supplemental material online at <http://jasn.asnjournals.org/lookup/suppl/doi:10.1681/ASN.2014050470/-/DCSupplemental>.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Bratov, A; Abramova, N; Domínguez, C. Investigation of chloride sensitive ISFETs with different membrane compositions suitable for medical applications *Analytica Chimica Acta* 514: 99–106, 2004
2. Burnett, RW; Covington, A K; Fogh-Andersen, N; Külpmann, W R; Lewenstam, A; Maas, A H J; Müller-Plathe, O; VanKessel, A L and Zijlstra, W G. Use of Ion-Selective Electrodes for Blood-Electrolyte Analysis. Recommendations for Nomenclature, Definitions and Conventions *Clin Chem Lab Med* 38(4): 363–370, 2000
3. Carmosino, M; Rizzo, F; Torretta, S; Procino, G; Svelto, M. High-throughput fluorescent-based NKCC functional assay in adherent epithelial cells. *BMC Cell Biology*, **14**:16, 2013
4. Caron, L; Rousseau, F; Gagnon, E; and Isenring, P. Cloning and functional characterization of a cation Cl-cotransporter interacting protein. *J Biol Chem* 275: 32027-32036, 2000
5. Delpire, E. Cation-Chloride Cotransporters in Neuronal Communication. *News Physiol Sci*. 15: 309-312, 2000
6. Delpire, E; Kaplan, M R; Plotkin, M D; Hebert, S C. The Na-(K)-Cl cotransporter family in the mammalian kidney: molecular identification and function(s) *Nephrol Dial Transplant* 11: 1967-1973, 1996
7. Dimeski, G; Badrick, T; St John, A. Ion Selective Electrodes (ISEs) and interferences—A review. *Clin Chim Acta* 411: 309–317, 2010
8. Gagnon, E; Bergeron, M J; Brunet, G M; Daigle, N D; Simard, C F; and Isenring, P. Molecular Mechanisms of Cl⁻ Transport by the Renal Na⁺-K⁺-Cl⁻ Cotransporter, *J Biol Chem*, 279 (7): 5648 –5654, 2004.
9. Gamba, G; Miyanoshita, A; Lombardi, M; Lytton, J; Lee, WS. Molecular Cloning, Primary Structure, and Characterization of Two Members of the Mammalian Electroneutral Sodium-(Potassium)-Chloride Cotransporter Family Expressed in Kidney. *J Biol Chem*, 269 (26): 17713-17722, 1994

10. Gamba, G. Molecular Physiology and Pathophysiology of Electroneutral Cation-Chloride Cotransporters. *Physiol Rev.* 85: 423–493, 2005a.
11. Gamba, G. Role of WNK kinases in regulating tubular salt and potassium transport and in the development of hypertension, *Am J Physiol Renal Physiol* 288: F245–F252, 2005b.
12. Ganong, E; Forbush, B; Flemmer, A W; Giménez, I; Caron, L; Isenring, P. Functional and molecular characterization of the shark renal Na-K-Cl cotransporter: novel aspects, *Am J Physiol Renal Physiol*, 283: F1046 – F1055, 2002.
13. Geck, P; Pietrzyk, C; Burckhardt, BC; Pfeiffer, B; Heinz, E. Electrically silent cotransport of Na, K and Cl in Ehrlich cells. *Biochem Biophys Acta.* 600: 432–447, 1980.
14. Haas, M and Forbush, B. The Na-K-Cl Cotransporters. *J Bioenerg Biomembr.* 30: 161-172, 1998.
15. Haas, M and Forbush, B. The Na-K-Cl cotransporter of secretory epithelia. *Annu Rev Physiol.* 62: 515–534, 2000.
16. Hannemann, A; Christie, J K; and Flatman, P W. Functional expression of the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2 in mammalian cells fails to confirm the dominant-negative effect of the AF splice variant. *J Biol Chem.* 284: 35348 –35358, 2009
17. Harvey, D; Modern Analytical Chemistry, McGraw Hill, EUA 2001
18. Hebert, S C; Mount, D B; Gamba, G. Molecular physiology of cation-coupled Cl⁻ cotransport: the SLC12 family, *Pflugers Arch.* 447: 580–593, 2004
19. Hediger, M A; Romero, M F; Ji-Bin Peng, J–B; Rolfs, A; Takanaga, H, Elspeth A. Bruford, EA. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. *Pflugers Arch.* 447: 465–468, 2004
20. International Union of Pure and Applied Chemistry. Recommendations for nomenclature of ion–selective electrodes. *Pure Appl Chem.* 66: 2527-2536, 1994
21. Isenring, P; Jacoby, S. C; Payne, J A; and Forbush, B. Comparison of Na-K-Cl Cotransporters NKCC1, NKCC2, and the HEK cell Na-K-Cl cotransporter, *J Biol Chem* 273: 11295–11301, 1998a.

