



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“Modificaciones en la dinámica de las proteínas de la Unión
Estrecha por Ouabaína”**

T E S I S

Que presenta

M. en C. RUTH RINCÓN HEREDIA

Para Obtener el Grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

En la Especialidad de

FARMACOLOGÍA

Directores de Tesis:

Dr. Rubén Gerardo Contreras Patiño

Dr. José Luis Reyes Sánchez

Con todo mi amor para César y Ollin quienes
siempre me esperaron con paciencia y amor.
Los pilares de mi fuerza y la luz de mi alma.

Agradecimientos

A mi esposo César Poot por su amor infinito, por todas aquellas ocasiones en las que me explicó aquello que no alcanzaba a comprender, por todos sus consejos, sus críticas, por toda su ayuda para realizar este proyecto y sobretodo por estar siempre a mi lado.

A mis queridos padres quienes siempre me han apoyado para lograr cada una de las metas que me he propuesto en la vida. Muy especialmente a mis sobrinos: Sergio y Junuen, mis pequeños cómplices de travesuras que muy a su estilo siempre me animaron a seguir adelante.

A los Doctores Gerardo Contreras Patiño, José Luis Reyes Sánchez y Martha Franco Guevara quienes me abrieron las puertas de su laboratorio y siempre me incentivaron en mi trabajo de investigación.

A mis amigos Eduardo Molina, Carmelita Namorado, David Flores, Eber Gómez, Carmen Retana, Esther Vargas, Alejandro García, Federico González, César Tóriz, Claudia Vilchis y Yasmín de Lorenz, con quienes siempre tuve la oportunidad de pasar momentos de mucha felicidad pero con quien también discutí mi trabajo, lo que permitió enriquecerlo de diversas maneras.

A los Doctores María Eugenia Mendoza Garrido, María del Carmen García García y Benjamín Floran Garduño, por sus valiosas aportaciones y consejos que ayudaron a mejorar sustancialmente mi trabajo.

A la QFB. Cermen Namorado Tónix, la M en C. Dolores Martín Tapia, el Dr. Rafael Rodríguez Muñoz, el MC José Santamaría por su valiosa colaboración en el desarrollo de este y otros proyectos.

A las secretarias Esther Vargas, Yasmín de Lorenz, Elizabeth del Oso y Beatriz Alcantara por su valioso apoyo para el desarrollo de mi estancia en CINVESTAV-IPN.

A los técnicos Eduardo Estrada Trejo, Arturo Mena Vieyra y Osvaldo Ríos Jiménez, cuya colaboración fue indispensable para culminar este trabajo.

Este trabajo fue realizado con el apoyo de una beca CONACYT (número de registro 224978).

Índice General

Agradecimientos.....	3
Índice de Figuras	6
Índice de Tablas	7
Abreviaturas.....	8
I. RESUMEN	9
II. ABSTRACT	10
1. EL RIÑÓN	11
1.1 Características anatómicas gruesas del riñón.....	11
1.2 Estructura de la Nefrona	12
1.2.1 Detalle de los segmentos de la nefrona	13
1.3 Formación de la orina.....	15
1.4 Regulación del sodio y del volumen circulante.....	16
1.5 Agua y Osmorregulación	18
1.5.1 Absorción tubular de agua.....	18
1.5.2 Hipertonicidad medular	18
1.6 Regulación del volumen por Osmorregulación	19
1.7. Transporte tubular renal de potasio.....	19
1.9 HIPERTENSIÓN.....	20
1.9.1 Factores etiológicos de la HTA esencial	21
1.9.2 Factores determinantes de la HTA: gasto cardíaco y resistencias periféricas.....	21
1.9.3 Ingesta de sal.....	21
2. LOS EPITELIOS Y LA UNIÓN ESTRECHA	23
2.1 Claudinas	25
2.2 Las claudinas y su expresión diferencial a lo largo de la nefrona	28
3. La Na⁺,K⁺-ATPasa.....	32
3.1 La Na ⁺ ,K ⁺ -ATPasa en la Hipertensión.....	33
4. LA OUABAÍNA	35
4.1 La ouabaína: fármaco para tratamiento médico y tóxico de origen vegetal.....	35
4.2 La ouabaína ¿una hormona?.....	36
4.3 Elevación de la Ouabaína Endógena y la Hipertensión	37
4.4 La ouabaína afecta la adhesión epitelial.	39
4.5 La ouabaína, en alta dosis, promueve la internalización de las proteínas de la UE vía EGFR-cSRC-ERK1/2.....	40
5. HIPÓTESIS	44
6. OBJETIVOS	45
6.1 Objetivo general.....	45
6.2 Objetivos particulares	45
7. RESULTADOS.....	46
7.2 La degradación de los componentes de la UE inducido por OUA se lleva a cabo en el lisosoma.....	48
7.3. La OUA altera los niveles de mRNA de las UEs.	52
7.4. Modelo de Hipertensión Arterial sensible a sal.....	54

7.5 Distribución y expresión de las proteínas de la UE en el riñón de rata	57
7.6 Regulación del sodio paracelular en el túbulo proximal.....	58
7.7 Expresión de las CLDNs que forman poros paracelulares para Cl ⁻ en la región distal de la nefrona.....	60
7.8 Cambios en la estructura glomerular.....	62
8. DISCUSIÓN	65
8.1 La endocitosis y degradación de las proteínas de la UE inducida por OUA ocurre por una vía canónica.....	65
8.2 El aumento de la OUA endógena en un caso patológico modifica la expresión de CLDNs a lo largo de la nefrona.....	67
9. CONCLUSIÓN.....	71
10. MATERIALES Y MÉTODOS	72
10.1 Cultivo celular.....	72
10.2 Resistencia eléctrica transepitelial (RET)	72
10.3 Inmunofluorescencia (IF) a partir de cultivo celular.....	72
10.4 Westernblot (WB) a partir de cultivo celular	73
10.5 Animales.....	73
10.6 Aislamiento de tejido renal, obtención de fracciones solubles e insolubles de corteza renal y Westernblot.....	74
10.7 Inmunofluorescencia en cortes congelados de riñón.....	75
10.8 Sustancias, anticuerpos e inhibidores.....	75
10.9 Estadística.....	75
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

Índice de Figuras

- Figura 1** Morfología general del riñón.
Figura 2 La nefrona.
Figura 3 Tipos de células a lo largo de la nefrona.
Figura 4 Estructura del glomérulo.
Figura 5 Célula epitelial.
Figura 6 Estructura de la UE.
Figura 7 Estructura cristalina de la Na⁺,K⁺-ATPasa unida a ouabaína.
Figura 8 Mecanismo del incremento a largo plazo del tono vascular en hipertensión sensible a sal.
Figura 9 Estructura de los Glicósidos Cardíacos.
Figura 10 Resistencia Eléctrica Transepitelial de monocapas de células MDCK bajo diferentes condiciones.
Figura 11 Internalización de la UE inducida por OUA.
Figura 12 Disminución en el contenido celular de proteínas de la UE.
Figura 13 La internalización de las proteínas de la UE inducida por OUA depende de dinamina.
Figura 14 La endocitosis de CLDN-2 inducida por OUA no está mediada por el endosoma de reciclamiento.
Figura 15 La inhibición del proteasoma no previene el efecto de OUA sobre la UE.
Figura 16 El inhibidor del proteasoma MG-132 disminuye el contenido celular de CLDN-2 y -4.
Figura 17 Efecto del bloqueo de la actividad lisosomal con NH₄Cl.
Figura 18 El NH₄Cl previene la disminución en la expresión de las proteínas de la UE inducida por OUA.
Figura 19 La inhibición del lisosoma disminuye la endocitosis de las proteínas inducida por OUA.
Figura 20 La bafilomicina bloquea la degradación de las proteínas de la UE inducida por OUA.
Figura 21 La OUA induce cambios en la expresión de mRNA de las proteínas de la UE.
Figura 22 Curso temporal de la Presión Arterial Diastólica y Sistólica.
Figura 23 Función Renal.
Figura 24 Distribución de proteínas de la UE en el riñón de la rata.
Figura 25 Localización y expresión de CLDN-2 en el túbulo proximal.
Figura 26 Localización y expresión de CLDN-10 en el túbulo proximal.
Figura 27 La CLDN-8 se sobreexpresa en la nefrona distal de ratas hipertensas.
Figura 28 La CLDN-4 se sobreexpresa en la nefrona distal de ratas hipertensas.
Figura 29 Alteración relación del glomérulo y la cápsula de Bowman.
Figura 30 Expresión de la subunidad α Na⁺,K⁺-ATPasa.
Figura 31 Señalización en el desensamble de la UE inducido por OUA.

Índice de Tablas

Tabla 1	Enfermedades relacionadas a la inactivación genética o alteraciones de la expresión de las claudinas.
Tabla 2	Efectos de la inactivación genética de las claudinas (Knockouts).
Tabla 3	Localización de claudinas a lo largo de la nefrona.
Tabla 4	Interacción de la Na ⁺ ,K ⁺ -ATPasa con algunas proteínas.

Abreviaturas

BAF	Bafilomicina A1
CLDN	Claudina
CCr	Depuración de Creatinina
DAS	Dieta Alta en Sal
DES	Desmosomas
DM	Diabetes mellitus
DYN	Dynasore
EC	Esteroides Cardiotónicos
ECEs	Esteroides Cardiotónicos Endógenos
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del EGF
ENaCs	Canales epiteliales de sodio
FeNa	Excreción Fraccional de Sodio
FG	Filtración Glomerular
GC	Glucósidos Cardíacos
HTA	Hipertensión Arterial
JAM	Molécula de Adhesión a la Unión
KO	Knock out
L-NAME	ω -Nitro-L-arginina metil éster
NCX	Intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$
NF-κB	Factor nuclear κ B
NH₄Cl	Cloruro de amonio
OCLN	Ocludina
OE	Ouabaína Endógena
OUA	Ouabaína
PA	Presión arterial
PHA II	Pseudohipoaldosteronismo tipo II
RET	Resistencia Eléctrica Transepitelial
SRAA	Sistema Renina – Angiotensina – Aldosterona
UA	Unión Adherente
UC	Unión Comunicante
UE	Unión Estrecha
WNK	Cinasas sin lisina (with no lysin kinases)
ZO	Zonula Ocludens

I. RESUMEN

La permeabilidad paracelular de los epitelios se puede ajustar a distintos requerimientos fisiológicos y puede alterarse bajo distintos estados patológicos. Esto se refleja en que la resistencia eléctrica transepitelial (RET) puede ser de unos cuantos ohms·cm² (Ω ·cm²) hasta miles de Ω ·cm² dependiendo del grado de sellado de la unión estrecha (UE). Las UEs son estructuras que regulan el transporte paracelular, están compuestas por proteínas integrales de membrana de la familia de las claudinas (CLDNs), las cuales son responsables de la selectividad y permeabilidad, la ocludina (OCLN), otra proteína de membrana, así como proteínas de andamiaje como ZO-1. La ouabaína (OUA), un esteroide cardiotónico (EC) de origen vegetal que ahora es considerado una hormona animal, cuya concentración se encuentra incrementada en el plasma de mamíferos con hipertensión. La incubación de altas concentraciones de OUA (≥ 200 nM) en células MDCK, promueven el despegue de las células de sus vecinas y del sustrato. En este trabajo estudiamos el mecanismo involucrado en la endocitosis de las proteínas de la UE en cultivos de células MDCK y analizamos si el mismo efecto se produce en riñones de ratas hipertensas.

En cultivos de células MDCK, la OUA produce una disminución progresiva de la resistencia eléctrica transepitelial (RET) que se ve retrasada por los inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) PD153035, cSrc (SU6656 y PP2) y ERK1/2 (PD98059). La apertura de las UEs depende de una endocitosis generalizada y de la degradación de proteínas de la UE como CLDN-2, -4, OCLN y ZO1. Concentraciones tóxicas de OUA disminuyen el nivel de abundancia del mRNA de CLDN-2 y ZO-1, sorprendentemente, aumentan el de CLDN-4 y OCLN. Los cambios a nivel de proteína y mRNA de CLDN-4, OCLN y ZO-1, requieren de la activación de ERK1/2; sin embargo, los cambios en CLDN-2 permanecen insensibles a la activación de la cinasa.

Ratas sensibilizadas durante 3 semanas con L-NAME en el agua de beber y posteriormente alimentadas durante 3 semanas más con una dieta alta en sal (NaCl 4%, DAS), desarrollan hipertensión (110 ± 10 vs 150 ± 10 mm Hg, n=18).

Los riñones de ratas normotensas presentan la distribución típica de CLDN-2, -4, -8, OCLN y ZO-1 a lo largo de la nefrona. Por otro lado, los riñones de ratas hipertensas muestran una disminución generalizada de CLDN-2 en el túbulo proximal y un aumento de las CLDN-4 y -8 en la nefrona distal.

Estos resultados muestran que niveles tóxicos de OUA activan la ruta EGFR-cSrc-ERK1/2 para inducir endocitosis, internalización y degradación de proteínas de la UE, con la notable excepción de CLDN-2 que no depende de ERK1/2. En las ratas con hipertensión la CLDN-2 se deslocaliza y disminuye su expresión en el túbulo proximal. Dado que CLDN-2 constituye un canal para el transporte de Na⁺ y agua, es posible que la disminución de esta proteína del túbulo proximal este asociada a un mecanismo de defensa del organismo para la eliminación de sal por la orina.

II. ABSTRACT

Epithelia adjust the permeability of their paracellular permeation route to physiological requirements, pathological conditions, and pharmacological challenges. Tight Junctions (TJs) are the structures that perform and regulate paracellular transport, and are composed by a protein and lipid complex that includes membrane proteins such as Claudins (CLDNs), the membrane proteins responsible of TJs' selectivity and permeability, and Occludin (OCLN), another membrane protein, as well as scaffold intracellular proteins like ZO-1. Ouabain (OUA), a Cardiotonic Steroid (CS) of vegetal origin, is now considered an animal hormone that increases its concentration in the plasma of mammals with hypertension. We have previously shown that the incubation of renal kidney MDCK cells with high concentrations of OUA (≥ 200 nM), detaches cells from the neighbors and the substrate. In this work we study the mechanisms involved in the disassembly of TJs in MDCK in culture and analyze if these mechanisms operate also in the kidney of hypertensive rats.

In cultured MDCK cells, OUA induces a progressive decrease of the transepithelial electrical resistance that is delayed by inhibitors of the epidermal growth factor receptor (PD153035) cSrc (SU6656 and PP2) and ERK1/2 kinases (PD98059). TJs' aperture depends on the generalized endocytosis and degradation of membrane TJs' proteins CLDN-2 and -4 and OCLN as well as the translocation to the nuclear periphery and degradation of the plasma membrane associated TJs' protein ZO-1. Toxic levels of OUA decrease ZO-1 and CLDN-2 mRNA abundance but, surprisingly, increase that of CLDN-4 and OCLN. Protein and mRNA changes of CLDN-4, OCLN and ZO-1 require ERK1/2 activation but those of CLDN-2 remain insensitive to this kinase.

Rats sensitized 3 weeks with oral L-NAME and fed 3 subsequent weeks with a salt rich diet develop moderate hypertension (110 ± 10 vs 150 ± 10 mm Hg, $n=18$). The kidneys of normotensive rats presented the typical distribution of CLDN-2, -4 and -8 and ZO-1 along the nephron. On the other hand, kidneys of hypertensive rats show a general decrease of CLDN-2 at the proximal tubule, and an increase of CLDN-4 and -8 in the distal tubule.

These results show that toxic levels of OUA activate EGFR-cSrc-ERK1/2 pathway to induce endocytosis, internalization and degradation of TJs' proteins, with the notable exception of CLDN-2 protein and mRNA decrements, that are independent on this pathway. In hypertension, CLDN-2 of the proximal tubule delocalizes and decreases. Given that CLDN-2 constitutes paracellular channels to transport Na^+ and water, CLDN-2 reduction in the proximal tubules of hypertensive rats may be associated with salt elimination in the urine.

1. EL RIÑÓN

1.1 Características anatómicas gruesas del riñón

El riñón es un órgano par en forma de frijol que se encuentra en la cavidad retroperitoneal del cuerpo. En una sección sagital, los riñones tienen tres regiones principales (figura 1): 1) La **corteza** es la región más externa, localizada justo por debajo de la cápsula del riñón. 2) La **médula** es la región central, dividida en médula externa y médula interna. 3) La **papila** es el extremo central de la médula interna cuya desembocadura son los cálices menores y mayores, que son extensiones del uréter. La orina de cada riñón drena dentro de los uréteres y es transportada a la vejiga para su almacenamiento y subsecuente eliminación (Hall & Guyton 2007)

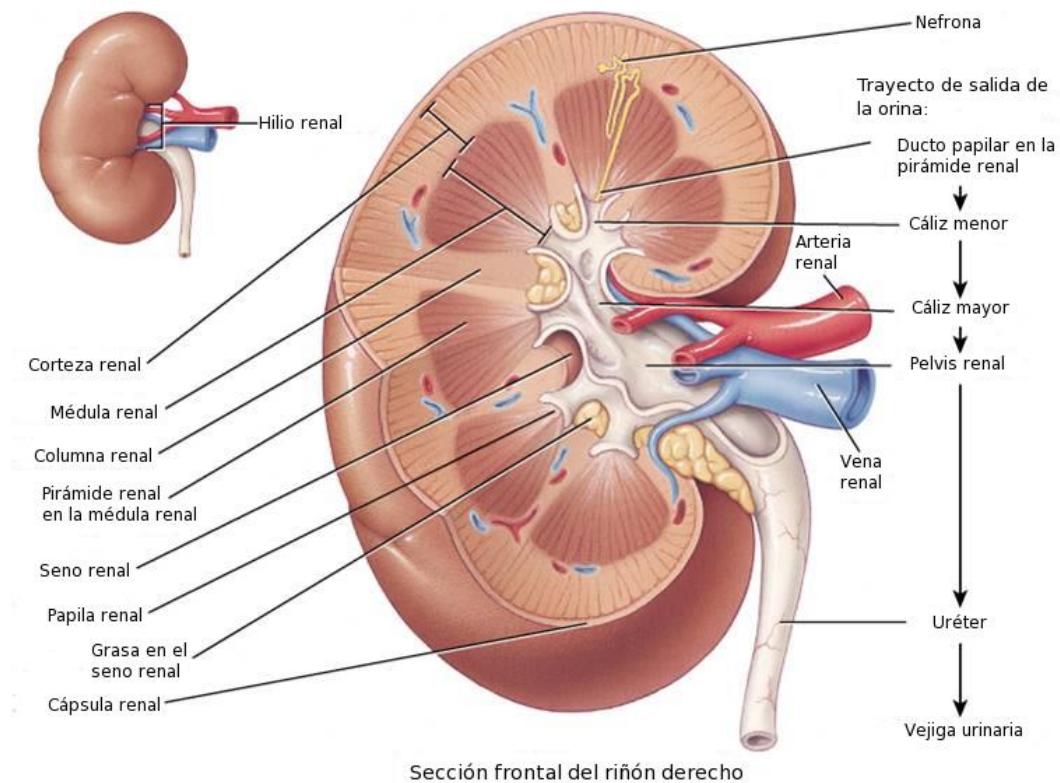


Figura 1. Morfología general del riñón. El riñón se compone de tres regiones primordiales: la corteza, la médula y la papila. Cada riñón está formado por 1 millón de nefronas a través de las cuáles la sangre es filtrada hasta convertirse en orina. Modificado de John Wiley Online Library <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118494073.ins>.

1.2 Estructura de la Nefrona

La unidad anatómica y funcional del riñón es la nefrona. En el humano cada riñón contiene aproximadamente un millón de nefronas (figura 2). Una nefrona consiste de un glomérulo y un sistema de túbulos (Madsen et al. 1988).

Glomérulo: Es un ovillo de capilares (red capilar glomerular) localizados entre la arteriola aferente y eferente, donde se forma el ultrafiltrado del plasma. Los capilares glomerulares están envueltos por la **cápsula de Bowman** (espacio de Bowman), que es continuo con la primera porción de la nefrona.

Sistema de túbulos: Puede subdividirse en varios segmentos de acuerdo con sus diferencias anatómicas y funcionales. Éste sistema es responsable de los procesos de reabsorción y secreción, en los cuales el ultrafiltrado es modificado para la formación de la orina. Sus principales segmentos son el túbulo contorneado proximal, el túbulo recto proximal, el asa de Henle (que contiene una porción descendente delgada, una porción ascendente delgada, y una porción ascendente gruesa), el túbulo contorneado distal, el túbulo conector y los ductos colectores. Cada segmento de la nefrona es funcionalmente distinto y las células epiteliales que revisten cada segmento tienen diferentes ultraestructuras. Por ejemplo, las células del túbulo contorneado proximal son únicas y tienen un amplio desarrollo de las microvellosidades (figura 3).

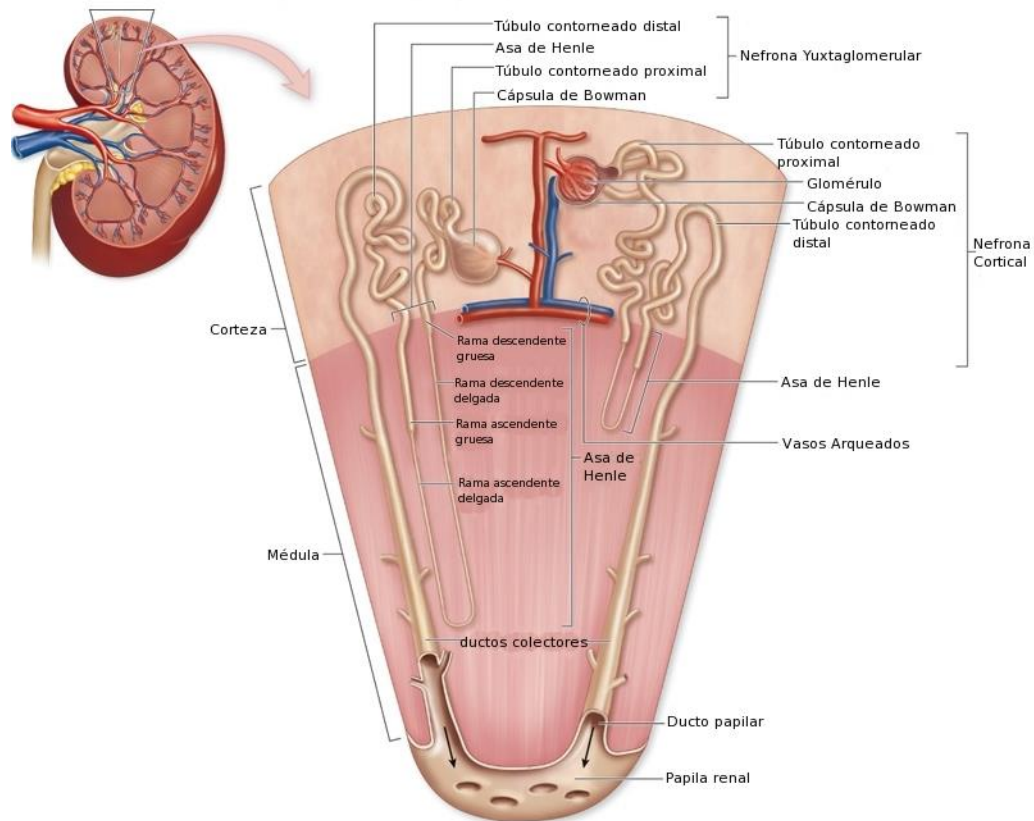


Figura 2. La Nefrona. Unidad anatómica del riñón que está constituida por: glomérulo, túbulo contorneado distal, asa de Henle (gruesa y delgada), túbulo contorneado proximal y ductos colectores. Los túbulos proximales y distales se localizan a lo largo de la corteza renal, mientras que el asa de Henle se encuentra en la médula renal.

La circulación renal presenta una característica importante. Posee dos sistemas capilares dispuestos en serie: el primer lecho capilar forma el ovillo glomerular y el segundo rodea el sistema de túbulos. A través del segundo, las sustancias reabsorbidas vuelven a la circulación y otras son secretadas hacia el interior de los túbulos.

1.2.1 Detalle de los segmentos de la nefrona

Túbulo contorneado proximal

El túbulo contorneado proximal es el responsable de la reabsorción de la mayoría de los pequeños solutos filtrados. Llega a retirar del ultrafiltrado hasta el 95% de los iones Na^+ , Cl^- , K^+ y Ca^{2+} y más del 99% del HCO_3^- . Las moléculas de aminoácidos y glucosa también se reabsorben casi en su totalidad, junto con el Na^+ , en este segmento. Esta porción presenta, además, la importante característica de ser más permeable al agua que las demás, lo que permite su reabsorción pasiva junto con los solutos para recuperar así gran parte del líquido del filtrado (Zhuo & X. C. Li 2013).

Asa de Henle

El asa de Henle se divide en tres segmentos: 1) descendente delgada, 2) ascendente delgada y 3) ascendente gruesa. En la porción gruesa tienen lugar las principales alteraciones del ultrafiltrado. Los iones Na^+ , K^+ y Cl^- son cotransportados hacia el interior de las células tubulares. A su vez, algunos iones K^+ retornan a la luz tubular a través de canales y crean un gradiente electrogénico importante para la reabsorción de cationes, como Mg^{2+} , Ca^{2+} y Na^+ . Cerca del 35% del sodio y el cloro filtrados se reabsorben en este segmento. Es importante resaltar que la impermeabilidad al agua de este trayecto lo convierte en un diluyente de la orina y en un concentrador de la médula (Jorgensen 1976).

Nefrona distal

Este segmento, que incluye el túbulo contorneado distal, el túbulo colector y el conducto colector, es responsable de los ajustes finales de la composición, tonicidad y volumen de la orina. En él se localizan los sitios de acción de las principales hormonas reguladoras de la función renal: la aldosterona, el péptido natriurético auricular y la hormona antidiurética (ADH) (Madsen et al. 1988; Eladari et al. 2012; Al-Awqati 2013).

