



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

3/2011

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
FACULTAD DE MEDICINA

EFFECTO DEL GÉNERO SOBRE LA RESPUESTA A  
LA ADMINISTRACIÓN AGUDA DE TIAZIDA Y LA  
EXPRESIÓN GÉNICA DEL COTRANSPORTADOR  
DE  $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$  SENSIBLE A TIAZIDAS EN RIÑÓN

LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA BÁSICA

P R E S E N T A :

PATRICIA MEADE HUERTA

DIRECTOR DE TESIS: DR. GERARDO GAMBA AYALA

MEXICO, D. F.

275662.

1999.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

A mis Papás  
Por ser apoyo y estímulo

Gracias

Al Dr. Gerardo Gamba

Por ser, además de ejemplo, un amigo

Gracias

A mis hermanos Carlos, Maluz y Bernardo.

A mis amigos Michelle, Nati, Karla,  
Tavo y Gerardo.

A mis compañeros y amigos de laboratorio,  
Gaby, Anayanzin, Chelo, Alejandra,  
Adriana Monroy, Adriana Mercado, Verena,  
Niño Luis y Edmundo.

Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel.

## ÍNDICE

RELACIÓN DE ABREVIATURAS	1
<b>INTRODUCCIÓN</b>	2
ESQUEMA GENERAL DE LA REABSORCIÓN RENAL DE SODIO	2
Túbulo proximal	4
Asa de Henle	5
Túbulo distal	8
Túbulo colector	10
LA FAMILIA DE COTRANSPORTADORES ELECTRONEUTROS DE SODIO, POTASIO Y CLORO	11
Cotransportador de Na <sup>+</sup> :Cl <sup>-</sup> sensible a tiazidas (CST)	14
Biología molecular del CST	14
Localización del CST	15
Características funcionales del CST	17
Regulación del CST	19
Regulación aguda	19
Regulación crónica. Efecto de la carga de sodio	20
Regulación crónica. Efecto de las hormonas esteroideas	23
Regulación crónica. Efecto del género	24
<b>HIPÓTESIS</b>	26
<b>OBJETIVOS</b>	26
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	27
Diseño Experimental	27
Determinaciones bioquímicas	30
Extracción del RNA total	31
Análisis de la expresión génica del CST	31
Análisis Estadísticos	34
<b>RESULTADOS</b>	35
La respuesta a la bendroflumetiazida es mayor en ratas hembras que en machos	35
La gonadectomía reduce la respuesta a la bendroflumetiazida en hembras, pero no en machos	41
La expresión génica del CST es similar en hembras y machos	54
La gonadectomía no afecta el nivel de RNAm del CST	56
<b>DISCUSIÓN</b>	58
<b>PERSPECTIVAS</b>	62
<b>CONCLUSIONES</b>	63
<b>APÉNDICES</b>	64
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	68

## RELACIÓN DE ABREVIATURAS UTILIZADAS

<b>APS</b>	Persulfato de amonio	<b>µl</b>	Microlitros
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina	<b>mM</b>	Milimolar
<b>BM</b>	Biología molecular	<b>mOsm</b>	Miliosmolar
<b>CSB</b>	Cotransportador sensible a bumetanida	<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>CSB1</b>	CSB apical del asa ascendente de Henle	<b>NaOH</b>	Hidróxido de sodio
<b>CSB2</b>	CSB basolateral o no epitelial	<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	Amonio
<b>CsCl</b>	Cloruro de cesio	<b>nm</b>	Nanómetros
<b>CST</b>	Cotransportador sensible a tiazidas	<b>NS</b>	No significativa
<b>CSTfl</b>	CST de lenguado	<b>11β-HSD</b>	11-β-hidroxiesteroide deshidrogenasa
<b>CSTh</b>	CST de humano	<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>CSTr</b>	CST de rata	<b>PKA</b>	Proteína cinasa A
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido	<b>PKC</b>	Proteína cinasa C
<b>DNA</b>	Acido desoxirribonucleico	<b>RNA</b>	Acido ribonucleico
<b>DNAc</b>	DNA complementario	<b>RNAm</b>	RNA mensajero
<b>dNTP</b>	Mezcla de desoxirribonucleótidos	<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>DOCA</b>	Deoxicorticosterona	<b>RT-PCR</b>	Transcripción reversa y PCR
<b>EtOH</b>	Etanol	<b>TCC</b>	Túbulo colector cortical
<b>FSH</b>	Hormona foliculo estimulante	<b>TCME</b>	Túbulo colector medular externo
<b>G3PD</b>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	<b>TCMI</b>	Túbulo colector medular interno
<b>KCC</b>	Cotransportador de K <sup>+</sup> :Cl	<b>TG</b>	Tiocianato de guanidina
<b>KDa</b>	Kilodaltons	<b>TR</b>	Transcripción reversa
<b>Km</b>	Inhibición enzimática al 50 %	<b>V</b>	Voltios
<b>LH</b>	Hormona luteinizante	<b>Vmax</b>	Inhibición enzimática al 100 %
<b>µEq</b>	Microequivalentes		

## INTRODUCCIÓN

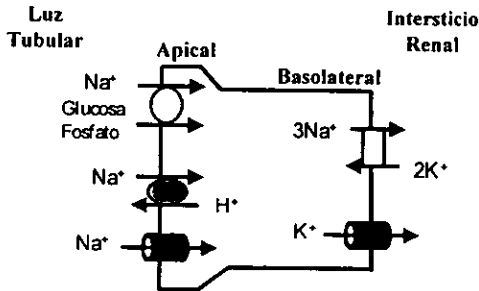
Una de las principales funciones del riñón es la excreción de sal y agua, lo que le permite mantener constantes la osmolaridad y la composición de los líquidos corporales a pesar de las variaciones en la ingesta de agua y solutos. Esta función la realiza el riñón mediante la integración de la filtración glomerular y la reabsorción tubular. La filtración glomerular es un proceso pasivo que depende de la presión de perfusión renal y de la integridad anatómica del glomérulo. La reabsorción tubular es un proceso activo con gran consumo de energía que depende de los procesos de transporte epitelial a lo largo de la nefrona. La eficiencia del epitelio tubular renal es tan grande que reabsorbe en un día 178 litros de agua y 1.3 kg de NaCl.

## ESQUEMA GENERAL DE LA REABSORCIÓN RENAL DE SODIO

De Wardener demostró en 1961 (de Wardener H E et al., 1961) que bajo condiciones fisiológicas la excreción urinaria de  $\text{Na}^+$  no depende de la filtración glomerular, sino de la función del epitelio tubular renal. La investigación que se llevó a cabo en este campo en las siguientes décadas ha mostrado que la reabsorción de  $\text{Na}^+$  a lo largo de la nefrona depende de la operación simultánea de la  $\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa en la membrana basolateral y de diversas proteínas acarreadoras de  $\text{Na}^+$  en la membrana apical. En el túbulo proximal y en el asa de Henle la reabsorción depende de la carga de  $\text{Na}^+$ , mientras que en el túbulo colector depende de la necesidad de mantener el balance de  $\text{Na}^+$ . El ajuste fino de la natriuresis se define entonces en los segmentos distales de la nefrona (de Wardener H E, 1987; de Wardener H E, 1978).



La figura 1 muestra un esquema del mecanismo general de reabsorción de  $\text{Na}^+$  que utilizan las células epiteliales a lo largo de la nefrona. La  $\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa se localiza exclusivamente en la membrana basolateral, por lo que polariza a las células epiteliales en dos caras: apical o luminal y basolateral (Fambrough M et al., 1987; Jorgensen P L, 1986; Jorgensen P L, 1980). Esta proteína es la encargada de sacar  $\text{Na}^+$  de la célula, en contra de su gradiente de concentración, mediante



**Figura 1. Fisiología molecular de la reabsorción de  $\text{Na}^+$  transtubular.** El  $\text{Na}^+$  filtrado entra a la célula por la membrana apical por medio de un acarreador transmembranal que puede también reabsorber (cotransportador de sodio-glucosa o sodio-fosfato) o secretar otra sustancia (intercambiador sodio-hidrógeno) o por un canal selectivo. El  $\text{Na}^+$  regresa a la circulación sistémica vía la  $\text{Na}^+:\text{K}^+$  ATPasa en la membrana basolateral.

un mecanismo de transporte activo dependiente del trifosfato de adenosina (ATP), en el que salen de la célula tres iones de  $\text{Na}^+$  y entran dos de  $\text{K}^+$ . La consecuencia de esta polarización es que el

transporte de  $\text{Na}^+$  es vectorial, desde la luz tubular hacia el intersticio renal, con lo que la carga eléctrica negativa en el interior de la célula permanece

constante, se mantiene la osmolaridad intracelular y además aumenta la concentración de  $\text{Na}^+$  en el espacio intersticial, lo que a su vez crea un gradiente osmótico que promueve la difusión de agua, por vía paracelular, desde la luz tubular hacia el espacio intersticial (Jorgensen P L, 1986; Jorgensen P L, 1980). El  $\text{Na}^+$  entra a las células epiteliales por la membrana apical a favor de su gradiente de concentración. Esto lo hace a través de un proceso de transporte activo secundario, en el que otros iones o moléculas son acoplados al  $\text{Na}^+$  para

transportarse en contra de su gradiente. Las proteínas de membrana que llevan a cabo este tipo de transporte se conocen como transportadores secundarios porque la energía requerida para el transporte no se obtiene por hidrólisis de ATP, sino a partir de la energía generada por el gradiente electroquímico del  $\text{Na}^+$  (Geck P and Heinz E, 1989).

La presencia de diversos tipos de cotransportadores, contratransportadores o canales es en parte responsable de la heterogeneidad de la nefrona, por lo que se ha dividido en varias regiones, en las que la reabsorción de  $\text{Na}^+$  y otros solutos difiere de una región a otra.

### **Túbulo proximal**

En el túbulo proximal se reabsorbe aproximadamente el 60% del ultrafiltrado glomerular y el 100% de la glucosa y aminoácidos. La intensa reabsorción se debe a la gran concentración de la  $\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa en la membrana basolateral.

El transporte de  $\text{Na}^+$  en el túbulo proximal se lleva a cabo en dos fases (Rector F C, 1983; Schafer J A, 1984). En la primera, se reabsorben nutrientes esenciales como glucosa y aminoácidos debido a la presencia de cotransportadores de  $\text{Na}^+$ -glucosa y de  $\text{Na}^+$ -aminoácidos en la membrana apical. La segunda fase consiste en el transporte de  $\text{NaCl}$  que se lleva a cabo por la operación simultánea de los contratransportadores de  $\text{Na}^+:\text{H}^+$  y de  $\text{Cl}^+:\text{HCO}_3^-$  (Berry C A and Rector F C, 1991b; Berry C A and Rector F C, 1991a; Baum M, 1987; Preisig P A and Rector F C Jr, 1988) (Figura 2). El contratransportador de  $\text{Na}^+:\text{H}^+$ , no sólo interviene en la reabsorción renal de  $\text{Na}^+$ , sino también en

procesos de regulación del volumen celular y del metabolismo ácido-base. Este tipo de transporte es sensible a drogas que inhiben la acción de la anhidrasa carbónica incrementando la acidez del fluido tubular en esta zona.

En el túbulo proximal la reabsorción de sal y agua es constitutiva y representa aproximadamente el 60 a 70 % de la reabsorción total. La reabsorción es constitutiva porque está bajo control de los denominados factores físicos peritubulares que juegan un papel

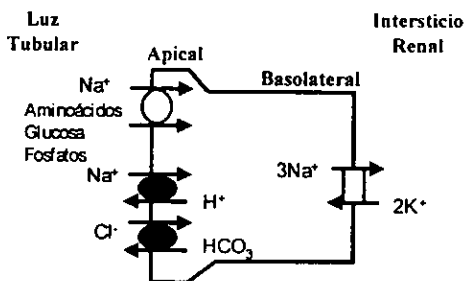
preponderante en la regulación de la reabsorción del ultrafiltrado glomerular (balance glomerulotubular). A mayor filtración glomerular, mayor será la presión intratubular y menor la presión

capilar postglomerular, por lo que se incrementa la fuerza de reabsorción. En cambio, a menor filtración glomerular, menor será la

presión intratubular y mayor la capilar postglomerular, lo que disminuye el gradiente de reabsorción (Brenner B M et al., 1973; Ichikawa I and Brenner B M, 1979; Ott C E et al., 1975).

### Asa de Henle

Se localiza a continuación del túbulo proximal, en la zona marcada por la unión entre las regiones externa e interna de la médula externa. Se divide en dos

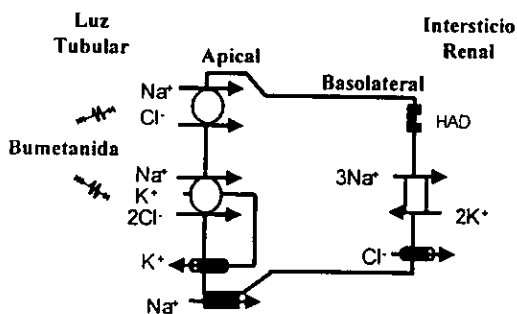


**Figura 2. Fisiología molecular del túbulo proximal.** El  $\text{Na}^+$  filtrado ingresa a la célula por la membrana apical por medio de los cotransportadores de  $\text{Na}^+$ :aminoácidos,  $\text{Na}^+$ :glucosa o  $\text{Na}^+$ :fosfatos o por el intercambiador  $\text{Na}^+$ :hidrógeno. Y sale por la membrana basolateral, al intersticio renal, vía la  $\text{Na}^+:\text{K}^+$  ATPasa

partes: descendente y ascendente, esta última subdividida en porción gruesa y delgada. En el asa ascendente se reabsorbe el 20% del filtrado glomerular y es la encargada de proveer a la médula renal con la hipertonicidad intersticial que es necesaria para poder diluir o concentrar la orina. El NaCl se reabsorbe en el asa ascendente, mientras que el agua lo hace en la porción descendente. La porción descendente del asa de Henle tiene elevado índice de permeabilidad al agua debido a la presencia de los canales de agua localizados en la membrana apical, conocidos como acuaporina-1 (Nielsen S et al., 1995). La combinación de hipertonicidad en la médula renal con canales de agua en la membrana apical resultan en una gran tasa de reabsorción de agua en este sitio. Además, la actividad de la  $\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa es muy baja, por lo que casi no hay reabsorción activa de solutos. Por lo tanto, la reabsorción de agua sin reabsorción de sal resulta en concentración del líquido tubular que en el riñón humano alcanza hasta 1200 mOsm/Kg en la punta de la papila renal.

El asa ascendente de Henle es el sitio en donde se reabsorbe NaCl, sin reabsorción de agua. En este sitio, la actividad de la  $\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa en la membrana basolateral es muy elevada y la membrana apical es impermeable al agua, de modo que se reabsorbe  $\text{Na}^+$ , pero no agua (Khraibi A A and Knox F G, 1989). La membrana apical es impermeable al agua porque es una membrana simple, con poca superficie de reabsorción, sin acuaporinas y con uniones intercelulares muy estrechas. En cambio, la reabsorción de NaCl es muy intensa debido a la presencia del cotransportador de  $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$  (Ott C E et al., 1975). Esta proteína es sensible a los diuréticos de asa como el furosemide y la bumetanida, lo que explica el potente efecto diurético de estos fármacos. Como se

trata de un acarreador de membrana, el transporte de  $\text{Cl}^-$  en la membrana apical depende del gradiente para la reabsorción del  $\text{Na}^+$  (Molony D A et al., 1989; Altamirano A A et al., 1988). En este cotransporte, un  $\text{Na}^+$  (a favor de su gradiente), un  $\text{K}^+$  (en contra de su gradiente) y dos  $\text{Cl}^-$  (en contra de su gradiente) se transportan hacia el interior de la célula. El  $\text{Na}^+$  abandona la célula en la cara basolateral a través de la  $\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa, el  $\text{K}^+$  se recicla hacia el interior del túbulo por canales conductivos y los iones  $\text{Cl}^-$  salen de la célula en la cara basolateral mediante canales de  $\text{Cl}^-$  o por transporte activo secundario unido al  $\text{K}^+$



**Figura 3. Fisiología molecular del asa de Henle.** El  $\text{Na}^+$  ingresa a la célula vía el cotransportador de  $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{Cl}^-$  o  $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$  en la membrana apical y regresa a la circulación sistémica vía la  $\text{Na}^+:\text{K}^+$  ATPasa en la membrana basolateral. El  $\text{Cl}^-$  ingresa a la célula por el cotransportador de  $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{Cl}^-$  o  $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$  en la membrana apical y sale por canales en la membrana basolateral. El  $\text{K}^+$  ingresa a la célula por el cotransportador de  $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{Cl}^-$  en la membrana apical y recicla a la luz tubular por los canales conductivos, generando voltaje positivo en la luz tubular y así, otro catión se reabsorbe por vía paracelular.

(Cotransportador de  $\text{K}^+:\text{Cl}^-$ )  
(Hebert S C and Andreoli T E, 1984; Guggino W B et al., 1988; Greger R and Schlatter E, 1983)  
(Figura 3).

La activación simultánea del cotransportador de  $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{Cl}^-$ , de los canales de  $\text{K}^+$  apicales sensibles a ATP y de los canales de  $\text{Cl}^-$  en la membrana basolateral hace al epitelio termodinámicamente

más eficiente porque permite aumentar la reabsorción de  $\text{Na}^+$ , sin que esto represente mayor gasto de energía. La salida de  $\text{Cl}^-$  por la membrana basolateral, junto con el reciclaje del  $\text{K}^+$  hacia la luz tubular, genera voltaje positivo en el interior de la luz tubular lo que permite el transporte de otro catión por vía

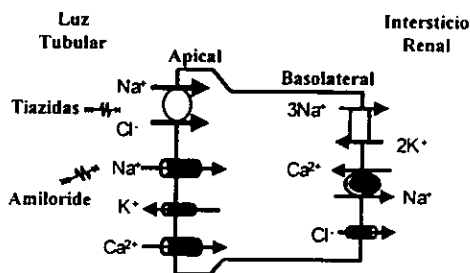
paracelular. Este otro catión puede ser  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , etc. La reabsorción de este segundo catión no consume energía porque no requiere de la  $\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa. Así, en el asa de Henle, la relación entre moles de  $\text{Na}^+$  reabsorbidos por mol de  $\text{O}_2$  consumido puede cambiar de 17:1 en ausencia de vasopresina (Hebert S C et al., 1981a; Hebert S C et al., 1981b), a una relación cercana a 36:1 en su presencia, es decir, el doble de reabsorción, con el mismo gasto de energía (Sun A et al., 1991). El papel fundamental del cotransportador de  $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ , del canal de  $\text{K}^+$  y del canal basolateral de  $\text{Cl}^-$ , en el transporte de  $\text{NaCl}$  en el asa ascendente de Henle, ha quedado plenamente demostrado no solo por estudios fisiológicos, sino también porque se ha identificado que mutaciones en cualesquiera de estos genes son responsables del síndrome de Bartter (Simon D B et al., 1996a; Vargas-Poussou R et al., 1998). Esta enfermedad hereditaria se caracteriza por reducción de la función del asa ascendente de Henle que resulta en pérdida renal de sal con hipotensión arterial, alcalosis hipokalémica, inhabilidad para concentrar la orina y pérdida renal de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (Simon D B et al., 1996a; Simon D B et al., 1996b; Simon D B et al., 1997).