22. Isenring, P; Jacoby, SC; Forbush, B III. The role of transmembrane domain 2 in cation transport by the Na–K–Cl cotransporter (kinetic/mutagenic analysis). *Proc Natl Acad Sci USA*. 95: 7179–7184, 1998b
23. Kahle, K T; Rinehart, J; de los Heros, P; Louvi, A; Meade, P; Vazquez, N; Hebert, S C; Gamba, G; Gimenez, I; and Lifton, R P. WNK3 modulates transport of Cl⁻ in and out of cells: Implications for control of cell volume and neuronal excitability. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102: 16783–16788, 2005
24. Kahle, K T; Rinehart, J.; Ring, A; Gimenez, I; Gamba, G; Hebert, S C; and Lifton R P. WNK Protein Kinases Modulate Cellular Cl⁻ Flux by Altering the Phosphorylation State of the Na-K-Cl and K-Cl Cotransporters. *Physiology*, 21: 326–335, 2006
25. Kakazu, Y; Akaike, N; Komiyama, S; and Nabekura, J. Regulation of Intracellular Chloride by Cotransporters in Developing Lateral Superior Olive Neurons, *J Neurosci*, 19: 2843–2851, 1999
26. Lytle, C; Forbush, B. The Na-K-Cl Cotransport Protein of Shark Rectal Gland, II. Regulation by direct phosphorylation, *J Biol Chem*. 267: 2538–25443, 1992
27. Lytle, C; and McManus, T. Coordinate modulation of Na-K-2Cl cotransport and K-Cl cotransport by cell volume and chloride *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C1422 – C1431, 2002
28. Mercado, A; Mount, D B; and Gamba, G. Electroneutral Cation-Chloride Cotransporters in the Central Nervous System. *Neurochem Res*, 29: 17–25, 2004
29. Mount, D B; Delpire, E; Gamba, G; Hall, A E; Poch, E; Hoover, R S; and Hebert, S C The electroneutral cation-chloride cotransporter, *J Exp Biol*, 201: 2091–2102, 1998
30. Mount, D B, Arias I, Xie, Q, Mercado, A, and Gamba, G. Cloning and characterization of SLC12A9, a new member of the cation-chloride cotransporter gene family. *FASEB J* 16: A807, 2002
31. Plambeck, J A. Electroanalytical Chemistry. Basic principles and applications. John Wiley & Sons, USA 1982

32. Plata, C; Meade, P; Vázquez, N; Hebert, SC; and Gamba, G. Functional properties of the apical $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ cotransporter isoforms, *J Biol Chem.* 277: 11004 –11012, 2002
33. Ponce-Coria, J; San-Cristobal, P; Kahle, K. T; Vazquez, N; Pacheco-Alvarez, D; de los Heros, P; Juárez, P; Muñoz, E; Michel, G; Bobadilla, N. A; Gimenez, I; Lifton, R. P; Hebert, S. C; and Gamba, G. Regulation of NKCC2 by a chloride-sensing mechanism involving the WNK3 and SPAK kinases, *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 8458 – 8463, 2008
34. Pretsch, E. The new wave of ion-selective electrodes. *TrAC.* 26: 46–51, 2007
35. Qin, Y; Bakker, E. Quantitive binding constants of H-selective chromoionophores and anion ionophores in solvent polymeric sensing membranes. *Talanta* 58: 909-918, 2002
36. Quick, M W, Volume Editor, Transmembrane Transporters, Wiley-Liss, USA 2002
37. Russell, J M. Sodium-Potassium-Chloride Cotransporter. *Physiol Rev.* 80: 211-276, 2000
38. Shinwari, M W, Zhitomirsky, D; Deen, I A; Selvaganapathy P R; Deen, M J; and Landheer D. Microfabricated Reference Electrodes and their Biosensing Applications, *Sensors.* 10: 1679-1715, 2010
39. Skoog, D A; Leary, J J. Análisis Instrumental, McGraw Hill, España 1994
40. Solsky, R L. Ion-Selective Electrodes, *Anal Chem*, 60: 106R-113R, 1988
41. Umezawa, Y; Bühlmann, P; Umezawa, K; Tohda, K; Amemiya S. Potentiometric selectivity coefficients of ion-selective electrodes. Part I. Inorganic cations. Technical report. *Pure Appl Chem*, 72 (10): 1851–2082, 2000
42. Vassos, B H. Electroquímica Analítica, Editorial Limusa, Noriega editores, México, 1998
43. Weber, W M. Ion currents of *Xenopus laevis* oocytes: state of the art, *Biochim Biophys Acta* 1421: 213–233, 1999
44. Xu, J; Wang, X; Ensign, B; Li, M; Wu, L; Guia, A; and Xu, J. Ion-channel assay technologies: *quo vadis?* *Drug Discov Today.* 6: 1278-1287, 2001