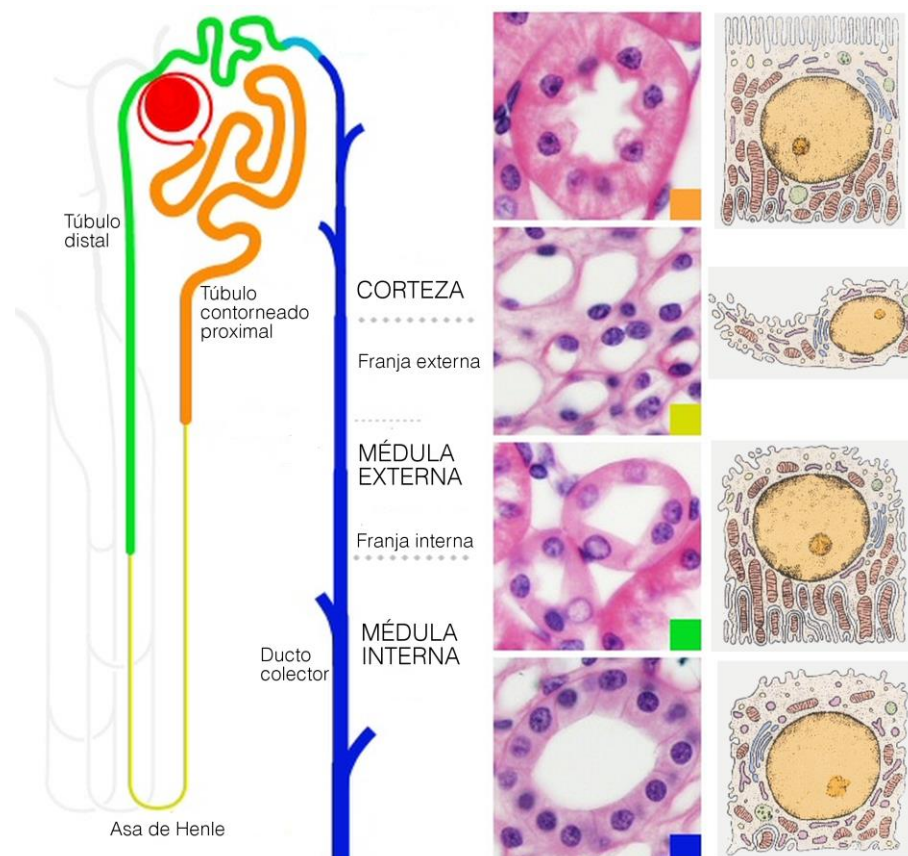


Figura 3. Tipos de células a lo largo de la nefrona. La anatomía de las células que revisten la nefrona es diferente, así como las funciones cada segmento de la misma. Del lado izquierdo de la figura se esquematiza una nefrona; marcando con colores las diferentes porciones de la ésta. En la parte central se observa la histología de la nefrona utilizando el mismo código de colores. Del lado izquierdo los diagramas de células únicas correspondientes a las histologías del centro. Modificado de <http://php.med.unsw.edu.au> y de Junqueira & Carneiro, 1995.

1.3 Formación de la orina

Barrera de filtración glomerular

El proceso de formación de la orina se inicia con el pasaje del plasma por la barrera de filtración glomerular. Este pasaje es promovido por las mismas fuerzas que determinan el transporte de líquidos por los capilares sanguíneos en general, las llamadas fuerzas de Starling (Camici 2005; Obeidat et al. 2012). Ellas surgen de las diferencias entre las presiones hidrostáticas y oncóticas existentes dentro y fuera del capilar glomerular. A pesar de esta semejanza, la barrera glomerular difiere en su fisiología pues consta de tres capas:

1. Endotelio fenestrado del capilar glomerular.
2. Lámina basal.
3. Células epiteliales especializadas, que presentan expansiones citoplasmáticas que circunscriben el capilar y forman innumerables hendiduras rellenas por una membrana delgada. Estas células se denominan **podocitos**, y sus respectivos procesos citoplasmáticos, **pedicelos** (figura 4).

Esta compleja barrera permite el libre pasaje de agua y de pequeños solutos, pero retiene la mayoría de las proteínas y grandes moléculas, así como todas las células sanguíneas. El principal determinante del pasaje por el filtro glomerular es el tamaño de la molécula, aunque la carga iónica también es importante. Las moléculas de carga negativa tienen un índice de retención mayor (Moeller & Tenten 2013; Haraldsson 2014; Tojo & Kinugasa 2012).

Después de la formación del ultrafiltrado glomerular, éste es captado en la cápsula de Bowman. Luego es conducido al sistema de túbulos renales, donde tendrá una serie de modificaciones hasta formar la orina final. Estas modificaciones consisten básicamente en dos procesos:

1. **Absorción:** comprende el movimiento de solutos o de agua desde la luz tubular hacia la sangre.
2. **Secreción:** movimiento del soluto sanguíneo, o de sustancias del interior celular, hacia la luz tubular.

Hay varios mecanismos de transporte de sustancias por la membrana, los cuales varían según el segmento de la nefrona y la molécula en cuestión.

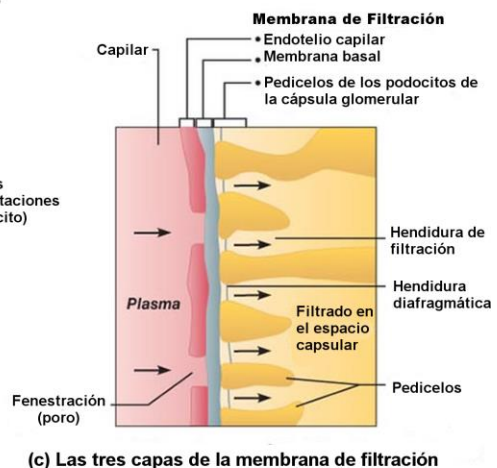
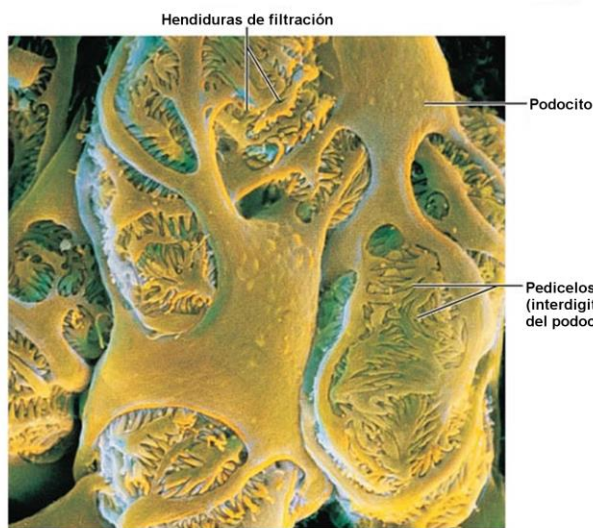
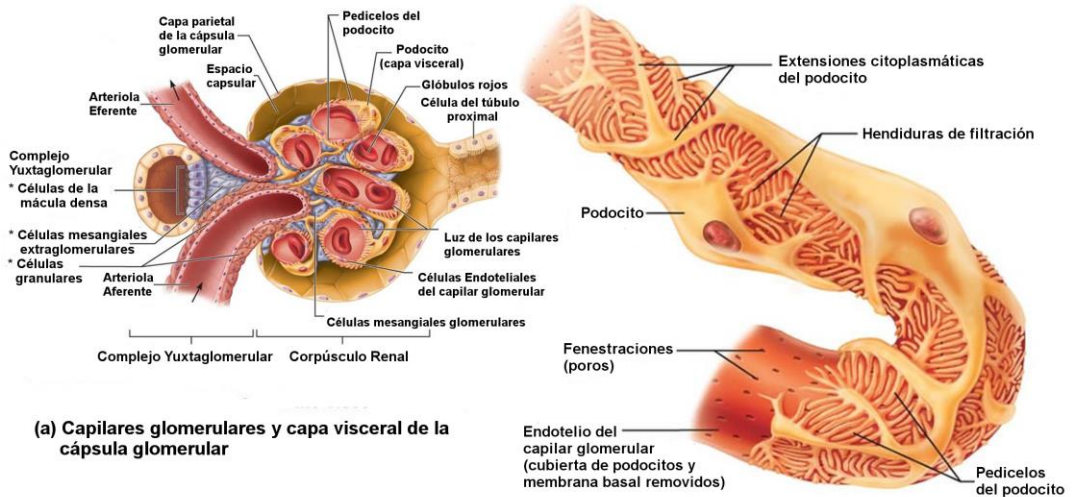


Figura 4. Estructura del glomérulo. (a) esquema a detalle de los diferentes tipos celulares que conforman el glomérulo, el aparato yuxtaglomerular y la cápsula de Bowman. (b) fotografía de microscopía electrónica de barrido que muestra las hendiduras de filtración que hay entre los pedicelios del podocito. (c) esquema de las tres capas de filtración que atraviesa el ultrafiltrado glomerular. Modificado de (Hall & Guyton 2007).

1.4 Regulación del sodio y del volumen circulante

El ion Na^+ presente en altas concentraciones en el medio extracelular, después de atravesar fácilmente la barrera glomerular, es reabsorbido casi en su totalidad (99%) en el sistema tubular. Su reabsorción se cumple por un proceso activo mediado por la bomba de $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPasa}$. Este proceso crea una diferencia de concentración entre el sodio intracelular y el presente en la luz del túbulo, lo que estimula el pasaje de iones por los canales iónicos existentes en la membrana luminal. Es importante subrayar que las membranas basolaterales de las células tubulares no presentan los mismos canales que la membrana luminal, lo cual impide que se produzca una entrada excesiva de Na^+ del medio extracelular hacia su interior (J. X. Xie et al. 2013).

Por el hecho de ser el soluto extracelular más abundante, la cantidad de sodio corporal determina el volumen del líquido extracelular. Dada la importancia que esto representa, se espera que exista un control preciso de su

concentración en el organismo. Esta regulación es efectuada por cuatro sistemas diferentes:

1. Sistema nervioso simpático. Posee receptores vasculares de volumen. Éstos son capaces de percibir la caída del volumen circulante y aumentar el tono simpático renal, el cual incrementa la reabsorción renal de sal y disminuye el flujo sanguíneo renal. Además, el sistema nervioso simpático promueve la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (Antunes-Rodrigues et al. 2004).

2. Sistema renina-angiotensina. La renina es producida por las células granulares yuxtglomerulares, que están presentes en la capa media de la arteriola aferente, próxima a la entrada del glomérulo. Junto con las células modificadas del túbulo distal, que constituye la mácula densa, forman el aparato yuxtglomerular (figura 4 a). Hay tres mecanismos de liberación de renina:

- Mecanismo de la mácula densa. Una caída de la concentración de NaCl en el filtrado tubular es percibida por las células de la mácula densa, las que estimulan a las células granulares para que produzcan renina. La alta concentración de NaCl desencadena el efecto inverso, o sea, inhibición de la síntesis de renina.

- Mecanismo de los barorreceptores. Una disminución de la presión arterial estimula a los barorreceptores, localizados en la arteriola aferente, los que activan la secreción de renina.

- Mecanismos β -adrenérgicos. Un aumento de la actividad simpática renal o de la concentración de catecolaminas circulantes estimula la liberación de renina por medio de los receptores β -adrenérgicos presentes en las células yuxtglomerulares (Wetzel & Sweadner 2003).

Después de secretada, la renina actúa en la hidrólisis del angiotensinógeno plasmático en angiotensina I. Ésta se transforma entonces en su forma biológicamente activa, la angiotensina II (ANG II), mediante la acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA).

La ANG II presenta efectos directos e indirectos sobre la retención de sales. Directamente, estimula la reabsorción de Na⁺ en el túbulo proximal y, por ser un potente vasoconstrictor, es capaz de disminuir la tasa de filtración glomerular por medio de la reducción del flujo sanguíneo renal. Indirectamente, la ANG II activa la síntesis y la secreción de aldosterona por la corteza de la glándula suprarrenal, la cual aumenta la reabsorción de NaCl y la secreción de K⁺ en el conducto colector

(Hall & Guyton 2007).

3. Péptido natriurético auricular (ANP). Es un péptido sintetizado por las células musculares cardíacas de la aurícula y liberado en respuesta al aumento de la distensión auricular. Este aumento de la distensión es provocado normalmente por una elevación del volumen circulante. La acción del ANP es justamente la de inhibir la reabsorción de Na⁺ a lo largo del conducto colector, lo cual aumenta la excreción urinaria. Otra acción se debe a su capacidad vasodilatadora, que disminuye la

presión arterial sistémica e incrementa la tasa de filtración glomerular, al provocar vasodilatación de la arteriola aferente y vasoconstricción de la eferente (Hall & Guyton 2007).

4. Hormona antidiurética (ADH) o vasopresina. Esta molécula estimula la retención de líquido en el organismo. Su secreción está relacionada directamente con la hiperosmolaridad del líquido extracelular y la depleción de volumen. Su acción entraña el transporte de canales de agua, denominados acuaporinas, desde las vacuolas citoplasmáticas hacia la membrana luminal de las células del conducto colector, lo cual aumenta la permeabilidad de este segmento al agua (Hall & Guyton 2007).

1.5 Agua y Osmorregulación

El control del volumen y las osmolaridad de la orina es realizado por la hormona antidiurética. En los estados de deshidratación, la orina eliminada presenta escaso volumen (menos de 1 L por día) y acentuada osmolaridad (hasta 1200 mOsm/ Kg. de agua). Cuando la ingestión de agua es elevada, el flujo urinario puede llegar hasta 14 L por día, con una osmolaridad inferior a la del plasma (75 a 100 mOsm/ Kg). Estas alteraciones del volumen urinario no llegan a afectar obligatoriamente la carga de excreción diaria de solutos.

1.5.1 Absorción tubular de agua

A lo largo de la nefrona, la presión osmótica del líquido tubular es menor que la del espacio intersticial. Esta diferencia crea la fuerza necesaria para la reabsorción de agua en los túbulos. La tasa de esta reabsorción depende de dos factores:

1. Magnitud del gradiente osmótico.
2. Permeabilidad al agua del segmento en cuestión.

Por ejemplo, el túbulo contorneado proximal, el cual presenta un gradiente osmótico pequeño (2-3 mOsm/ L), pero, al ser muy permeable al agua, muestra una tasa de alta reabsorción de líquidos. La rama ascendente gruesa del asa de Henle tiene un gradiente elevado (hasta 250 mOsm/ L), pero no participa en la reabsorción por ser impermeable al agua. El conducto colector es el único segmento capaz de alterar su permeabilidad al agua en respuesta a las variaciones de los niveles de ADH. De esta forma, existe la adaptación a las necesidades del organismo (mecanismo de las acuaporinas).

1.5.2 Hipertonicidad medular

Para la reabsorción de agua en el conducto colector, es necesario que el intersticio medular tenga una concentración osmótica mayor que la de la luz tubular. Este medio hipertónico se obtiene gracias al sistema de contracorriente

producido en el asa de Henle. Las características de la rama descendente (permeable al agua) y de la ascendente (impermeable al agua, pero con un potente sistema de transporte activo de NaCl) son fundamentales para la creación de este medio hiperosmótico, que será responsable de concentrar el líquido tubular que pasa por el conducto colector. Además de los iones, la urea es también un importante contribuyente a la hipertonicidad medular, ya que llega a representar casi el 50% del valor final de la osmolaridad medular. Debido a estas características, una reducción de la síntesis de urea, provocada por una caída drástica de la ingesta de proteínas, podría comprometer la capacidad concentradora de los riñones.

1.6 Regulación del volumen por Osmorregulación

El control del volumen es realizado por una serie de mecanismos y funciones relativamente superpuestos, por lo que la falla del funcionamiento de uno de ellos no acarrea grandes consecuencias al individuo. La osmorregulación es efectuada únicamente por la ADH, cuya escasez o presencia en exceso puede provocar síndromes clínicos radicales de pérdida excesiva o retención excesiva de agua, respectivamente.

Los síntomas característicos de los trastornos de la osmorregulación y de la regulación del volumen son diferentes. La hiponatremia y la hipernatremia son signos de alteraciones de la osmorregulación; el edema o hipovolemia, de la regulación de volumen.

1.7. Transporte tubular renal de potasio

El 60 a 70% del K^+ filtrado se reabsorbe en el túbulo contorneado proximal; otro 20 a 30%, en la rama ascendente gruesa del asa de Henle. Así, apenas el 10% de la carga filtrada de K^+ llega a la nefrona distal. En el conducto colector, el K^+ es tanto secretado como reabsorbido, por lo que este segmento es el principal responsable de las variaciones de su excreción urinaria. El aumento de la ingestión de K^+ lleva a un incremento de su secreción por los conductos colectores. En este punto, la reabsorción se torna el proceso predominante.

Tres factores regulan la tasa de secreción de K^+ por las células del conducto colector:

1. La actividad de la bomba de Na^+, K^+ -ATPasa.
2. El gradiente electroquímico entre la luz tubular y el interior de la célula.
3. La permeabilidad al K^+ de la membrana luminal, a través de los canales de K^+ .

Estos factores son controlados por las siguientes variables:

- Concentración plasmática de K^+ : un aumento del K^+ plasmático debido a una alteración de su ingesta o, a defectos en su eliminación

llevan a un flujo del ion hacia el interior de la célula, lo que aumenta su pasaje desde el medio intracelular hacia la luz tubular.

- Aldosterona: eleva la secreción de K^+ por activación de la bomba Na^+,K^+ -ATPasa o por incremento de la permeabilidad al ion de la membrana luminal; este efecto es independiente de la angiotensina.

- Tasa de flujo tubular: un aumento del flujo tubular provocado, por ejemplo, por diuréticos, estimula una mayor secreción de K^+ hacia la luz; esto se debe a la capacidad de los túbulos de eliminar rápidamente los iones K^+ secretados y mantener así elevado el gradiente a través de la membrana apical.

- Cantidad de Na^+ en la nefrona distal: cuando la cantidad de Na^+ reabsorbida en el túbulo distal aumenta, la carga eléctrica de la luz se torna predominantemente negativa, lo cual favorece el pasaje de cationes, como el K^+ , hacia el interior del túbulo.

- Iones hidrógeno: una caída de la concentración de H^+ estimula la secreción de K^+ , a raíz del aumento intracelular de este ion que tiene lugar durante la alcalosis (Brenner & Livine 1999; Giebisch & Windhager 1964; Giebisch et al. 1964; Karniski et al. 2002).

1.9 HIPERTENSIÓN

La presión arterial (PA) resulta de la interacción de factores genéticos y factores ambientales. Estos últimos modulan la predisposición subyacente debida a la herencia y a determinados factores que aparecen durante la maduración fetal. En algunos individuos predomina el factor genético, mientras que en otros los factores ambientales son determinantes.

El 95% de los hipertensos que se observan en la clínica no tienen una etiología definida, constituyen la llamada hipertensión arterial (HTA) esencial, también denominada primaria o idiopática, mientras que el 5% son secundarias a diversas causas entre las que destacan por su frecuencia las inducidas por drogas o fármacos, la enfermedad renovascular, la falla renal, y el hiperaldosteronismo (MacGregor & Kaplan 2006).

La hipertensión arterial esencial es un desorden heterogéneo, en el que la participación de los factores causales puede variar bajo diferentes condiciones o períodos y en cada individuo.

La interacción entre variaciones genéticas y factores ambientales tales como el estrés, la dieta y la actividad física, contribuyen al desarrollo de la HTA esencial.

Esta interacción origina los denominados fenotipos intermedios, mecanismos que determinan el fenotipo final HTA a través del gasto cardíaco y la resistencia vascular total. Los fenotipos intermedios incluyen, entre otros: el sistema nervioso autónomo, el sistema renina angiotensina, factores

endoteliales, hormonas vasodilatadoras y vasoconstrictoras y volumen del líquido corporal (Kaplan 2010).

1.9.1 Factores etiológicos de la HTA esencial

Se han descrito los siguientes factores etiológicos de la hipertensión:

1. Obesidad
2. Resistencia a la insulina
3. Ingesta elevada de alcohol
4. Ingesta elevada de sal en pacientes sensibles a la sal
5. Edad avanzada y género femenino
6. Sedentarismo
7. Estrés
8. Ingesta baja de potasio
9. Ingesta baja de calcio

Muchos de estos factores son aditivos, tal como ocurre con la obesidad y la ingesta de alcohol (Kaplan 2010).

1.9.2 Factores determinantes de la HTA: gasto cardíaco y resistencias periféricas

La característica hemodinámica fundamental de la hipertensión primaria es el aumento persistente de la resistencia vascular, que se puede alcanzar a través de diferentes vías. Estas pueden converger tanto en el engrosamiento estructural de la pared como en la vasoconstricción funcional (Hall & Guyton 2007; Kaplan 2010).

En esta tesis desarrollamos un modelo de hipertensión esencial sensible a sal debido a la sensibilización por vasoconstricción funcional.

1.9.3 Ingesta de sal

El aporte excesivo de Na⁺ induce HTA por aumento del volumen sanguíneo y de la precarga, lo cual eleva el gasto cardíaco. También puede aumentar la PA mediante otros mecanismos (Kaplan 1990).

La asociación positiva entre aporte de sal en HTA está avalada por datos epidemiológicos como la ausencia de HTA en individuos que habitan en comunidades indígenas aisladas que no ingieren sodio (Mancilha-Carvalho & Souza e Silva 2003), la aparición de HTA en determinados individuos que adoptan un estilo de vida moderno que incluye mayor aporte de sodio y estudios comparativos entre diferentes países como el estudio INTERSALT.

En el estudio INTERSALT (Kaplan 1990) realizado en 52 centros de diversos países, se relacionó la excreción de sodio ajustada por el peso corporal

con la pendiente de los niveles de PA diastólica y con la edad. En los países con mayor consumo de sodio la pendiente es mayor, indicando la relación entre ambos parámetros, ingesta de sal y PA diastólica.

También existen diversos estudios experimentales en animales y humanos que sustentan la participación del exceso de Na⁺ en la aparición de HTA como el incremento de la PA en chimpancés genéticamente predispuestos con el aumento progresivo de Na⁺ en la dieta y la disminución de la PA observada después de 6 meses y a los quince años en niños a los que se redujo el aporte de Na⁺ durante los 6 primeros meses de vida respecto a aquellos con aporte normal (Geleijnse et al. 1997).

Sensibilidad a la sal: Dentro de un mismo nivel de ingesta de Na⁺ existen pacientes (sensibles a la sal) en los que ésta, determina de forma marcada los valores de PA (se eleva con dietas con alta cantidad de sal y disminuye con la restricción de sal), mientras que en otros no. Esto puede establecerse observando los cambios de PA que se producen al modificar de forma significativa la ingesta de Na⁺ (dieta hiposódica y luego dieta con sobrecarga de sal) o mediante un protocolo experimental (sobrecarga salina endovenosa seguida de dieta hiposódica y furosemida) (Stolarz-Skrzypek et al. 2013).

Son predictores clínicos de sensibilidad a la sal: obesidad, edad avanzada, raza negra, niveles bajos de renina plasmática, actividad incrementada del Sistema Nervioso Simpático (SNS) y presencia de enfermedades concomitantes tales como la insulino-resistencia/DM, la insuficiencia renal y la microalbuminuria (Blaustein et al. 2012).

Variantes en los genes que codifican la alfa-aducina (modula la reabsorción de sodio en el túbulo proximal) y el angiotensinógeno se han asociado con incremento de la PA y la sensibilidad a la sal (Staessen & Bianchi 2005).

Se han propuesto diferentes mecanismos de sensibilidad al Na⁺:

- Defecto en la excreción renal de Na⁺: vasoconstricción renal y mayores índices de reabsorción proximal de Na⁺.
- Aumento de la actividad del intercambiador de Na⁺/H⁺ en el túbulo proximal.
- Mayor nivel de actividad del SNS y mayor reactividad presora que la normal.
- Disfunción endotelial por disminución de la respuesta del óxido nítrico (NO) a cargas de Na⁺.

La sensibilidad a la sal en normotensos se asocia con un aumento del riesgo para el desarrollo de HTA, eventos cardiovasculares y muerte (Van Huysse et al. 2011; Blaustein & Hamlyn 2010; Blaustein et al. 2012; Blaustein 1985; Stolarz-Skrzypek et al. 2013).

2. LOS EPITELIOS Y LA UNIÓN ESTRECHA

Los epitelios son tejidos especializados que recubren y tapizan todas las cavidades y superficies libres del organismo, separan compartimentos biológicamente distintos y constituyen una barrera que modula el movimiento de agua, solutos y células entre los diversos compartimentos (figura 1). Tienen dos características fundamentales: 1) se **adhieren** entre sí y al sustrato con uniones celulares y 2) se **polarizan**, es decir, distribuyen los componentes de su membrana plasmática en tres dominios de composición y estructura distinta: el **apical**, que tiene microvellosidades y está orientado hacia el lumen de órganos como el intestino y el riñón; el **lateral** que contacta a las células epiteliales entre sí, y el **basal**, con el que se unen al sustrato (Cereijido 2004; Cereijido et al. 1989) (Figura 5).

Las células epiteliales se unen entre sí a través de diferentes uniones celulares, llamadas en conjunto el “complejo de unión”, que incluyen a las Uniones Estrecha (**UE**), Adherente (**UA**), Desmosomas (**DES**) y Comunicantes (**UC**). Además se unen al sustrato mediante Hemidesmosomas y Contactos Focales. Todas las estructuras mencionadas juegan un papel fundamental en la función y arquitectura de la célula epitelial (figura 5).

Los epitelios transportan sustancias entre los compartimentos que separan a través de las rutas **transcelular** y **paracelular**. En la **trancelular** las sustancias cruzan las membranas celulares mediante canales, acarreadores y bombas. En la **paracelular** las sustancias pasan por el espacio extracelular entre células vecinas a través de la UE (Cereijido et al. 1983; Van Itallie & Anderson 2006).