### **Túbulo distal**

El transporte de  $\text{Na}^+$  en la membrana apical del túbulo distal se lleva a cabo por dos mecanismos: el cotransporte electroneutro de  $\text{NaCl}$  y el transporte electrogénico de  $\text{Na}^+$  (Velazquez H and Wright F S, 1986; Rose B D, 1991). El primero se lleva a cabo en la región inicial del túbulo distal, donde el  $\text{Cl}^-$  es transportado hacia el interior de la célula en contra de su gradiente y el segundo

mecanismo, en la porción final del túbulo distal gracias a canales de  $\text{Na}^+$ , sensibles a amiloride (Rose B D, 1991).

El  $\text{Na}^+$  que ingresa a la célula por ambos mecanismos, se intercambia en la cara basolateral por  $\text{K}^+$  vía la  $\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa. El  $\text{K}^+$  que entra por la cara basolateral es secretado hacia la luz tubular por canales conductivos, de modo que la secreción de  $\text{K}^+$  depende también de la  $\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa y del cotransportador de  $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ . El  $\text{Cl}^-$  que ingresa a la célula, acoplado al  $\text{Na}^+$ , sale por canales de  $\text{Cl}^-$ , en la membrana basolateral, hacia el intersticio renal (Figura 4).



**Figura 4. Fisiología molecular del túbulo distal.** El  $\text{Na}^+$  ingresa la célula vía el cotransportador de  $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$  en la membrana apical y sale de la célula, al intersticio renal, vía la  $\text{Na}^+:\text{K}^+$  ATPasa en la membrana basolateral. El  $\text{Ca}^{2+}$  entra a la célula por la membrana apical a favor de su gradiente de concentración y sale por la membrana basolateral vía el intercambiador de  $\text{Na}^+:\text{Ca}^{2+}$ .

La proteína responsable del transporte de  $\text{Na}^+$  en la membrana apical del túbulo contorneado distal es el cotransportador de  $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$  que

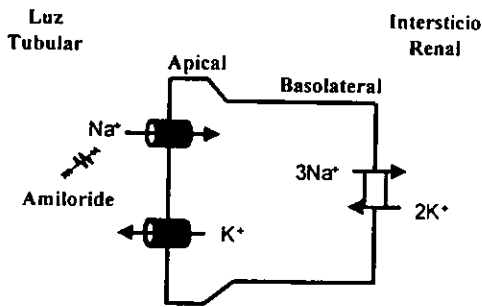
tiene una estequiometría de 1  $\text{Na}^+$  y 1  $\text{Cl}^-$  y es sensible a los diuréticos tipo tiazida (clortalidona, hidro-clorotiazida, metolazona).

En el túbulo distal se reabsorbe el 5% del filtrado glomerular y la reabsorción depende del flujo. El aumento del flujo al túbulo distal durante la terapia con diuréticos, así como la exposición a dietas altas en sodio se acompaña de aumento en la reabsorción de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , con hipertrofia tubular y aumento de la actividad de la  $\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa (Velazquez H and Wright F S, 1986; Scherzer P et al., 1987; Ellison D H et al., 1989; Stanton B A and Kaissling B, 1988).

## Túbulo colector

En el túbulo colector es en donde se modula la diuresis final (de Wardener H E, 1978). Es en esta región de la nefrona en donde puede o no retenerse cierta cantidad de  $\text{Na}^+$  y agua, y con esto se determina el volumen final de la orina (de Wardener H E, 1978). Se divide en tres porciones: túbulo colector cortical (TCC), túbulo colector medular externo (TCME) y túbulo colector medular interno (TCMI).

En el TCC la reabsorción de  $\text{Na}^+$  se realiza a través de canales de  $\text{Na}^+$ ,



**Figura 5. Fisiología molecular del túbulo colector.** El  $\text{Na}^+$  entra a la célula vía el canal de  $\text{Na}^+$  sensible a amiloride en la membrana apical y regresa a la circulación sistémica vía la  $\text{Na}^+:\text{K}^+$  ATPasa en la membrana basolateral. El  $\text{K}^+$  que ingresa a la célula por la  $\text{Na}^+:\text{K}^+$  ATPasa en la membrana basolateral sale a la luz tubular por medio de canales conductivos en la membrana apical.

sensibles a amiloride (Stokes J B, 1990). Algunos autores han sugerido la operación del cotransportador de  $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$  sensible a tiazidas (CST) en esta región (Terada Y and Knepper M A, 1990; Wilson D R et al., 1983), pero la presencia de esta proteína no ha podido corroborarse (Plotkin M D et al., 1996; Obermuller N et al., 1995).

El transporte activo de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  prácticamente desaparece en el TCME, debido a que el voltaje se vuelve positivo (Stokes J B et al., 1978; Stokes J B et al., 1981), dando como resultado que la reabsorción de  $\text{Na}^+$  en esta porción de la nefrona se realice sólo por vía paracelular.



En el TCMI el transporte de  $\text{Na}^+$  en la cara apical se lleva a cabo principalmente por los canales catiónicos sensibles a amiloride y en la membrana basolateral por la  $\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa (Stokes J B, 1990) (Figura 5).

## LA FAMILIA DE COTRANSPORTADORES ELECTRONEUTROS DE SODIO, POTASIO Y CLORO

El cotransporte electroneutro de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  sensible a diuréticos fue descrito por primera vez en 1980 por Geck y colaboradores (Geck P et al., 1980). A partir de este descubrimiento se han descrito diferentes cotransportadores electroneutros de  $\text{Na}^+:(\text{K}^+):\text{Cl}^-$  sensibles a diuréticos en células epiteliales y no epiteliales.

Los cotransportadores electroneutros se agrupan en una familia de proteínas membranales con homología estructural, cuya función es el transporte de  $\text{Cl}^-$  acoplado a cationes que pueden ser  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , o ambos. A la fecha, se conocen siete genes que codifican para miembros de esta familia. Se han identificado dos genes para el cotransportador de  $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$  sensible a bumetanida, uno que codifica para la isoforma apical específica del asa ascendente de Henle, denominada CSB1 y clonada de rata (Gamba G et al., 1994), ratón (Igarashi P et al., 1995), conejo (Payne J A and Forbush III B, 1994) y humano (Simon D B et al., 1996a) y otro para la isoforma basolateral o no epitelial (CSB2) clonada de tiburón (Xu J-C et al., 1994), ratón (Delpire E et al., 1994), bovino (Yerby T R et al., 1997), humano (Payne J A et al., 1995) y de la planta de tabaco (Harling H et al., 1997). Del cotransportador de  $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$  sensible a tiazidas (CST1) se conoce un solo gen que se ha clonado del lenguado (Gamba G et al.,

1993), rata (Gamba G et al., 1994) y humano (Simon D B et al., 1996c; Mastroianni N et al., 1996) y del cotransportador de  $K^+Cl^-$  se han identificado cuatro genes, tres para isoformas ubicuas (KCC1, KCC3 y KCC4), clonados de rata (Payne J A et al., 1996) y uno para una isoforma neuronal (KCC2) clonado de rata (Gillen C M et al., 1996). La figura 6 muestra el árbol filogenético de la familia de proteínas, en la que claramente se observan dos ramas: una de los transportadores que acoplan  $Na^+$  (CSB1, CSB2 y CST) y otra de los que acoplan únicamente  $K^+$  (KCC1 y KCC2). El grado de identidad entre CSB1, CSB2 y CST es superior al 50 % y entre KCC1 y KCC2 es superior al 70 %, mientras que entre CSB1, CSB2 y CST con KCC1 y KCC2 es apenas del 20%.

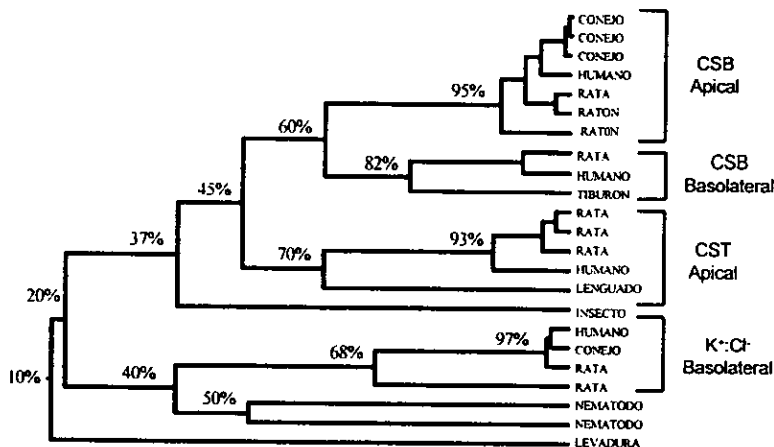
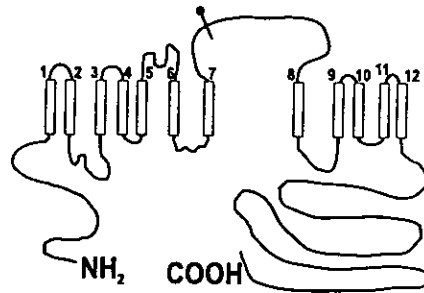


Figura 6. Arbol filogenético de la familia de cotransportadores electroneutros de  $Na^+:(K^+):2Cl^-$

A pesar de las diferencias en la sensibilidad a diuréticos, así como en el tipo de iones y estequiometría del transporte, los cotransportadores electroneutros tienen alto grado de igualdad en la

secuencia de aminoácidos y conservan la misma topología propuesta a través del análisis de hidrofobicidad (Gamba G et al., 1994). La figura 7 muestra la topología básica que consiste en



una región hidrofóbica central de ~ 250 residuos de aminoácidos con 12  $\alpha$ -hélices, que se cree corresponden a regiones

**Figura 7. Topología de los cotransportadores electroneutros de  $\text{Na}^+:(\text{K}^+):2\text{Cl}^-$ .** Los extremos carboxi y amino terminales se localizan en el citoplasma y flanquean una región hidrofóbica que forma doce dominios transmembrana, entre el dominio 7 y 8 presenta un asa extracelular con sitios potenciales para glucosilación.

transmembrana, con un asa hidrofílica extracelular (glucosilada), entre los segmentos transmembrana S7 y S8. El dominio hidrofóbico central está flanqueado por dos asas predominantemente hidrofílicas: una aminoterminal corta de 130 a 270 residuos de aminoácidos, con la mayor diversidad y otra carboxiterminal más larga, que varía de 50 a 450 residuos de aminoácidos con múltiples sitios potenciales para fosforilación vía proteína cinasa A (PKA) o proteína cinasa C (PKC) (Mount D B et al., 1998). La diversidad molecular de la familia de cotransportadores electroneutros es aún mayor dada la existencia de isoformas por empalme alternativo de algunos genes como CSB1, CSB2 y CST.

## Cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ sensible a tiazidas (CST)

### *Biología molecular del CST*

El primer cotransportador electroneutro que fue caracterizado molecularmente fue el cotransportador de  $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ . Esta proteína fue clonada inicialmente a partir de la vejiga urinaria del pez conocido como lenguado de invierno (*Pseudopleuronectes americanus*) (Gamba G et al., 1993), en el que Renfro y colaboradores (Renfro J L, 1978; Renfro J L, 1975) y Stokes y colaboradores (Stokes J B et al., 1984) habían previamente demostrado la existencia de este cotransportador. Mediante la estrategia de expresión funcional en ovocitos de *Xenopus laevis*, Gamba y colaboradores (Gamba G et al., 1993) aislaron un fragmento de cDNA de 3.7 kilobases a partir del RNAm de la vejiga urinaria del lenguado. Este DNAc fue denominado CSTfl. CSTfl fue utilizado para construir una sonda con la que fue posible identificar y clonar el DNAc del CST de rata, denominado CSTr (Gamba G et al., 1994) y el de humano, denominado CSTh (Simon D B et al., 1996c).

La identidad entre CSTfl, CSTr y CSTh es de 61 %. CSTr codifica para una proteína de 1002 residuos de aminoácidos con peso molecular de 110 kDa. El análisis de hidrofobicidad revela una proteína con el patrón antes mencionado para los cotransportadores electroneutros (Figura 7). CSTr tiene dos sitios potenciales para glucosilación en el asa hidrofílica entre los segmentos transmembrana S7 y S8. Ambos sitios se utilizan para glucosilación y son necesarios para la apropiada función del CST (Nishio T et al., 1998). En los extremos amino y carboxiterminales CSTr tiene 4 sitios potenciales para fosforilación vía proteína cinasa C (Gamba G et al., 1994). En el humano el gen de

CST se localiza en el cromosoma 16 y mutaciones en este gen se han asociado claramente con el síndrome de Gitelman. Esta es una enfermedad hereditaria caracterizada por hipotensión arterial con alcalosis metabólica hipokalémica, hipocaciuria e hipermagnesemia que se presentan usualmente en la segunda década de la vida (Simon D B et al., 1996a; Simon D B et al., 1996b; Simon D B et al., 1997).

La transfección de CSTfl y de CSTr en ovocitos de *Xenopus laevis* induce la aparición de un cotransportador de  $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$  con cinética similar a la reportada para los transportadores endógenos. El transporte de  $\text{Na}^+$  no depende de la presencia de  $\text{K}^+$  extracelular ni es sensible a ouabaina, amiloride, acetazolamida y bumetanida. La captación de  $\text{Na}^+$  inducida por CSTfl o CSTr es sensible a diuréticos tipo tiazida, con un patrón de inhibición similar al reportado para la vejiga urinaria del lenguado (Stokes J B et al., 1984), para la unión de [ $^3\text{H}$ ]metolazona a membranas de corteza renal (Beaumont K et al., 1988) y para la actividad clínica de las tiazidas (polítiazida > metolazona > tricolorometiazida > bendroflumetiazida > hidroclorotiazida > clortalidona). En el análisis funcional de CSTfl inyectado en ovocitos se demostró que el coeficiente de Hill para  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  es de 1, lo que indica claramente que la estequiometría del cotransportador es de  $1\text{Na}^+:1\text{Cl}^-$  (Gamba G et al., 1993; Gamba G et al., 1994).

#### *Localización del CST*

En 1975 Robert Kunau y colaboradores fueron los primeros en sugerir que las tiazidas ejercen su efecto diurético al inhibir la reabsorción de sal en el túbulo distal (Kunau R T et al., 1975). Posteriormente, Costanzo (Costanzo L S, 1985) y Ellison (Ellison D H et al., 1987) mostraron que la reabsorción de  $\text{Na}^+$  en el túbulo

distal es inhibida por diuréticos tipo tiazida. En experimentos de microperfusión *in vivo* en ratas Sprague-Dawley, Velázquez y colaboradores (Velazquez H et al., 1984) demostraron que el transporte de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en el túbulo distal es interdependiente y ocurre en ausencia de  $\text{K}^+$ . El estudio cinético mostró  $K_m$  de 9 mM para el  $\text{Na}^+$  y de 12 mM para el  $\text{Cl}^-$ . Por lo tanto, estos trabajos demostraron que la principal vía de reabsorción de  $\text{Na}^+$  en el túbulo distal es el cotransportador de  $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$  sensible a tiazidas. En otras especies se ha sugerido que el cotransportador de  $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$  podría ser responsable de la reabsorción de  $\text{Na}^+$  más allá del túbulo distal. Por ejemplo, el grupo de Imai en Japón (Shimizu T et al., 1988; Yoshitomi K et al., 1989), mostró que en el conejo el cotransportador de  $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$  sensible a tiazidas se localiza en el túbulo conector y no en el túbulo distal (Yoshitomi K et al., 1989). Así mismo, Terada y Knepper (Terada Y and Knepper M A, 1990) observaron que en ratas Sprague-Dawley tratadas con desoxicorticoesterona (DOCA) el 50 % del transporte transepitelial de  $\text{NaCl}$  en el túbulo colector cortical (TCC) es inhibido por 100  $\mu\text{M}$  de hidroclorotiazida, sin efecto detectable en el voltaje, lo cual sugiere que se trata del cotransportador electroneutro de  $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ . Los estudios de inmunofluorescencia concuerdan con la expresión del CST exclusivamente en el túbulo distal. Ahora que existen anticuerpos dirigidos específicamente contra el CST, Plotkin y colaboradores (Plotkin M D et al., 1996), Obermuller y colaboradores (Obermuller N et al., 1995) y Kim y colaboradores (Kim G-H et al., 1998) han mostrado en riñón de humano, de rata y de ratón, que el CST se expresa abundantemente en la membrana apical de la región inicial del túbulo distal, con disminución de la expresión hacia el final del

túbulo. En algunas ocasiones se ha visto leve tinción en la región inicial del túbulo colector.

#### *Características funcionales del CST*

Beaumont y colaboradores (Beaumont K et al., 1988) realizaron estudios de afinidad de metolazona marcada radioactivamente con tritio ( $[^3\text{H}]$ metolazona) en corteza renal de rata y demostraron que este compuesto se fija en dos diferentes sitios, uno de alta y otro de baja afinidad. El sitio de baja afinidad, con  $K_m$  de 289 nM, se localiza en varios tejidos (riñón, hígado, testículo y corazón) y la unión de  $[^3\text{H}]$ metolazona es inhibida por otras drogas no derivadas de tiazidas, como los bloqueadores de canal de  $\text{Ca}^{2+}$ , por lo que se consideró como no específico. En cambio, el sitio de alta afinidad, con  $K_m$  de 4.27 nM, es exclusivo del riñón y la unión de  $[^3\text{H}]$ metolazona puede ser alterada únicamente con otras tiazidas, y no con cualquier otro tipo de droga, por lo que se consideró que este sitio representa unión de la  $[^3\text{H}]$ metolazona al CST. La localización autorradiográfica mostró que la unión de  $[^3\text{H}]$ metolazona en la corteza renal se lleva a cabo específicamente en el túbulo distal (Beaumont K et al., 1989a). Dado que se consideró que estas características correspondían a lo esperado para el receptor de tiazidas, desde entonces, varios grupos han utilizado la unión de  $[^3\text{H}]$ metolazona a corteza renal para inferir algunas características fisiológicas del CST en riñón de mamíferos.

Tran y colaboradores (Tran J M et al., 1990) estudiaron el efecto de diversos iones en la unión de  $[^3\text{H}]$ metolazona a membranas de corteza renal y demostraron que el  $\text{Na}^+$  estimula la unión, con  $K_m$  de ~ 10 mM. En cambio, el  $\text{Cl}^-$  en concentraciones bajas estimula la unión de  $[^3\text{H}]$ metolazona, mientras que a

concentraciones mayores se comporta como inhibidor. El coeficiente de Hill entre la metolazona y el  $\text{Na}^+$  fue de 1 a 1, lo que indica que la interacción de  $\text{Na}^+$  y metolazona tiene estequiometría de 1:1. Con estos resultados los autores sugirieron que la estequiometría del cotransportador es de 1:1, lo que ha sido comprobado por estudios funcionales del CSTfl (Gamba G et al., 1993) y que las tiazidas compiten con el  $\text{Cl}^-$  por el sitio de unión. También se observó que el  $\text{NH}_4^+$  y el  $\text{Li}^+$  afectan la unión de [ $^3\text{H}$ ]metolazona, pero el significado fisiológico de esta observación no ha sido reportado. La idea de que la droga compite con el  $\text{Cl}^-$  por el sitio de unión se ve reforzada por el hecho de que esto mismo ha sido observado en el caso de los diuréticos de asa y el cotransportador de  $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$  (Forbush III B and Palfrey H C, 1983; Haas M and McManus T J, 1983).