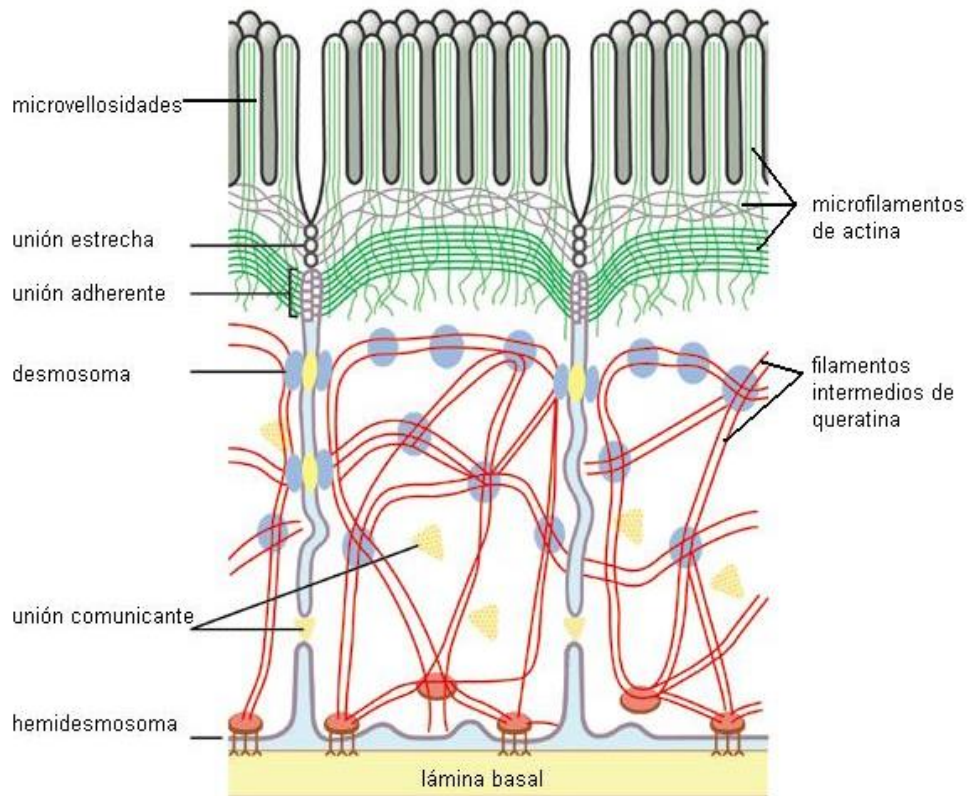


Figura 1. Célula epitelial. Dominios de membrana y estructuras del complejo de unión. En la membrana lateral se observa en la porción más apical la Unión Estrecha (UE), por debajo la Unión Adherente (UA), los desmosomas (DES) y la Unión Comunicante (UC). En la membrana basal se localizan los hemidesmosomas y Contactos Focales que mantienen unida la célula con el sustrato.

La **UE** es la frontera que divide al dominio apical del dominio lateral. En cortes finos, vistos por microscopía electrónica de transmisión, se observan como puntos donde las membranas plasmáticas de células contiguas se fusionan y sellan el espacio intercelular (figura 6a) (FARQUHAR & PALADE 1963), mientras que en replicas de criofractura se observan estructuras similares a filamentos entrecruzados (Figura 6B) (Staehein et al. 1969). La UE sella el espacio extracelular entre las células vecinas, y una vez que se forma evita la difusión libre de moléculas a través de la ruta paracelular (Figura 6C) (Revel & Karnovsky 1967). La UE realiza dos funciones cruciales en los epitelios: la función de “**cerca**” consiste en que, al estar colocada a todo lo largo de la membrana plasmática de la célula, como un cinturón entre los dominios apical y lateral, constituye una “cerca” que impide a los componentes de la membrana apical difundir en el plano de la membrana hacia el dominio basolateral; la función de “**compuerta**” consiste en que la UE ejecuta el transporte de iones y moléculas a través de la ruta paracelular, con una selectividad e intensidad que depende, principalmente, de su composición molecular (Diamond 1977).

La función de compuerta de las UEs se evalúa a través de la medición de la Resistencia Eléctrica Transepitelial (RET). Dado que, en la mayoría de los casos, la resistencia eléctrica de la ruta transcelular es enorme, comparada con la paracelular, la RET refleja principalmente el paso de iones a través de la ruta paracelular (Cereijido et al. 1978).

Los insectos y moluscos tienen uniones septadas que son los análogos funcionales de las UEs. Las uniones septadas se encuentran por debajo de la unión adherente y tienen el aspecto de una “escalera” en las fotografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (Rosenbluth 1965; Cereijido et al. 2008).

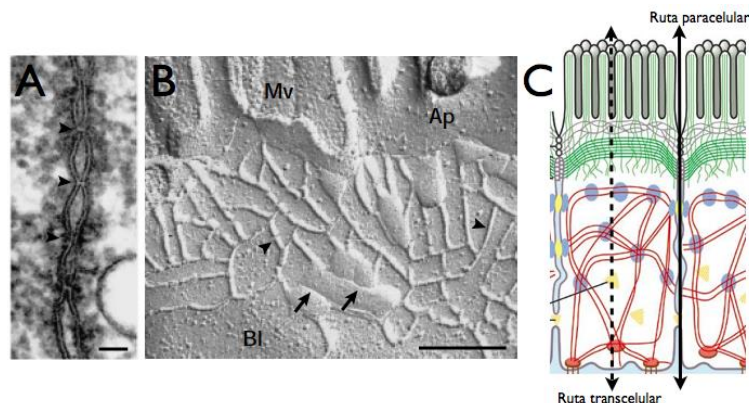


Figura 2. Estructura de la UE. (A) En un corte fino tomado por microscopía electrónica, las cabezas de flecha señalan los puntos de la UE donde las membranas de las células contiguas están fusionadas y el espacio intercelular se observa obliterado. (B) Replicas de criofracturas donde se muestra el arreglo en anastomosis de los filamentos de la UE (Tomadas de Tsukita et al., 2001) (C) Diagrama del movimiento de solutos a través de los epitelios donde se observa el paso a través de la célula (ruta transcelular, línea punteada) y el paso de sustancias por el espacio intercelular (ruta paracelular, línea continua). Modificado de Tsukita 2001 (Tsukita et al. 2001).

Las UEs están compuestas por más de 50 especies moleculares entre las que se encuentran proteínas de membrana con 1 o 4 dominios transmembranales, como las moléculas de adhesión de la unión (JAM), claudinas y proteínas MARVEL (por ejemplo la ocludina y la tricellulina), y citoplásmicas que se asocian, por un lado, a las transmembranales y por el otro al citoesqueleto de actina, como ZO-1, -2 y -3 (Cereijido et al. 2000; Gonzalez-Mariscal et al. 2003). Además, la UE es un dominio lipídico rico en glicosfingolípidos y colesterol (Calderón et al. 1998; Nusrat et al. 2000).

2.1 Claudinas

Las claudinas (CLDNs) constituyen una familia de proteínas de 4 dominios transmembranales que forman las hebras de la UE observadas mediante criofractura (Furuse et al. 1998), pesan entre 20 y 28 kDa y están formadas por cuatro dominios transmembranales (por lo que se les denomina proteínas tetraespán), dos asas extracelulares, un asa pequeña intracelular y los dominios citoplasmáticos amino y carboxilo terminales (Furuse et al. 1998). Forman una familia de 24 parálogos en ratones y humanos (Morita et al. 1999), cruciales para determinar la permeabilidad y selectividad específica de la ruta paracelular (Furuse et al. 2001; Colegio et al. 2003; Van Itallie et al. 2001). Las CLDNs 1-10, 14, 15, 17 y 19 muestran una secuencia homóloga y similitud funcional y se les conoce generalmente como CLDNs **clásicas** (Krause et al. 2008). Las funciones *in vivo* de las CLDNs se han investigado mediante mutaciones nulas (*knockouts*)

en ratón y pez zebra y analizando mutaciones en algunos padecimientos del humano (Tabla 1). En todos los casos se altera la permeabilidad paracelular a distintas sustancias, por ejemplo, la ausencia de CLDN-16, también llamada paracellina, provoca la hipomagnesemia con hipercalcemia y nefrocalcinosis hereditaria en humanos (formación de cálculos renales), como resultado de la falta de absorción del Ca^{2+} y el Mg^{2+} del fluido tubular a la sangre en la porción gruesa ascendente del asa de Henle renal (Simon 1999).

Tabla 1. Enfermedades relacionadas a la inactivación genética o alteraciones de la expresión de las claudinas.

<i>Claudina</i>	<i>Efecto</i>	<i>Referencia</i>
1	Engrosamiento progresivo de la piel y obstrucción de los ductos biliares, conocida como colangitis esclerosante neonatal con ictericia	(Anon 2004)
4	La mutación en las cinasas 1 y 4 de la familia WNK produce un síndrome conocido como Pseudohipoaldosteronismo (PHA II), en el que los pacientes presentan hipertensión arterial, hipercalemia y acidosis metabólica. En el PHA II, la CLDN-4 no está presente en la membrana.	(Gamba 2004; San-Cristobal et al. 2008; Yamauchi et al. 2004; Hou et al. 2010)
16	Hipomagnesemia con hipercalcemia y nefrocalcinosis hereditaria en humanos (formación de cálculos renales),	(Simon 1999)
19	Asociada a diversas enfermedades oculares, tales como coloboma macular, nistagmus y miopía; así como hipomagnesemia y falla renal	(Konrad et al. 2006)

La inactivación génica (mutación nula, knockouts, KO) de la CLDN-1 induce la muerte de los ratones al día de nacimiento por la deshidratación masiva a través de la piel (Furuse et al. 2002; Sugawara et al. 2013); la de la CLDN-2 produce ratones incapaces de reabsorber el Na^+ del filtrado glomerular en el túbulo proximal (Muto et al. 2010); ratones deficientes en CLDN-11 padecen de sordera debido a la desaparición de la UE en la pared lateral de las células basales de la estría vascular (la pared lateral del conducto coclear) (Kitajiri et al. 2004; Gow et al. 2004). Algo parecido ocurre con el ratón KO para CLDN-14, ya que éstos también pierden la audición probablemente debido al deterioro en la selectividad iónica de las capas epiteliales que está en contacto directo con las células ciliadas de la lámina reticular (Tabla 2) (Ben-Yosef et al. 2003).

Tabla 2. Efectos de la inactivación genética de las claudinas (Knockouts).

Claudina	Efecto	Referencia
1	Muerte de los ratones al día de nacimiento por la deshidratación masiva a través de la piel	(Furuse et al. 2002; Sugawara et al. 2013)
2	Disminución en la reabsorción de Na ⁺ , Cl ⁻ y agua en el túbulo proximal	(Muto et al. 2010)
4	Hiperplasia urotelial, aumento en la excreciónn fraccional de Ca ²⁺ y Cl ⁻ , obstrucción en el tracto urinario y una hidronefrosis progresiva letal	(Ashton 2012)
5	Impedimento el paso de sustancias de bajo peso molecular a través de la barrera hemato-cefálica	(Nitta et al. 2003)
8	Disminución en la permeabilidad paracelular de Cl ⁻	(Hou et al. 2010)
11	Transmisión nerviosa lenta, debilidad en las extremidades traseras y esterilidad, defectos causados por la ausencia de UEs en los oligodendrocitos y entre las células de Leydig. Así como sordera causada por la desaparición de la UE en la pared lateral de las células basales de la estría vascular	(Gow et al. 1999; Gow et al. 2004; Kitajiri et al. 2004)
14	Pérdida de la audición por un deterioro de la selectividad iónica.	(Ben-Yosef et al. 2003)

Diversos estudios han mostrado que las CLDNs son responsables de la selectividad en el tamaño y la carga de las partículas que se transportan por la ruta paracelular. La expresión de CLDNs exógenas en cultivos de células epiteliales modifica significativamente su Resistencia Eléctrica Transepitelial (RET) (Furuse et al. 1998; Inai et al. 1999; Van Itallie et al. 2001). Las CLDNs se clasifican en términos generales como CLDNs de **barrera**, en el sentido de que alteran la función de compuerta que impide el transporte paracelular de iones y por lo tanto aumentan la RET, o CLDNs **formadoras de poro**, que promueven ese transporte y, en consecuencia, disminuyen la RET (Hou et al. 2013). Por ejemplo, la expresión de CLDN-4 en células epiteliales de baja resistencia MDCK II triplica la RET; por lo tanto, la CLDN-4 se clasifica como una CLDN barrera (Van Itallie et al. 2001). Por el contrario, la expresión exógena de CLDN-2 –una claudina poro– en cultivos de células epiteliales de alta resistencia MDCK I disminuye la RET unas 20 veces (Furuse et al. 2001; Amasheh et al. 2002). Con base en diversos estudios de sobreexpresión, se han categorizado a las CLDNs -1, -4, -5, -6, -8, -9, -11, -15 y 19 como CLDNs de barrera; mientras que las CLDNs -2, -10 y -16 se clasifican como CLDNs poro (Hou et al. 2005; Furuse et al. 2001; Amasheh et al. 2002; Gunzel et al. 2009).

Por otro lado las CLDNs poro en la nefrona están asociadas a los segmentos tubulares más laxos, mientras que las CLDNs barrera se expresan en los segmentos tubulares más herméticos. Por ejemplo, la CLDN-2 se localiza en el túbulo proximal (Enck et al. 2001) que se caracteriza por su alta permeabilidad a sodio y agua, mientras que la CLDN-8 se expresa en la nefrona distal que es mucho más hermética (W. Y. Li et al. 2004).

2.2 Las claudinas y su expresión diferencial a lo largo de la nefrona

Las CLDNs se expresan diferencialmente en distintos tejidos, dependiendo de los requerimientos fisiológicos. La expresión de las CLDNs ha sido muy bien caracterizada en el riñón y su localización se resume en la tabla 3.

Tabla 3. Localización de claudinas a lo largo de la nefrona.

Segmento de la Nefrona	Claudina(s)	Referencia
Glomérulo	1, 2	(Kiuchi-Saishin et al. 2002; Ohse et al. 2008)
Podocitos	5, 6	(Koda et al. 2011; Zhao et al. 2008)
Túbulo Contorneado Proximal	2, 10a, 17	(Gunzel et al. 2009; Enck et al. 2001; Kiuchi-Saishin et al. 2002; Reyes et al. 2002; Krug et al. 2012)
Rama descendente del asa de Henle	2, 7, 8	(Enck et al. 2001; W. Y. Li et al. 2004; Gonzalez-Mariscal 2006)
Rama ascendente delgada del asa de Henle	3, 4, 10, 16, 17, 18, 19	(Reyes et al. 2002; Angelow, Schneeberger, et al. 2007b; Angelow, El-Husseini, et al. 2007a; Kiuchi-Saishin et al. 2002; Krug et al. 2012)
Rama ascendente gruesa del asa de Henle	3, 10, 14, 16, 18, 19	(Simon 1999; Reyes et al. 2002; Hou et al. 2005; Angelow, Schneeberger, et al. 2007b; Angelow, El-Husseini, et al. 2007a; Kiuchi-Saishin et al. 2002; Konrad et al. 2006)
Túbulo Contorneado Distal	3, 7, 8	(W. Y. Li et al. 2004; Kiuchi-Saishin et al. 2002; Reyes et al. 2002; Gonzalez-Mariscal 2006; Alexandre et al. 2005)
Túbulo Conector	7, 8	(W. Y. Li et al. 2004; Kiuchi-Saishin et al. 2002; Reyes et al. 2002; Gonzalez-Mariscal 2006; Alexandre et al. 2005)
Túbulo Colector	3, 4, 7, 8, 18	(Hou et al. 2010; Angelow, El-Husseini, et al. 2007a; Kiuchi-Saishin et al. 2002; Reyes et al. 2002; W. Y. Li et al. 2004)

La distribución de las claudinas a lo largo de la nefrona correlaciona con la función de cada porción de la misma. Así la expresión de CLDNs que aumentan la permeabilidad se localiza en regiones proximales, especializadas en la reabsorción de sustancias, mientras que las CLDNs más herméticas se localizan en los segmentos más distales de la nefrona. Veamos algunos casos.

Las CLDNs -1 y -2 se expresan en la UE de las células epiteliales parietales del glomérulo. En estudios *in vitro*, se ha demostrado que la CLDN-1 funciona

como una barrera a la conductancia de iones y a la difusión de moléculas de dextrán de 4-40 KDa (Inai et al. 1999; Van Itallie et al. 2001) sugiriendo que puede ser responsable de la función de barrera de la cápsula de Bowman; por otro lado estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado que la CLDN-2 forma un poro catiónico en epitelios laxos (Furuse et al. 1998; Furuse et al. 2001; Kiuchi-Saishin et al. 2002; Amasheh et al. 2002; Yu et al. 2009; Enck et al. 2001). Algunas CLDNs únicamente se expresan durante el desarrollo embrionario. Así en el podocito inmaduro, que es la célula especializada del glomérulo que forma el diafragma en hendidura se expresa la CLDN-6 cuya función se desconoce hasta el momento. La CLDN-5 se expresa a lo largo de la membrana plasmática de los podocitos (Koda et al. 2011), mientras que CLDN-6 se encuentra en la membrana basal y en la base del diafragma en hendidura (Zhao et al. 2008). La CLDN-6 aparece en el adulto durante estados nefróticos y coincide con la desaparición de los pedicelos y la obliteración de los poros de hendidura (Caulfield et al. 1976; Ryan, Leventhal, et al. 1975a; Ryan, Rodewald, et al. 1975b; Pricam et al. 1975)

El túbulo proximal del adulto está recubierto por un epitelio laxo que reabsorbe más de dos terceras partes de la carga filtrada de Cl^- (Karniski et al. 2002; Wagner et al. 2002; Balkovetz et al. 2009), así como dos terceras partes del volumen total del ultrafiltrado glomerular (Rector 1983). Casi la mitad del NaCl es reabsorbido a través de la ruta paracelular (Alpern et al. 1985).

La CLDN-2 está altamente expresada en éste segmento de la nefrona (Enck et al. 2001; Kiuchi-Saishin et al. 2002; Reyes et al. 2002), forma un canal de sodio y un poro de agua para su transporte a través de la ruta paracelular (Muto et al. 2010; Rosenthal et al. 2010). La CLDN-2 también puede transportar K^+ y Ca^{2+} (Yu et al. 2009). La expresión de CLDN-2 en el túbulo proximal es fundamental; ya que se ha demostrado que en la mutación nula de ésta proteína se disminuye la permeabilidad iónica y se reduce la reabsorción de NaCl y agua en túbulos proximales aislados de ratones con ésta mutación (Muto et al. 2010). En el túbulo proximal también se expresan las CLDNs -10 (Gunzel et al. 2009; Muto et al. 2010; Van Itallie et al. 2006), -12 (Abuazza et al. 2006) y -17 (Krug et al. 2012). La CLDN-10 presenta seis isoformas resultantes de procesamientos alternativos: 1) 10a, que incrementa la permeabilidad de Cl^- paracelular y cuyo mRNA se encuentra mayoritariamente en la corteza renal; 2) 10b, que forma un poro selectivo a Na^+ , su mRNA se expresa mayoritariamente en médula renal y, transfectada en células MDCK de alta resistencia, reduce drásticamente la resistencia eléctrica transepitelial; las variantes 10a y b forman poros de baja resistencia (Van Itallie et al. 2006); 3) 10a_v1, que causa una delección en los últimos 57 nucleótidos del exón 1a, no tiene un efecto directo en el transporte, pero modula la permeabilidad aniónica de la variante 10a; 4-6) 10a_v2, 10a_v3 y 10b_v1 que carecen del exón 4 son retenidos en el retículo endoplásmico (Gunzel et al. 2009). Las CLDNs -10a y 17 pueden funcionar como poros selectivos de aniones y podrían ser responsables del transporte paracelular de Cl^- en el túbulo proximal (Krug et al. 2012; Fujita et al. 2008).

En la rama descendente del asa de Henle se expresan las CLDN -2 ((Enck et al. 2001; Kiuchi-Saishin et al. 2002; Reyes et al. 2002), -7 (W. Y. Li et al. 2004; Alexandre et al. 2005; Gonzalez-Mariscal 2006).

En la rama delgada ascendente del asa de Henle se expresan las CLDNS -3, -4, -10, -16, -17, -18, -19 (ver tabla 3); sin embargo, su papel funcional en éste segmento de la nefrona no ha sido estudiado.

En la rama gruesa ascendente del asa de Henle se reabsorbe del 25-45% del Na⁺ filtrado (Giebisch & Windhager 1964); 50-60% del Mg²⁺ filtrado (Cole & Quamme 2000) y 30-35% del Ca²⁺ filtrado (Hebert 2004). En este segmento de la nefrona se transporta activamente Na⁺ y Cl⁻ por la ruta transcelular. El establecimiento de una carga promedio negativa en el intersticio, con respecto al lumen, debida principalmente a la acumulación intersticial de Cl⁻, impulsa la absorción paracelular de Ca²⁺ y Mg²⁺ en esta porción del riñón (Hebert, Culpepper & Andreoli 1981a; Hebert, Culpepper & Andreoli 1981b; Hebert, Culpepper & Andreoli 1981c). Las bases moleculares para la reabsorción de cationes divalentes en ésta porción de la nefrona se desconocían hasta el descubrimiento de las mutaciones de CLDN-16 y -19 como la causa de un desorden renal autosómico recesivo (la hipomagnesemia con hipercalemia y nefrocalcinosis hereditaria, FHHNC por sus siglas en inglés) con y sin afectación ocular (Simon 1999; Konrad et al. 2006). Este desorden se caracteriza por la pérdida renal de Ca²⁺ y Mg²⁺.

En la nefrona distal se localizan los segmentos más herméticos. Los túbulos conectores y el ducto colector tienen una conductancia pasiva de Cl⁻ muy significativa (O'Neil & Boulpaep 1982; O'Neil & Sansom 1984; Sansom et al. 1984). Varias CLDNS como la -3, -4, -7 y -8, se expresan en los túbulos conectores y el ducto colector (W. Y. Li et al. 2004; Kiuchi-Saishin et al. 2002; Alexandre et al. 2005). La CLDN-4 aumenta significativamente la permeabilidad paracelular aniónica incluyendo al Cl⁻ en el ducto colector, en células MDCK que sobreexpresan CLDN-4 disminuye la permeabilidad al Na⁺ e incrementa la RET (Van Itallie et al. 2001; Van Itallie et al. 2003). La CLDN-4 puede ser fosforilada por WNK (*with no lysine kinase*), familia de cinasas localizadas específicamente en las UEs de la nefrona distal. WNK-1 y -4 se encuentran mutadas en el síndrome de Gordon, un trastorno autosómico dominante caracterizado por la presencia de hipertensión e hipercalemia debido a un exceso en la reabsorción de Cl⁻ en la nefrona distal (Yamauchi et al. 2004; Kahle, Macgregor, et al. 2004a; Kahle, Wilson, et al. 2004b), lo que sugiere la participación de la CLDN-4 en la regulación de la permeabilidad paracelular de Cl⁻. Las CLDNs -2, -3, -7 y -8 también pueden ser fosforiladas por cinasas WNK (San-Cristobal et al. 2008; Gamba 2004). Además la aldosterona promueve una fosforilación transitoria en residuos de treonina de CLDN-4 y el incremento paracelular de Cl⁻ en células del ducto colector obtenidas de riñones de rata (Le Moellic 2005), lo que indica que la aldosterona participa en la regulación de CLDN-4 en este segmento de la nefrona.

La CLDN-8 tiene una participación fundamental en la permeabilidad paracelular de Cl⁻ en el ducto colector. En mutaciones nulas para ésta proteína se observa una reducción del transporte paracelular de Cl⁻ similar al observado con CLDN-4. Se ha observado que los efectos de CLDN-8 dependen de la interacción en *cis* de CLDN-8 con CLDN-4. La CLDN-8 es reclutada para que la CLDN-4 se

localice en la membrana, ya que sin la -8, la -4 se confina al retículo endoplásmico y complejo de Golgi (Hou et al. 2010).

El papel funcional de las CLDNs en el túbulo contorneado distal es desconocido.

Otras proteínas de la UE como ZO-1 y OCLN se distribuyen a todo lo largo de la nefrona pero más abundantemente en los segmentos más herméticos (González-Mariscal et al. 2000; Reyes et al. 2002).

3. La Na⁺,K⁺-ATPasa

La Trifosfatasa de Adenosina dependiente de Na⁺ y K⁺ (Na⁺,K⁺-ATPasa), o bomba de sodio, es la enzima de la membrana plasmática que transporta Na⁺ y K⁺ y genera el gradiente iónico característico de las células de los animales (Skou 1957). Es crucial para regular el volumen celular, transportar nutrientes y recuperar la excitabilidad de células eléctricamente activas, entre otras funciones biológicas importantes (scheiner-bobis 2010). Está compuesta de tres subunidades. La α -que presenta tres isoformas- es una proteína transmembranal que atraviesa 10 veces la membrana plasmática, ejecuta el transporte iónico y une a los glicósidos cardiacos (GCs) que inhiben a la enzima (SCHATZMANN 1953). La unión involucra los aminoácidos de la segunda asa extracelular, cerca de la membrana. Así, la subunidad $\alpha 1$ es capaz de unir ouabaína mientras que la $\alpha 2$ no, porque expresa aminoácidos distintos en esa región (Dostanic-Larson 2005). La β -que presenta tres isoformas- atraviesa una sola vez la membrana, es necesaria para el transporte, es una chaperona para el plegamiento correcto de la enzima y su arribo a la membrana (Wetzal et al. 1999) y es además una molécula de adhesión por si misma (Gloor et al. 1990; Shoshani 2005; Padilla-Benavides et al. 2010). La subunidad γ (FXVD) es una proteína transmembranal pequeña que modula la actividad de la enzima y se expresa de manera tejida específica (Figura 7) (Arystarkhova et al. 1999; Arystarkhova et al. 2006; Murray et al. 2003).