En el túbulo distal, la inhibición de la función del CST produce disminución en la reabsorción de  $\text{Na}^+$ , por efecto directo de la droga, pero también aumento en la reabsorción de  $\text{Ca}^{2+}$ , por un efecto indirecto (Costanzo L S, 1985). No se conoce con precisión el mecanismo de esta acción indirecta, pero Friedman y colaboradores (Friedman P A and Gesek F A, 1993), han sugerido que las tiazidas bloquean la entrada de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en la membrana apical, mientras que el  $\text{Na}^+$  continúa saliendo en forma activa vía la  $\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa en la membrana basolateral. La desproporcionada concentración intracelular de  $\text{Cl}^-$  resulta en hiperpolarización de la célula tubular distal que tiene como consecuencia la apertura de canales catiónicos en la membrana apical, de los cuales los más abundantes son los de  $\text{Ca}^{2+}$ . De hecho, Barry y colaboradores (Barry E L R et al., 1998) utilizando una estrategia con oligonucleótidos antisentido dirigidos en contra de las diferentes subunidades del canal de  $\text{Ca}^{2+}$ , han generado información que



sugiere que las subunidades  $\alpha 1c$  y  $\beta 3$  son las involucradas en la respuesta indirecta a las tiazidas. El efecto indirecto de las tiazidas tiene traducción clínica importante. Las tiazidas, además del efecto natriurético, producen aumento en la reabsorción de  $Ca^{2+}$ , con la consecuente disminución en la excreción urinaria de  $Ca^{2+}$ . Por eso se utilizan tiazidas en el tratamiento de la litiasis renal. Además, la disminución crónica en la excreción urinaria de  $Ca^{2+}$  en pacientes tratados con tiazidas, podría explicar el aparente efecto benéfico de las tiazidas en la masa ósea (Feskanich D et al., 1997; Cauley J A et al., 1993).

### *Regulación del CST.*

#### *Regulación aguda*

Debido a la ausencia de líneas celulares confiables de túbulo distal es poco lo que se conoce en relación a la regulación aguda del CST.

Beaumont y colaboradores (Beaumont K et al., 1989b) demostraron que la isquemia renal aguda en ratas, producida por estenosis del pedículo renal, produce alteraciones inmediatas pero reversibles en el CST, ya que disminuye su densidad, medida con la unión de [ $^3H$ ]metolazona a membranas de corteza renal, en un 90%. Este efecto es revertido en un 40% con 10 minutos de reperusión del riñón. Además, demostraron que el bloqueo de la fosforilación oxidativa con sustitución de oxígeno por nitrógeno o con tratamiento con dinitrofenol y que la inhibición del transporte de electrones mitocondrial con rotenona disminuyen la unión de [ $^3H$ ]metolazona a un valor menor al 20% del original. Este trabajo sugiere que el CST es sensible a la concentración de oxígeno, que presenta regulación aguda y reversible, y que la afinidad del CST por las tiazidas es dependiente de la

producción intracelular de ATP. Por otro lado, Edelstein y colaboradores (Edelstein C L et al., 1998) en ratas con isquemia en el riñón izquierdo por 30 o 45 minutos seguidos de 15 minutos, 6 y 24 horas de reperfusión, midieron la expresión de CST con Western blot. En este trabajo demostraron que la isquemia renal disminuye la abundancia del CST en la corteza renal. Estos efectos podrían contribuir al gasto de sal y la resistencia a diuréticos del túbulo presentes durante falla renal aguda. Hasta el momento, no se conocen las vías de fosforilación a través de las cuales sea regulada la función del CST. Wang y colaboradores (Wang Z et al., 1998) estudiaron los niveles de RNAm de CST en riñones de ratas con 30 minutos de isquemia y 12, 24 o 48 horas de reperfusión. Por medio del análisis con Northern blot demostraron que la expresión del RNAm de CST disminuye después de 30 minutos de isquemia y 24 horas de reperfusión pero no antes y que los niveles de RNAm del contratransportador de  $\text{Na}^+:\text{H}^+$  y del cotransportador de  $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$  disminuyen significativamente después de la isquemia y se mantienen así hasta 48 horas después. Por lo tanto sugieren que estas dos proteínas juegan un papel importante en el proceso de natriuresis/diuresis que ocurre como consecuencia de la isquemia renal aguda.

#### *Regulación crónica. Efecto de la carga de sodio*

El furosemide (Scherzer P et al., 1987) y el aumento de  $\text{Na}^+$  en la dieta (Ellison D H et al., 1989) incrementan la carga de  $\text{NaCl}$  a la nefrona distal e inducen hipertrofia e hiperplasia del túbulo distal, con proliferación de la membrana basolateral (Kaissling B and Hir M L, 1982), aumento en el volumen de las mitocondrias (Kaissling B and Hir M L, 1982), en la actividad de la  $\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa basolateral (Scherzer P et al., 1987; Hir M L et al., 1982) y en el número de

receptores para tiazida en la membrana apical (Chen Z et al., 1990), lo que incrementa la capacidad de reabsorción de  $\text{Na}^+$  (Ellison D H et al., 1989; Kaissling B and Stanton B A, 1988).

Ellison y colaboradores (Ellison D H et al., 1989) estudiaron el efecto de la ingesta de  $\text{NaCl}$  en la dieta y de la administración crónica de furosemide, sobre el túbulo distal. Por medio de micropunción, microperfusión *in vivo* y técnicas morfométricas, determinaron en ratas el efecto de la alimentación con dieta alta y baja en  $\text{Na}^+$  y el tratamiento crónico con furosemide. Observaron que la restricción de  $\text{Na}^+$  en la dieta no afecta la llegada de  $\text{NaCl}$  al túbulo distal, pero sí aumenta la capacidad para transportar  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ . La administración crónica de furosemide aumenta la llegada de  $\text{NaCl}$  al túbulo distal y también la velocidad de transporte de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ . Mientras que la dieta alta en  $\text{Na}^+$  aumenta la reabsorción de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ . Esto sugiere que el aumento de flujo en el túbulo distal se acompaña de aumento en la capacidad de reabsorción vía el CST. Con lo cual el túbulo distal se adapta funcional y estructuralmente a los cambios de ingesta de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en la dieta.

Chen y colaboradores (Chen Z et al., 1990) estudiaron el efecto de diferentes concentraciones de  $\text{Na}^+$  en la dieta y el efecto de la administración de furosemide, hidroclorotiazida o acetazolamida (inhibidor de anhidrasa carbónica), en la capacidad de unión de la [ $^3\text{H}$ ]metolazona a las membranas de corteza renal de ratas Sprague-Dawley. Demostraron que el tratamiento agudo o crónico con furosemide o con hidroclorotiazida aumenta la capacidad de unión de [ $^3\text{H}$ ]metolazona. En cambio, la unión no se vio afectada por acetazolamida ni por variaciones en el contenido de  $\text{Na}^+$  en la dieta. El aumento en la capacidad de unión fue secundario a aumento en el número de transportadores ya que lo que se

modificó fue la  $V_{max}$  y no la  $K_m$ . El furosemide, la acetazolamida y el aumento en la concentración de  $Na^+$  en la dieta incrementan la carga de NaCl al túbulo distal. Sin embargo, únicamente el furosemide aumentó la capacidad de unión de las membranas de corteza renal a la [ $^3H$ ]metolazona. Dado que se cree que las tiazidas compiten con el  $Cl^-$  por el sitio de unión en el cotransportador, es posible que el estímulo para aumentar la cantidad de receptores en la membrana sea el hecho de que se ocupe el sitio de unión para el  $Cl^-$  (con  $Cl^-$  o con tiazida).

La única evidencia de que este mecanismo puede operar en el humano es el trabajo realizado por Loon y colaboradores (Loon N R et al., 1989) en el que estudiaron pacientes con hipertensión arterial moderada que fueron tratados durante un mes con placebo, furosemide o hidroclorotiazida. En este estudio demostraron que después de un mes bajo tratamiento con furosemide se aumenta la capacidad de respuesta a las tiazidas, lo que sugiere que el tratamiento crónico con diuréticos de asa aumenta la capacidad de reabsorción de  $Na^+$  en el túbulo distal a través del cotransportador de  $Na^+Cl^-$  sensible a tiazidas.

No ha sido aclarado con precisión si el aumento en la capacidad de transporte del túbulo distal durante la administración de furosemide o de dieta alta en  $Na^+$  se acompaña de incremento en la expresión génica del CST. Obermuller y colaboradores (Obermuller N et al., 1995) mostraron con hibridación *in situ* que después de siete días de administración de furosemide existe incremento en los niveles del RNAm del CST en el túbulo distal de rata. Sin embargo, Moreno y colaboradores (Moreno G et al., 1998) han mostrado con análisis de semicuantificación del CST mediante RT-PCR que los niveles de RNAm no se afectan después de siete días bajo tratamiento con furosemide o con dieta alta en

Na<sup>+</sup>. En cambio, existe incremento en la expresión del CST después de la deshidratación. Debido a que las ratas tratadas por Obermuller y colaboradores (Obermuller N et al., 1995) perdieron más del 20 % del peso corporal, es posible que estuvieran deshidratadas.

#### *Regulación crónica. Efecto de las hormonas esteroideas*

Al igual que la Na<sup>+</sup>:K<sup>+</sup>-ATPasa y los canales de K<sup>+</sup> en el túbulo distal, el cotransportador de Na<sup>+</sup>:Cl<sup>-</sup> parece ser regulado por las hormonas adrenales.

Chen y colaboradores (Chen Z et al., 1994a) estudiaron el efecto de los esteroides adrenocorticales en la unión de [<sup>3</sup>H]metolazona a membranas de corteza renal, demostraron que la adrenalectomía disminuye la densidad del CST, efecto que es revertido al administrar glucocorticoides y mineralocorticoides, sugiriendo que la densidad del CST, así como la reabsorción de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> sensible a tiazidas en el riñón, están bajo control adrenocortical. Posteriormente, Velázquez y colaboradores (Velazquez H et al., 1996) demostraron que tanto la dexametasona como la aldosterona estimulan el transporte de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> sensible a tiazidas en la corteza renal. Estudiaron ratas machos adrenalectomizadas a las cuales les administraron dexametasona y aldosterona, por medio de microperfusión *in vivo* determinaron el transporte de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> en túbulos de nefronas distales de corteza y después midieron la densidad de CST, por medio de la unión de [<sup>3</sup>H]metolazona, a membranas de corteza renal. La administración de ambas hormonas adrenales aumenta el transporte de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> sensible a tiazidas en el túbulo distal, así como la afinidad de las membranas de corteza renal por la [<sup>3</sup>H]metolazona. Estos resultados son consistentes con la presencia de receptores para mineralocorticoides y glucocorticoides en el túbulo contorneado

distal de mamíferos (Farman N, 1992). Esto junto con la reciente demostración de que la aldosterona aumenta los niveles de CST en análisis de Western blot (Kim G-H et al., 1998), sugiere que cambios en la concentración sérica de hormonas esteroideas regulan al CST.

#### *Regulación crónica. Efecto del género*

El género tiene influencia sobre la función renal en varios aspectos. Por ejemplo, sabemos que la transcripción de varias proteínas en el riñón es específicamente estimulada por los andrógenos (Asadi F K et al., 1994; Crozat A et al., 1992). Existen inclusive algunos compuestos que inducen diuresis en machos, pero no en hembras (Loon N R et al., 1989). Se ha observado que la afinidad por la [<sup>3</sup>H]metolazona en la corteza renal de ratas se reduce significativamente en ratas menopausicas y regresa a lo normal al administrarles estrógenos, lo que sugiere que existe una diferencia sexual en la regulación de esta proteína (Fanestil D D, 1992). Ya que las tiazidas reducen la excreción urinaria de Ca<sup>2+</sup>, es razonable pensar que la función del CST puede estar relacionada con la producción o mantenimiento de la masa ósea. La ingesta crónica de tiazidas parece ser un factor protector de osteoporosis. La relación causal puede ser por mecanismos renales, como la modulación de la excreción urinaria de Ca<sup>2+</sup> por el CST, o extrarrenales, como efecto directo del CST en el hueso. La posible regulación de la expresión del CST por las hormonas sexuales podría a su vez, ser un factor que explique, en parte, el incremento en la incidencia de osteoporosis en mujeres durante la postmenopausia. Un defecto hereditario en la función del CST podría explicar la agregación familiar de la osteoporosis.

En el curso de estudios con unión de [ $^3\text{H}$ ]metolazona a membranas de corteza renal se observó que las ratas hembras consistentemente mostraban mayor densidad de unión que los machos, por lo que Chen y colaboradores (Chen Z et al., 1994b) estudiaron el efecto del género sobre la densidad de unión de [ $^3\text{H}$ ]metolazona y sobre la respuesta a la administración de bendroflumetiazida, que es un diurético tipo tiazida. Utilizaron grupos de ratas Sprague-Dawley, machos con o sin orquiectomía y hembras con o sin ooforectomía. Observaron que la unión de [ $^3\text{H}$ ]metolazona es mayor en hembras que en machos, que la orquiectomía se asocia con incremento y la ooforectomía con decremento en la densidad del CST y que las hembras muestran una respuesta significativamente mayor a la administración de bendroflumetiazida, diferencia que desaparece con la ooforectomía. Estos resultados sugieren que la expresión del CST se estimula en estados estrogénicos y se inhibe en estados androgénicos. En apoyo a estos resultados, Verlander y colaboradores (Verlander J M et al., 1998) mostraron que la ooforectomía disminuye la expresión del CST medida por Western blot con anticuerpos policlonales dirigidos contra CST. Lo que no se conoce es si el género afecta la expresión del CST a nivel del RNAm o en forma postraduccional.

## **HIPÓTESIS**

El nivel de respuesta a los diuréticos tipo tiazida es diferente entre ratas hembras y machos. Esta diferencia desaparece con la gonadectomía y podría estar relacionada con efecto del género sobre el nivel del RNAm del cotransportador de  $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$  sensible a tiazidas (CST).

## **OBJETIVOS**

1.- Estudiar el efecto de la administración aguda de bendroflumetiazida en ratas Wistar machos y hembras.

2.- Estudiar el efecto de la gonadectomía sobre la respuesta a la administración aguda de bendroflumetiazida en ratas Wistar machos y hembras.

3.- Determinar el nivel de expresión génica del cotransportador de  $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$  sensible a tiazidas (CST) en riñón de ratas Wistar machos y hembras.

4.- Conocer el efecto de la gonadectomía sobre la expresión génica del CST en riñón de ratas Wistar machos y hembras.



## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Diseño Experimental*

En este trabajo estudiamos el efecto de la administración aguda de bendroflumetiazida, un diurético tiazida de rápida acción, sobre la excreción urinaria de agua y electrolitos, y su relación con el género. Se estudiaron ratas de la cepa Wistar especie *Ratus norvegicus* del sexo masculino y femenino, de 250 a 300 gr de peso, divididas en cuatro grupos de 12 ratas cada uno. Los grupos estudiados fueron:

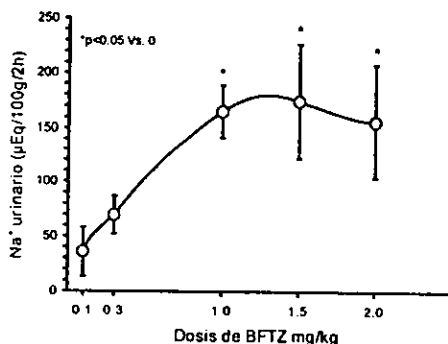
- 1) Machos control
- 2) Hembras control
- 3) Machos gonadectomizados
- 4) Hembras gonadectomizadas

Las ratas nacieron y se mantuvieron en todo momento en la Unidad de Investigación Experimental del Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán, expuestas a periodos de luz/oscuridad de 12:12 horas, temperatura de 18°-19° C y humedad relativa de 60-65 %. Se estudió en todo momento cada animal en forma individual.

Antes de la administración del diurético, las ratas permanecieron cuatro días en jaula metabólica para su adaptación, con acceso a comer 20 gr/día de alimento balanceado para ratas 5001 molido (PMI FEED Inc.) y con acceso libre a beber agua corriente. El día anterior a la administración de la bendroflumetiazida se colectó la orina de 24 horas en la que se midió el volumen urinario y la excreción urinaria de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Ca}^{2+}$ .

Al término de la colección de orina de 24 horas los animales fueron sometidos a la administración de una dosis única de bendroflumetiazida por vía intraperitoneal. La bendroflumetiazida fue diluida en dimetilsulfóxido (DMSO) al 20%. Posteriormente, se colectó la orina de las siguientes dos horas en la que también se determinó el volumen urinario y la excreción urinaria de electrolitos.

Para determinar la dosis a inyectar del diurético, inicialmente hicimos un



**Figura 8. Curva dosis respuesta a bendroflumetiazida.** Efecto sobre la excreción urinaria de Na<sup>+</sup> a diferentes dosis de bendroflumetiazida: 0.1, 0.3, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/kg.

estudio piloto en el que analizamos en machos la respuesta a la administración de dosis crecientes de bendroflumetiazida, de 0.1 mg/kg hasta 2 mg/kg de peso. Como muestra la figura 8, en este estudio observamos que

la respuesta máxima a la bendroflumetiazida se alcanza con la administración de 1 mg/kg de peso. Por lo tanto, esta fue la dosis que utilizamos en el resto del trabajo.

Debido a que en este estudio pretendíamos analizar el efecto del género y el estado hormonal sobre la respuesta a la administración de una tiazida, determinamos también, en un estudio piloto, la respuesta a la bendroflumetiazida en los periodos del ciclo estral con mayor y menor producción de estrógenos en ratas hembras. Con este fin estudiamos dos grupos de 12 ratas cada uno. Un

grupo fue estudiado en estró (el día del ciclo con menor nivel de estradiol circulante) y el otro fue estudiado en proestro (el día del ciclo con mayor producción de estradiol). El día del ciclo fue determinado por medio de frotis vaginal. Con este fin se toma una muestra de lavado vaginal mediante una pipeta con solución salina, el cual es sujeto a análisis citológico en un microscopio óptico. Según Hafez (Hafez E S E, 1970) las diferencias en el tamaño, forma y cantidad



**Figura 9. Efecto de la bendroflumetiazida sobre el  $\text{Na}^+$  urinario en ratas hembras en proestro y estró.** Las barras negras representan la excreción urinaria de  $\text{Na}^+$  antes de la administración del diurético, mientras que las barras blancas representan los valores obtenidos después de la bendroflumetiazida, en las ratas estudiadas en proestro y en estró.

de células son indicativas del día del ciclo estral. Como muestra la figura 9, la respuesta a la administración de bendroflumetiazida fue similar en ratas hembras en fase de estró comparadas con las estudiadas en proestro.

Por lo tanto, las ratas hembras en este estudio fueron utilizadas sin determinar el día del ciclo estral.

La respuesta a la bendroflumetiazida fue estudiada en los cuatro grupos. Posteriormente, el grupo 3 y 4 fueron sometidos a la cirugía correspondiente de gonadectomía: orquiectomía total en los machos y ooforectomía bilateral en las hembras. Los cuatro grupos fueron seguidos durante seis semanas, al término de las cuales fueron expuestos de nuevo a la administración aguda de bendroflumetiazida. De esta manera, determinamos la respuesta a la

bendroflumetiazida tanto basal como después de seis semanas, con o sin gonadectomía, en los cuatro grupos estudiados. Con esto podemos determinar la diferencia entre hembras y machos y también la respuesta antes y después de gonadectomía.

Al día siguiente de la segunda administración de bendroflumetiazida las ratas fueron sacrificadas previa anestesia en cámara de éter. Una vez anestesiado el animal se tomó muestra de sangre mediante punción cardíaca para determinar los niveles séricos de creatinina y hormonas sexuales (estradiol en hembras y testosterona en machos). Se extrajeron los riñones que fueron inmediatamente congelados en nitrógeno líquido y almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

#### *Determinaciones bioquímicas*

El  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{K}^{+}$  y  $\text{Cl}^{-}$  urinarios fueron determinados mediante el potencial de ion selectivo en un analizador de electrolitos NOVA 4 y el  $\text{Ca}^{2+}$  urinario mediante espectrometría de absorción atómica. Estos electrolitos fueron determinados tanto en la orina de 24 horas como en la de dos horas después de administrada la bendroflumetiazida.

La creatinina se determinó tanto en suero como en orina mediante la técnica de reacción de punto final con ácido picrico e hidróxido de sodio en un analizador de creatinina II de Beckman. Los resultados obtenidos fueron utilizados para calcular la depuración de creatinina según la fórmula  $U \cdot V / P$  en donde U es la concentración urinaria, V el volumen urinario y P la concentración plasmática. En condiciones normales como las de estos animales, la depuración de creatinina es un índice confiable de la filtración glomerular y se midió con el objetivo de demostrar que la función renal era normal en todas las ratas estudiadas.

### *Extracción del RNA total*

El RNA total se extrajo por homogeneización en tiocianato de guanidina y ultracentrifugación a través de un gradiente de cloruro de cesio (Apéndice A). El RNA obtenido se diluyó en agua, se precipitó con 0.1 volumen de acetato de sodio (3 M pH 5.2) y 3 volúmenes de etanol al 100% y se almacenó a -20°C. Para su utilización, el RNA fue liofilizado y resuspendido en agua grado biología molecular. La concentración se determinó con espectrofotometría de luz ultravioleta a una absorbancia de 260nm/280nm en un espectrofotómetro DU 640 Beckman. La calidad se corroboró al observar las bandas correspondientes a las subunidades ribosomales 28s y 18s en un gel de agarosa/formaldehído al 1% teñido con bromuro de etidio y expuesto a luz ultravioleta (Apéndice B).

### *Análisis de la expresión génica del CST*

Como fue mencionado en la introducción, el CST se expresa exclusivamente en la membrana apical de las células del túbulo distal de la nefrona. Aunque en este sitio la expresión del CST es muy abundante, dado que el túbulo distal es apenas un pequeño segmento de la nefrona (~ 10 %), al analizar el RNAm del CST en muestras de RNA total de riñón, el mensaje aparece con poca abundancia. En estos casos, el análisis de RNAm mediante Northern blot puede ser insuficiente para demostrar diferencias debido a la poca abundancia del RNAm en la muestra. Por este motivo, decidimos estudiar el nivel de expresión del RNAm del CST mediante RT-PCR semicuantitativa.

Se diseñaron iniciadores específicos para el gen de CST y para el gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PD), considerado un gen constitutivo.

Los iniciadores de CST utilizados fueron:

5' AAT GGC AAG GTC AAG TCG G 3' (5' → 3')

5' GAT CGG GAT GTC ATT GAT GG 3' (3' → 5')

Con estos iniciadores se amplifica una región de 204 pares de bases, localizada en el extremo amino terminal del CST (corresponde a las bases 589-792 del DNAC del CST de rata) (Gamba G et al., 1994). Se escogió esta región por ser la de menor grado de identidad con los demás miembros de la familia de cotransportadores electroneutros (Mount D B et al., 1998). La banda de amplificación fue secuenciada en ambos sentidos para corroborar la especificidad de los iniciadores (Bobadilla N A et al., 1997).

Los iniciadores de G3PD utilizados fueron:

5' GTA GCC ATA TTC ATT GTC ATA 3' (5' → 3')

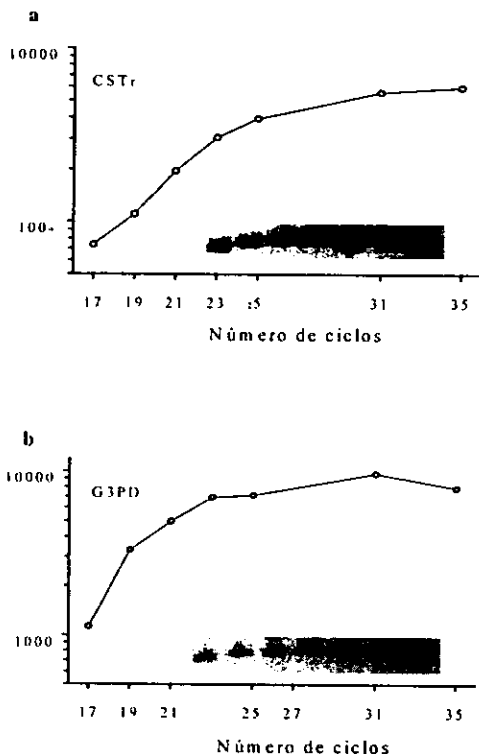
5' AAT GCA TCC TGC ACC ACC AA 3' (3' → 5')

estos amplifican una región de 515 pares de bases. Estos iniciadores han sido utilizados previamente por otros grupos de investigación (Rocco M V et al., 1992).

La transcripción reversa (TR) se llevó a cabo con 5 µg de RNA total de riñón completo. Antes de la reacción de TR el RNA se desnaturaliza a 65° C durante 10 minutos. La TR se realiza a 37° C durante 60 minutos en un volumen total de 20 µl usando 200 U de transcriptasa reversa (MMLV GIBCO), 100 pmol de hexámeros, 0.5 mM de cada dNTP y buffer RT 1x. Las muestras se calientan a 95° C por 5 minutos para inactivar la transcriptasa reversa y se diluyen a un volumen final de 40 µl con agua grado PCR.

Posteriormente, la amplificación del DNAC se lleva a cabo en presencia de [ $\alpha^{32}$ P]-dCTP. Se toma el 2 % de la muestra de TR para la reacción de PCR que se

realiza en 20  $\mu$ l de volumen final con buffer PCR 1x, 0.1 mM de cada dNTP, 0.2  $\mu$  Ci de [ $\alpha^{32}$ P]-dCTP, 10  $\mu$ M de los iniciadores (CST o G3PD) y 1x de taq DNA polimerasa (Biotecnologías Universitarias). A las muestras se les agrega 20  $\mu$ l de aceite mineral. Los ciclos de la PCR son 1 minuto a 94° C de desnaturalización, 1 minuto a 60° C de anidación y 1.5 minutos a 72° C de extensión.



**Figura 10. Curvas de amplificación de CST y G3PD.** Amplificación del RNAm de CST (a) y G3PD (b) por medio de RT-PCR semicuantitativa a diferentes ciclos.

Para llevar a cabo la semicuantificación con PCR es necesario determinar primero las fases exponencial y de meseta de la amplificación de cada mensaje en particular. Para hacer esto, amplificamos el DNAc de CST y de G3PD a diferentes ciclos (Figura 10). Estudiamos del ciclo 17 al 35. Las bandas obtenidas en los diferentes ciclos fueron corridas en una gel de acrilamida y teñidas con bromuro de etidio (Apéndice C). La curva de amplificación de cada gen fue obtenida de dos formas. En una, las bandas observadas en

el gel de acrilamida fueron cortadas y colocadas en forma individual en viales de centelleo, diluidas con líquido de centelleo Ecolume y la radioactividad fue determinada en un contador de centelleo Beckman LS 6500. En la otra forma, un gel de acrilamida fue expuesto a autorradiografía y las bandas observadas fueron digitalizadas y analizadas mediante densitometría. Tanto para el CST como para el G3PD las curvas obtenidas por ambas formas fueron similares. La figura 10a muestra la curva de amplificación para CST y la figura 10b para G3PD. A partir de estas curvas decidimos que la mitad de la fase exponencial para ambos genes es de 18 ciclos. Por lo tanto, los análisis de expresión se llevaron a cabo a los 18 ciclos.

#### *Análisis Estadísticos*

El análisis de la respuesta a la bendroflumetiazida se llevó a cabo en la siguiente forma. La excreción urinaria de 24 horas tanto de volumen como de electrolitos fue dividida entre 12 para obtener el valor basal de excreción en periodos de dos horas. Este valor fue comparado con la excreción de volumen y electrolitos obtenidos en las dos horas siguientes a la administración del diurético. El análisis de expresión del CST se llevó a cabo mediante la determinación del radio entre CST y G3PD.

Los resultados obtenidos se analizaron con la prueba t de student pareada y no pareada o con prueba de U de Mann-Withney según fuera necesario. El nivel de  $p < 0.05$  de dos colas fue tomado como significativo.



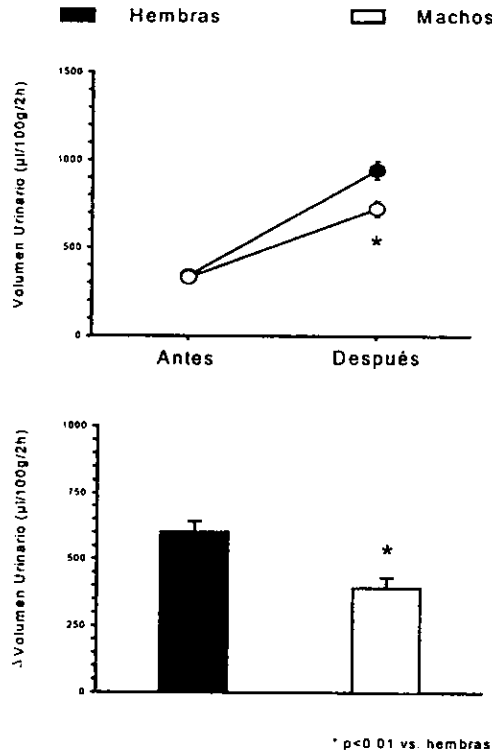
## RESULTADOS

### *La respuesta a la bendroflumetiazida es mayor en ratas hembras que en machos*

La administración aguda de bendroflumetiazida tuvo efecto significativo sobre el volumen urinario y la excreción urinaria de electrolitos tanto en ratas hembras como en ratas machos. Sin embargo, la magnitud de respuesta fue claramente diferente entre ambos sexos. Las figuras 11 a 15 muestran la respuesta renal a la bendroflumetiazida en 32 hembras y 29 machos. En todos los casos, la gráfica superior muestra los valores obtenidos en cada variable antes y después de administrado el diurético, de manera tal, que puede observarse el punto de partida y el punto final en cada sexo y la gráfica inferior muestra el delta en la respuesta, es decir, el valor obtenido después de la administración del diurético, menos el valor basal.

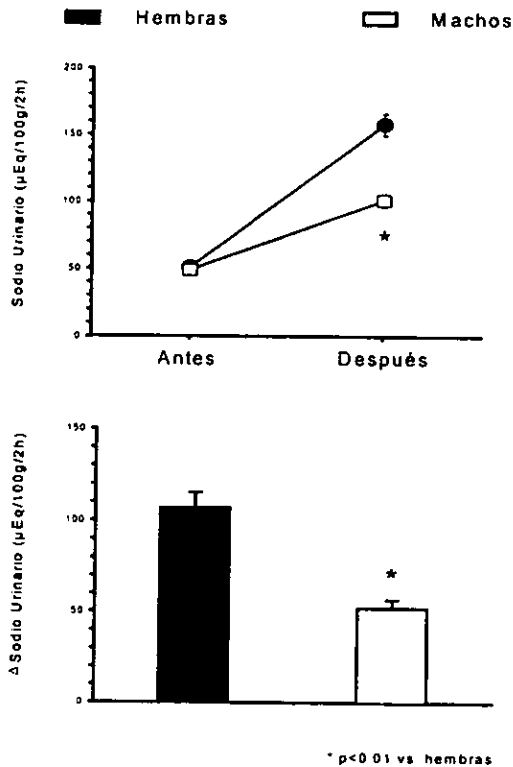
La figura 11 muestra el efecto de la bendroflumetiazida sobre el volumen urinario, expresado como  $\mu\text{l}/100\text{ g}/2\text{ h}$ . En las hembras el cambio observado fue de  $342 \pm 136$  a  $943 \pm 299$  ( $p < 0.01$ ) y en los machos el volumen urinario cambió de  $331 \pm 117$  a  $723 \pm 258$  ( $p < 0.01$ ). En ambos sexos el efecto diurético fue significativo. Sin embargo, la magnitud de respuesta fue claramente mayor en las hembras ya que el delta fue de  $601 \pm 230$  en las hembras y  $392 \pm 215$  en los machos ( $p < 0.01$ ).

El efecto de la bendroflumetiazida sobre el  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  urinarios fue diferente entre ambos sexos. La figura 12 muestra que en hembras el  $\text{Na}^+$  urinario, expresado como  $\mu\text{Eq}/100\text{ g}/2\text{h}$ , incrementó de una basal de  $50.8 \pm 18.1$  a  $157.5 \pm 45.5$  después del diurético ( $p < 0.01$ ) mientras que en las ratas machos incrementó de  $48.9 \pm 12.6$  antes del diurético a  $100.8 \pm 25.5$  después del diurético ( $p < 0.01$ ).



**Figura 11. Efecto de la bendroflumetiazida sobre el volumen urinario en hembras y machos control.** En la gráfica superior se muestran los valores antes y después de la bendroflumetiazida y en la gráfica inferior el delta en la respuesta. Los círculos y la barra de color negro representan las ratas hembras, mientras que los círculos y la barra de color blanco a los machos.

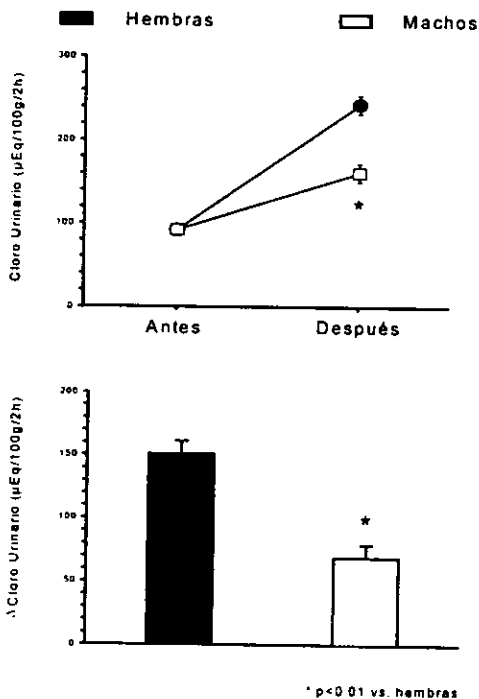
De esta forma, el valor inicial fue similar en ambos grupos ( $50.8 \pm 18.1$  hembras vs.  $48.9 \pm 12.6$  machos,  $p=NS$ ), mientras que el valor final fue significativamente mayor en la hembras ( $157.5 \pm 45.5$  en hembras vs.  $100.8 \pm 25.5$  en machos,  $p<0.01$ ), debido a que la magnitud de respuesta (delta) fue mayor en hembras que en machos ( $106.6 \pm 48.3$  hembras vs.  $51.9 \pm 26.1$  machos,  $p<0.01$ ).



**Figura 12. Efecto de la bendroflumetiazida sobre el sodio urinario en hembras y machos control.** En la gráfica superior se muestran los valores antes y después de la bendroflumetiazida y en la gráfica inferior el delta en la respuesta. Los círculos y la barra de color negro representan las ratas hembras, mientras que los círculos y la barra de color blanco a los machos.

La figura 13 muestra el efecto sobre el  $\text{Cl}^-$  urinario, expresado como  $\mu\text{Eq}/100 \text{ g}/2\text{h}$ . Al igual que con el  $\text{Na}^+$ , el incremento en las hembras fue de  $92.3 \pm 32.6$  antes a  $243.1 \pm 62.2$  después del diurético ( $p < 0.01$ ), mientras que en los machos fue de  $92.2 \pm 29.4$  antes a  $160.8 \pm 58.2$  después del diurético ( $p < 0.01$ ). Nuevamente, aunque el valor inicial fue idéntico entre ambos grupos ( $92.3 \pm 32.6$  en hembras vs.  $92.2 \pm 29.4$  en machos,  $p = \text{NS}$ ), el valor final fue significativamente

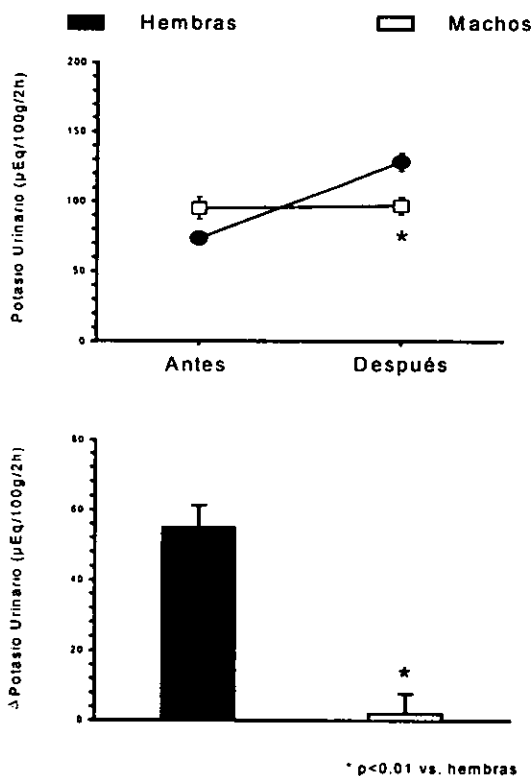
mayor en las hembras ( $243.1 \pm 62.2$  hembras vs.  $160.8 \pm 58.2$  machos,  $p < 0.01$ ), debido a que el delta fue mayor en las hembras.



**Figura 13. Efecto de la bendroflumetiazida sobre el cloro urinario en hembras y machos control.** En la gráfica superior se muestran los valores antes y después de la bendroflumetiazida y en la gráfica inferior el delta en la respuesta. Los círculos y la barra de color negro representan las ratas hembras, mientras que los círculos y la barra de color blanco a los machos.