Esta visión clásica de la Na⁺,K⁺-ATPasa, derivada de numerosos trabajos realizados desde que la Na⁺,K⁺-ATPasa fue descubierta por Skou en 1957, se ha enriquecido recientemente con la demostración de que:

1. Es la bomba que genera el gradiente iónico crucial no sólo para el transporte transmembranal, sino para el transepitelial. Desde hace tiempo se sabe que el transporte es inhibido con alta especificidad y afinidad por tóxicos vegetales, especialmente la ouabaína. Como discutiré adelante, estos inhibidores han pasado a ser considerados hormonas reguladoras de diversas funciones (Contreras et al. 2006).
2. Es un transductor de señales. Al unir a sus ligandos como la ouabaína, la Na⁺,K⁺-ATPasa se transloca a un compartimento caveolar junto a otras proteínas y activa rutas de señalización intracelular (Z. Xie & Askari 2002; Aperia 2007; Liang et al. 2007).
3. Es una molécula de adhesión. Precisamente la propiedad adhesiva de la bomba (Gloor et al. 1990; Shoshani 2005) es crucial para que se exprese polarizadamente e impulse el transporte transepitelial (Shoshani 2005; Padilla-Benavides et al. 2010).

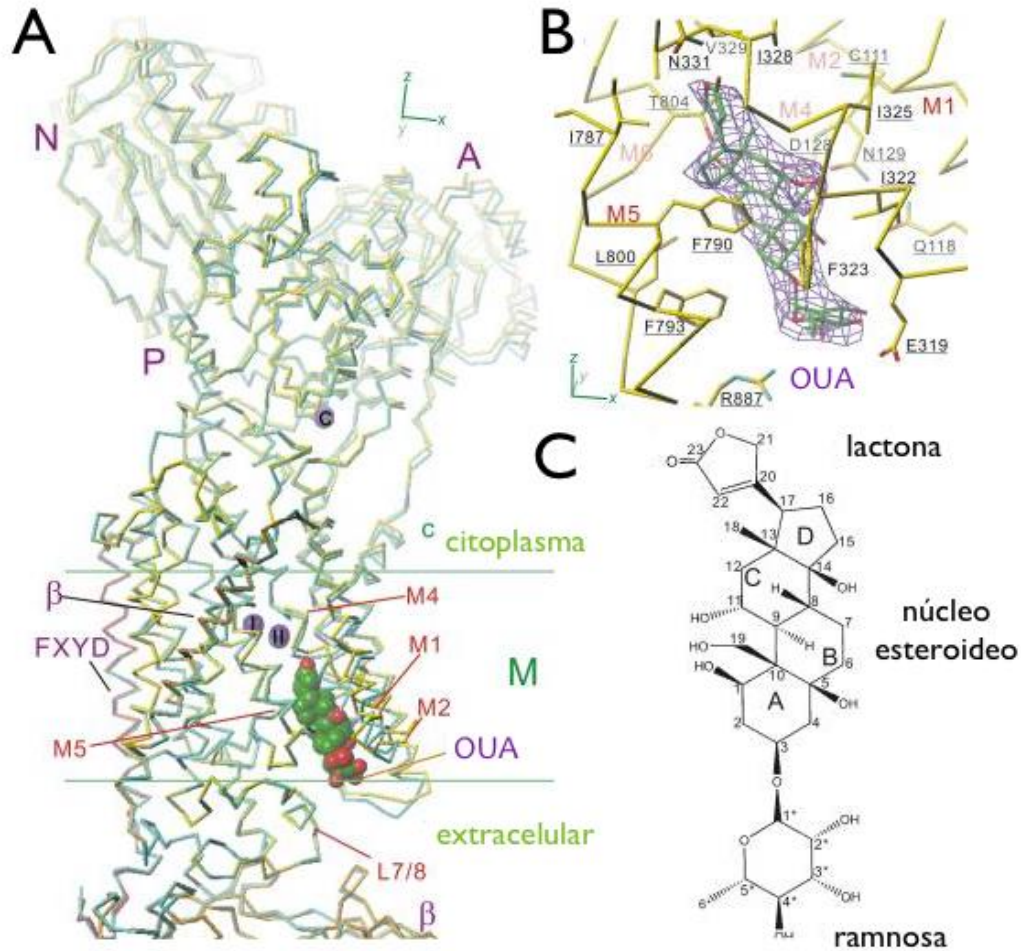


Figura 3. Estructura cristalina de la Na⁺,K⁺-ATPasa unida a Ouabaína. (A) Superposición a lo largo de la membrana plasmática de los trazadores de α de Na⁺,K⁺-ATPasa de glándula anal de tiburón en un estado unido a ouabaína (amarillo); y no unido a ouabaína (cian). La Na⁺,K⁺-ATPasa está fijada en un estado E2·K⁺·Pi. Los Iones y K⁺ (I, II, y c; morado); ouabaína (verde y rojo OUA) se muestran en los espacios llenos. La β -subunidad, la proteína FXYP, 3 dominios citoplásmicos (A, N, y P), y varias hélices transmembrana están marcados. Las líneas horizontales verdes indican la posición aproximada de la bicapa lipídica (M). (B) Un espacio omitido de unión a ouabaína en 3 σ , superpuestos sobre el modelo atómico final. El subrayado indica que los residuos han sido identificados afectables a la unión de ouabaína por mutagénesis. (C) Un diagrama de ouabaína. Modificado de Ogawa 2009 (Ogawa et al. 2009).

3.1 La Na⁺,K⁺-ATPasa en la Hipertensión

La conexión entre la actividad disminuida de la Na⁺,K⁺-ATPasa y la hipertensión experimental fue propuesta por Haddy y colaboradores en 1976. El primer mecanismo integral y comprensible que relacionaba inhibidores de la bomba de sodio con la actividad arterial de la misma Na⁺,K⁺-ATPasa, el metabolismo del calcio y la hipertensión fue propuesto por Blaustein un año después (Blaustein 1977). Blaustein propuso que tres entidades moleculares trabajan juntas para elevar la concentración de calcio intracelular (Ca²⁺_i) y el tono arterial, lo cual podía explicar la causa de la hipertensión. Los componentes de esta triada molecular incluyen: 1) una molécula circulante en el plasma, análogo a la ouabaína que abate la actividad de extrusión de Na⁺; 2) Una bomba de sodio de miocitos vasculares, sensible a ouabaína; 3) Un sistema de

transporte membranal que específicamente intercambie iones Na^+ por iones Ca^{2+} y que traduzca los efectos de reducción en la actividad de la bomba de sodio en cambios en el diámetro arterial debidos a los iones de Ca^{2+} .

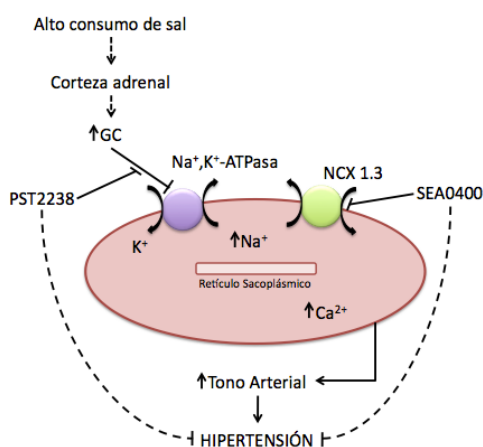


Figura 4. Mecanismo del incremento a largo plazo del tono vascular en hipertensión sensible a sal. Modelo propuesto por Blaustein en 1977, en el que relaciona la ingesta de sal con el aumento de glucosidos cardíacos (GC), la activación de la bomba de Na^+ y la inactivación del intercambiador de sodio/calcio (NCX) con la génesis de la hipertensión. PST2238: análogo de la digoxina que bloquea la acción de ouabaína. SEA0400: inhibidor del NCX. Modificado de Blaustein 1977.

En la figura 8 se muestra el esquema de un miocito vascular que incluye los elementos moleculares originales propuestos por Blaustein en 1977; en ese entonces, las pruebas de que un factor humoral fuera el responsable de la génesis de la hipertensión eran escasas. Adicionalmente la existencia del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ vascular estaba en duda (Mulvany et al. 1991), y no había evidencia clínica relevante de que los inhibidores de la bomba de sodio realmente disminuyeran la presión arterial de pacientes con hipertensión arterial (Abarquez 1967).

La principal evidencia que une a los inhibidores de la $\text{Na}^+,\text{K}^+ \text{-ATPasa}$ con niveles elevados de la presión arterial, es la caída en el transporte activo de Na^+ que se induce al adicionar muestras hervidas de plasma, obtenidas de animales hipertensos, sobre preparaciones vasculares aisladas (Haddy & Overbeck 1976).

Para detallar el papel de la bomba de Na^+ en la génesis de la Hipertensión, es necesario antes, hablar de los glicosidos cardíacos, sus inhibidores naturales y más específicamente de la ouabaína.

4. LA OUABAÍNA

Es el glicósido cardiaco (GC) más conocido, se extrae de las semillas de *Strophantus gratus*, y de la corteza de *Acokanthera schimperi* y de *Acokanthera ouabaio* (Hamlyn et al. 1996). Otros glicósidos cardiacos, por ejemplo digoxina y digitoxina, se extraen de plantas del género *Digitalis* (*D. purpurea*, *D. lanata*, etc.), por lo que también se les denomina digitálicos. Cada glicósido está constituido por: 1) un grupo glicona compuesto por varias moléculas de azúcar, 2) un grupo aglicona formado por un núcleo esteroideo ciclopentanoperhidrofenantreno y 3) un grupo funcional que se localiza en el carbono 17 de la aglicona. Este último define la clase de glicósido; es decir, si es cardenólido o bufodienólido (Figura 9). La ouabaína es un cardenólido. Extractos de plantas que contienen GCs se han usado desde hace más de 200 años (William Withering, 1785) para tratar la insuficiencia cardiaca congestiva (Altamirano et al. 2006).

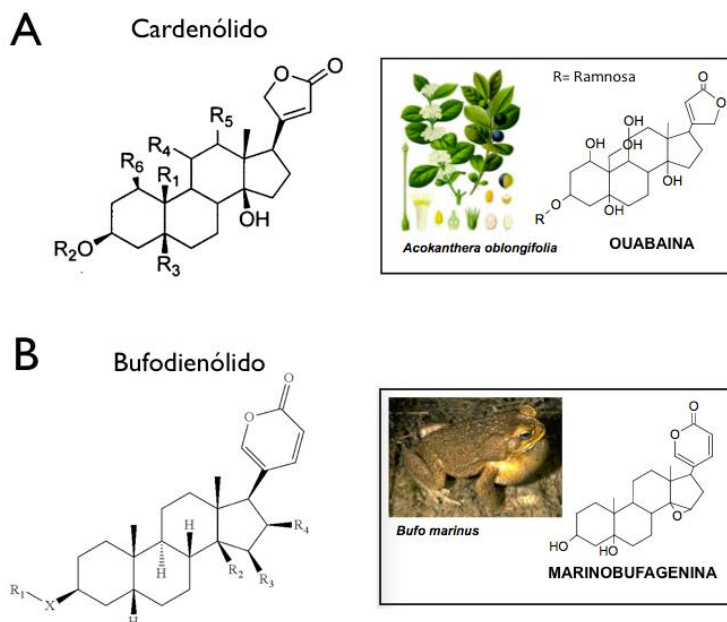


Figura 5. Estructura de los Glicosidos Cardíacos. (A) Los GCs pueden ser cardenólidos, como la Ouabaína o (B) bufodienólidos, como la marinobafagenina. Dependiendo del grupo que expresen en el C-17 del anillo ciclopentanoperhidrofenantreno. Su identidad también depende del grupo químico que expresan en R. Modificado de (Bagrov et al. 2009).

4.1 La ouabaína: fármaco para tratamiento médico y tóxico de origen vegetal.

El efecto farmacológico principal de los glicósidos cardiacos es el aumento dosis dependiente de la fuerza de contracción del miocardio o “efecto inotrópico positivo”, que explica el mecanismo de acción de los GCs en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca congestiva (Mohammadi et al. 2003). Este efecto se ha atribuido a que la inhibición parcial de la Na^+, K^+ ATPasa, con dosis no saturantes de ouabaína, aumenta la concentración intracelular de sodio ($[\text{Na}^+]_i$) y disminuye

la del potasio ($[K^+]_i$). La disipación del gradiente de $[Na^+]$ reduce la actividad del intercambiador Na^+/Ca^{2+} de la membrana plasmática y en consecuencia aumenta el Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), que a su vez activa el aparato contráctil (Hauptman & Kelly 1999). Alternativamente se ha planteado que la inhibición de la Na^+,K^+ -ATPasa produce señales intracelulares que aumentan la fuerza de la contracción (Hauptman et al. 1999). Además del efecto inotrópico, los glicósidos cardiacos ejercen efectos tóxicos severos sobre el corazón y los sistemas nervioso y gastrointestinal. De hecho, tribus africanas han aplicado extractos de plantas que los contienen en puntas de flecha para la caza (De Mello 1989). El mecanismo del efecto tóxico se atribuye a que la inhibición total de la Na^+,K^+ -ATPasa produce una disminución de $[K^+]_i$ y una sobrecarga de $[Ca^{2+}]_i$, de forma que la homeostasis no se puede mantener y sobreviene la muerte celular (Ramirez-Ortega et al. 2002).

4.2 La ouabaína ¿una hormona?

La unión tan específica y afín de la ouabaína a la Na^+,K^+ -ATPasa sugirió la existencia de análogos endógenos, de la misma forma que los opioides de plantas, llevaron a sospechar de la evidencia de las endorfinas endógenas (Hughes et al. 1975). En 1991 se demostró que hay una sustancia en el plasma humano indistinguible de la ouabaína vegetal (Hamlyn et al. 1991). La ouabaína endógena (OE) podría provenir de la dieta (Kitano et al. 1998) o de síntesis endógena. Sin embargo, la cancelación de toda fuente posible de ouabaína de la dieta, no produce su disminución en el plasma, células de la corteza suprarrenal de bovinos liberan ouabaína *in vitro* (Doris et al. 1996) y bajo el estímulo de la angiotensina II (Laredo et al. 1994; Laredo et al. 1995; Laredo et al. 1997). La pregnenolona y la progesterona podrían ser precursores de la ouabaína (Perrin et al. 1997; Komiyama et al. 2001), y la inhibición de la 3β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa estimula la síntesis de ouabaína (Schoner 2002). Algunos tumores de glándula suprarrenal producen tanta ouabaína, que su concentración en el plasma sube de 1 nM a cerca de 1 μ M (Komiyama et al. 2001).

Los glicósidos estimulan la síntesis de glucógeno (Kotova et al. 2006), hipertrofian células epiteliales y cardiacas (Huang et al. 1997), alteran la proliferación (Khundmiri et al. 2006) e inducen muerte celular (Kulikov et al. 2007). Los efectos inducidos por los cardiotónicos esteroideos involucran re-arreglos moleculares complejos, que incluyen la asociación con receptores como el del Factor de Crecimiento Epidérmico (Haas 2002) y el del IP_3R (Miyakawa-Naito et al. 2003). Sin embargo, hay asociaciones de la Na^+,K^+ -ATPasa con otras proteínas, que podrían ser reguladas por la ouabaína. Así, la subunidad α de la Na^+,K^+ -ATPasa de las células gliales del órgano subfornical, se une a los canales de sodio Na_x , homólogos a los dependientes de voltaje. La entrada de Na^+ a través del canal, activa a la Na^+,K^+ -ATPasa y consecuentemente al metabolismo de la glucosa (Shimizu et al. 2007). Esta misma subunidad también interactúa con la Policistina-1 renal, modulando así el transporte de iones y la producción de fluido tubular (Zatti et al. 2005) (tabla 4). Todas estas evidencias sugieren que la ouabaína actúa como una hormona. Es posible que los GC constituyan hormonas

que regulan la adhesión epitelial pues, en cultivos celulares se ha demostrado que la ouabaína y la Na^+/K^+ -ATPasa tienen una relación directa con la adhesión al sustrato (Contreras et al. 1999).

La ouabaína endógena aumenta fisiológicamente rápida y transitoriamente con el ejercicio (Antolovic et al. 2000; Schoner 2002; Bauer 2005), y en situaciones patológicas como: la hipertensión, la insuficiencia cardiaca (Gottlieb et al. 1992) y la preeclampsia (Lopatin et al. 1999).

4.3 Elevación de la Ouabaína Endógena y la Hipertensión

Se ha observado un aumento del 55% de Ouabaína Endógena en el plasma de pacientes con tumores adrenocorticales causando exceso de aldosterona e hipertensión esencial (Rossi et al. 1995). Los niveles de OE están incrementados de un 30-200% en muchas formas de hipertensión, incluyendo hipertensión esencial (Masugi et al. 1986; Hasegawa et al. 1987; Masugi et al. 1987; Rossi et al. 1995; Goto et al. 1992; Pierdomenico et al. 2001).

Análisis en plasma de pacientes con hipertensión esencial muestran que entre el 45 y el 50% los pacientes no tratados mantienen elevados los niveles circulantes de OE. Análisis de regresión múltiple revelan una relación significativa entre la presión arterial, el índice de masa corporal, la edad y la OE; mientras que los mismo parámetros no están asociados al sistema renina-angiotensina-aldosterona (Rossi et al. 1995; Manunta et al. 2010; Pierdomenico et al. 2001).

La administración periférica y prolongada de ouabaína induce hipertensión sostenida en la rata (Anon 2003; Anon 1993). En ratas preñadas que desarrollan hipertensión debido a que se les administran dietas ricas en sal, un modelo animal de la preeclampsia, la inyección intravenosa de anticuerpos contra el GC marinobufagenina restablece la presión arterial normal (Vu et al. 2005). Por otro lado, mientras que los ratones normales desarrollan hipertensión cuando se les administra ouabaína crónicamente, los transgénicos que expresan una subunidad $\alpha 1$ "resistente" a la ouabaína no lo hacen, poniendo en evidencia el papel regulador de la presión arterial que tienen los GCs y la Na^+/K^+ -ATPasa (Dostanic-Larson 2005; Dostanic-Larson et al. 2005).

En humanos sanos y con hipertensión, la administración aguda de GC evoca incrementos transitorios de la presión arterial y aumenta la respuesta presora de agentes vasoactivos (Pidgeon et al., 1994; Cappuccio et al., 1986; Guthrie et al., 1984). En pacientes con compromiso cardiovascular reflejo, la administración de ouabaína aumenta la presión arterial dramáticamente (Mason et al., 1964; Kumar et al., 1973; Ross et al., 1960). Además, un análogo sintético de la digoxina, la rostafuroxina, que fue desarrollado como un antagonista del receptor de ouabaína, disminuye la presión arterial en hipertensión inducida por ouabaína (Ferrari et al., 1998). De manera similar a la reducción de OE en

humanos con anticuerpos contra la digoxina, la rostafuroxina disminuye la presión en ratas con hipertensión y en mujeres con eclampsia (Goodlin et al., 1988; Kunes et al., 1985; Huang et al., 1984; Mann et al., 1987; Balzan et al., 1991). A la inversa, la hipersecreción de OE por tumores adrenocorticales está asociada invariablemente con la hipertensión (Masugi et al., 1988; 1986; Rossi et al., 1995; Manuta et al., 1992; Komiyama et al., 1999).

La rostafuroxina que antagoniza selectivamente los efectos de las OEs, y bloquea la Na⁺,K⁺-ATPasa, se desarrolló específicamente para el tratamiento de la hipertensión arterial sensible a sal de aquellos pacientes que tienen una mutación en la α -aducina, es decir, aquellos pacientes que presentan el polimorfismo Gly460Trp. En el estudio multicéntrico OASIS-HT (un estudio clínico controlado fase 2), cuyo objetivo fue encontrar la dosis de rostafuroxina para pacientes con hipertensión, se concluyó que de los 5 estudios cruzados en los que se utilizó un arreglo de doble ciego la rostafuroxina no disminuye la presión arterial a ninguna dosis. Lo que permite suponer que hay otros mecanismos involucrados en el desarrollo de la hipertensión de pacientes con el polimorfismo Gly460Trp.

Tabla 4. Interacción de la Na⁺,K⁺-ATPasa con algunas proteínas

Na ⁺ ,K ⁺ -ATPasa	Proteína con la que interactúa	Tipo celular	Función	Referencia
Subunidad α	Src Tyr ⁴¹⁸	Miocitos cardíacos, LLCPK-1, MDCK, A7r5	Transactivación del EGFR por la activación de Src, inducido por ouabaina	(Haas 2002)
Subunidad α	Policistina-1 (PC-1, unida por el extremo carboxilo)	Riñón <i>in situ</i> (de ratones transgénicos que sobreexpresan PC-1), MDCK y CHO	Regulación de la actividad de la bomba de sodio, modula el volumen del fluido tubular renal y el transporte de electrolitos	(Zatti et al. 2005)
Subunidad β	Subunidad β	MDCK, CHO (transfectadas con subunidad β de perro)	Molécula de adhesión	(Shoshani 2005)
Subunidad α_1	Proteína fosfatasa 2A (PP2A)	Células epiteliales de alveolos	Reclutamiento de la bomba de Na ⁺ a la membrana plasmática cuando hay un estímulo por agonistas de los Receptores Acoplados a Proteínas G (GPCR)	Lecuona et al., 2006
Subunidad α	Canal Na _x	Órganos subfornical (SFO), especialmente en las células gliales	Activación metabólica de las células gliales, dependiente de Na ⁺	(Shimizu et al. 2007)
N-terminal	IP ₃ R (unida por el	Astroцитos del	Forman un	Liu et al., 2007

	extremo amino) y Anquirina	hipocampo	microdominio de señalización que en presencia de ouabaína evocan oscilaciones de Ca ²⁺	
--	----------------------------	-----------	---	--

4.4 La ouabaína afecta la adhesión epitelial.

Cuando las células epiteliales MDCK (renales de perro) se incuban con ouabaína, se despegan del sustrato y de sus vecinas siguiendo una cadena de eventos que se denomina mecanismo P→A (Pump, Attachment) y que consiste en: 1) la unión del fármaco a su receptor, la Na⁺/K⁺-ATPasa, 2) la activación de cinasas de tirosinas (CTs) y reguladas extracelularmente (ERK1/2), 3) un aumento de la proteína p190^{Rho-GAP}, inactivadora de la proteína pequeña que une GTP RhoA, 4) la disminución del contenido celular de RhoA y 5) la internalización y degradación de varias moléculas componentes de las uniones celulares y en consecuencia, el despegue celular de la matriz extracelular y la muerte celular (Contreras et al. 1999)(Contreras et al., 1999; Contreras et al., 2004; Contreras et al., 2006).

También se ha demostrado que altas dosis de ouabaína inhiben a la bomba de sodio y abren UEs, proceso que puede simularse depletando el K⁺ del medio de baño (extracelular), lo que sugiere que es el cambio iónico el que provoca la apertura (Rajasekaran et al. 2003). Sin embargo, puesto que la ouabaína activa señales intracelulares, es posible que éstas participen en el despegue y que incluso, sean el factor determinante (Contreras et al., 2006).

La ouabaína también activa otras rutas de señalización como las de las especies reactivas al oxígeno (ROS) que llevan a la hipertrofia celular (Xie et al., 1999; Chen et al., 2007). Las ROS regulan diversas rutas de señalización a través de la oxidación reversible de fosfatasa, que junto con algunas cinasas de tirosina mantienen la homeostasis normal de fosforilación/defosforilación en tirosinas, como sucede, por ejemplo, al tratar células epiteliales con el factor de crecimiento derivado de plaquetas (Chen et al., 2007). La ouabaína también activa rutas que involucran al receptor del inositol 1,4,5- trisfosfato (InsP₃R) (Aizman et al., 2001; Miyakawa-Naito et al., 2003; Schoner, 2002) pues al inhibir parcialmente la actividad de la bomba de sodio, se inducen oscilaciones lentas de [Ca²⁺]_i, dependientes del InsP₃R, que producen aumentos de NF-κB y cAMP y protegen a las células renales de la muerte (Miyakawa-Naito et al., 2003). Los efectos de la ouabaína sobre la adhesión se deben más a la activación de las rutas mencionadas que a la inhibición del bombeo o los cambios intracelulares de Na⁺ y K⁺. Así, la disminución del [K⁺]_i intracelular, producido por una disminución de éste ion (0.1 mM de K⁺) en el medio de baño y en ausencia de ouabaína, no despega a las células MDCK del sustrato (Contreras et al. 2004).

Cambios en la adhesión como los inducidos por la ouabaína juegan un

papel preponderante en situaciones patológicas como el cáncer. Debido a que la Na⁺,K⁺-ATPasa está involucrada en la adhesión celular, a que funciona como una molécula muy versátil transductora de señales y que además tiene una expresión aberrante implicada en el desarrollo y progresión del cáncer de mama, se ha sugerido que la ouabaína y la Na⁺,K⁺-ATPasa podrían ser blancos para el desarrollo de fármacos anti-cáncer (Chen et al. 2006).

4.5 La ouabaína, en alta dosis, promueve la internalización de las proteínas de la UE vía EGFR-cSrc-ERK1/2.

En mi tesis de maestría describí que altas dosis de ouabaína (300 nM) inducen la apertura de la UE, pues provocan una caída de la RET en monocapas de células epiteliales MDCK cultivadas sobre filtros (Figura 10A). Para investigar si la apertura de la UE por la OUA está mediada por la ruta EGFR-cSrc-ERK1/2, agregué al medio inhibidores específicos del EGFR (PD153035, 2.5 μM, cuadros grises), cSrc (PP2, 10 μM, triángulos grises; SU6656 10 μM, triángulos grises invertidos) y ERK1/2 (PD98059 25 μM, rombos grises) (Figura 10B). A las 4 h, todos los inhibidores evitaron la caída de la RET, a las 6-8 h, solo los inhibidores de c-Src y ERK1/2, mientras que a las 10 h solo el inhibidor de ERK1/2 (Figura 10B). Estos resultados indican que la OUA induce la apertura de las UEs a través de la ruta EGFR-cSrc-ERK1/2.

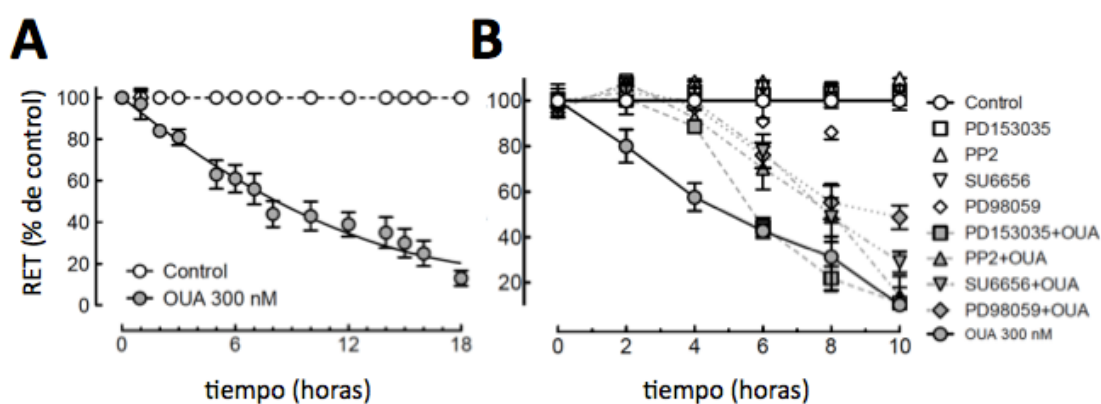


Figura 6. Resistencia Eléctrica Transepitelial de monocapas de células MDCK bajo diferentes condiciones. (A) La ouabaína 300 nM (círculos grises) induce la caída de la RET de manera gradual. (B) el efecto de la ouabaína (círculos grises), se ve retrasado, sobre todo en tiempos tempranos, cuando se utilizan inhibidores del EGFR (PD153035 2.5 μM, cuadros grises), cSrc (PP2, 10 μM triángulos grises; SU6656 10 μM triángulos grises invertidos) y ERK1/2 (PD98059 25 μM, rombos grises). Rincón-Heredia 2008, tesis de maestría.

El hecho de que la OUA induzca la caída de la RET sugiere que esta sustancia está induciendo internalización de los componentes de la UE. Para demostrar esta posibilidad, teñí por inmunofluorescencia a las CLDNs -2 y -4, a la OCLN y a ZO-1. En la figura 11 se observa que las células MDCK, sembradas sobre filtros, expresan sus proteínas de la UE en la membrana plasmática, en un patrón típico de panal de abeja. 10 h de tratamiento con 300 nM de OUA inducen la internalización de todas las proteínas y un aumento de la señal intracelular. Este efecto se bloquea cuando las monocapas se incuban 30 min antes y durante la incubación con OUA, con los inhibidores arriba mencionados (Figura 11),

demonstrando que el EC induce internalización de las proteína de la unión mediante la activación de c-Src y ERK1/2.

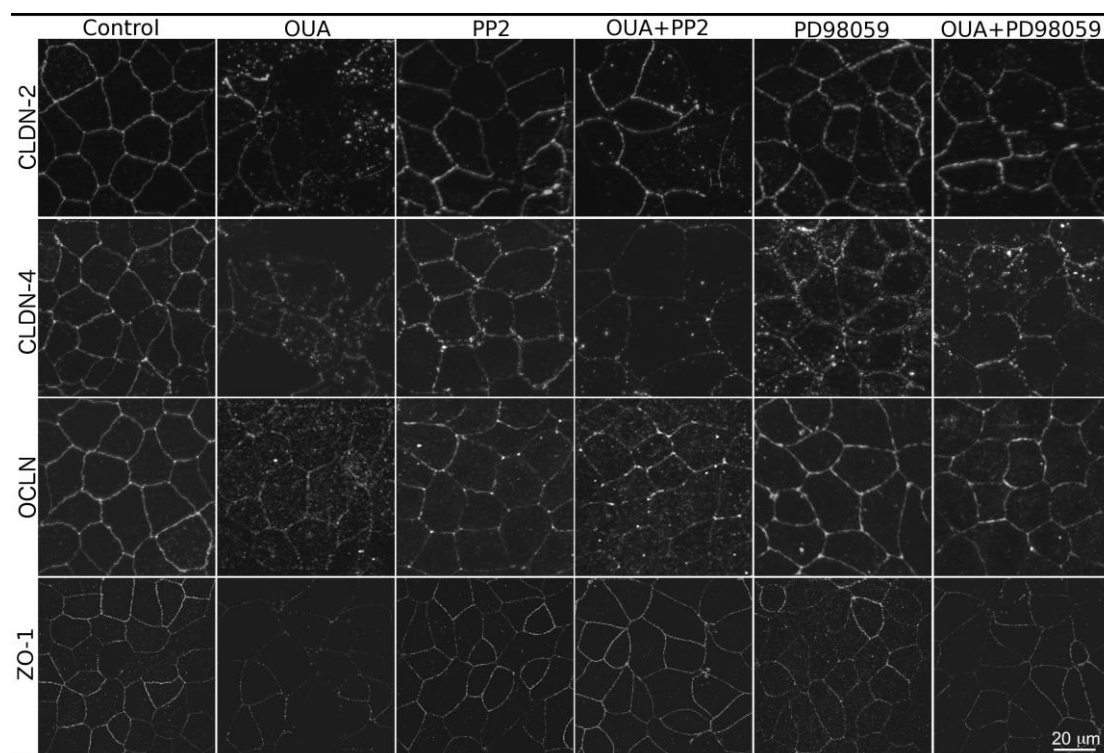


Figura 7. Internalización de la UE inducida por OUA. Monocapas de células epiteliales MDCK fueron cultivadas con y sin OUA (300 nM) en presencia o ausencia de inhibidores de cSrc (PP2 10 μM) y ERK1/2 (PD98059 25 μM), adicionados 30 minutos antes del tratamiento con OUA. Se realizó la tinción para diferentes proteínas de la UE: CLDN-2, -4, OCLUDINA y ZO-1. Observe que en todos los casos la OUA induce la internalización de las proteínas de la UE y que dicho efecto se previene en gran medida al utilizar el tratamiento concomitante OUA+inhibidor (10 h). Rincón-Heredia 2008, tesis de maestría.

La inhibición de cSrc y ERK1/2 retrasan la caída de la RET inducida por OUA a tiempos largos; por ello decidimos utilizar estos inhibidores para evaluar la localización de las proteínas de la UE cuando células MDCK son cultivadas con OUA. La OUA desorganiza e induce la internalización de las proteínas de la UE CLDN-2, -4, OCLN y ZO-1 (figura 11). Tal fenómeno se previene cuando las células son pretratadas con inhibidores de cSrc (PP2 10 μM) y ERK1/2 (PD98059 25 μM), pues se observa una mayor continuidad en la expresión membranal de las proteínas de la UE, así como un menor contenido intracelular. Los inhibidores por sí mismos no tienen un efecto sobre las proteínas de la UE.

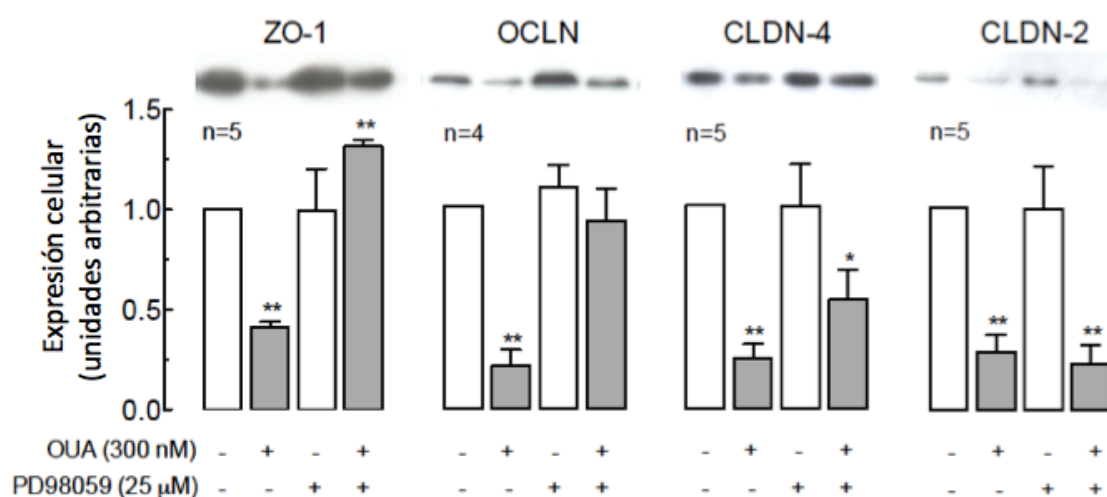


Figura 8. Disminución en el contenido celular de proteínas de la UE. En todas las proteínas de la UE que estudiamos (ZO-1, CLDN-2, -4 y OCLN) se observa una reducción en sus niveles de expresión cuando son tratadas con OUA (300 nM); éste efecto se revierte totalmente cuando las células son pretratadas con el inhibidor de ERK1/2 (PD98059 25 μM) en el caso de ZO-1 y OCLN, parcialmente para CLDN-4 pero no en el caso de CLDN-2. Rincón-Heredia 2008, tesis de maestría.

Altas concentraciones de OUA inducen la degradación de las moléculas de adhesión (Contreras et al., 1999). Sin embargo, la UE es una estructura compleja, con diversos componentes proteicos, cada uno de los cuales confiere características específicas a la unión. Por esta razón podría esperarse que cada componente tenga una regulación específica. En la figura 11 se observa que la OUA (300 nM) disminuye el contenido celular total de ZO-1, OCLN, CLDN-2 y CLDN-4 (Figura 12, segunda vs primera columnas), pero el PD98059, inhibidor de ERK1/2, impide la disminución de ZO-1 y OCLN, parcialmente la de la CLDN-4, pero no la de la CLDN-2.

La dinamina es una GTPasa esencial para la formación de vesículas recubiertas de clatrina. Es una enzima mecanoquímica que es la responsable directa de la fisión de las vesículas nacientes; se ensambla como un collar “en el cuello” alrededor de las invaginaciones recubiertas de clatrina que aún están unidas a la membrana plasmática y tras un cambio conformacional que acompaña la hidrólisis de GTP, seguida de la constricción y escisión de la vesícula, permite la formación y liberación de la vesícula recubierta de clatrina (Danino et al. 2004; Macia et al. 2006).

La dinamina es necesaria para la fisión de las vesículas recubiertas de clatrina y que dichas vesículas siguen la ruta de endocitosis clásica que comprende la fusión de la vesícula con los endosomas tempranos, los cuales se convierten en un punto de control en donde se gobierna el destino de las proteínas que se encuentran dentro del compartimento, que pueden ser dirigidos al endosoma de reciclamiento para regresar las moléculas endocitadas a la superficie celular, o bien, ser dirigidos a un endosoma multivesicular y posteriormente a endosomas tardíos para su degradación en los lisosomas (Le Roy and Wrana 2005; Ivanov et al., 2004; 2006).

Si bien la ouabaína induce la internalización y la disminución de del contenido total de las proteínas de la UE en las células MDCK utilizando diferentes rutas de señalización, no está claro todavía qué tipo de internalización está involucrada ni si la OUA induce degradación de las proteínas o la inhibición de su síntesis, sin afectar el recambio. Además es necesario investigar si este mecanismo se presenta en las células epiteliales de un organismo animal, en el que la ouabaína se encuentre aumentada de manera endógena, como puede suceder en la hipertensión.

5. HIPÓTESIS

La ouabaína induce la endocitosis mediada por clathrina y dinamina de las proteínas de membrana de la UE, así como su degradación en el lisosoma, tanto en células epiteliales en cultivo como en ratas con hipertensión sensible a sal, condición en la que los niveles de esteroides endógenos (ouabaína y marinobufagenin), se encuentran elevados.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Identificar la ruta de degradación de proteínas de la UE, inducida por ouabaína en un modelo *in vitro* e investigar si este mismo proceso de degradación ocurre en un modelo *in vivo* de Hipertensión sensible a sal.

6.2 Objetivos particulares

- Investigar si la OUA induce la endocitosis dependiente de dinamina de las proteínas de la UE
- Estudiar si la degradación de las proteínas de la UE se realiza en el lisosoma o en el proteasoma
- Implementar un modelo de Hipertensión Arterial *in vivo* sensible a sal en el cual aumente la concentración de ouabaínas endógenas.
- Analizar la expresión de las proteínas de la UE a lo largo de la nefrona de la rata normotensa e hipertensa por microscopia confocal.
- Comparar si los cambios en la expresión y distribución de proteínas de la UE que se observan *in Vitro* suceden de manera similar en el epitelio renal de ratas con hipertensión sensible a sal.

7. RESULTADOS

En primer lugar investigamos el mecanismo celular que activa la OUA para internalizar a las proteínas de la UE.

7.1 La internalización de proteínas de la UE inducida por OUA depende de Dinamina.

Para investigar el mecanismo de internalización de las proteínas de la UE, utilizamos dynasore (80 μ M, DYN), un inhibidor no competitivo de la actividad GTPasa de la dinamina que consecuentemente bloquea la fisión de las vesículas endocíticas (Macia et al., 2006).

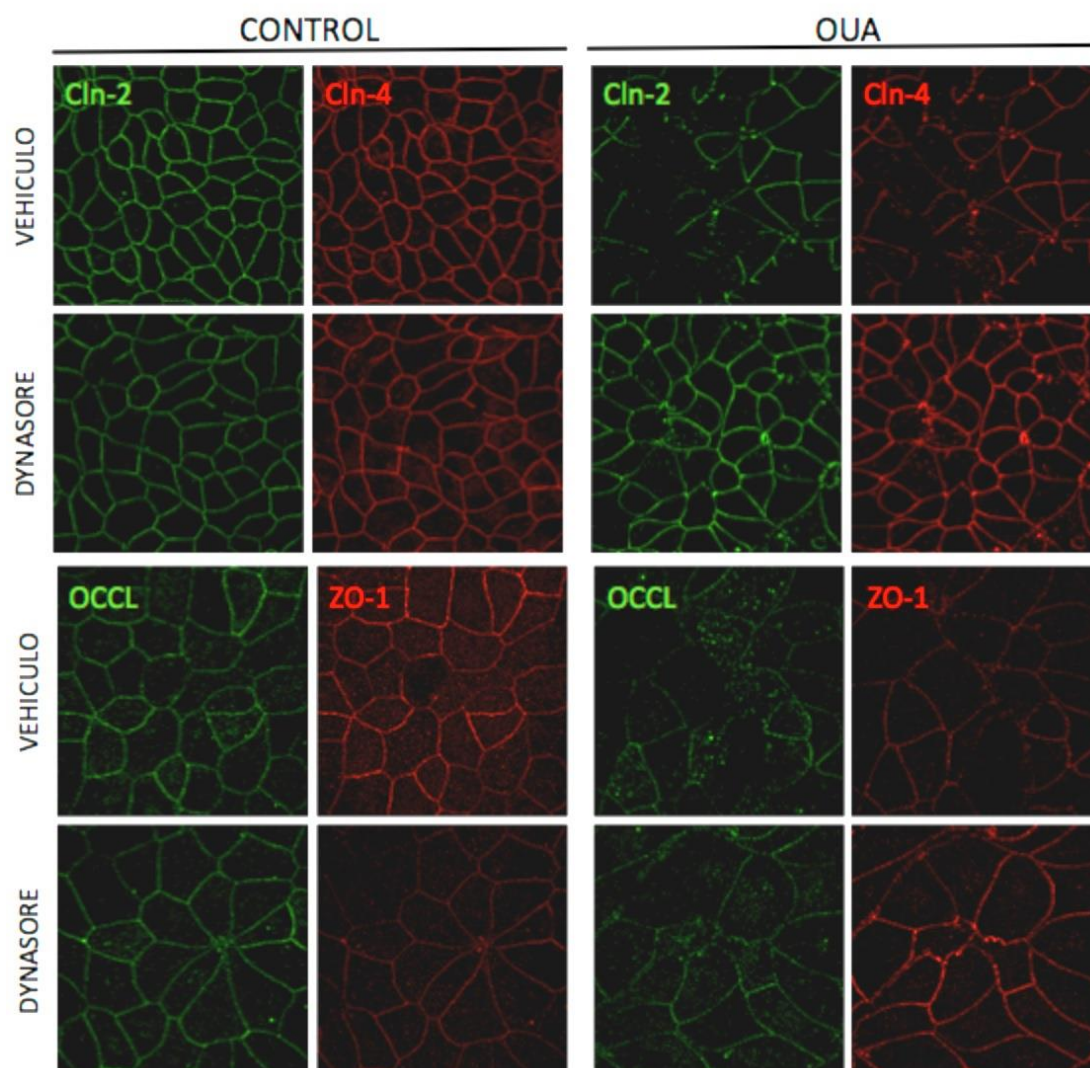


Figura 9. La internalización de las proteínas de la UE inducida por OUA depende de dinamina. Células MDCK sembradas en insertos Transwell® fueron tratadas con y sin OUA (300 nM) durante 10 h. DYN (80 μ M) un inhibidor de la actividad GTPasa de la dinamina fue preincubado 30 minutos antes de

adicionar OUA. Las células fueron marcadas con anticuerpos que reconocen CLDN-2, -4, OCLN Y ZO-1. El proceso de endocitosis de las proteínas de la UE inducido por OUA, depende de dinamina ya que es bloqueado por DYN.

En la figura 13 se observa el patrón de “malla de gallinero” típico de células epiteliales (CONTROL, columna 1), cuando las células son tratadas con OUA (300 nM, 10 h) se pierde dicho patrón y se observa una disminución en la marca de membrana y relocalización hacia el interior celular de las proteínas de la UE (CLDN-2, -4, OCLN y ZO-1. Columna 2). El DYN previene el proceso de internalización inducido por OUA (OUA+DYN, columna 4) y demuestra que se lleva a cabo mediante la endocitosis dependiente de dinamina. Por sí solo, el DYN no afecta la estructura celular ni la localización de las proteínas de la UE estudiadas.

Debido a que en las imágenes anteriores se observa menor señal fluorescente de CLDN-2, -4, OCLN y ZO-1 en la membrana cuando las monocapas de células MDCK se incuban con OUA, cabe la posibilidad de que este Esteroide Cardiotónico interfiera con el tráfico vesicular. Por ello estudiamos por microscopia confocal, si CLDN-2 colocaliza con Rab11 en células incubadas con OUA durante 6 h, un tiempo al que la degradación es todavía baja. Rab11 es un marcador del endosoma de reciclamiento. En el control de la Figura 14 la señal intracelular de Rab11 (rojo) no colocaliza con la de la CLDN-2 (verde). Esto indica que la CLDN-2 no se recicla a través de este compartimento o que lo hace a una alta velocidad. La OUA induce un aumento de la señal intracelular pero no la colocación de ambos marcadores. Sin embargo, la OUA aumenta drásticamente el tamaño de los endosomas, fenómeno que se observa cuando el tráfico se altera, por ejemplo, por la interferencia de la expresión de la proteína Rab11 (Takahashi et al., 2011). Estos resultados demuestran que la OUA altera el tráfico vesicular.

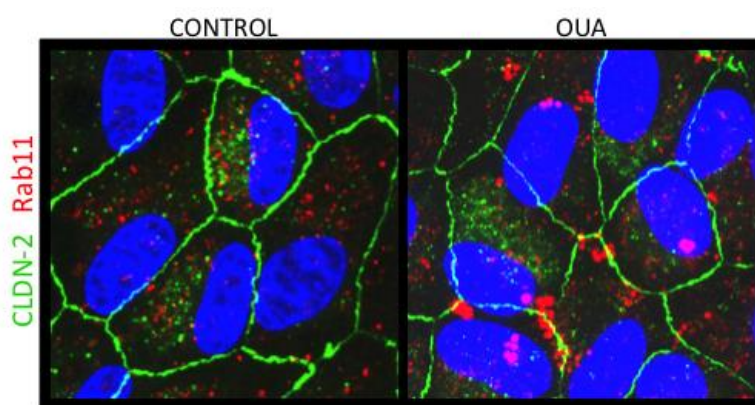


Figura 10. La endocitosis de CLDN-2 inducida por OUA no está mediada por el endosoma de reciclamiento. Células MDCK tratadas con y sin OUA (300 nM) por 6 h fueron fijadas y marcadas con anticuerpos específicos contra CLDN-2 (verde) y Rab11 (rojo), un marcador del endosoma de reciclaje. Se observa mayor contenido intracelular de CLDN-2 en aquellas células tratadas con OUA, así como un mayor tamaño en los endosomas de reciclaje en la misma condición. A pesar de ello, no se observan sitios de colocalización.

7.2 La degradación de los componentes de la UE inducido por OUA se lleva a cabo en el lisosoma

El siguiente paso fue investigar el sitio de degradación de los componentes de la UE. Las CLDN-1 y -2 se ubiquitinan pero no se degradan en el proteasoma Takahashi et al. (2008), mientras que, la CLDN-5 es ubiquitinada y degradada en el proteasoma o, alternativamente, a través de una vía lisosomal indirecta, que es sensible a la inhibición del proteasoma pero no requieren de la ubiquitinación de CLDN-5 (Mandel et al., 2012). Por esa razón investigamos la participación del proteasoma en la degradación de CLDN-4 y comparando con el caso de la CLDN-2.

Para estudiar si la degradación de las proteínas de la UE depende del proteasoma utilizamos MG-132 (1 μ M), un inhibidor específico que limita la degradación de proteínas ubiquitinadas (Takahashi et al., 2008).

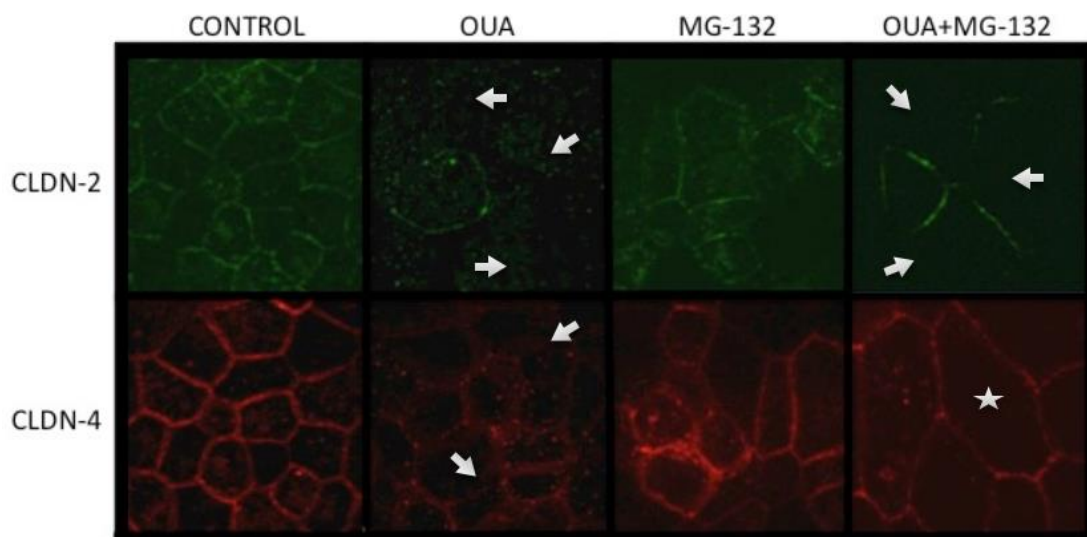


Figura 11. La inhibición del proteasoma no previene el efecto de OUA sobre la UE. Células MDCK fueron sembradas en insertos transwell® e incubadas con y sin OUA (300 nM) durante 10 h. Previo al tratamiento con OUA las células fueron preincubadas con MG-132 (1 μ M) por 18 h. Las células fueron marcadas con CLDN-2 (verde) y CLDN-4 (rojo). Observe que el inhibidor del proteasoma por si mismo tiene un efecto sobre las células (MG-132, columna 3) y cuando las células son tratadas con el inhibidor más la OUA (OUA+MG-132, columna 4), no se previene el efecto de la OUA.

Las inmunofluorescencias de la figura 15 muestran la “malla de gallinero” típica en los controles y la endocitosis que causa usualmente la OUA (300nM, 10 h) en la CLDN-2 (verde) y -4 (rojo). El inhibidor del proteasoma (MG-132), por si solo, disminuye las CLDNs de la membrana de algunas células y aumenta discretamente su señal intracelular. Además, la OUA promueve el despegue de las células dejando huecos claramente visibles (flechas). El MG-132 no previene el efecto de la OUA. Resalta que en presencia de ambas sustancias (MG 132 + OUA) las células aumentan su tamaño (estrella). Estos resultados sugieren que una proteína, que se degrada continuamente en el proteasoma, es necesaria para

mantener a las claudinas en la UE y que las CLDNs no se degradan en este organelo.

Con respecto al contenido total de las CLDNs -2 y -4, la OUA (300 nM, 10 h) disminuye su contenido celular total (Figura 16, columna 2 de ambos gráficos), tal como sugieren las inmunofluorescencias anteriores, y éste efecto no se bloquea con el MG-132, sino que, por el contrario, lo potencia ligeramente.

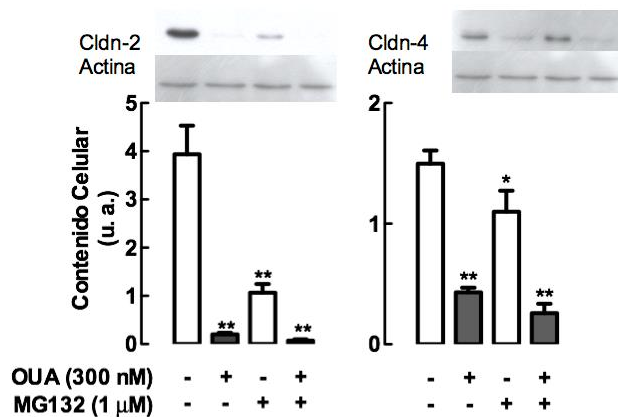


Figura 12. El inhibidor del proteasoma MG-132 disminuye el contenido celular de CLDN-2 y -4. Células MDCK fueron tratadas con y sin OUA (300 nM). 12 h antes del tratamiento con OUA las células fueron preincubadas con el inhibidor del proteasoma (MG-132, 1 μM). En las células tratadas únicamente con OUA se observa una disminución en la expresión de CLDN-2 y -4 (columna 2 de ambos gráficos), el tratamiento con OUA+MG-132 (columna 4 de ambos gráficos) no previene el efecto de OUA sobre las proteínas de la UE, n=4.