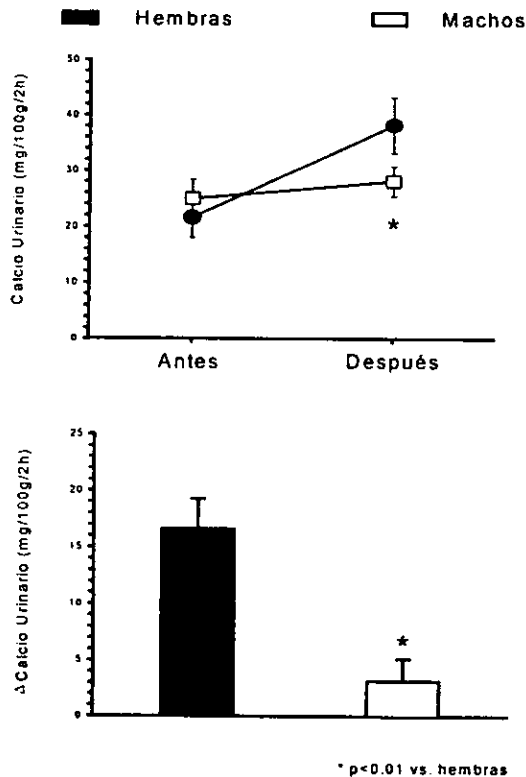
Como muestra la figura 14, el efecto de la bendroflumetiazida sobre la excreción urinaria de  $\text{K}^+$  ( $\mu\text{Eq}/100\text{g}/2\text{h}$ ) también fue mayor en las hembras. De hecho, no hubo cambio significativo en la excreción urinaria de  $\text{K}^+$  en los machos ( $95.1 \pm 42.5$  antes vs  $96.9 \pm 34.1$  después de la bendroflumetiazida), mientras que en las hembras la excreción de potasio cambió de  $73.5 \pm 28.9$  a  $128.3 \pm 37.1$

( $p < 0.01$ ). Evidentemente el delta fue significativamente mayor en hembras que en machos. Este resultado es consistente con el hecho de que las tiazidas afectan la función del cotransportador de  $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$  y que el efecto sobre la excreción urinaria del  $\text{K}^+$  es secundaria. El aumento en la carga de  $\text{Na}^+$  que llega al túbulo colector debido a la inhibición en la reabsorción de  $\text{NaCl}$  en el túbulo distal resulta en aumento de la función reabsortiva del colector, con incremento secundario en la secreción de  $\text{K}^+$ .



**Figura 14. Efecto de la bendroflumetiazida sobre el potasio urinario en hembras y machos control.** En la gráfica superior se muestran los valores antes y después de la bendroflumetiazida y en la gráfica inferior el delta en la respuesta. Los círculos y la barra de color negro representan las ratas hembras, mientras que los círculos y la barra de color blanco a los machos.

Este efecto no deseado de las tiazidas es bien conocido en clínica y ha sido utilizado como un argumento en contra la utilización de tiazidas como terapia inicial de la hipertensión arterial. En nuestros resultados, es probable que el aumento en la carga de  $\text{Na}^+$  que llega al túbulo colector en los machos no sea de la suficiente intensidad como para resultar en hiperkaluria, mientras que en las hembras, en las que la carga de  $\text{NaCl}$  al túbulo colector es mayor, este mecanismo secundario se expresa claramente.



**Figura 15.** Efecto de la bendroflumetiazida sobre el calcio urinario en hembras y machos control. En la gráfica superior se muestran los valores antes y después de la bendroflumetiazida y en la gráfica inferior el delta en la respuesta. Los círculos y la barra de color negro representan las ratas hembras, mientras que los círculos y la barra de color blanco a los machos.

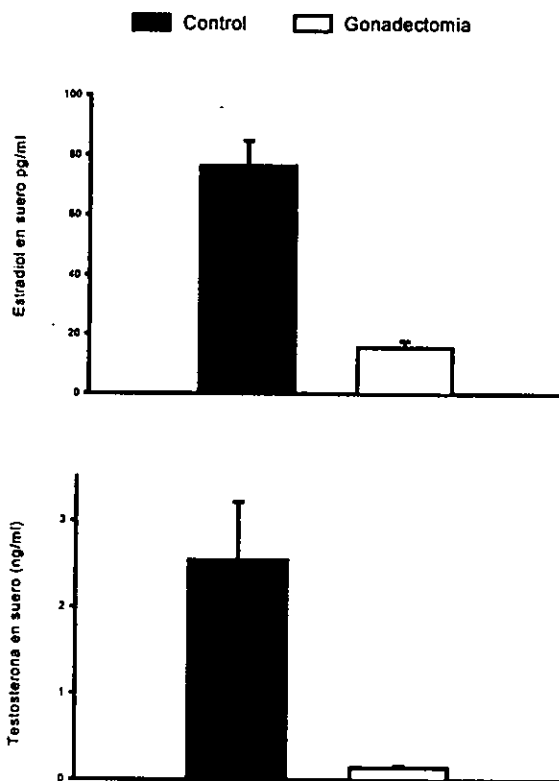
La bendroflumetiazida afectó significativamente la excreción urinaria de  $\text{Ca}^{2+}$  únicamente en las hembras. La figura 15 muestra la excreción urinaria de  $\text{Ca}^{2+}$  expresada como mg/100 g/2 h. En los machos el  $\text{Ca}^{2+}$  urinario cambió de  $24.9 \pm 16.8$  a  $28.1 \pm 13.1$ . Este cambio, sin embargo, no fue significativo. En contraste, en las hembras el  $\text{Ca}^{2+}$  urinario antes de la administración de bendroflumetiazida fue de  $21.6 \pm 19.5$  y se incrementó a  $38.2 \pm 27.3$ . Este aumento fue claramente significativo ( $p < 0.01$ ).

Los resultados anteriores en conjunto muestran que la magnitud de respuesta diurética, natriurética, clorurética, kaliurética y calciurética a la bendroflumetiazida es claramente mayor en las ratas hembras, en comparación con las ratas macho. Este resultado sugiere que en las hembras existe mayor proporción de reabsorción de NaCl por el CST en el túbulo distal, que en los machos. Esto podría ser debido a que la expresión del CST en el túbulo distal sea mayor en las ratas hembras, por lo que la expresión del CST podría estar regulada por hormonas sexuales.

*La gonadectomía reduce la respuesta a la bendroflumetiazida en hembras, pero no en machos*

Nueve machos y nueve hembras fueron sometidos a gonadectomía quirúrgica. Seis semanas después se estudió nuevamente la respuesta a la bendroflumetiazida en estos animales. Además, como control todas las ratas no gonadectomizadas también fueron estudiadas seis semanas después. La figura 16 muestra en la parte superior los niveles séricos de estradiol en hembras normales y ooforectomizadas, y en la parte inferior, los niveles séricos de testosterona en machos normales y orquiectomizados. Estos valores fueron obtenidos al momento

de hacer el estudio seis semanas después de la gonadectomía. La medición de las hormonas sexuales demuestra que la gonadectomía fue adecuada en los grupos estudiados.

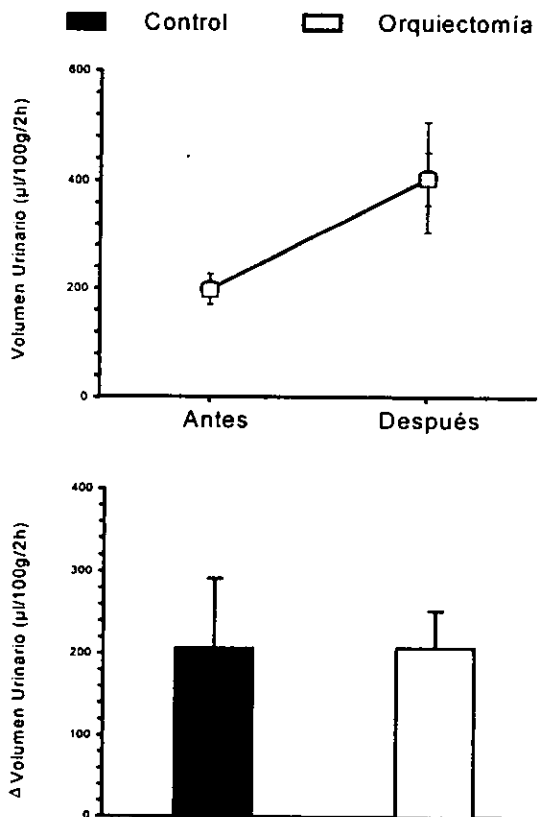


**Figura 16. Niveles de hormonas sexuales en hembras y machos controles y gonadectomizados.** La gráfica superior muestra los valores obtenidos en las ratas hembras y la gráfica inferior en los machos. Las barras negras corresponden a los grupos control y las blancas a los grupos sometidos a gonadectomía.

Las figuras 17 a 21 muestran el efecto de la orquiectomía sobre la respuesta a la bendroflumetiazida en ratas machos. En todos los casos, la gráfica

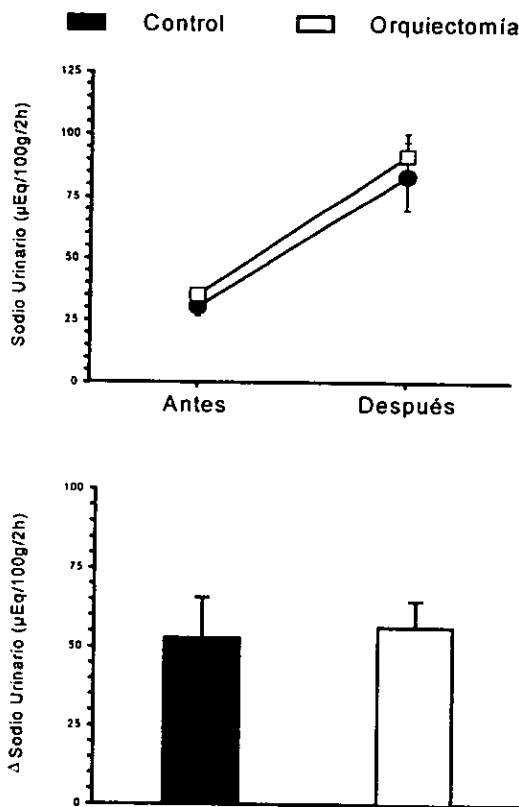


superior muestra los valores obtenidos en cada variable antes y después de administrado el diurético, de manera tal que puede observarse el punto de partida y el punto final en cada grupo y la gráfica inferior muestra el delta en la respuesta, es decir, el valor obtenido después de la administración del diurético, menos el valor basal.



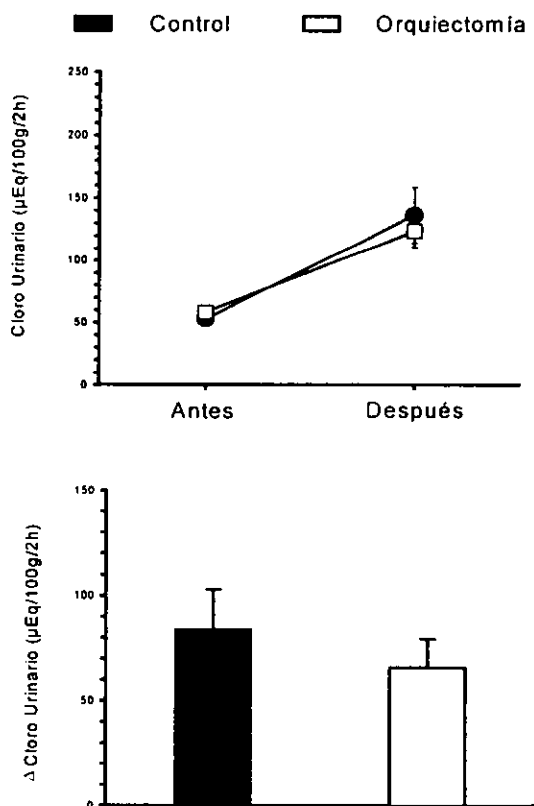
**Figura 17. Efecto de la bendroflumetiazida sobre el volumen urinario en machos controles y gonadectomizados.** La gráfica superior muestra los valores obtenidos antes y después de la bendroflumetiazida y en la gráfica inferior el delta en la respuesta. Los círculos y la barra de color negro representan el grupo control, mientras que los círculos y la barra de color blanco al grupo sometido a gonadectomía.

En estas figuras, los círculos y barras de color negro muestran los valores obtenidos en el grupo control, es decir, las ratas machos que fueron estudiados seis semanas después del análisis inicial (para controlar el efecto de la edad), mientras que los círculos y barras de color blanco muestran los resultados en las ratas orquiectomizadas.



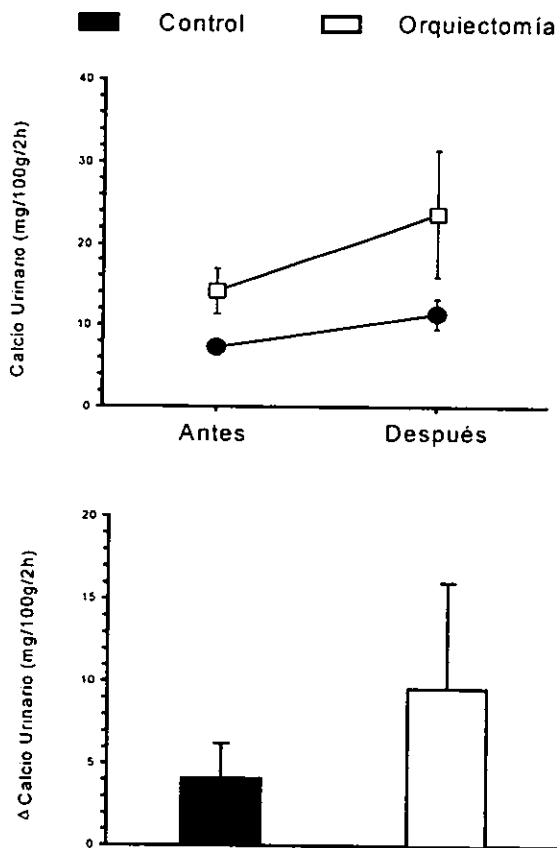
**Figura 18. Efecto de la bendroflumetiazida sobre el sodio urinario en machos controles y gonadectomizados.** La gráfica superior muestra los valores obtenidos antes y después de la bendroflumetiazida y en la gráfica inferior el delta en la respuesta. Los círculos y la barra de color negro representan el grupo control, mientras que los círculos y la barra de color blanco al grupo sometido a gonadectomía.

La figura 17 muestra que la respuesta en volumen urinario ( $\mu\text{l}/100\text{ g}/2\text{ h}$ ) fue similar en las ratas control y en las orquiectomizadas. De hecho, en la gráfica superior se sobreponen. El delta fue de  $206 \pm 238$  en el grupo control y de  $207 \pm 136$  en el grupo gonadectomizado.



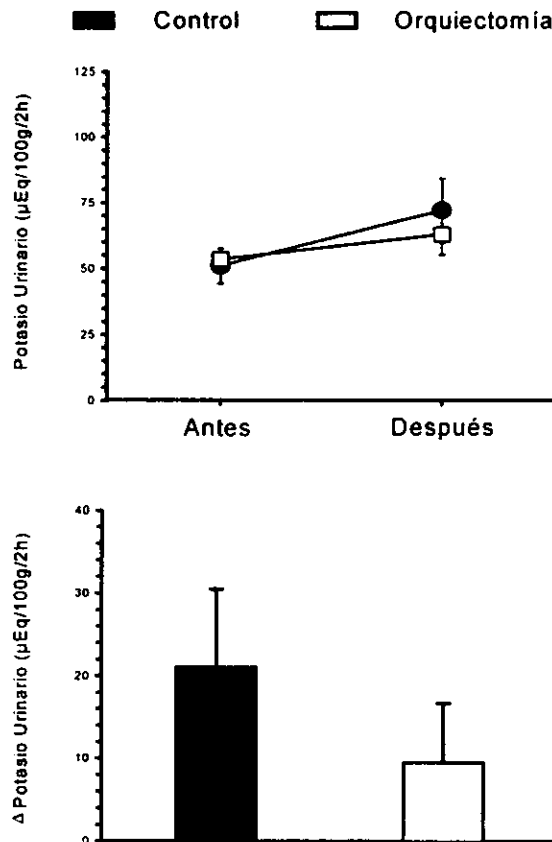
**Figura 19.** Efecto de la bendroflumetiazida sobre el cloro urinario en machos controles y gonadectomizados. La gráfica superior muestra los valores obtenidos antes y después de la bendroflumetiazida y en la gráfica inferior el delta en la respuesta. Los círculos y la barra de color negro representan el grupo control, mientras que los cuadrados y la barra de color blanco al grupo sometido a gonadectomía.

La figura 18 muestra que tampoco hubo cambio significativo en el nivel de respuesta a la bendroflumetiazida en la excreción urinaria de  $\text{Na}^+$ . El delta en el grupo control fue de  $52.8 \pm 35.7 \mu\text{Eq}/100 \text{ g}/2 \text{ h}$ , mientras que en el grupo con orquiectomía fue de  $56.2 \pm 24.7 \mu\text{Eq}/100 \text{ g}/2 \text{ h}$ .



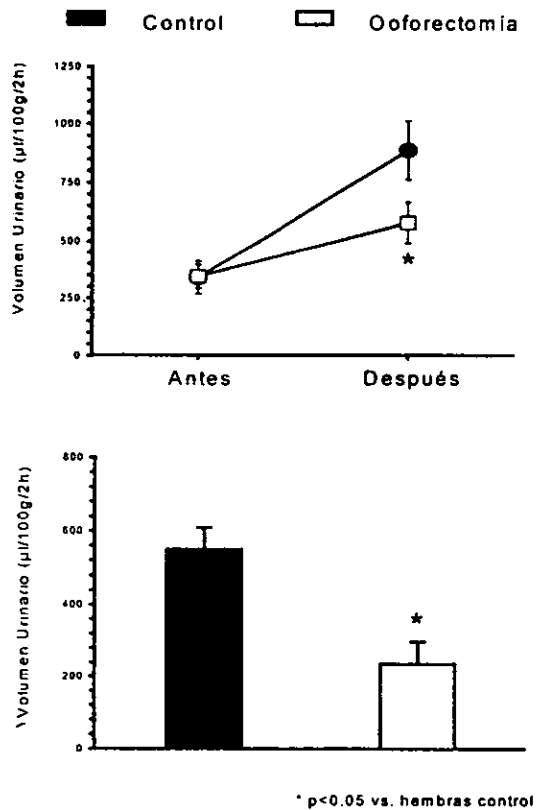
**Figura 20. Efecto de la bendroflumetiazida sobre el calcio urinario en machos control y gonadectomizados.** La gráfica superior muestra los valores obtenidos antes y después de la bendroflumetiazida y en la gráfica inferior el delta en la respuesta. Los círculos y la barra de color negro representan el grupo control, mientras que los cuadrados y la barra de color blanco al grupo sometido a gonadectomía.

Las figuras 19, 20 y 21 muestran que tampoco hubo cambio en el nivel de respuesta en la excreción urinaria de Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>2+</sup> y K<sup>+</sup>. En el caso del Ca<sup>2+</sup>, el delta fue de  $4.1 \pm 6.0$  mg/100 g/2 h antes y  $9.5 \pm 19.4$  mg/100 g/2 h después de la gonadectomía (p=NS). La diferencia no es significativa debido probablemente a la gran dispersión en la respuesta.



**Figura 21. Efecto de la bendroflumetiazida sobre el potasio urinario en machos control y gonadectomizados.** La gráfica superior muestra los valores obtenidos antes y después de la bendroflumetiazida y en la gráfica inferior el delta en la respuesta. Los círculos y la barra de color negro representan el grupo control, mientras que los círculos y la barra de color blanco representan al grupo sometido a gonadectomía.

Por lo tanto, la orquiectomía en ratas machos no tuvo ningún efecto significativo sobre el nivel de respuesta a la inyección de una dosis única de bendroflumetiazida.