Una vez descartada la posibilidad de que las proteínas de la UE se degradaran por el proteasoma dirigimos nuestra investigación al lisosoma.

El NH₄Cl o sal de amonio, es una sustancia que alcaliniza y por lo tanto neutraliza la actividad lisosomal (Strous GJ et al., 1985; Dabydeen S. and Meneses P., 2009). La figura 17 muestra un experimento, similar al anterior, en el que agregamos NH₄Cl (10 μM) al medio. El efecto usual de la OUA sobre las CLDNs -2 y -4, OCLN y ZO-1, es sensible al NH₄Cl, mientras que esta sal, por sí misma, aumenta la señal fluorescente intracelular (figura 17).

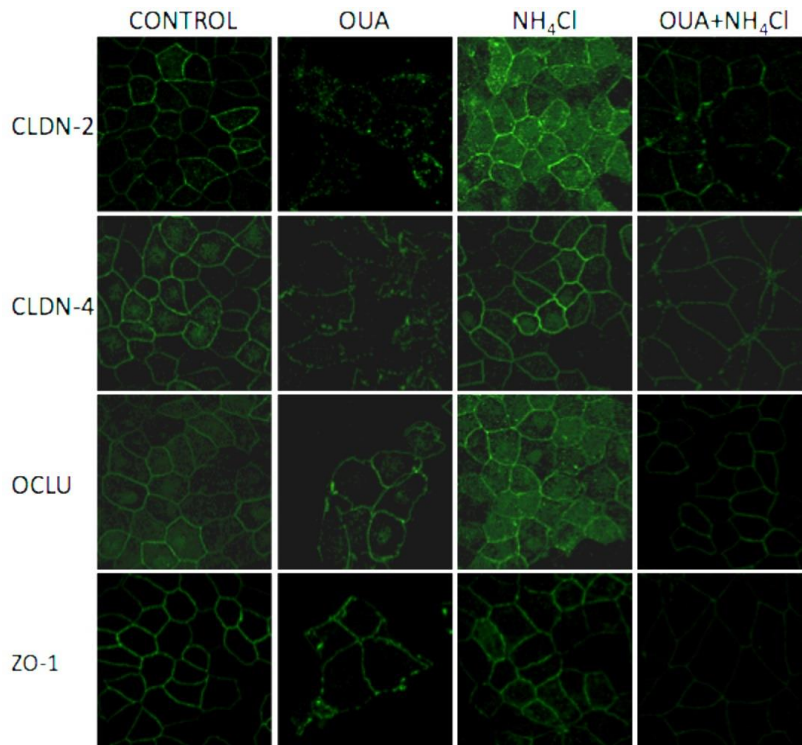


Figura 13. Efecto del bloqueo de la actividad lisosomal con NH_4Cl . Células MDCK fueron sembradas en insertos transwell® e incubadas con y sin OUA (300 nM) durante 10 h. Las células se preincubaron con NH_4Cl (10 μM) por 1 h antes de agregar la OUA. Las células fueron teñidas con anticuerpos fluorescentes contra la CLDN-2, -4, OCLU y ZO-1. El inhibidor del lisosoma por si mismo no tiene un efecto sobre las células (NH_4Cl , columna 3) y cuando las células son tratadas con el inhibidor más la OUA (OUA+ NH_4Cl , columna 4), se previene el efecto de la OUA sobre la UE.

Los resultados obtenidos por inmunofluorescencia concuerdan en las mediciones del contenido total de la proteína: el NH_4Cl bloquea el efecto de la OUA sobre la degradación de las proteínas y en el caso de la OCLU y ZO-1, hasta lo revierte (Figura 18).

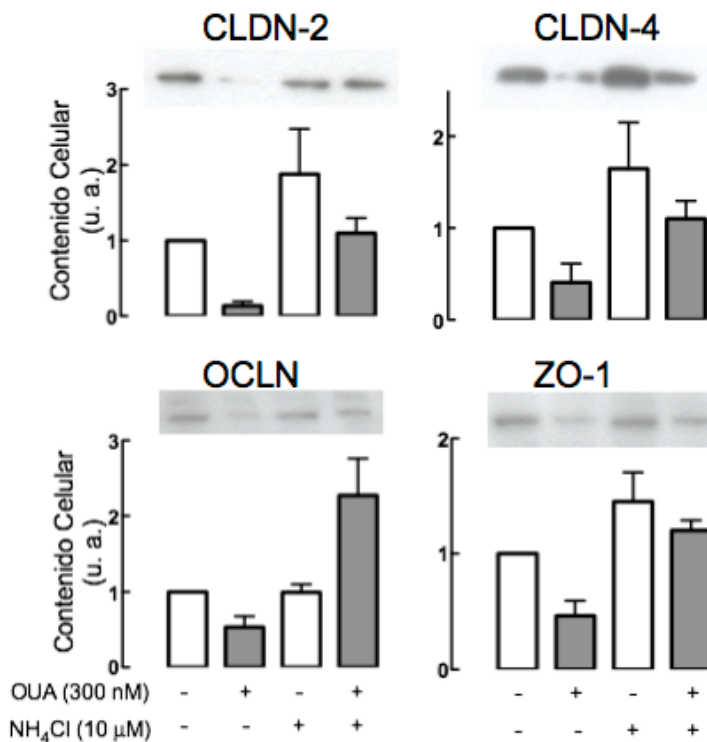


Figura 14. El NH_4Cl previene la disminución en la expresión de las proteínas de la UE inducida por OUA. Células MDCK sembradas en insertos transwell® se incubaron con y sin NH_4Cl durante 1 h y después se incubaron con y sin OUA por 8 h. En todos los casos el tratamiento con NH_4Cl revierte el efecto de la OUA (columna 4 de las gráficas de expresión de CLDN-2, -4, OCLU y ZO-1), y en el caso de OCLU aumenta su expresión. Adicionalmente el tratamiento con únicamente NH_4Cl también muestra un aumento en el contenido celular de CLDN-2, -4 y ZO-1, n=6.

Se ha argumentado que el NH_4Cl , además de alcalinizar el interior del lisosoma e inhibir su actividad, induce cambios en el tráfico vesicular. Por ejemplo, esta sal induce la secreción de la glicoproteína de 80 kDa al medio que baña la membrana apical de las células MDCK (Yamagishi et al., 2013). Lo anterior plantea entonces, la posibilidad de que los cambios observados en los experimentos anteriores se deban a defecto de tráfico más que a inhibición del lisosoma. Para reforzar nuestros resultados, decidimos confirmarlos usando bafilomicyna A1 (BAF), un inhibidor específico de las bombas H^+ -ATPasas vacuolares que impide la acidificación y degradación de las proteínas en los lisosomas (Yoshimori et al., 1991; Akimova et al., 2008; Lanaspá et al., 2008).

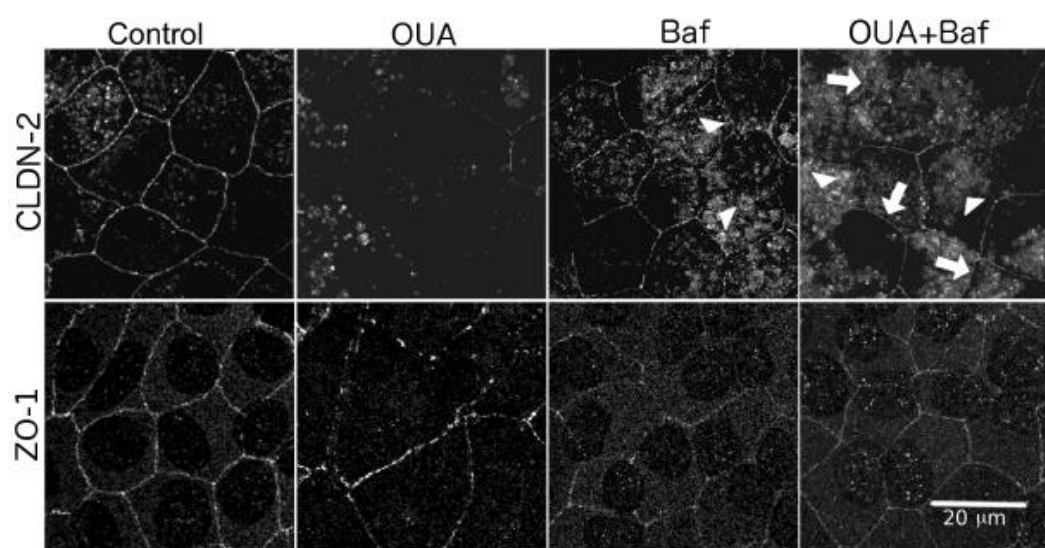


Figura 15. La inhibición del lisosoma disminuye la endocitosis de las proteínas inducida por OUA. Células MDCK fueron sembradas en insertos transwell® e incubadas con y sin OUA (300 nM) durante 12 h. Previo al tratamiento con OUA las células fueron preincubadas con BAF (1 μM) por 12 h. Las células fueron marcadas con CLDN-2 y ZO-1. El inhibidor del lisosoma por si mismo no afecta la arquitectura celular (BAF, columna 3), cuando las células son tratadas con el inhibidor más la OUA (OUA+BAF, columna 4), se previene el efecto de la OUA sobre la UE.

En la figura 19 observamos monocapas de células epiteliales con el patrón de “malla de gallinero” de CLDN-2 y ZO-1 localizadas en la membrana plasmática (control), cuando las células son tratadas con OUA (300 nM), las proteínas se retiran de la membrana plasmática y las células aumentan de tamaño. El tratamiento con BAF por si mismo no promueve cambios en el patrón típico de las proteínas de la UE, pero bloquea el efecto de la OUA y, en el caso de CLDN-2, aumenta claramente su señal intracelular (OUA+BAF; Figura 19). En concordancia con estos resultados, la BAF (1 μM , 12 h) aumenta el contenido celular de las CLDNs -2 y -4, OCLN y ZO-1 y bloquea la disminución que provoca típicamente la OUA (300 nM; Figura 20) y la revierte en el caso de las CLDNs y el ZO-1.

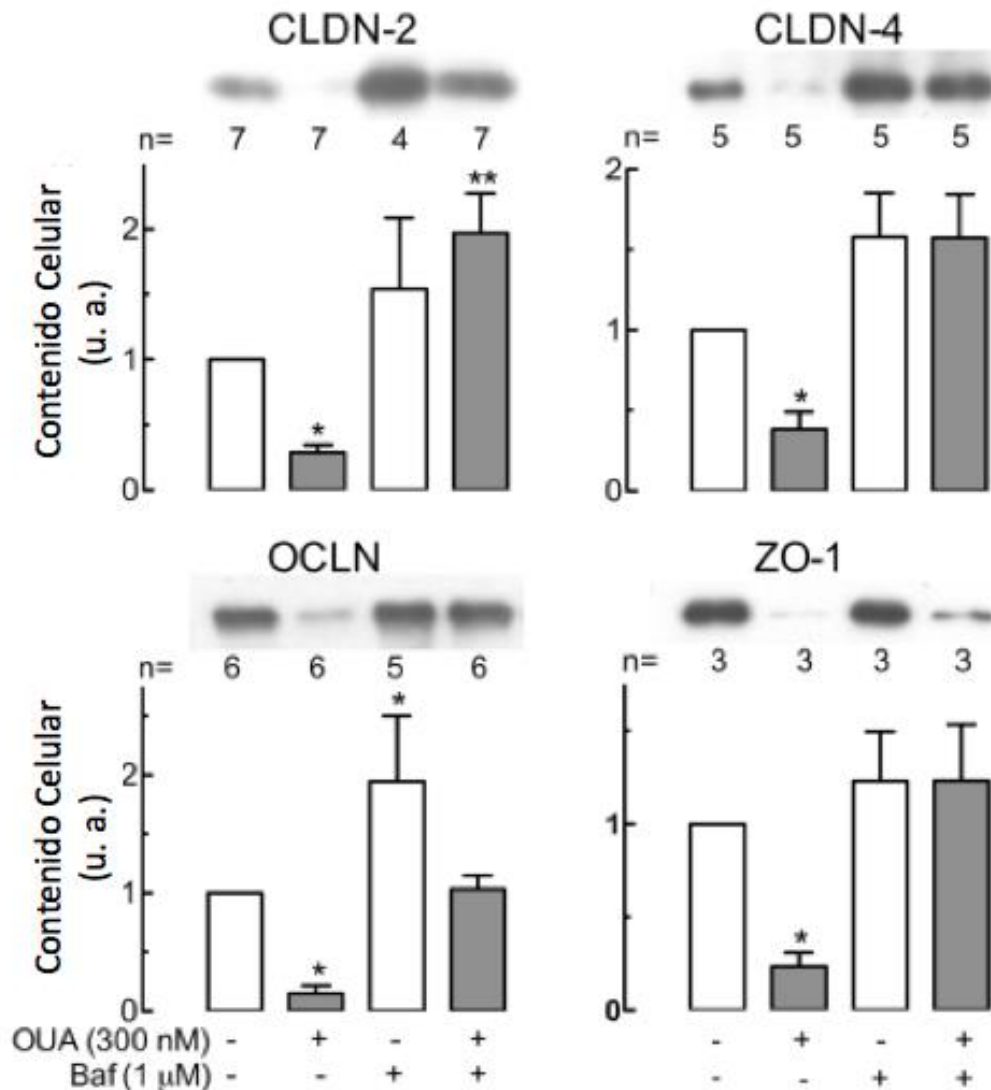


Figura 16. La bafilomicina bloquea la degradación de las proteínas de la UE inducida por OUA. Células MDCK sembradas en insertos transwell® se incubaron con y sin BAF durante 12 h y después se incubaron con y sin OUA por 12 h. En todos los casos el tratamiento con BAF revierte el efecto de la OUA (columna 4 de las gráficas de expresión de CLDN-2, -4, OCLN y ZO-1), y en el caso de CLDN-2 aumenta su expresión de manera significativa. Adicionalmente el tratamiento con BAF también muestra un aumento en el contenido celular de OCLN.

7.3. La OUA altera los niveles de mRNA de las UEs.

La OUA promueve la endocitosis de CLDN-2, -4, OCLN y ZO-1, disminuye sus niveles de expresión e induce su degradación en los lisosomas; sin embargo, es necesario saber si también bloquea la síntesis de éstas proteínas y si este efecto depende de c-Src y ERK1/2. Monocapas de células MDCK, sembradas sobre filtros, se trataron 12 h con 300 nM de OUA, en presencia y ausencia de PD98059 (25 $\mu\mu\mu\mu$ M), y se les extrajo el mRNA total para medir, por PCR de tiempo real, el contenido total del mRNA de las CLDNs -2 y -4, OCLN y ZO-1.

Niveles de mRNA

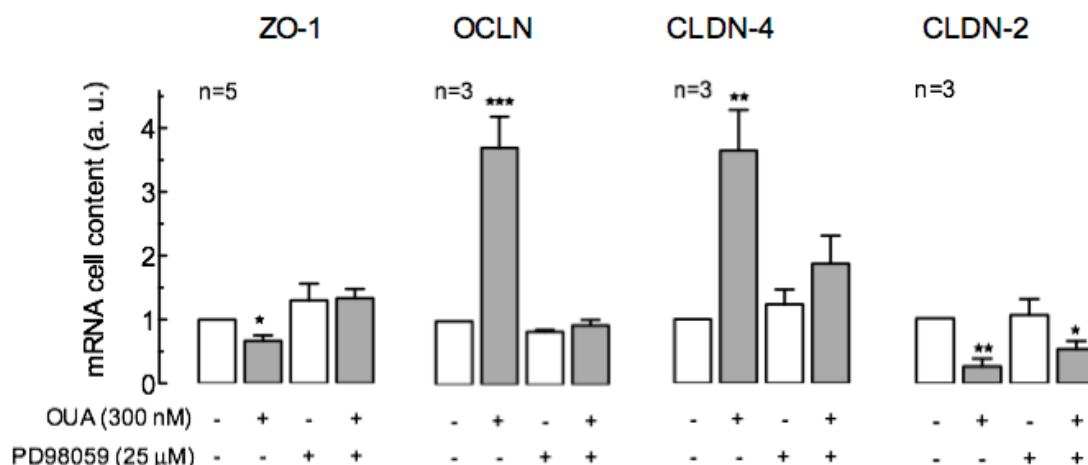


Figura 17. La OUA induce cambios en la expresión de mRNA de las proteínas de la UE.

Tal como se espera de su efecto en las proteínas, la OUA disminuye los niveles de los mRNAs de ZO-1 y CLDN-2 (figura 21, segunda columna de cada gráfico). Sorprendentemente este EC aumenta 4 veces el contenido total de mRNA de la CLDN-4 y OCLN. Mientras que la disminución del contenido de mRNA total de ZO-1 requiere la activación de ERK1/2, el de la CLDN-2 no. Los aumentos del contenido celular de los mRNAs de OCLN y CLDN-4, dependen de la activación de ERK1/2 pues el PD98059 los bloquea (Figura 21). Estos resultados ponen en evidencia que la regulación génica de las proteínas de la UE es muy compleja.

De manera que en células epiteliales en cultivo, altas dosis de OUA inducen la endocitosis dependiente de clathrina y dinamina, y la degradación de las proteínas de la UE. Ambos procesos dependen de la activación de la ruta EGFR-c-Src-ERK1/2, para la mayoría de las proteínas de la UE. Como cabe esperar, la OUA también inhibe la transcripción de ZO-1 la CLDN-2 pero, inesperadamente, aumenta la de la OCLN y CLDN-4. Así pues, las células epiteliales renales cuentan con un mecanismo celular que retira las CLDNs de la UE e involucra a la ruta de señalización EGFR-c-Src-ERK1/2. Particularmente es importante el caso de la CLDN-2 pues confiere a la UE la capacidad de transportar Na⁺. Surge entonces la pregunta ¿Estos mecanismos celulares operan en un animal? El túbulo proximal es sitio de expresión de la CLDN-2 por excelencia. La endocitosis de esta CLDN, desencadenada por factores humorales, como la OUA u otros ECs, podría ser de utilidad para controlar el transporte paracelular de Na⁺.

Existen diversas situaciones fisiológicas, como el parto y el ejercicio atlético, y patológicas, como la falla renal y la hipertensión, en las que aumentan los ECs (Schonenr 2002). Por estas razones decidimos investigar si la endocitosis y degradación de las CLDNs, inducida por ECs, se presenta en un modelo animal.

Se ha demostrado que los ECs aumentan en la Hipertensión Esencial en Humanos (Abdelrahman et al., 1995; Hamlyn et al., 1982; 1996; Manuta et al., 1999; Overeck 1976; Shooneer 2002), durante el desarrollo y mantenimiento de la hipertensión en mamíferos (Hamlyn et al., 1996; Saunders and Scheiner-Bobis

2004) así como en la hipertensión (HTA) inducida por alto consumo de sal en la rata (Huang y Leenen 1999; Manuta et al., 1994; 2000; Rossoni et al., 2002; Veerasingham y Leenen 1999). La HTA, en humanos, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-030-SSA2-2009, se define como “el aumento sostenido de la presión arterial sistólica, diastólica o ambas por arriba de 140/90 mmHg, en ausencia de enfermedad cardiovascular, renal o diabetes”. El mismo valor se aplica a las ratas, cuya presión arterial normal es de 120/80 mmHg. Se puede inducir HTA a ratas en el laboratorio de diversas maneras. Una particularmente sencilla consiste en suministrar ω -Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, $2.59 \cdot 10^{-4}$ M) (Biancardi et al. 2007; Osanai et al. 2002), un inhibidor de la sintasa de óxido nítrico (NOS, por sus siglas en inglés), durante 3 semanas, en el agua de beber. El L-NAME causa un daño renal leve y un incremento temporal de la presión arterial. Las ratas desarrollan HTA si posteriormente se alimentan durante 3 semanas con una dieta alta en sal (4% NaCl, DAS; Rees et al., 1990; Higashi et al., 1996; Osani et al., 2002; Biancardi et al., 2007). Decidimos utilizar éste método para el desarrollo de la HTA sensible a sal debido a que no se ha demostrado que el L-NAME aumente por sí mismo las Ouabaínas endógenas.

7.4. Modelo de Hipertensión Arterial sensible a sal.

En la figura 22 observamos el curso temporal de la presión arterial diastólica (PAD, figura 22A) y la presión arterial sistólica (PAS, figura 22B) en función del tiempo y del tratamiento. Las ratas alimentadas con el alimento normal (0.28% de NaCl) mantienen su presión arterial promedio en 118.5/77.8 mmHg durante las 7 semanas de evolución (control, círculos vacíos). El tratamiento con L-NAME eleva la presión arterial; sin embargo, al retirar el fármaco, la presión se reduce a los niveles normales (113.2/82 mmHg en la semana 7; L-NAME, cuadros vacíos). La ingesta de DAS por sí misma no aumenta la presión arterial de las ratas (118.3/77.5 mmHg; NaCl 4%, círculos grises), mientras que el tratamiento combinado de L-NAME+NaCl 4% genera animales hipertensos con PAS= 155 mmHg y PAD=95.83 a las 7 semanas de tratamiento (cuadros negros). Las ratas hipertensas a las que a partir de la semana 7 se les retira la DAS y se les cambia por dieta normal (rest time, rombos grises), se mantienen hipertensas a pesar de ya no estar recibiendo la carga de sal.

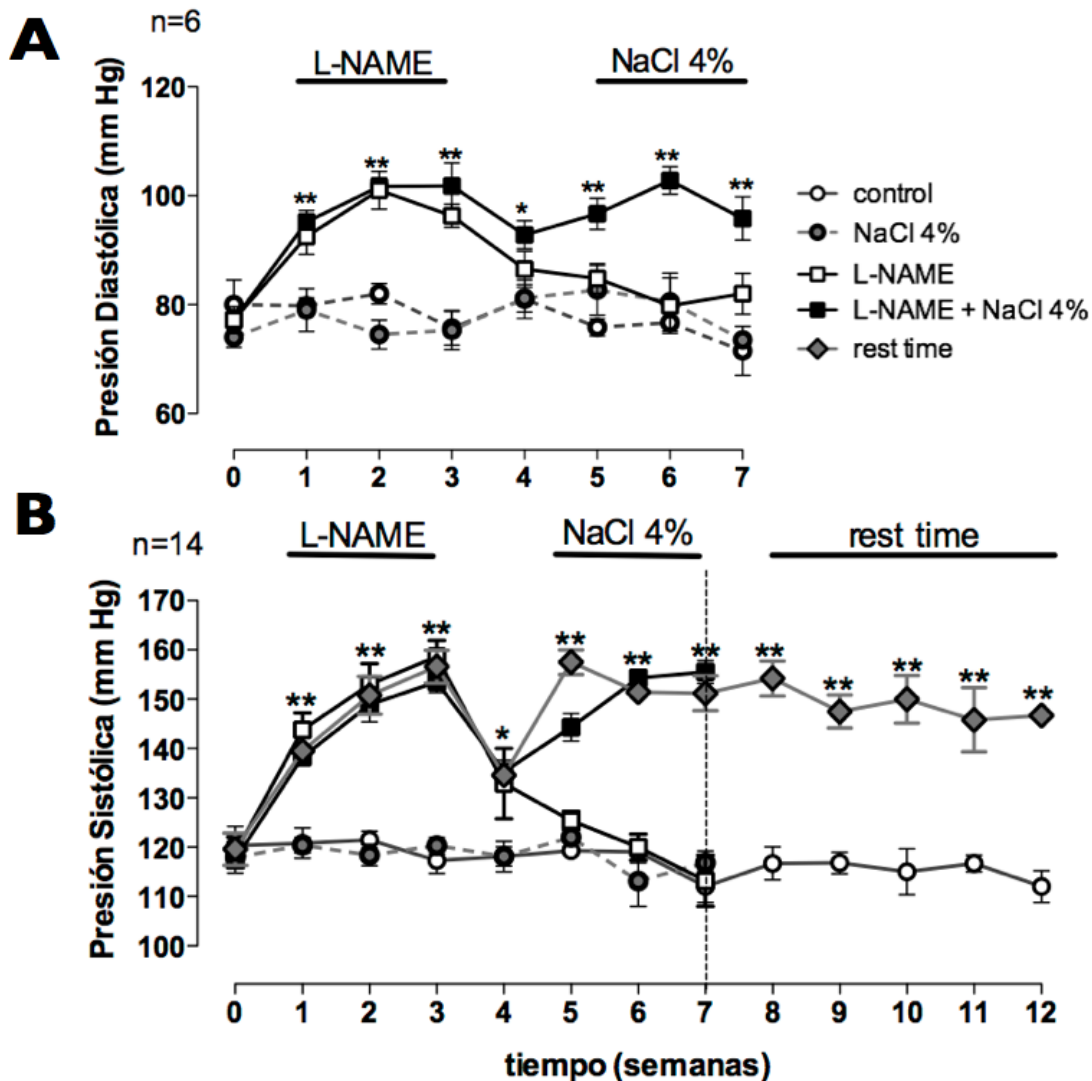


Figura 18. Curso temporal de la Presión Arterial Diastólica y Sistólica. La presión arterial diastólica (PAD) para las ratas control es de 80 mmHg a lo largo de las 7 semanas, mientras que la presión arterial sistólica (PAS) es de 120 mmHg. El tratamiento con L-NAME aumenta de manera transitoria la PAD y PA. EL aumento de NaCl (4%) en la dieta de las ratas no afecta la PAD o PAS. Las ratas desarrollan HTA únicamente cuando son tratadas con el esquema conbinado de L-NAME+NaCl 4%. Si a las ratas que se les induce HTA se les retira la dieta alta en sal (4%) y se les sustituye por una dieta normal (0.28% de NaCl), éstas continúan hipertensas (PAS) (B), aún en la semana 12.

Una vez establecida la HTA sensible a sal estudiamos la función renal. Evaluamos la concentración de Na^+ en plasma y orina; la filtración glomerular (FG), cuya estimación se basa en el concepto de aclaramiento (C, del inglés *clearance*) plasmático de una sustancia en su paso por el riñón; nosotros elegimos la Creatinina sérica (Cr), debido a que es la sustancia de producción endógena más utilizada para calcular la tasa de FG (C_{Cr}). El aclaramiento de creatinina (C_{Cr}) se define como el volumen del plasma que queda totalmente libre de creatinina a su paso por el riñón por unidad de tiempo (ml/min). Calculamos el aclaramiento de Sodio y realizamos pruebas de función tubular: La valoración de la reabsorción de sodio o excreción fraccional de sodio (FeNa). La FeNa nos indica la cantidad de sodio filtrado que es excretado y nos indica el estado de la reabsorción tubular.

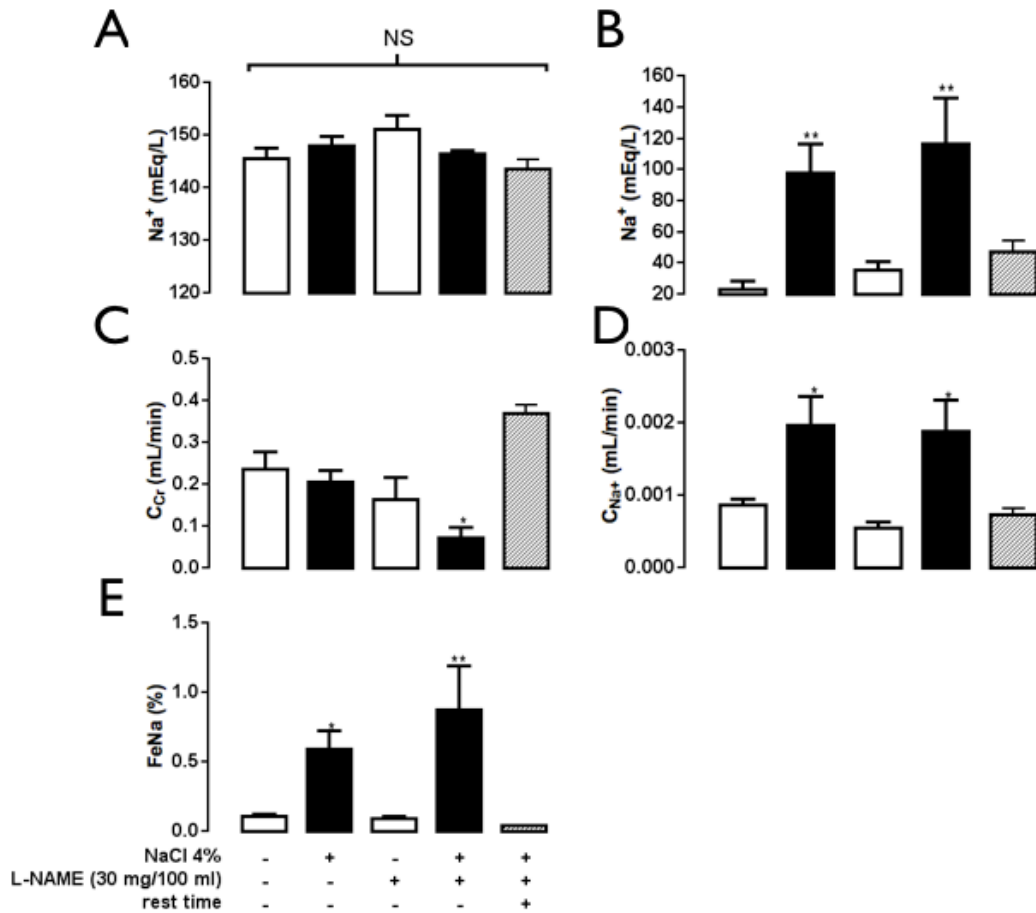


Figura 19. Función Renal. La concentración de sodio en el plasma no cambia en los diferentes grupos (A), mientras que el sodio en orina aumenta en las ratas que consumieron la dieta alta en sal (DAS) (NaCl 4%, B). La depuración renal de creatinina (C_{Cr}) se disminuye en el grupo de ratas hipertensas y se reestablece cuando se retira la DAS (C). La depuración renal de sodio aumenta en los grupos que consumieron DAS hasta el sacrificio (D). La Excreción Fraccional de sodio (FeNa), también está aumentada en los grupos que recibieron alta carga de sal como tratamiento final (E). La carga filtrada de sodio disminuye considerablemente en las ratas hipertensas, pero tal efecto se revierte al retirar la DAS (F).

Los niveles plasmáticos de Na^+ no cambian en los diferentes grupos a pesar de la elevada carga de sal (figura 23 A). El riñón compensa el aumento de la ingesta de Na^+ eliminando el exceso en la orina (23 B). Los resultados anteriores muestran la capacidad renal de manejar las altas concentraciones de NaCl (4%) y mantener así la homeostasis corporal. En seguida investigamos el funcionamiento de los distintos segmento de la nefrona.

Para evaluar el estado funcional del glomérulo medimos la depuración renal de creatinina (C_{Cr}). Éste parámetro disminuye significativamente en el grupo de ratas hipertensas, lo que sugiere que la HTA daña el glomérulo. La disminución se revierte una vez que las ratas regresan a su dieta normal, en el grupo "rest time" (23 C). El manejo global del Na^+ en el riñón lo evaluamos a través del cálculo de la depuración renal de sodio (C_{Na^+}). Como cabía esperar, el riñón filtra más sodio en aquellos animales que lo consumen más, o sea el grupo con DAS (Figura 23D). El transporte tubular de Na^+ lo evaluamos calculando la excreción fraccional de sodio (FeNa), que aumenta en las ratas con alta carga de sodio (23 E), indicando así que sus los túbulos no están reabsorbiendo el Na^+ .

Estos resultados confirman el daño glomerular descrito en las ratas hipertensas (Liao et al., 2008) y el hecho de que las ratas que consumen DAS se adaptan disminuyendo la reabsorción tubular de Na⁺ y excretando el exceso. Cabría esperar, por tanto, que la composición de las claudinas en las UEs a lo largo de la nefrona cambie. Pero antes de investigar este problema, es necesario primero conocer la distribución normal de las CLDNs en el riñón de la rata.

7.5 Distribución y expresión de las proteínas de la UE en el riñón de rata.

Confirmamos la localización de cada proteína utilizando marcadores específicos de cada región de la nefrona y estudiando la estructura celular específica de cada zona. Resumimos las observaciones en la figura 24.

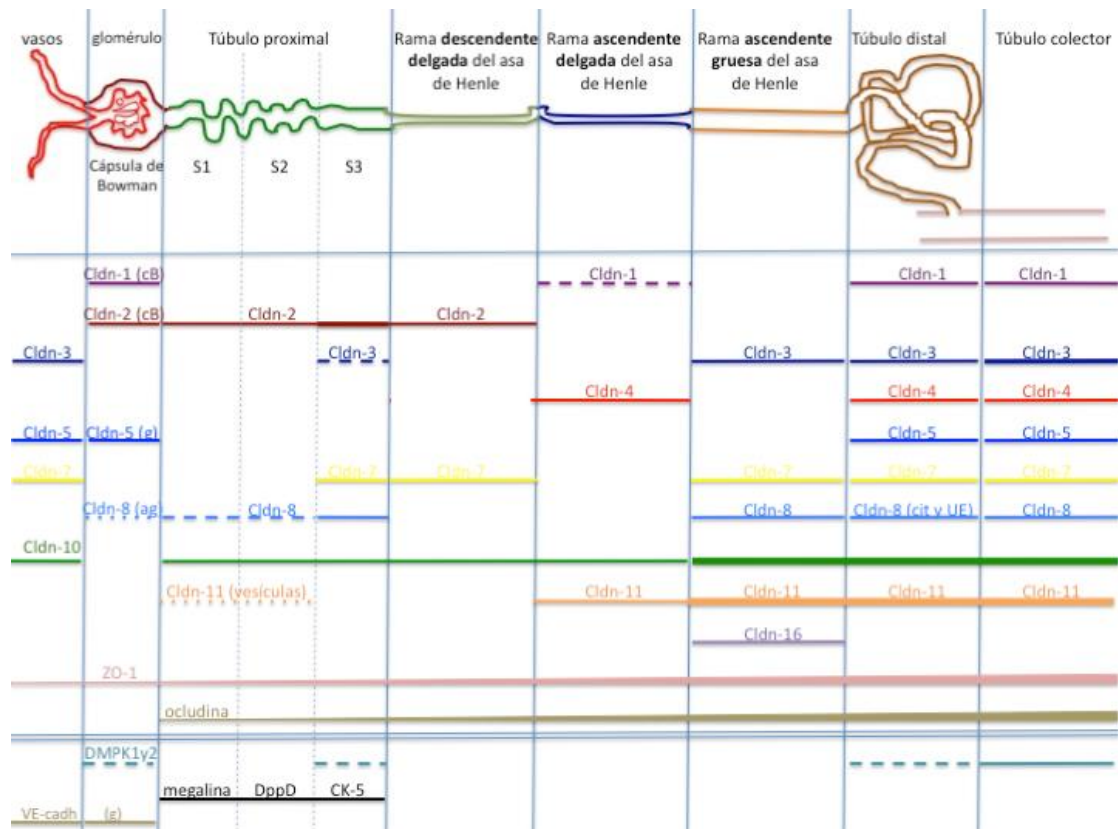


Figura 20. Distribución de proteínas de la UE en el riñón de la rata. Mapa de la localización de las proteínas de la UE obtenidas por IF y microscopia confocal de cortes congelados de riñón.

De nuestras observaciones destaca que, a diferencia de otras especies, en la rata la CLDN -1 y -2 se expresa en la cápsula de Bowman, y la CLDN-11 en el túbulo proximal pero en el interior celular.

7.6 Regulación del sodio paracelular en el túbulo proximal.

Dado que las ratas con HTA compensan la ingesta de Na⁺ excesiva, reduciendo la reabsorción en el riñón, y que dos terceras partes de éste ion se reabsorben en el túbulo proximal y el 50% de ésta cantidad corresponde a transporte a través de la vía paracelular, estudiamos aquellas proteínas de la unión estrecha que permiten la conducción de sodio a través de la UE. Comenzamos por las que forma los poros selectivos a este ión, la CDLN-2 y la -10.

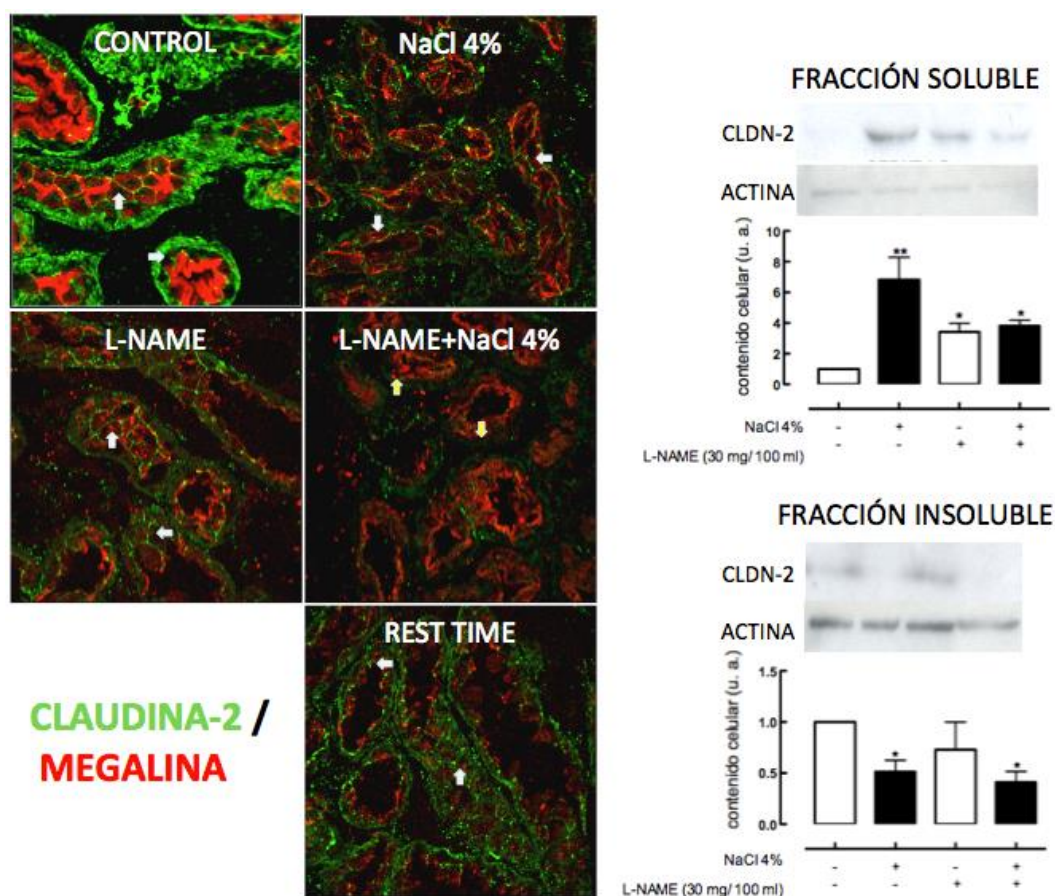


Figura 21. Localización y expresión de CLDN-2 en el túbulo proximal. La CLDN-2 se localiza en la porción más apical del borde lateral a lo largo del túbulo proximal (verde), mientras que la megalina, una proteína estructural de las microvellosidades solo se expresa en el borde en cepillo (rojo). Cuando las ratas son tratadas con una dieta alta en sal (DAS) o con L-NAME, disminuye la expresión de la proteína; sin embargo, no cambia su localización. La localización de la CLDN-2 en ratas hipertensas (L-NAME+NaCl 4%) cambia por completo y no se observa más en membrana, esto se acompaña de la disminución en la expresión de la proteína en la fracción insoluble.

El túbulo proximal está formado por un epitelio muy permeable, esta característica única en la nefrona, permite que en esta porción haya una tasa de reabsorción de NaCl elevada (Mount & Yu 2008). CLDN-2 y algunas isoformas de CLDN-10 conocidas como claudinas muy permeables que permiten el flujo paracelular de Na⁺ y agua se expresan en el túbulo proximal (Muto et al., 2010; Rosenthal et al., 2010; Van Itallie et al., 2006).

En la figura 25 (IZQUIERDO), observamos inmunofluorescencias (IFs) de rebanadas de riñón de rata en condiciones control mostrando la distribución de

la CLDN-2 (verde) en la UE, caracterizada por un punto fluorescente en el corte lateral y por la ya descrita malla de gallinero en las zonas donde el epitelio se cortó transversalmente, a nivel de la unión. Confirmamos la expresión de la CLDN-2 en el túbulo proximal mediante colocalización con la megalina (rojo), una proteína estructural del borde en cepillo, que únicamente se expresa en el dominio apical del túbulo proximal y cuya función es transportar albúmina (Abreu et al., 2009). Cuando las ratas son tratadas con una DAS (NaCl 4%) o con L-NAME, no se modifica la localización de CLDN-2, aunque si disminuye su expresión en la fracción insoluble en TX-100 (figura 25, inferior derecha) de extractos proteicos de riñón, y que corresponde a la proteína de membrana. Cuando se da un tratamiento concomitante a las ratas (L-NAME+NaCl 4%), éstas desarrollan hipertensión, se observa que disminuye la CLDN-2 en la membrana y así como la cantidad medida en la fracción insoluble. En el grupo “rest time” las ratas descansan de la DAS por 4 semanas, es decir, se les administra una dieta normal de mantenimiento y si bien se mantienen hipertensas, la CLDN-2 reestablece su localización en la membrana.

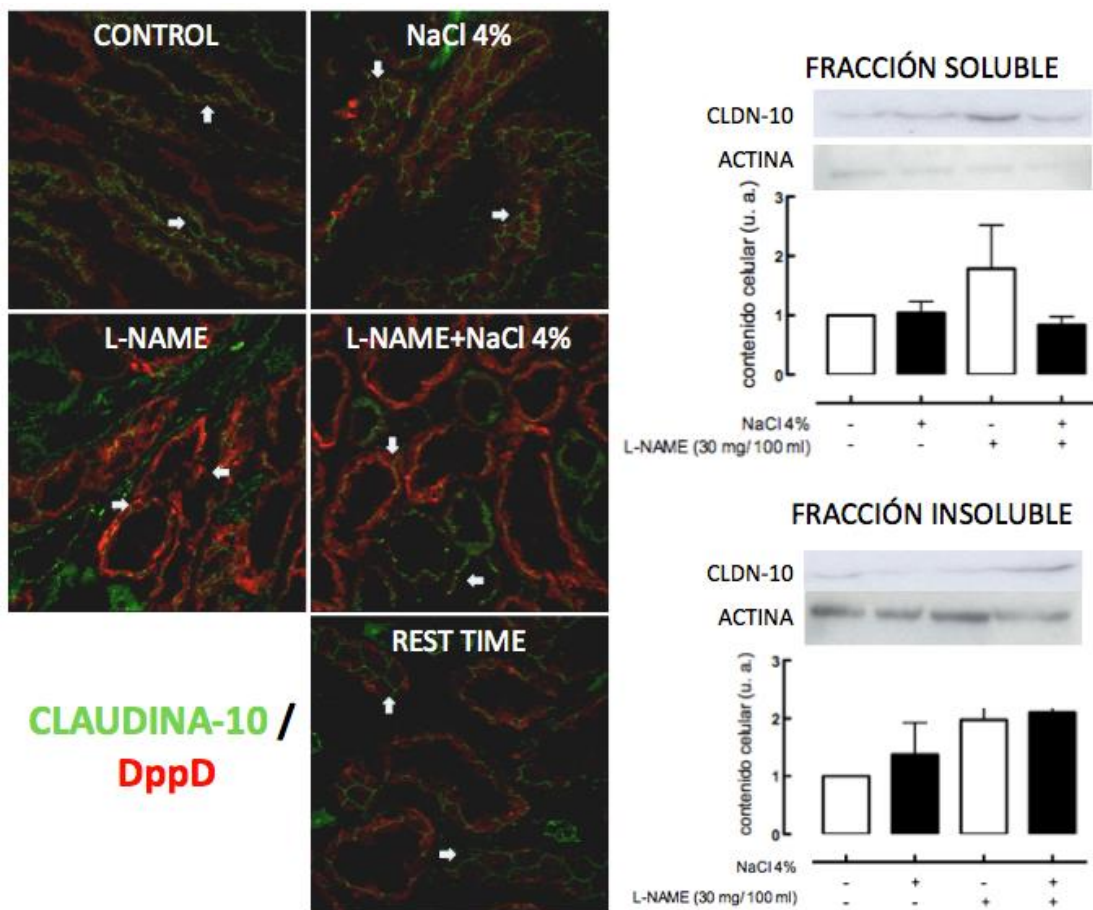


Figura 22. Localización y expresión de CLDN-10 en el túbulo proximal. La CLDN-10 se localiza en la porción más apical del borde lateral a lo largo del túbulo proximal (verde), mientras que la Dipeptidil peptidasa (DppD), una enzima proteolítica que se expresa en el borde en cepillo (rojo). Los diversos tratamientos no cambian la localización ni la expresión de la CLDN-10.

Existen seis isoformas de procesamientos alternativos de la CLDN-10 (Gunzel et al., 2009); sin embargo, solo dos de ellas se localizan en el riñón: la CLDN-10a y 10b. Estas isoformas promueven la permeabilidad de aniones orgánicos y a cationes, respectivamente. El anticuerpo de CLDN-10 que utilizamos para este trabajo no distingue entre las dos isoformas así que únicamente evaluamos si cambia su localización y expresión en el túbulo proximal sin entrar en detalle con su función. Observamos que a pesar de los tratamientos no hay cambios en la localización de CLDN-10 ni tampoco hay cambios estadísticamente significativos en su expresión (figura 26).

7.7 Expresión de las CLDNs que forman poros paracelulares para Cl⁻ en la región distal de la nefrona.

Tanto el cloruro (Cl⁻) como el sodio, son iones predominantes y por lo tanto determinan el volumen del líquido extracelular y la presión arterial (Kurts and Morris et al., 1983; Tanaka et al., 1997; Whitescaver et al., 1984; Jensen et al., 2013). La nefrona distal es responsable de la reabsorción del 2-3% del Cl⁻ filtrado; sin embargo, desempeña un papel regulador fundamental en el manejo renal de sal, el control del volumen extracelular y la presión sanguínea (Lifton et al., 2001).

Como describimos en el capítulo 2, la nefrona distal comprende el túbulo contorneado distal, el túbulo conector y el ducto colector, en estos segmentos de la nefrona, las células son más herméticas al paso de iones.

El cloruro es transportado por dos mecanismos principales. Se reabsorbe activamente por un intercambiador electroneutro (Cl⁻/HCO⁻) localizado en la membrana apical, luego sale de la célula a través de un canal de Cl⁻ basolateral; y difunde pasivamente a través de la UE gracias a la generación de gradientes electroquímicos.

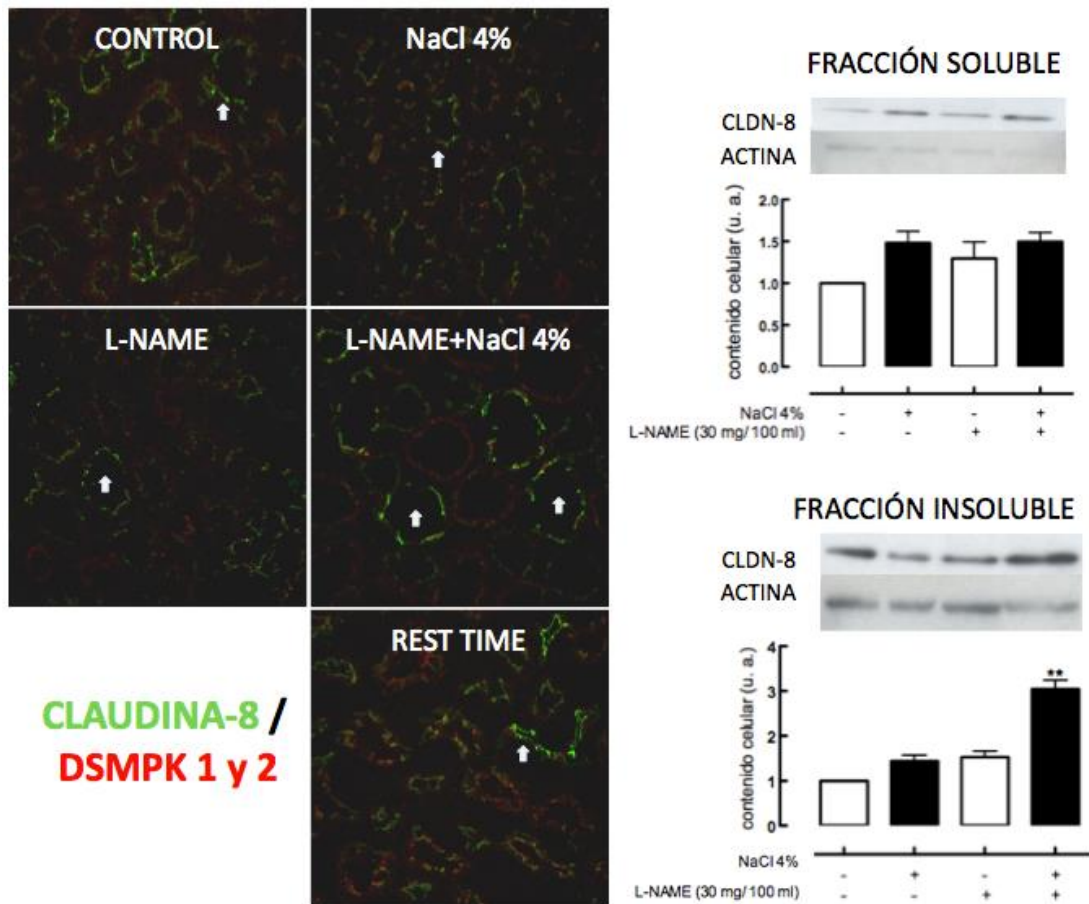


Figura 23. La CLDN-8 se sobreexpresa en la nefrona distal de ratas hipertensas. La distribución de CLDN-8 (verde), no cambia entre los diversos tratamientos, se utilizó un anticuerpo que reconoce las isoformas de desmoplaquina 1 y 2 (DSMPK, rojo) como marcador de las porciones distales del riñón (izquierdo). La fracción insoluble de CLDN-8, es decir, aquella que se localiza en membrana, aumenta significativamente (derecha).

La CLDN-4 forma un canal paracelular de Cl⁻ en la nefrona distal y requiere de la CLDN-8 para su correcta localización en la UE (Hou et al., 2010). Ambas proteínas disminuyen la permeabilidad a cationes, específicamente Na⁺, K⁺ e H⁺ (Van Itallie et al., 2001; Yu et al., 2003).

En la figura 27 observamos cortes de riñón de rata marcados con anticuerpos que reconocen CLDN-8 (verde). La CLDN-8 no cambia de localización entre los diversos tratamientos pero si se observa un aumento en su expresión en la fracción insoluble de los riñones de ratas hipertensas.