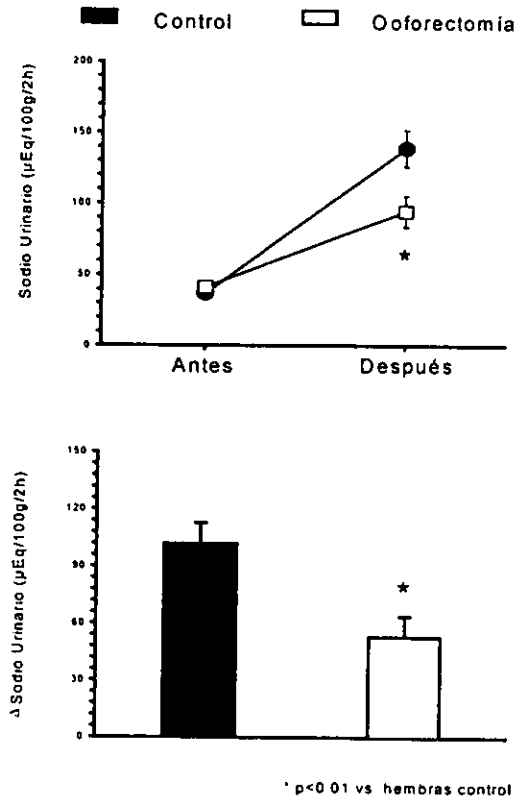
**Figura 22. Efecto de la bendroflumetiazida sobre el volumen urinario en hembras controles y gonadectomizadas.** La gráfica superior muestra los valores obtenidos antes y después de la bendroflumetiazida y en la gráfica inferior el delta en la respuesta. Los círculos y la barra de color negro representan el grupo control, mientras que los círculos y la barra de color blanco al grupo sometido a gonadectomía.

En las hembras, la ooforectomía redujo claramente la magnitud de respuesta a la bendroflumetiazida. Las figuras 22 a 26 muestran el efecto de la ooforectomía sobre la respuesta a la bendroflumetiazida en ratas hembras.

En estas figuras, los cuadrados y barras blancas muestran los valores obtenidos en el grupo control, es decir, las ratas hembras que fueron estudiadas seis semanas después del análisis inicial (para controlar el efecto de la edad), mientras que los cuadrados y barras negras muestran los resultados en las ratas gonadectomizadas.

La figura 22 muestra los resultados en volumen urinario ( $\mu\text{l}/100 \text{ g}/2\text{h}$ ). La gráfica superior muestra que ambos grupos partieron del mismo valor basal (control  $340 \pm 191$  vs. ooforectomía  $344 \pm 153$ ). Sin embargo, las ratas ooforectomizadas alcanzaron volumen urinario a las dos horas que fue significativamente menor que en las ratas normales ( $888 \pm 330$  vs.  $579 \pm 257$ ,  $p < 0.05$ ). Como resultado, el delta obtenido en volumen urinario fue claramente mayor en las ratas control ( $548 \pm 158$ ) que en las ratas ooforectomizadas ( $234 \pm 183$ ) ( $p < 0.01$ ). Nótese que el delta en las ratas ooforectomizadas no es diferente que el obtenido en los grupos de ratas machos.

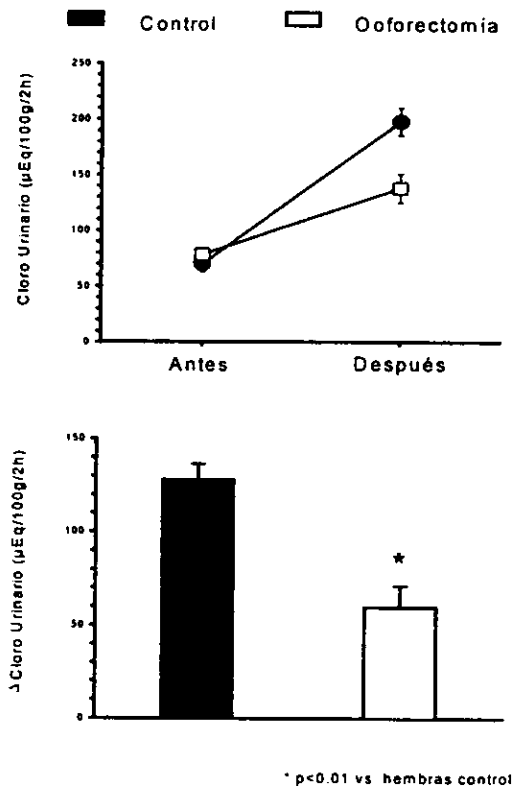
La figura 23 muestra lo sucedido con la excreción de  $\text{Na}^+$  urinario, expresado como  $\mu\text{Eq}/100 \text{ g}/2 \text{ h}$ . Al igual que con el volumen urinario, ambos grupos partieron de la misma basal, pero el grupo control alcanza excreción mucho mayor que el grupo con gonadectomía ( $138 \pm 33.8$  vs  $94 \pm 33.1$ ,  $p < 0.01$ ). Con este resultado, el delta es mucho mayor en ratas normales ( $101.8 \pm 29.1$ ) que en las que fueron sometidas a ooforectomía ( $52.8 \pm 33.0$ ,  $p < 0.01$ ).



**Figura 23. Efecto de la bendroflumetiazida sobre el sodio urinario en hembras controles y gonadectomizadas.** La gráfica superior muestra los valores obtenidos antes y después de la bendroflumetiazida y en la gráfica inferior el delta en la respuesta. Los círculos y la barra de color negro representan el grupo control, mientras que los círculos y la barra de color blanco al grupo sometido a gonadectomía.

La figura 24 muestra que la ooforectomía también redujo la excreción urinaria de  $\text{Cl}^-$ . El delta fue de  $127.9 \pm 22.7 \mu\text{Eq}/100 \text{ g}/2 \text{ h}$  en el grupo control vs.  $59.4 \pm 34.1 \mu\text{Eq}/100 \text{ g}/2 \text{ h}$  en el experimental ( $p < 0.01$ ).

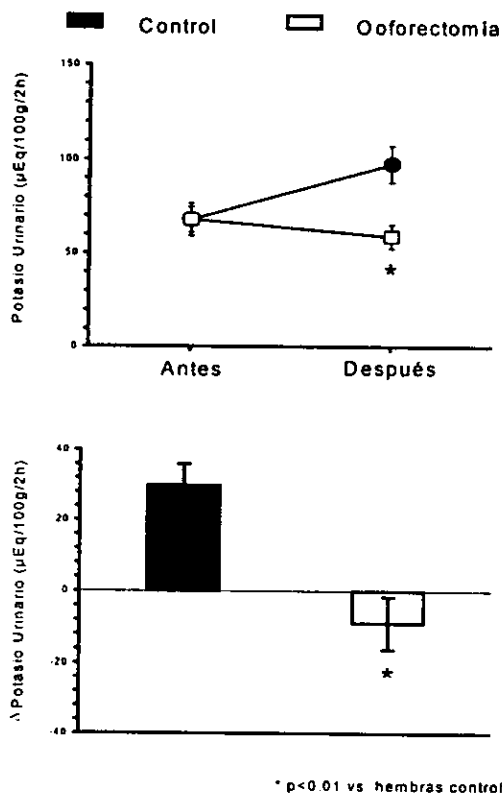




**Figura 24. Efecto de la bendroflumetiazida sobre el cloro urinario en hembras controles y gonadectomizadas.** La gráfica superior muestra los valores obtenidos antes y después de la bendroflumetiazida y en la gráfica inferior el delta en la respuesta. Los círculos y la barra de color negro representan el grupo control, mientras que los círculos y la barra de color blanco al grupo sometido a gonadectomía.

La figura 25 muestra que la excreción urinaria de  $K^+$  también se vio afectada con la ooforectomía. Ambos grupos partieron del mismo valor basal (control  $67 \pm 22$  y ooforectomía  $67 \pm 20 \mu\text{Eq}/100 \text{ g}/2 \text{ h}$ ). Pero el delta en el grupo control fue de  $33.4 \pm 7.4$  mientras que en el grupo ooforectomizado fue de  $-8.8 \pm 27.5$  ( $p < 0.01$ ). Esto se puede explicar con el hecho de que al disminuir el efecto de la bendroflumetiazida sobre la excreción urinaria de  $\text{Na}^+$  en las ratas

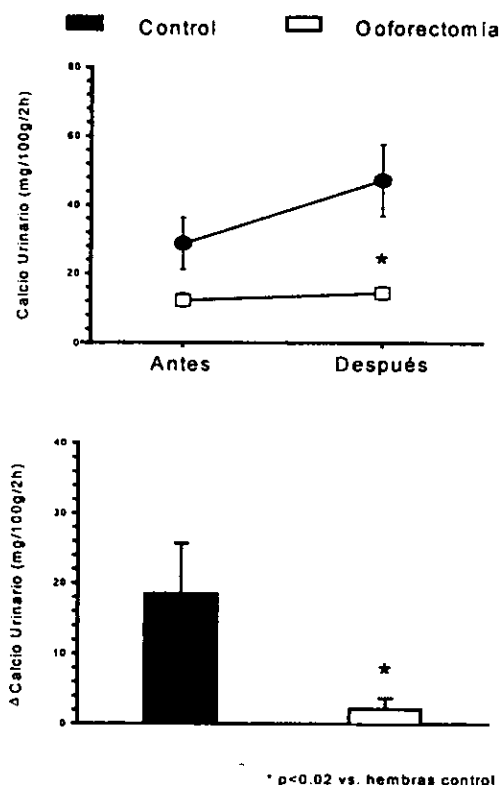
ooforectomizadas, es menor la carga de  $\text{Na}^+$  que llega al túbulo colector y por lo tanto, las hembras gonadectomizadas no presentan hiperkaluria como efecto secundario.



**Figura 25. Efecto de la bendroflumetiazida sobre el potasio urinario en hembras controles y gonadectomizadas. La gráfica superior muestra los valores obtenidos antes y después de la bendroflumetiazida y en la gráfica inferior el delta en la respuesta. Los círculos y la barra de color negro representan el grupo control, mientras que los círculos y la barra de color blanco al grupo sometido a gonadectomía.**

La figura 26 muestra lo sucedido con el  $\text{Ca}^{2+}$  urinario, expresado como  $\text{mg}/100 \text{ g}/2 \text{ h}$ . Aunque los dos grupos parten de diferente valor basal ( $28.8 \pm 20.0$

en controles vs.  $12.3 \pm 5.9$  en ooforectomizadas,  $p < 0.03$ ), el nivel de respuesta en las hembras con ooforectomía fue menor que en las hembras controles. En las hembras controles el  $\text{Ca}^{2+}$  cambió de  $28.8 \pm 20.0$  antes del diurético a  $47.2 \pm 27.5$  después del diurético ( $p = \text{NS}$ ), mientras que en las ooforectomizadas cambió de  $12.3 \pm 5.9$  a  $14.4 \pm 5.4$  ( $p = \text{NS}$ ). Estos cambios no fueron significativos, sin embargo, el delta fue significativamente mayor en las ratas control que en las ooforectomizadas ( $18.4 \pm 19.1$  control vs.  $2.1 \pm 4.8$  ooforectomía,  $p < 0.02$ ).



**Figura 26. Efecto de la bendroflumetiazida sobre el calcio urinario en hembras controles y gonadectomizadas.** La gráfica superior muestra los valores obtenidos antes y después de la bendroflumetiazida y en la gráfica inferior el delta en la respuesta. Los círculos y la barra de color negro representan el grupo control, mientras que los círculos y la barra de color blanco al grupo sometido a gonadectomía.

Nótese que el delta en la excreción urinaria de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  en las ratas ooforectomizadas tampoco es diferente que el obtenido en los grupos de ratas machos.

Las ratas hembras reducen la magnitud de respuesta a la bendroflumetiazida con la ooforectomía. Mientras que los machos, no modifican su respuesta con la orquiectomía. Las ratas hembras gonadectomizadas responden de manera similar que los machos (controles y orquiectomizados) a la administración de bendroflumetiazida. Lo cual indica que el efecto diurético de la bendroflumetiazida y por lo tanto, el CST están relacionados con la presencia de hormonas sexuales. Estos resultados apoyan la hipótesis de que el CST podría estar regulado por hormonas sexuales.

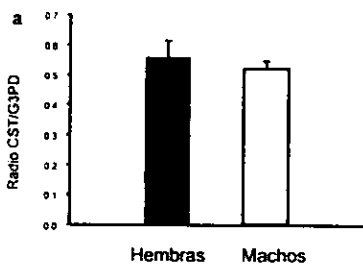
La depuración de creatinina, referida como ml/min, fue similar en los cuatro grupos estudiados (machos control  $1.64 \pm 0.87$ , hembras control  $1.72 \pm 0.42$ , machos orquiectomía  $2.08 \pm 0.60$  y hembras ooforectomía  $1.94 \pm 1.21$  p=NS ). Lo cual confirma que los cambios observados en la excreción urinaria de volumen y electrolitos son el resultado de un fenómeno tubular independiente de la filtración glomerular.

#### *La expresión génica del CST es similar en hembras y machos*

El estudio del nivel de expresión del RNAm del CST en riñón completo se hizo mediante la técnica de RT-PCR semicuantitativa. En la nefrona, el CST únicamente se expresa en la membrana apical de las células del túbulo distal (Plotkin M D et al., 1996; Obermuller N et al., 1995; Kim G-H et al., 1998). Por este motivo, aunque en este sitio es muy abundante, cuando se analiza el RNA total del riñón completo, o inclusive de corteza renal, el RNAm de CST se diluye y aparece

como poco abundante. En este caso, analizar el nivel de expresión de RNAm con la técnica de Northern blot no es lo ideal porque, dada la poca abundancia, cambios en el nivel de expresión podrían pasar desapercibidos. Por eso utilizamos una metodología ideal para estudiar genes poco abundantes, como es el caso de la RT-PCR (Bobadilla N A et al., 1997).

La técnica de RT-PCR semicuantitativa se caracteriza por su alta



**Figura 27. Análisis de la expresión génica de CST y G3PD en ratas hembras y machos controles. (a) ratio de la expresión de CST sobre G3PD en hembras (barra negra) y machos (barra blanca) controles. (b) autorradiografía de los productos de PCR.**

sensibilidad para estudiar expresión génica en circunstancias donde la cantidad del RNAm que se quiere analizar es limitada, como en el caso del riñón donde existen proteínas exclusivas de cada segmento de la nefrona. Esta técnica es útil para determinar si la cantidad de RNAm poco abundante es modificada en determinada circunstancia. Para poder semicuantificar, es necesario que junto con el gen de interés (en este caso CST) se haga el análisis de un gen constitutivo como control (Bobadilla N A et

al., 1997). En este caso se utilizó el gen de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (G3PD).

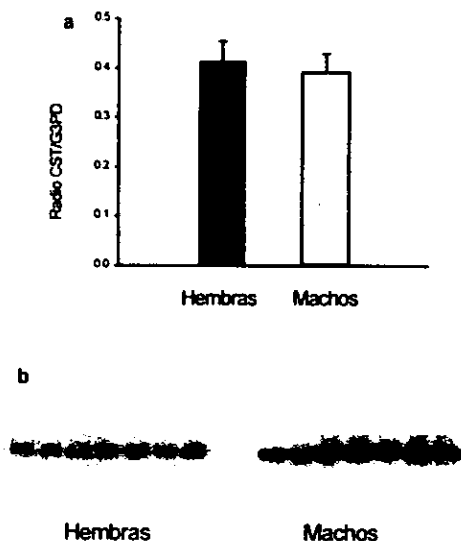
En el análisis del RNA total de riñón completo, de los grupos de ratas hembras y machos controles, no se encontraron diferencias en los productos de PCR, lo cual indica que no existen diferencias en la expresión génica de CST, entre los dos grupos. En la figura 27 se muestran los resultados obtenidos en la RT-PCR de CST y G3PD de riñón completo de ratas hembras y machos controles. En la figura 27a se muestra el análisis hecho a partir de la cuantificación de la radioactividad de los productos de PCR, referida como el ratio de CST/G3PD. En los machos, el valor obtenido fue  $0.52 \pm 0.02$  y en las hembras  $0.56 \pm 0.07$  ( $p=NS$ ). La figura 27b muestra un ejemplo representativo con una imagen computarizada de la autorradiografía de los productos de PCR para CST. En esta imagen se comprueba en forma visual que no existe diferencia en la expresión de CST entre hembras y machos.

#### *La gonadectomía no afecta el nivel de RNAm del CST*

En el análisis del RNA total de riñón completo, de los grupos de hembras y machos gonadectomizados, tampoco se encontraron diferencias en los productos de PCR, lo cual indica que la gonadectomía no afecta la expresión génica del CST, tanto en ratas hembras como en ratas machos.

En la figura 28 se muestran los resultados obtenidos en la RT-PCR de CST y G3PD. La figura 28a muestra el ratio de CST/G3PD. Los valores obtenidos fueron  $0.42 \pm 0.04$  en machos gonadectomizados y  $0.48 \pm 0.05$  en hembras gonadectomizadas ( $p=NS$ ). Nótese que estos valores no son diferentes de los

obtenidos en las ratas normales. La figura 28b muestra el análisis en una imagen computarizada de la autorradiografía de los productos de PCR para CST.



**Figura 28. Análisis de la expresión génica de CST y G3PD en ratas hembras y machos gonadectomizadas. (a) ratio de la expresión de CST sobre G3PD en hembras (barra negra) y machos (barra blanca) gonadectomizados. (b) autorradiografía de los productos de PCR.**

Es posible que al ser analizado el RNA total de riñón completo de rata no haya sido posible detectar cambios en la expresión génica del CST, ya que éste se expresa únicamente en la membrana apical del túbulo distal en la corteza renal. Para descartar esta posibilidad, estudiamos también el nivel del RNAm del CST a partir de RNA total de corteza renal, en donde el mensaje de CST se concentra (Bobadilla N A et al., 1997). Sin

embargo, los resultados fueron similares a los obtenidos al analizar el RNA total de riñón completo. Por lo tanto, el nivel de RNAm del CST no es diferente entre ambos sexos ni tampoco es afectado con la gonadectomía.

## DISCUSIÓN

El hecho de que la expresión génica del CST a nivel de RNAm no esté afectada por el sexo es interesante a la luz de nuestros resultados fisiológicos, en donde las hembras claramente responden con más intensidad a las tiazidas, y también por los resultados de otros grupos que han sugerido que las hembras expresan mayor CST que los machos.

Chen y colaboradores (Chen Z et al., 1994b) estudiaron la influencia del género y de la gonadectomía en la densidad del CST, medido a través de la unión de [<sup>3</sup>H]metolazona a membranas de corteza renal, y en la excreción urinaria de electrolitos como respuesta a la administración aguda del diurético bendroflumetiazida en ratas Sprague-Dawley. La densidad del CST fue significativamente mayor en las ratas hembras ( $0.770 \pm 0.48$  pmol/mg) en comparación con los machos ( $0.433 \pm 0.04$  pmol/mg). La orquiectomía incrementó la densidad del CST ( $0.793 \pm 0.07$  pmol/mg), mientras que la ooforectomía la disminuyó ( $0.529 \pm 0.05$  pmol/mg). Los resultados fisiológicos fueron similares a los nuestros. Así, Chen y colaboradores postulan que la excreción renal de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{NH}_4^+$  es controlada, en parte, por el género y las hormonas sexuales, por medio de la regulación de la densidad del CST. Aunado a estos resultados, Verlander y colaboradores (Verlander J M et al., 1998) con análisis de Western blot e inmunomicroscopía electrónica en los que utilizaron anticuerpos policlonales dirigidos contra CST, demostraron que la ooforectomía reduce la densidad del CST en el túbulo distal y altera las prolongaciones de la membrana plasmática, efecto que es revertido en las ratas sujetas a reposición hormonal con estradiol. Estos resultados muestran que la disminución en la expresión del CST en ratas



ooforectomizadas puede ser revertido por la administración de estrógenos. Así se demostró que las hormonas sexuales tienen efecto sobre la cantidad de CST presente en la membrana plasmática. No se estudiaron ratas machos ni se analizó la densidad de otra proteína de membrana como control.

El nivel de RNAm del CST no es mayor en ratas hembras, ni cambia con la gonadectomía, por lo tanto, es poco probable que el efecto que ejercen los estrógenos sobre el CST sea un efecto directo; es decir, que los estrógenos afecten la velocidad de transcripción del gen. En favor de esta hipótesis está el hecho de que hasta el momento no se ha demostrado que existan receptores para estrógenos en el epitelio del túbulo distal (Farman N, 1992).

El efecto de los estrógenos sobre el CST podría ser un efecto indirecto. Se sabe que los estrógenos incrementan los niveles circulantes de algunas hormonas, las cuales podrían ejercer efecto directo sobre el CST, como renina, angiotensina II, glucocorticoides y calcitonina.

La ooforectomía reduce los niveles séricos de calcitonina y la respuesta de calcitonina a hipercalcemia (Cressent M et al., 1979), mientras que la administración de estrógenos incrementa la expresión del RNAm de calcitonina en la tiroides. Aunque la calcitonina de salmón aumenta la unión de [<sup>3</sup>H]metolazona en homogenados renales, la calcitonina de rata no es capaz de reproducir este efecto. Es poco probable que la estimulación en la producción y liberación de calcitonina por estrógenos sea responsable del efecto sobre el CST.

La actividad en plasma de renina, angiotensinógeno y angiotensina II aumenta con la administración oral de estrógenos en ratas (Inao H, 1985) y

humanos (Oelkers W K, 1996), pero los niveles séricos de aldosterona no se modifican.

Los glucocorticoides plasmáticos se elevan con dosis fisiológicas de estrógenos por vía parenteral, en humanos (Mahajan D K et al., 1978) y en ratas (Burgess L H and Handa R J, 1992), incrementan la unión de [<sup>3</sup>H]metolazona en el riñón (Chen Z et al., 1994a; Velazquez H et al., 1996) y el transporte de NaCl sensible a tiazidas en el túbulo distal estudiado con microperfusión *in vivo* (Velazquez H et al., 1996), además se conoce la existencia de receptores para glucocorticoides en el túbulo distal (Farman N et al., 1991). Kim y colaboradores (Kim G-H et al., 1998) estudiaron el efecto de la elevación de niveles séricos de mineralocorticoides, en ratas tratadas con dieta alta en NaCl o administración de aldosterona, y demostraron por medio de Western blot e inmunofluorescencia, que el CST es una proteína que puede ser inducida por aldosterona. Los receptores de mineralocorticoides se activan con elevación en los niveles séricos de glucocorticoides y en algunas partes del túbulo distal no está presente la isoforma de la enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (11 $\beta$ -HSD) que protege al receptor de mineralocorticoides de esta activación (Whorwood C B et al., 1992), por lo tanto, es posible que el efecto del estradiol sobre el CST sea un efecto de los niveles elevados de glucocorticoides que no son detectados por la 11 $\beta$ -HSD.

Es probable que la mayor respuesta a la bendroflumetiazida en ratas hembras y la reducción de dicha respuesta después de la gonadectomía, aunado a la ausencia de efecto sobre el nivel del RNAm del CST, podría no estar relacionado con los estrógenos, sino con otras hormonas sexuales que también se

afectan con la gonadectomía. Es poco probable que esto sea mediado por hormonas hipofisarias como la hormona foliculoestimulante (FSH) o luteinizante (LH) porque ambas hormonas aumentan al máximo después de gonadectomía, tanto en hembras como en machos. En cambio, una interesante posibilidad es la prolactina.

La prolactina es una hormona proteica secretada normalmente por la adenohipófisis. En condiciones normales, los niveles de prolactina en suero son mayores en hembras que en machos. En hembras, la prolactina se afecta en forma similar que los estrógenos con la ooforectomía; es decir, disminuye significativamente. Además, la administración de estradiol resulta en recuperación de los niveles normales de prolactina (Martinez-Campos A et al., 1984). El inhibidor de la secreción de prolactina más importante es la dopamina y se cree que los estrógenos modifican los receptores de membrana para dopamina (Heiman M L and Ben-Jonathan N, 1982) e incrementan la entrada de calcio a la célula para promover la síntesis y liberación de prolactina. Por lo tanto, desde el punto de vista endocrinológico, la modificación predecible de la prolactina con la ooforectomía la hace un buen candidato para regular al CST.

Por razones fisiológicas, la prolactina también es un buen candidato para regular al CST. La prolactina es un osmorregulador importante en vertebrados inferiores en los que inhibe el movimiento de agua a través de la pared de la vejiga y por lo tanto disminuye la reabsorción de NaCl (Hirano T et al., 1971). Inhibe la excreción de  $\text{Na}^+$  cuando los peces se adaptan de ambientes de agua salada a ambientes de agua dulce, previene la hidratación y la hiponatremia, controlando el transporte de NaCl y la permeabilidad al agua (Lam T J, 1972; Nicoli C S, 1980).

En la nefrona distal la prolactina aumenta la reabsorción de  $\text{Na}^+$ , ya que estimula la actividad de la  $\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa, por lo cual la prolactina facilita la reabsorción de  $\text{Na}^+$  y agua a lo largo de la nefrona.

La prolactina es una hormona proteica, por lo tanto, actúa por medio de receptores de membrana. De esta manera, es probable que su efecto sobre el CST sea a nivel de la proteína y no a nivel transcripcional.

## **PERSPECTIVAS**

Con base en todo esto, nuestras perspectivas son estudiar la respuesta a la bendroflumetiazida en ratas hiperprolactinémicas, machos normales y ratas hembras ooforectomizadas, con incremento en los niveles de prolactina por medio del implante de dos glándulas hipófisis dentro de la cápsula renal (Guevara-Aguirre J et al., 1986) y en ratas hembras normales tratadas con bromocriptina, un inhibidor de la secreción de prolactina. De esta manera, se determinará el papel de la prolactina en la respuesta de mayor magnitud, observada en las ratas hembras, a la administración de diuréticos tipo tiazida.

En la nefrona distal la prolactina aumenta la reabsorción de  $\text{Na}^+$ , ya que estimula la actividad de la  $\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa, por lo cual la prolactina facilita la reabsorción de  $\text{Na}^+$  y agua a lo largo de la nefrona.

La prolactina es una hormona proteica, por lo tanto, actúa por medio de receptores de membrana. De esta manera, es probable que su efecto sobre el CST sea a nivel de la proteína y no a nivel transcripcional.

## **PERSPECTIVAS**

Con base en todo esto, nuestras perspectivas son estudiar la respuesta a la bendroflumetiazida en ratas hiperprolactinémicas, machos normales y ratas hembras ooforectomizadas, con incremento en los niveles de prolactina por medio del implante de dos glándulas hipófisis dentro de la cápsula renal (Guevara-Aguirre J et al., 1986) y en ratas hembras normales tratadas con bromocriptina, un inhibidor de la secreción de prolactina. De esta manera, se determinará el papel de la prolactina en la respuesta de mayor magnitud, observada en las ratas hembras, a la administración de diuréticos tipo tiazida.

## **CONCLUSIONES**

Las ratas hembras tienen un nivel de respuesta mayor a la bendroflumetiazida en comparación con las ratas machos.

No se encontraron diferencias en el nivel de RNAm de CST tanto de riñón completo como de corteza renal, entre ratas hembras y machos, con o sin gonadectomía.

No existe un efecto directo de las hormonas sexuales, en particular del estradiol, sobre la expresión génica del CST.

## APÉNDICE A

### EXTRACCIÓN DE RNA CON GUANIDINA Y CsCl

#### Día 1

1. Preparar 8 ml de tiocianato de guanidina (TG) y 4 ml de cloruro de cesio (CsCl) por cada 0.5-1.0 g de tejido.
2. Transferir de 0.5 a 1.0 gr de tejido congelado a un tubo de plástico de 50 ml nuevo que contenga 8 ml de isotiocianato de guanidina.
3. Homogeneizar 15 seg x 4 a máxima velocidad.
4. Agregar 400  $\mu$ l de sarcosil al 10%, mezclar con cuidado.
5. Centrifugar 15 min a 11,500 rpm a 4 °C.
6. Transferir el sobrenadante a un tubo de ultracentrifuga en el que previamente se colocaron 4 ml de CsCl.
7. Ultracentrifugar a 29,000 rpm durante 18 horas a 18 °C.

#### Día 2

8. Vaciar el sobrenadante con cuidado y cortar el tubo para obtener en  $\frac{1}{4}$  parte el pellet.
9. Lavar el pellet con 300  $\mu$ l de agua BM para eliminar basura.
10. Resuspender el precipitado con 600  $\mu$ l de agua BM (hacerlo con 300  $\mu$ l x 2). Mezclar bien con la pipeta, transferirlo a un tubo ependorf etiquetado y luego agitar en vortex.
11. Dejar resuspendiendo mínimo 1 hora.
12. Tomar 20  $\mu$ l de RNA + 480  $\mu$ l de agua para espectrofotometría.
13. Separar los 600  $\mu$ l en dos tubos de 1.5 ml (300  $\mu$ l por tubo) y precipitarlos con 0.1 volumen (30  $\mu$ l) de acetato de Na<sup>+</sup> pH 5.2 y con 3 volúmenes (990  $\mu$ l) de EtOH al 100%.
14. Guardar a -20 °C.

#### Día 3

15. Centrifugar 30 min a 12,000 a 4 °C.
16. Quitar el sobrenadante y lavar con EtOH al 70% (900  $\mu$ l).
17. Centrifugar 5 min a 12,000 a 4 °C.
18. Sacar el etanol (-100  $\mu$ l).
19. Centrifugar 30 seg a 12,000 a 4 °C.
20. Sacar todo el etanol.
21. Speed Vac por 2 min.
22. Resuspender en 100-300  $\mu$ l de agua BM.
23. Guardar a -80 °C.
24. Tomar 2  $\mu$ l de RNA + 498  $\mu$ l de agua para espectrofotometría.
25. Correr un gel de agarosa al 1% formaldehído para corroborar la calidad del RNA.

## SOLUCIONES PARA EXTRACCIÓN DE RNA

### Istiocianato de Guanidina

8 ml

- 4 M Guanidina: 3.78 g
- 25 mM Citrato de Na: 200  $\mu$ l de 1 M citrato de Na pH 7.0
- Llevar el volumen a 8 mls con agua BM
- Calentar para disolver ( $\sim 40^{\circ}\text{C}$ ). Enfriar en hielo.
- 0.7%  $\beta$ -mercaptoetanol: 56  $\mu$ l (se agrega hasta que la guanidina esté fría y lista para ser usada)
- Esterilizar por filtración

### Cloruro de Cesio

4 ml

- 5.7 M CsCl: 3.83 g
- 25 mM Acetato de Na: 33.3  $\mu$ l de 3 M acetato de Na pH 5.2
- Llevar el volumen a 4 mls con agua BM
- Esterilizar por filtración



## APÉNDICE B

### GEL DE AGAROSA AL 1% FORMALDEHÍDO PARA RNA

#### Gel

Por cada 10 ml de gel:

0.1 gr agarosa

8.5 ml agua destilada

1 ml MOPS 10x \*

0.5 ml formaldehído

Mezclar la agarosa con el agua destilada en un matraz, disolver calentándolo (horno de microondas 1.5 minutos).

Poner termómetro y añadir el MOPS.

Cuando la temperatura baje a 50° C, añadir el formaldehído.

Mezclar y vaciar en la caja.

Dejarlo secar cuando menos 10 minutos.

#### Buffer de Carga

Por cada muestra de RNA:

5 µl formamida

1 µl MOPS 10x

2 µl formaldehído

1 µl gel loading (Sigma)

0.16 bromuro de etidio (10 mg/ml)

Mezclar 8.1 µl de buffer de carga, con 1 µl de RNA y 2.9 µl de agua destilada.

Calentar a 65° C por 10 minutos.

Vaciar las muestras en el gel (12 µl) sumergido en MOPS 1x.

Correr el gel a 75 V durante 1.5 hora.

Para desteñir el gel se enjuaga en agua durante 10 minutos.

\* MOPS 10x (1 litro)

41.86 g MOPS

6.8 g acetato de sodio

20 ml EDTA 0.5 M

pH 7.0 con NaOH 10 N

Esterilizar por filtración

## APÉNDICE C

### GEL DE POLIACRILAMIDA PARA DNA

Para preparar 10 ml de gel al 5 % agregar:

7.4 ml de agua bidestilada

2 ml de TBE 5x \*

1.5 ml de acrilamida/bisacrilamida 1:29

100  $\mu$ l de persulfato de amonio 10 % (APS)

10  $\mu$ l de TEMED

Mezclar y vaciar inmediatamente en la caja.

Poner el peine y esperar cuando menos 15 minutos.

Vaciar las muestras en el gel sumergido en TBE 1x.

Correr el gel a 120 V durante 30 minutos.

Para teñirlo el gel ponerlo en un recipiente con 100 ml de agua y 2  $\mu$ l de bromuro de etidio (10 mg/ml).

Para destañir el gel enjuagarlo en agua durante 10 minutos.

\* TBE 5x (1 litro)

54 gr tris

27.5 gr ácido bórico

20 ml EDTA 0.5 M pH 8

## BIBLIOGRAFÍA

1. Altamirano A A, Breitwieser G E, and Russell J M (1988). Vanadate and fluoride effects on  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{Cl}^-$  cotransport in squid giant axon. *Am.J.Physiol (Cell Physiol)* 254, C582-C586.
2. Asadi F K, Dimaculagan D D, and Berger F G (1994). Androgen regulation of gene expression in primary epithelial cells of the mouse kidney. *Endocrinology* 134, 1179-1187.
3. Barry E L R, Gesek F A, Yu A S L, Lytton J, and Friedman P A (1998). Distinct calcium channels isoforms mediate parathyroid hormone and chlorothiazide-stimulated calcium entry in transporting epithelial cells. *J.Membrane Biol* 161, 55-64.
4. Baum M (1987). Evidence that parallel  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  and  $\text{Cl}^-\text{-HCO}_3^-\text{(OH)}^-$  antiporters transport NaCl in the proximal tubule. *Am.J.Physiol.(Renal Fluid Electrolyte Physiol.)* 252, F338-F345.
5. Beaumont K, Vaughn D A, and Fanestil D D (1988). Thiazide diuretic receptors in rat kidney: Identification with [ $^3\text{H}$ ]metolazone. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85, 2311-2314.
6. Beaumont K, Vaughn D A, and Healy D P (1989a). Thiazide diuretic receptors: Autoradiographic localization in rat kidney with [ $^3\text{H}$ ]metolazone. *J.Pharmacol.Exp.Therap.* 250, 414-419.
7. Beaumont K, Vaughn D A, Maciejewski A R, and Fanestil D D (1989b). Reversible downregulation of thiazide diuretic receptor by acute renal ischemia. *Am.J.Physiol.(Renal Fluid Electrolyte Physiol.)* 256, F329-F334.
8. Berry C A and Rector F C (1991a). Mechanism of proximal NaCl reabsorption in the proximal tubule of the mammalian kidney. *Sem.Nephrol.* 11, 86-97.
9. Berry C A and Rector F C (1991b). Renal transport of glucose, aminoacids, sodium, chloride and water. In *The kidney*. Brenner B M and Rector F J, eds. (Philadelphia: W.B.Saunders Company), pp. 245-282.
10. Bobadilla N A, Herrera J P, Merino A, and Gamba G (1997). Semi-quantitative PCR: a tool to study low abundance messages in the kidney. *Arch.Med.Res.* 28, 55-60.

11. Brenner B M, Troy J L, Daugharty T M, and MacInnes R M (1973). Quantitative importance of changes in postglomerular colloid osmotic pressure in mediating glomerulotubular balance in the rat. *J.Clin.invest.* 52, 190-197.
12. Burgess L H and Handa R J (1992). Chronic estrogen-induced alterations in adrenocorticotropin and corticosterone secretion, and glucocorticoid receptor-mediated functions in female rats. *Endocrinology* 131, 1261-1269.
13. Cauley J A, Cummings S R, Seeley D G, Black D, Browner W, Kuller L H, and Nevitt M C (1993). Effect of thiazide diuretic therapy on bone mass, fractures, and falls. *Ann.Intern.Med.* 118, 666-673.
14. Chen Z, Vaughn D A, Beaumont K, and Fanestil D D (1990). Effects of diuretic treatment and of dietary sodium on renal binding of <sup>3</sup>H-metolazone. *J.Am.Soc.Nephrol.* 1, 91-98.
15. Chen Z, Vaughn D A, Blakley P, and Fanestil D D (1994a). Adrenocortical steroids increase renal thiazide diuretic receptor density and response. *J.Am.Soc.Nephrol.* 5, 1361-1368.
16. Chen Z, Vaughn D A, and Fanestil D D (1994b). Influence of gender on renal thiazide diuretic receptor density and response. *J.Am.Soc.Nephrol.* 5, 1112-1119.
17. Costanzo L S (1985). Localization of diuretic action in microperfused rat distal tubules: Ca and Na transport. *Am.J.Physiol.(Renal Fluid Electrolyte Physiol.)* 248, F527-F535.
18. Cressent M, Bouizar Z, Pidoux E, Moukhtar M S, and Milhaud G (1979). Effet de l'ovariectomie sur le taux de calcitonine plasmatique chez le rat. *Comp.Rend.Acad.Sci.Paris Serie D* 289, 501-504.
19. Crozat A, Palvimo J J, Julkunen M, and Janne O A (1992). Comparison of androgen regulation of ornithine decarboxylase and S-adenosylmethionine decarboxylase gene expression in rodent kidney and accessory sex organs. *Endocrinology* 130, 1131-1144.
20. de Wardener H E (1978). The control of sodium excretion. *Am.J.Physiol.(Renal Fluid Electrolyte Physiol.)* 235, F163-F173.
21. de Wardener H E (1987). Control of sodium excretion. In *Renal Physiology. People and ideas.* Gottschalk C W, Berliner B W, and Giebisch G H, eds. (New York: American Society of Physiology. Williams and Wilkins Company.), pp. 217-246.

22. de Wardener H E, Mills I H, Clapham W F, and Hayter C J (1961). Studies on the efferent mechanism of the sodium diuresis which follows the intravenous administration of saline in the dog. *Clin.Sci.* 21, 249-258.
23. Delpire E, Rauchman M I, Beier D R, Hebert S C, and Gullans S R (1994). Molecular cloning and chromosome localization of a putative basolateral Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporter from mouse inner medullary collecting duct (mIMCD-3) cells. *J.Biol.Chem.* 269, 25677-25683.
24. Edelstein C L, Shi Y, Berkman J, and Ellison D H (1998). Renal ischemia decreases thiazide-sensitive NaCl cotransporter expression. *J.Am.Soc.Nephrol.* 9, 34A(Abstract).
25. Ellison D H, Velazquez H, and Wright F S (1987). Thiazide-sensitive sodium chloride cotransport in early distal tubule. *Am.J.Physiol.(Renal Fluid Electrolyte Physiol.)* 253, F546-F554.
26. Ellison D H, Velazquez H, and Wright F S (1989). Adaptation of the distal convoluted tubule of the rat. Structural and functional effects of dietary salt intake and chronic diuretic infusion. *J.Clin.invest.* 83, 113-126.
27. Fambrough M, Wolitzky B A, Tamkun M M, and Takeyasu K (1987). Regulation of the sodium pump in excitable cells. *Kidney Int.* 32 (suppl 23), S97-S112.
28. Fanestil D D (1992). Steroid regulation of thiazide-sensitive transport. *Sem.Nephrol.* 12, 18-23.
29. Farman N (1992). Steroid receptors: distribution along the nephron. *Sem.Nephrol.* 12-17.
30. Farman N, Oblin M E, Lombes M, Delahaye F, Westphal H, Bonvalent J P, and Gasc J M (1991). Immunolocalization of gluco- and mineralocorticoid receptors in rabbit kidney. *Am J Physiol* 260, C226-C233.
31. Feskanich D, Willett W C, Stampfer M J, and Colditz G A (1997). A prospective study of thiazide use and fractures in women. *Osteoporosis Int.* 7, 79-84.
32. Forbush III B and Palfrey H C (1983). [<sup>3</sup>H]Bumetanide binding to membranes isolated from dog kidney outer medulla. Relationship to the Na,K,Cl co-transport system. *J.Biol.Chem.* 258, 11787-11792.

33. Friedman P A and Gesek F A (1993). Mechanism of action of thiazide diuretics on sodium and calcium transport by distal convoluted tubules. In *Diuretics IV: Chemistry, Pharmacology and Clinical Applications*. Puschett J B and Greenberg A, eds. (New York: Elsevier Scientific Publications), pp. 319-327.
34. Gamba G, Miyanoshita A, Lombardi M, Lytton J, Lee W S, Hediger M A, and Hebert S C (1994). Molecular cloning, primary structure and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney. *J.Biol.Chem.* 296, 17713-17722.
35. Gamba G, Saltzberg S N, Lombardi M, Miyanoshita A, Lytton J, Hediger M A, Brenner B M, and Hebert S C (1993). Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the thiazide-sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90, 2749-2753.
36. Geck P and Heinz E (1989). Secondary active transport: Introductory remarks. *Kidney Int.* 36, 334-341.
37. Geck P, Pietrzyk C, Burckhardt B C, Pfeiffer B, and Heinz E (1980). Electrically silent cotransport of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> in ehrlich cells. *Biochim Biophys Acta* 600, 432-447.
38. Gillen C M, Brill S, Payne J A, and Forbush III B (1996). Molecular cloning and functional expression of the K-Cl cotransporter from rabbit, rat and human. A new member of the cation-chloride cotransporter family. *J.Biol.Chem.* 271, 16237-16244.
39. Greger R and Schlatter E (1983). Properties of the basolateral membrane on the cortical thick ascending limb of Henle's loop of rabbit kidney. A model for secondary active chloride transport. *Pflugers Arch.* 396, 325-334.
40. Guevara-Aguirre J, Schoener G, Ulloa-Aguirre A, Perez-Palacios G, and Larrea F (1986). Induced hyperprolactinemia does not alter FSH binding or ABP secretion in the rat testis. *Int J Androl* 9, 381-392.
41. Guggino W B, Oberleithner H, and Giebisch G (1988). The amphibian diluting segment. *Am.J.Physiol.(Renal Fluid Electrolyte Physiol.)* 254, F615-F627.
42. Haas M and McManus T J (1983). Bumetanide inhibits (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>+Cl<sup>-</sup>) co-transport at a chloride site. *Am.J.Physiol (Cell Physiol)* 245, C235-C240
43. Hafez E S E (1970). Sexual Cycles. In *Reproduction and breeding techniques of laboratory animals*. Lea & Febiger.

44. Harling H, Czaja J, Schell J, and Walden R (1997). A plant cation-chloride co-transporter promoting auxin-independent tobacco protoplast division. *EMBO J.* 16, 5855-5866.
45. Hebert S C and Andreoli T E (1984). Control of NaCl transport in the thick ascending limb. *Am.J.Physiol.(Renal Fluid Electrolyte Physiol.)* 246, F745-F756.
46. Hebert S C, Culpepper R M, and Andreoli T E (1981a). NaCl transport in mouse medullary thick ascending limbs. I. Functional nephron heterogeneity and ADH-stimulated NaCl cotransport. *Am.J.Physiol.(Renal Fluid Electrolyte Physiol.)* 241, F412-F431.
47. Hebert S C, Culpepper R M, and Andreoli T E (1981b). NaCl transport in mouse medullary thick ascending limbs. II. ADH enhancement of transcellular NaCl cotransport; origin of transepithelial voltage. *Am.J.Physiol.(Renal Fluid Electrolyte Physiol.)* 241, F432-F442.
48. Heiman M L and Ben-Jonathan N (1982). Dopaminergic receptors in the rat anterior pituitary change during the estrous cycle. *Endocrinology* 111, 37-41.
49. Hir M L, Kaissling B, and Dubach U C (1982). Distal tubular segments of the rabbit kidney after adaptation to altered Na- and K-intake. II. Changes in Na-K-ATPase activity. *Cell Tissue Res.* 224, 493-504.
50. Hirano T, Johnson D W, and Bern H A (1971). Control of water movement in flounder urinary bladder by prolactin. *Nature* 230, 45-47.
51. Ichikawa I and Brenner B M (1979). Mechanism of inhibition of proximal tubule fluid reabsorption after exposure of the rat kidney to the physical effects of expansion of extracellular fluid volume. *J.Clin.invest.* 64, 1466
52. Igarashi P, Vanden Heuvel G B, Payne J A, and Forbush III B (1995). Cloning, embryonic expression, and alternative splicing of a murine kidney-specific Na-K-Cl cotransporter. *Am.J.Physiol.(Renal Fluid Electrolyte Physiol.)* 269, F406-F418.
53. Inao H (1985). Effects of sex steroid hormones on vascular reactivity to angiotensin II in castrated rat. *Acta Obstet.Gynaecol.Jpn.* 37, 2806-2812.
54. Jorgensen P L (1980). Sodium and potassium ion pump in kidney tubules. *Physiol.Rev.* 60, 864-908.
55. Jorgensen P L (1986). Structure, function and regulation of Na-K-ATPase in the kidney. *Kidney Int.* 29, 10-20.

56. Kaissling B and Hir M L (1982). Distal tubular segments of the rabbit kidney after adaptation to altered Na- and K-intake. I Structural changes. *Cell Tissue Res.* 224, 469-492.
57. Kaissling B and Stanton B A (1988). Adaptation of distal tubule and collecting duct to increased sodium delivery. I. Ultrastructure. *Am.J.Physiol.(Renal Fluid Electrolyte Physiol.)* 255, F1256-F1268.
58. Khraibi A A and Knox F G (1989). Effect of renal decapsulation on renal interstitial hydrostatic pressure and natriuresis. *Am.J.Physiol.(Regulatory Integrative Comp.Physiol.)* 257, R44-R48.
59. Kim G-H, Masilamani S, Turner R, Mitchell C, Wade J B, and Knepper M A (1998). The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter is an aldosterone-induced protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 95, 14552-14557.
60. Kunau R T, Weller D R, and Webb H L (1975). Clarification of the site of action of chlorothiazide in the rat nephron. *J.Clin.invest.* 56, 410-407.
61. Lam T J (1972). Prolactin and hydromineral regulation in fishes. *General and Comparative Endocrinology* 3, 328-338.
62. Loon N R, Wilcox C, and Unwin R J (1989). Mechanism of impaired natriuretic response to furosemide during prolonged therapy. *Kidney Int.* 36, 682-689.
63. Mahajan D K, Billiar R B, Jassani M, and Little A B (1978). Ethinyl estradiol administration and plasma steroid concentrations in ovariectomized women. *Am J Obstet Gynecol* 130, 398-402.
64. Martinez-Campos A, Moctezuma, and Larrea F (1984). Interaction of estrogens with dopamine and calcium in the regulation of prolactin release *in vivo*. In *Prolactin secretion*. Anonymous Academic Press, Inc.), pp. 263-273.
65. Mastroianni N, DeFusco M, Zollo M, Arrigo G, Zuffardi O, Bettinelli A, Ballabio A, and Casari G (1996). Molecular cloning, expression pattern, and chromosomal localization of the human Na-Cl thiazide-sensitive cotransporter (SLC12A3). *Genomics* 35, 486-493.
66. Molony D A, Reeves W B, and Andreoli T E (1989).  $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$  cotransport and the thick ascending limb. *Kidney Int.* 36, 418-426.
67. Moreno G, Merino A, Mercado A, Herrera J P, González-Salazar J, Correa-Rotter R, Hebert S C, and Gamba G (1998). Electroneutral Na-coupled



cotransporter expression in the kidney during variations of NaCl and water metabolism. *hypertension* 31, 1002-1006.

68. Mount D B, Delpire E, Gamba G, Hall A E, Poch E, Hoover Jr.R S, and Hebert S C (1998). The electroneutral cation-chloride cotransporters. *J.Exp.Biol.* 201, 2091-2102.

69. Nicoli C S (1980). Ontogeny and evolution of prolactin's functions. *Fed.Proc.* 39, 2563.

70. Nielsen S, Pallone T, Smith B L, Christensen E I, Agre P, and Maunsbach A B (1995). Aquaporin-1 water channels in short and long loop descending thin and in descending vasa recta of rat kidney. *Am.J.Physiol.(Renal Fluid Electrolyte Physiol.)* 268, F1023-F1037.

71. Nishio T, Poch E, Monroy A, Plata C, Hall A E, Welsh R, Xu J Z, Gamba G, and Hebert S C (1998). Effects of two glycosylation sequons on function of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter (rTSC). *J.Am.Soc.Nephrol.* 9, 42A

72. Obermuller N, Bernstein P, Velázquez H, Reilly R, Moser D, Ellison D H, and Bachman S (1995). Expression of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter in rat and human kidney. *Am.J.Physiol.(Renal Fluid Electrolyte Physiol.)* 269, F900-F910.

73. Oelkers W K (1996). Effects of estrogens and progesterons on the renin-aldosterone system and blood pressure. *Steroids* 61, 166-171.

74. Ott C E, Haas J A, and Cucho J L (1975). Effect of increased peritubule protein concentration on proximal tubule reabsorption in the presence and absence of extracellular volume depletion. *J.Clin.invest.* 55, 612

75. Payne J A and Forbush III B (1994). Alternatively spliced isoforms of the putative renal Na-K-Cl cotransporter are differentially distributed within the rabbit kidney. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 91, 4544-4548.

76. Payne J A, Stevenson T J, and Donaldson L F (1996). Molecular characterization of a putative K-Cl cotransporter in rat brain. A neuronal-specific isoform. *J.Biol.Chem.* 271, 16245-16252.

77. Payne J A, Xu J-C, Haas M, Lytle C Y, Ward D, and Forbush III B (1995). Primary structure, functional expression, and chromosomal localization of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter in human colon. *J.Biol.Chem.* 270, 17977-17985.

78. Plotkin M D, Kaplan M R, Verlander J M, Lee W-S, Brown D, Poch E, Gullans S R, and Hebert S C (1996). Localization of the thiazide sensitive Na-Cl cotransporter, rTSC1, in the rat kidney. *Kidney Int.* 50, 174-183.
79. Preisig P A and Rector F C Jr (1988). Role of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> antiport in rat proximal tubule NaCl absorption. *Am.J.Physiol.(Renal Fluid Electrolyte Physiol.)* 255, F461-F465
80. Rector F C (1983). Sodium, bicarbonate, and chloride absorption by proximal tubule. *Am.J.Physiol.(Renal Fluid Electrolyte Physiol.)* 244, F461-F471.
81. Renfro J L (1975). Water and ion transport by the urinary bladder of the teleost *Pseudopleuronectes americanus*. *Am.J.Physiol* 228, 52-61.
82. Renfro J L (1978). Interdependence of active Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> transport by the isolated urinary bladder of the teleost, *pseudopleuronectes americanus*. *J.Exp.Zool.* 199, 383-390.
83. Rocco M V, Neilson E G, Hoyer J, and Ziyadeh F (1992). Attenuated expression of epithelial cell adhesion molecules in murine polycystic kidney disease. *Am.J.Physiol.(Renal Fluid Electrolyte Physiol.)* 262, F679-F686.
84. Rose B D (1991). Diuretics. *Kidney Int.* 39, 336-352.
85. Schafer J A (1984). Mechanism coupling the absorption of solutes and water in the proximal tubule. *Kidney Int.* 25, 708-716.
86. Scherzer P, Wald H, and Popovtzer M M (1987). Enhanced glomerular filtration and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase with furosemide administration. *Am.J.Physiol.(Renal Fluid Electrolyte Physiol.)* 252, F910-F915.
87. Shimizu T, Yoshitomi K, Nakamura M, and Imai M (1988). Site and mechanism of action of trichlormethiazide in rabbit distal nephron segments perfused in vitro. *J.Clin.invest.* 82, 721-730.
88. Simon D B, Bindra R S, Mansfield TA, Nelson-Williams C, Mendonca E, Stone R, Schurman S, Nayir A, Alpay H, Bakkaloglu A, Rodriguez-Soriano J, Morales J M, Sanjad S A, Taylor C M, Pilz D, Brem A, Trachtman H, Griswold W, Richard G A, John E, and Lifton R P (1997). Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III. *Nature Genetics* 17, 171-178.

89. Simon D B, Karet F E, Hamdan J M, Di Pietro A, Sanjad S A, and Lifton R P (1996a). Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nature Genetics* 13, 183-188.
90. Simon D B, Karet F E, Rodriguez-Soriano J, Hamdan J H, DiPietro A, Trachtman H, Sanjad S A, and Lifton R P (1996b). Genetic heterogeneity of Bartter's syndrome revealed by mutations in the K<sup>+</sup> channel, ROMK. *Nature Genetics* 14, 152-156.
91. Simon D B, Nelson-Williams C, Johnson-Bia M, Ellison D, Karet F E, Morey-Molina A, Vaara I, Iwata F, Cushner H M, Koolen M, Gainza F J, Gitelman H J, and Lifton R P (1996c). Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Nature Genetics* 12, 24-30.
92. Stanton B A and Kaissling B (1988). Adaptation of distal tubule and collecting duct to increased Na delivery. II Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transport. *Am.J.Physiol.(Renal Fluid Electrolyte Physiol.)* 255, F1269-F1275.
93. Stokes J B (1990). Sodium and potassium transport by collecting duct. *Kidney Int.* 38, 679-686.
94. Stokes J B, Ingram M J, Williams A D, and Ingram D (1981). Heterogeneity of the rabbit collecting tubule: Localization of mineralocorticoid hormone action to the cortical portion. *Kidney Int.* 20, 340-347.
95. Stokes J B, Lee I, and D'Amico M (1984). Sodium Chloride absorption by the urinary bladder of the winter flounder. A thiazide-sensitive, electrically neutral transport system. *J.Clin.invest.* 74, 7-16.
96. Stokes J B, Tisher C C, and Kokko J P (1978). Structural-functional heterogeneity along the rabbit collecting tubule. *Kidney Int.* 14, 585-593.
97. Sun A, Grossman E B, Lombardi M, and Hebert S C (1991). Vasopressin alters the mechanism of apical Cl<sup>-</sup> entry from Na<sup>+</sup>:Cl<sup>-</sup> to Na<sup>+</sup>:K<sup>+</sup>:2Cl<sup>-</sup> cotransport in mouse medullary thick ascending limb. *J.Membrane Biol* 120, 83-94.
98. Terada Y and Knepper M A (1990). Thiazide-sensitive NaCl absorption in rat cortical collecting duct. *Am.J.Physiol.(Renal Fluid Electrolyte Physiol.)* 259, F519-F528.
99. Tran J M, Farrell M A, and Fanestil D D (1990). Effect of ions on binding of the thiazide-type diuretic metolazone to kidney membrane. *Am.J.Physiol.(Renal Fluid Electrolyte Physiol.)* 258, F908-F915.

100. Vargas-Poussou R, Feldman D, Vollmer M, Konrad M, Kelly L, Van der Heuvel L P W J, Tebouri L, Brandis M, Karolyi L, Hebert S C, Lemmink H H, Deschênes G, Hildebrandt F, Seyberth H W, Guay-Woodford L M, Knoers N V A M, and Antignac C (1998). Novel molecular variants of the Na-K-2Cl cotransporter gene are responsible for atenatal Bartter syndrome. *Am.J.Hum.Genet.* 62, 1332-1340.
101. Velazquez H, Bartiss A, Bernstein P, and Ellison D H (1996). Adrenal steroids stimulate thiazide-sensitive NaCl transport by rat renal distal tubules. *Am.J.Physiol.(Renal Fluid Electrolyte Physiol.)* 270, F211-F219.
102. Velazquez H, Good D W, and Wright F S (1984). Mutual dependence of sodium and chloride absorption by renal distal tubule. *Am.J.Physiol.(Renal Fluid Electrolyte Physiol.)* 247, F904-F911.
103. Velazquez H and Wright F S (1986). Effects of diuretic drugs on Na, Cl and K transport by rat renal distal tubule. *Am.J.Physiol.(Renal Fluid Electrolyte Physiol.)* 250, F1013-F1023.
104. Verlander J M, Tran T M, Zhang L, Kaplan M R, and Hebert S C (1998). Estradiol enhances thiazide-sensitive NaCl cotransporter density in the apical plasma membrane of the distal convoluted tubule in ovariectomized rats. *J.Clin.invest.* 101, 1661-1669.
105. Wang Z, Raab H, Haq M, Shull G E, and Soleimani M (1998). A possible molecular basis of natriuresis during ischemic-reperfusion injury in the kidney. *J.Am.Soc.Nephrol.* 9, 605-613.
106. Whorwood C B, Franklyn J A, Sheppard M C, and Stewart P M (1992). Tissue localization of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and its relationship to the glucocorticoid receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 41, 21-28.
107. Wilson D R, Honrath U, and Sonnenberg H (1983). Thiazide diuretic effect on medullary collecting duct function in the rat. *Kidney Int.* 23, 711-716.
108. Xu J-C, Lytle C, Zhu T T, Payne J A, Benz Jr.E, and Forbush III B (1994). Molecular cloning and functional expression of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 91, 2201-2205.
109. Yerby T R, Vibat C R T, Sun D, Payne J A, and O'Donnell M E (1997). Molecular characterization of the Na-K-Cl cotransporter of bovine aortic endothelial cells. *Am.J.Physiol (Cell Physiol)* 273, C188-C197.

110. Yoshitomi K, Shimizu T, Taniguchi J, and Imai M (1989). Electrophysiological characterization of rabbit distal convoluted tubule cell. *Pflugers Arch.* 414, 457-463.