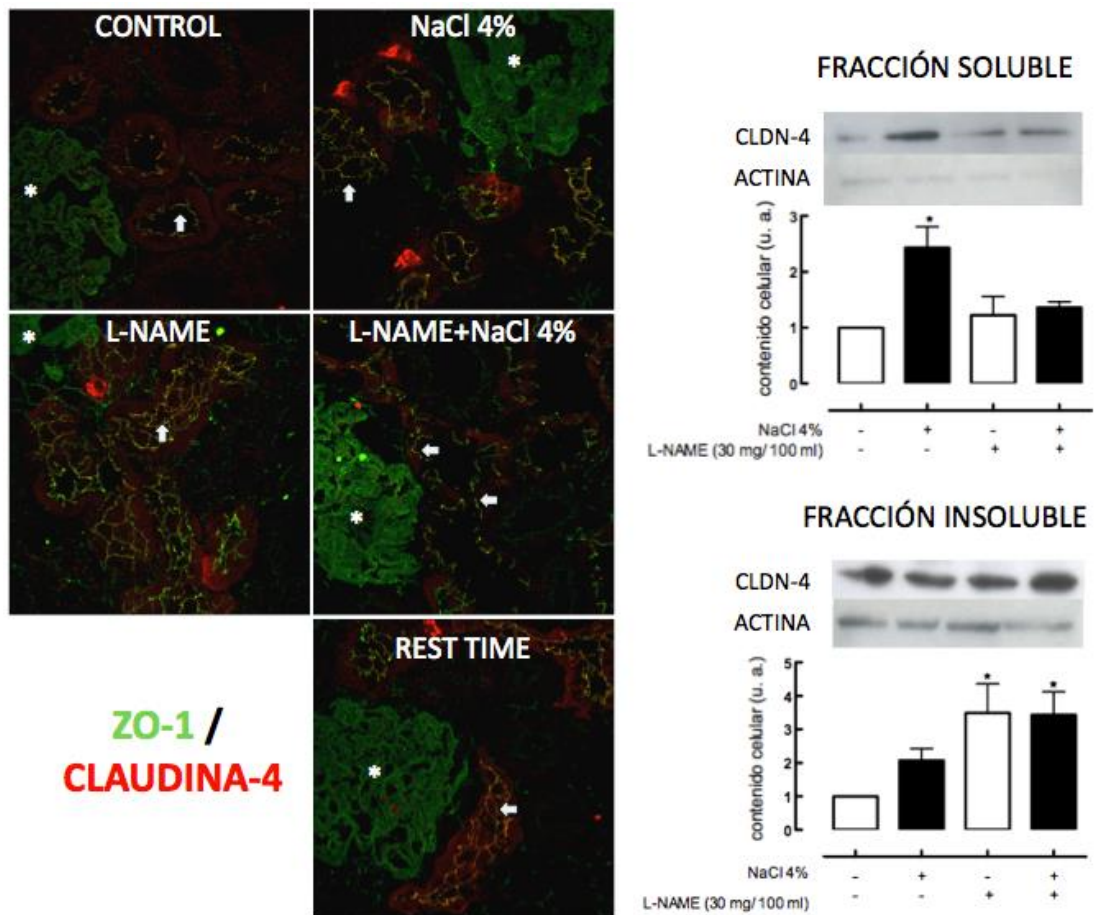


Figura 24. La CLDN-4 se sobreexpresa en la nefrona distal de ratas hipertensas. La expresión de ZO-1 (verde) no se observó modificada; sin embargo, se observa un engrosamiento de los capilares glomerulares. El caso de CLDN-4 (rojo) es similar, ya que tampoco se observa cambio alguno en su localización (izquierda); sin embargo, el aumento de la proteína en la fracción insoluble es muy claro (Derecha).

El caso de CLDN-4 (rojo) es similar; si bien no se observan cambios en la localización de la proteína a lo largo de la nefrona distal, si hay un aumento estadísticamente significativo en su expresión en la fracción membranal (figura 28).

7.8 Cambios en la estructura glomerular.

Los capilares glomerulares están constituidos por células epiteliales que permiten la filtración de sustancias a su través para llevarlas a la cápsula de Bowman. Una de las principales proteínas de la UE que se expresa en los endotelios glomerulares es la CLDN-5 (Reyes et al., 2005), mientras que ZO-1 se localiza en el diafragma en hendidura.

La figura 28 muestra una IF de cortes congelados de riñón con anticuerpos que reconocen CLDN-4 (rojo), que se localiza en la región distal y para ZO-1 (verde) que se expresa en toda la nefrona de forma creciente, es decir, en menor proporción en el glomérulo con respecto a la nefrona distal. Sin embargo, en el glomérulo, llama la atención que en los riñones de las ratas que fueron tratadas

con NaCl 4%, L-NAME y L-NAME+NaCl 4% (ratas hipertensas), se observa un engrosamiento de la estructura, el cual se revierte en el grupo “rest time”. Lo que podría ser indicativo de un daño a nivel del glomérulo.

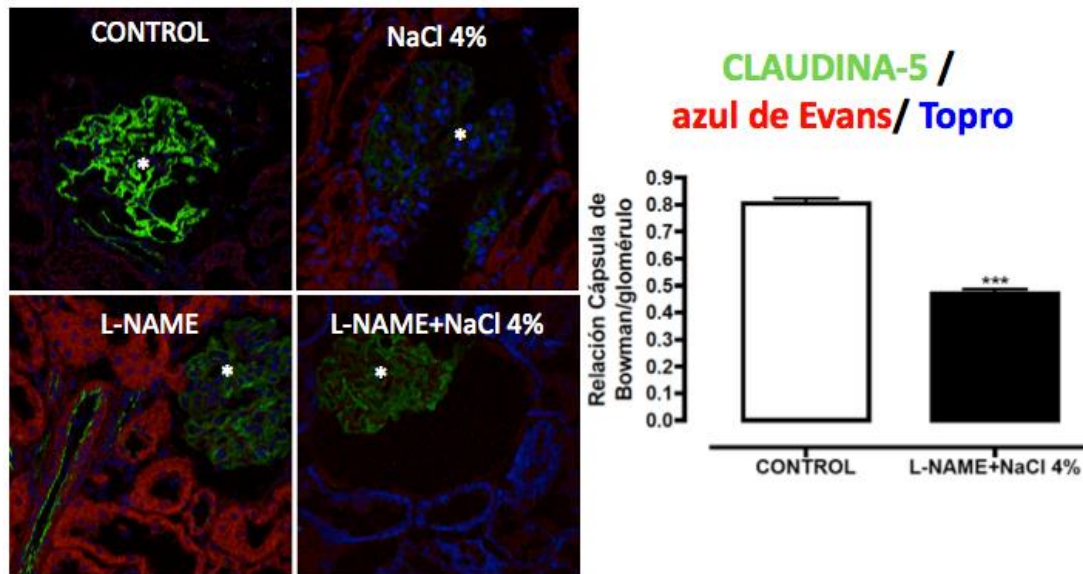


Figura 25. Alteración relación del glomérulo y la cápsula de Bowman. La CLDN-5 (verde), se localiza por excelencia en células endoteliales y en ésta imagen se muestra un daño a nivel del glomérulo en los riñones de ratas hipertensas, el cual puede apreciarse debido al aumento del espacio entre la cápsula de Bowman y el glomérulo (derecha).

En ese mismo sentido cuando los cortes congelados de riñón de rata son marcados con anticuerpos que reconocen a CLDN-5 (verde) y teñidos con azul de Evans (rojo) como medio de contraste se observa que el glomérulo está constreñido o más “apretado”, además la relación entre el diámetro mayor del glomérulo con el de la cápsula de Bowman es significativamente menor en los riñones de ratas hipertensas que en las control. Lo que podría indicar que hay una mayor presión de filtración en las ratas hipertensas (figura 29).

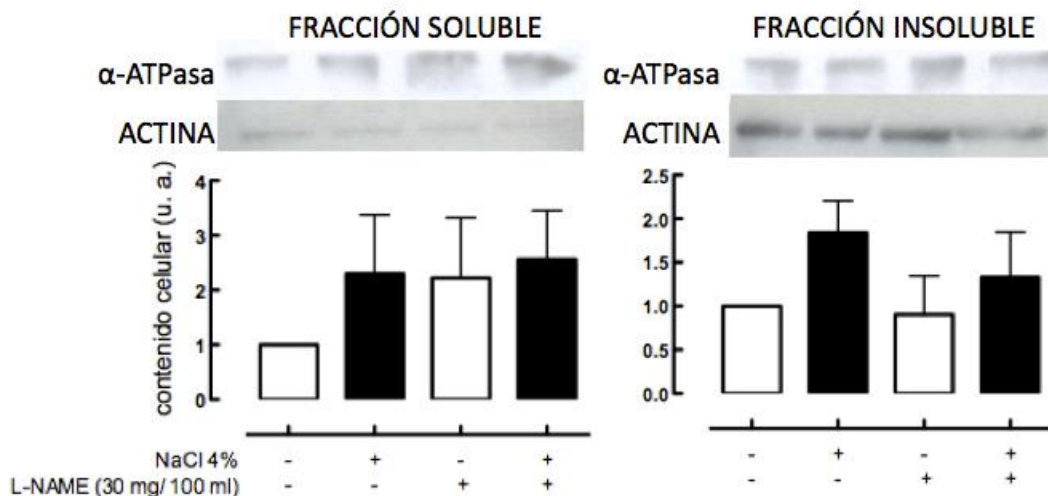


Figura 26. Expresión de la subunidad α Na^+, K^+ -ATPasa. No se observan cambios estadísticamente significativos en la expresión de la proteína en ninguna de las fracciones celulares; sin embargo, si se aprecia una tendencia muy clara de que las en los riñones de las ratas que recibieron cualquiera de los tratamientos aumenta el nivel de la proteína.

Ya que la Na^+, K^+ -ATPasa regula el transporte de diversos iones en el riñón al generar un gradiente electroquímico, cuantificamos su expresión en el riñón. En la figura 30 se muestran WB representativos de la expresión de la Na^+, K^+ -ATPasa en las fracciones soluble (izquierda) e insoluble (derecha). Aún cuando no hay una diferencia estadísticamente significativa en las dos fracciones de los diferentes grupos, si se observa una tendencia a la alta en la fracción soluble de los grupos que recibieron DAS, NaCl 4% y L-NAME+NaCl 4% (ratas hipertensas).

8. DISCUSIÓN

La hermeticidad de la UE está regulada por diversas sustancias, así como por situaciones fisiológicas y patológicas. En la presente tesis estudiamos la regulación de la UE por ouabaína, un esteroide cardiotónico que modifica la localización, degradación y síntesis de la UE en cultivos celulares. Así como también analizamos un modelo de hipertensión sensible a sal en la rata, una situación patológica en la que las ouabaínas endógenas están aumentadas. Examinamos los cambios y adaptaciones que ocurren en las UE renales, bajo esta condición.

8.1 La endocitosis y degradación de las proteínas de la UE inducida por OUA ocurre por una vía canónica.

La internalización de varias proteínas y lípidos de la superficie celular de los epitelios ocurre a través de las rutas endocíticas mediadas por clatrina, caveolina y por balsas lipídicas. Las interacciones proteína-proteína y lípido-proteína controlan la disposición de diversas moléculas en compartimentos membranales especializados que son parte de estas vías. La internalización es necesaria para controlar, entre otras cosas, la actividad de cascadas de señalización, el tiempo de vida media de una proteína membranal, la regulación de la barrera epitelial o la terminación de eventos de señalización (Le Roy & Wrana 2005; Ivannov et al., 2005).

Estos mecanismos no son ajenos a las proteínas de la UE y su manejo y disposición son dependientes del medio ambiente extracelular o de la señal que desencadene su internalización y degradación. Por ejemplo el EGF incrementa la internalización de CLDN-2 (Flores-Benitez et al., 2009) en vesículas recubiertas de clatrina y su degradación en los lisosomas en cultivos de células epiteliales MDCK II (Ikari et al., 2010), mientras que la internalización de la OCLN promovida por el TNF α en ratones transgénicos es dependiente de caveolina-1 (Marchiando et al., 2010).

Para estudiar la ruta de internalización de las proteínas de la UE inducida por OUA, nos enfocamos en el papel de la dinamina, una GTPasa involucrada en la formación de la vesícula endocítica recubierta de clatrina (Danino et al., 2004; Macia et al., 2006); encontramos que el bloqueo de la actividad GTPasa de la dinamina con DYN, previene la endocitosis y degradación de las proteínas de la UE inducida por la OUA.

Una vez formada la vesícula endocítica es posible que siga cualquiera de los siguientes caminos: 1) que se dirija al endosoma de reciclamiento (Rab11), en donde la molécula endocitada será nuevamente sorteada a la membrana o 2) que el endosoma temprano, madure a un endosoma tardío y posteriormente llegue al lisosoma donde se degradaran las moléculas contenidas en la vesícula (Sönnichsen et al., 2000; Le Roy & Wrana 2005).

Altas concentraciones de OUA inducen despegue y muerte celular (Contreras et al., 1999; Akimova et al., 2008), lo que indica una probabilidad mínima de que las proteínas de la UE endocitadas por acción de la OUA sean nuevamente enviadas a la membrana. En esta tesis demostramos que a las 6 h de tratamiento con OUA, la CLDN-2 no colocaliza con el endosoma de reciclamiento (figura 14), lo que sugiere su camino directo a degradación.

Evaluamos la posible participación del proteasoma en la degradación de las proteínas de la UE, debido a que en un estudio realizado por Tsukamoto & Nigam (1999) se demostró que la actividad del proteasoma es necesaria para que el factor de crecimiento de hepatocitos promueva la degradación de moléculas de adhesión como OCLN, ZO-1, E-Cadherina y α -Catenina e induzca la dispersión de los hepatocitos en cultivo. La CLDN-5 en células HeLa y HUVEC se procesa post-traduccionalmente y degrada en los lisosomas. Sin embargo, puede también ser poliubiquitinada en la lisina 199 y entonces degradada en el proteasoma (Mandel et al., 2012). En nuestro caso, el proteasoma no interviene en la degradación de CLDN-2 ni CLDN-4 inducidas por OUA (figura 16), además promueve un cambio en la localización de CLDN-4 (figura 15), ya que ahora se observa más en los bordes laterales, esto no ocurre en el caso de CLDN-2, quien es removida de la membrana casi en su totalidad a las 10 h de tratamiento con OUA.

Exploramos el papel de los lisosomas en la degradación de las proteínas de la UE neutralizando su actividad con NH_4Cl o con Bafilomicina A1. Ambos inhibidores de la actividad lisosomal previenen la degradación de CLDN-2, CLDN-4, OCLN y ZO-1 cuando las células son tratadas con OUA (300 nM) (figuras 17, 18, 19 y 20). Otras señales también promueven la degradación de proteínas de la UE en el lisosoma; por ejemplo, el caso de la degradación lisosomal de CLDN-4 en la corteza renal de ratones que se someten en estrés hipertónico (Lanaspa et al., 2008).

La OUA también bloquea la síntesis de mRNA de CLDN-2 y ZO-1; simultáneamente, los niveles de CLDN-4 y OCLN incrementan (figuras 21 y 31F). La disminución proteínica en el contenido celular de ZO-1, asociada a altos niveles de su mRNA son también observados en células MDCK cultivadas durante una noche en un medio de cultivo con bajo Ca^{2+} . Estos niveles regresan a valores normales después de 5 h de haber cambiado las células a un medio con Ca^{2+} normal (González-Mariscal et al., 1999).

Esto sugiere que las células detectan la deficiencia de proteínas cruciales de la UE e inducen la síntesis de mRNAs y esto permitiría su recuperación.

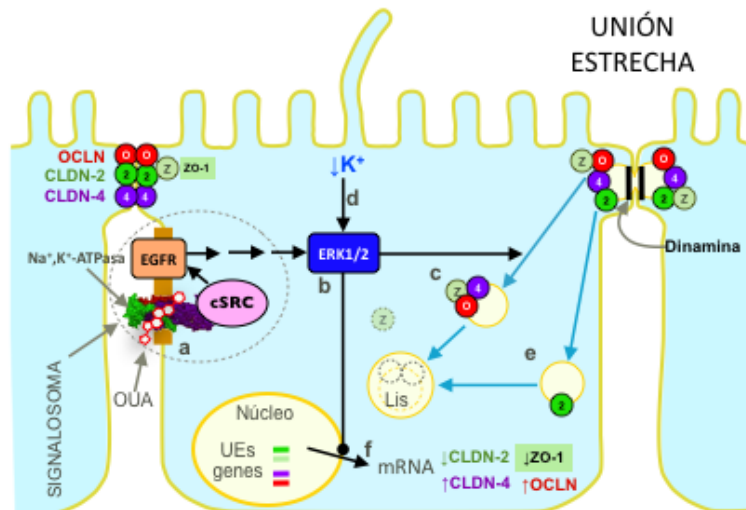


Figura 27. Señalización en el desensamble de la UE inducido por OUA. La OUA (rojo) induce la formación del signalosoma (a), un complejo caveolar (línea gruesa café) que incluye a la Na⁺,K⁺-ATPasa, cSrc y el receptor a EGF (EGFR). La OUA activa a cSrc, quien transactiva al EGFR, resultando en la fosforilación de la cinasa ERK1/2 (b). El desequilibrio iónico resultante de la inhibición de la Na⁺,K⁺-ATPasa también puede contribuir en la activación de ERK1/2 (d). La activación de estas proteínas de señalización es necesaria para la endocitosis de los componentes de la UE, dependiente de clatrina y dinamina (c). Nuestros resultados son consistentes con la posibilidad de que haya dos tipos de vesículas endocíticas: una que contenga un complejo con proteínas esenciales de la UE como ZO-1, OCLN y CLDN-4 (c), y otra que contenga proteínas con características funcionales muy bien diferenciadas tal como CLDN-2 (e), que permite el paso de agua y Na⁺ a través de la UE. La activación de ERK1/2 es necesaria para reducir los niveles proteicos de OCLN, CLDN-4 y ZO-1 (c), pero no los de CLDN-2 (e). ERK1/2 también es requerida para reducir los niveles de mRNA de CLDN-2 y ZO-1 (f). De modo sorprendente, durante la apertura de las UE, el contenido celular de los mRNAs de OCLN y CLDN-4 incrementa.

8.2 El aumento de la OUA endógena en un caso patológico modifica la expresión de CLDNs a lo largo de la nefrona.

Como ya se ha discutido en esta tesis los Esteroides Cardiotónicos (EC) juegan diferentes papeles en la célula. Estos compuestos son interesantes en un contexto fisiológico o patológico ya que habitualmente se encuentran en diferentes órganos y en el plasma sanguíneo en concentraciones subnanomolares (Hamlyn et al., 1991; Lichtstein & Rosen 2001; Aperia 2007), pero bajo ciertas condiciones fisiológicas como el ejercicio (Antolovic et al., 2000; Schoner et al., 2003; Bauer et al., 2005), o patológicas como la preclampsia (Lopatin et al., 1999), la hipertensión esencial (Masugi et al., 1987; 1988; 1986; Rossi et al., 1995; Scheaffer et al., 1991; Manuta et al., 1992; 1999; Goto et al., 1992; Pierdomenico 2001; Ferrandi et al., 2010), la insuficiencia cardíaca (Gottlieb et al., 1992) y en algunos cánceres (Komiyama et al., 1999) se elevan hasta concentraciones micromolares. Sin embargo, no se conoce con certeza cuál es su papel en el organismo de los mamíferos.

Se ha demostrado que una sobrecarga de sal incrementa la concentración de Na⁺ en el plasma (de Wardener et al., 2004) y en el fluido cerebroespinal (Lichtstein & Rosen 2001). La concentración de sodio del líquido cefalorraquídeo es sensada por las células ependimales o las células del hipotálamo, que presentan receptores a mineralocorticoides, Na⁺,K⁺-ATPasa y ENaC (canales de Na⁺ epiteliales); lo que promueve la liberación de ouabaínas endógenas (OEs),

elevando las concentraciones de Angiotensina II y activando los núcleos simpáticos del Sistema Nervioso Central. Después de un incremento rápido de OUA a nivel plasmático, se observa un aumento sostenido de marinobufagenina (MBG) (Bagrov et al., 1996), un vasoconstrictor (Lopatin et al., 1999) con alta afinidad a la subunidad $\alpha 1$ de la Na^+, K^+ -ATPasa. Lo anterior tiene como consecuencia global el aumento en la presión sanguínea (Huang et al., 2006). Estudios recientes sugieren que la OE es uno de los reguladores de la concentración de Na^+ en el fluido cerebro espinal (Huang & Leenen 2011).

Estudiamos la localización de diferentes proteínas de la UE a lo largo de la nefrona del riñón de ratas con hipertensión sensible a sal, con la hipótesis de que las OEs aumentan en la hipertensión esencial y que la sobrecarga de sal promueve la síntesis de OEs.

Encontramos que en las nefronas de ratas hipertensas desaparece la CLDN-2 (figura 25), proteína que normalmente se ubica en el túbulo proximal y permite la absorción de agua y Na^+ a través de la ruta paracelular (Muto et al., 2010; Rosenthal et al., 2010). Este resultado correlaciona con el aumento en la excreción fraccional de sodio (FeNa) de los grupos de ratas que recibieron una dieta alta en sal (DAS) (figura 23 E), lo que sugiere un daño renal a nivel tubular. En un modelo de contaminación con cadmio, ratas preñadas son intoxicadas con el metal pesado, como consecuencia las crías de éstas desarrollan hipertensión a los 60 días de nacimiento. En este estudio se observa una deslocalización de CLDN-2 y un aumento de la FeNa en las crías de 60 días pero no en las de 21 o 45 días que aún no desarrollan hipertensión (Jacquillet et al., 2007). La disminución de CLDN-2 en nuestro modelo podría ser la respuesta del organismo para eliminar el exceso de sal con la consecuente elevación en la natriuresis en las ratas hipertensas.

Por otro lado encontramos que las CLDN-4 y -8 de ratas hipertensas aumentan en las regiones distales de la nefrona. En el ducto colector de riñones de ratón se demostró que la CLDN-4 forma un canal de Cl^- y que necesita de la CLDN-8 para su localización en la membrana (Hou et al., 2010), lo que sustenta que ambas proteínas se encuentren aumentadas ya que viajan en dímeros. Mutaciones en los genes *Wnk4* y *Wnk1* provocan pseudohipoaldosteronismo tipo II (PHA II), una forma rara de hipertensión (Wilson et al., 2001), se ha demostrado que WNK4 se une y fosforila a CLDN-4 en PHA II (Yamauchi et al., 2003; Kahle et al., 2004).

También encontramos modificaciones en la localización de CLDN-5, que se expresa en el endotelio de los capilares glomerulares; y observamos que hay un aumento en el espacio que hay entre el glomérulo y la cápsula de Bowman, debido a la constricción del glomérulo. Este hallazgo es consistente con la disminución en la depuración renal de creatinina en los grupos de ratas hipertensas. En el estudio de Jacquillet observan que hay un alargamiento en el espacio de la capsula de Bowman en los riñones de la progeñe (de 60 días) de ratas intoxicadas con cadmio, este resultado se hace evidente al observar la distribución de CLDN-3 (Jacquillet et al., 2007).

Diversos estudios epidemiológicos han mostrado que el inicio de la hipertensión está fuertemente asociado al consumo de sal (Dahl & Love 1954; Sasaki 1964; Swaye et al., 1972; Carvalho et al., 1989; Stalmier 1997; Erdem et al., 2010).

La alimentación con dietas ricas en sal en la rata, promueven niveles elevados de sodio en el fluido cerebro espinal, que activan los canales de epiteliales de sodio (ENaCs). La activación de los ENaCs y/ o el incremento intracelular de sodio en las neuronas activan el sistema Renina – Angiotensina – Aldosterona (SRAA); lo que conlleva a la liberación de Esteroides Cardiotónicos Endógenos (ECEs) en el cerebro, activando al sistema nervioso simpático. El SRAA promueve estrés oxidativo en el cerebro, además de activar más al SRAA aumentando el flujo simpático. La angiotensina II y la aldosterona de origen periférico actúan en el cerebro para activar esta cascada, incrementando el flujo simpático, lo que conduce a la hipertensión (Huang et al., 1994; Sancho 1998; Houghton et al., 2010; Collister & Hendel 2005; de Champlain et al., 1999; Esler 2010).

En el modelo de hipertensión sensible a sal que utilizamos, no encontramos Esteroides Cardiotónicos Endógenos (ouabaína o marinobufagenina) aumentados en las muestras de orina de ratas de 24 h que se tomaron en cada una de las 7 semanas de evolución del modelo (datos no mostrados). Suponemos que esto se debe principalmente a que el aumento de OEs es rápido y transitorio, cuyo pico máximo se encuentra a los tres días de consumo de la dieta alta en sal (4% de NaCl). Esto no descarta la participación de los ECE en la génesis de la hipertensión; sin embargo, nuestros resultados no nos permiten atribuir los cambios encontrados en las proteínas de la UE a las OEs.

Diversos estudios sustentan la participación de ECEs en la génesis de la hipertensión, e incluso hay evidencia farmacológica que indica que los ECE podrían ser blanco para el desarrollo de medicamentos antihipertensivos. Un ejemplo claro es el desarrollo de la rostafuroxina, un análogo de la digoxina que bloque la acción de la ouabaína (Ferrari et al., 1998). La rostafuroxina, así como otros bloqueadores de los efectos de las OEs han mostrado la reducción de la presión arterial en humanos y en ratas Milan con hipertensión (Bianchi et al., 1995; Ferrandi et al., 1993; Manuta et al., 2006), en ratas con hipertensión generada por bajas dosis de OUA (Ferrari et al., 2010) y en ratas preñadas con preclampsia (Vu et al., 2005). Sin embargo, en el estudio clínico multicéntrico fase 2: OASIS-HT, en el que se propuso encontrar la dosis de rostafuroxina para pacientes con hipertensión, se encontró que la rostafuroxina no disminuye la presión arterial de los pacientes con hipertensión de manera significativa. Lo que nos conduce a reflexionar acerca del papel de las OEs en el mantenimiento de la hipertensión. Si bien el papel de los ECE está más que aceptado, probado e incluso descrito en el desarrollo de la hipertensión, no es posible atribuir todos los cambios observados durante la evolución de la hipertensión a los ECE cuando el aumento de la OE es tan fugaz y transitorio; lo anterior permite suponer que hay otros mecanismos involucrados en el desarrollo y mantenimiento de la hipertensión, y que el papel que pueden jugar los fármacos o anticuerpos contra

los ECE debe ser utilizado en un tiempo muy inicial de la génesis de la hipertensión.

Por otro lado está el papel de la aldosterona que continuamente se libera en el organismo mediante el SRAA y que se retroalimenta positivamente con el consumo elevado de sodio (Gomez-Sanchez et al., 2005; Gomez-Sanchez et al., 1986; Takahashi et al., 1988; Sasaki et al., 1984). Además en un estudio mostrado por Le Moellic (2005) se observa que la aldosterona promueve la fosforilación de CLDN-4 en células epiteliales de riñón RCCD2. Lo cual no se contrapone a la hipótesis inicial de esta tesis, ya que si bien, no demostramos el aumento de una u otra hormona, si se sabe que ambas están presentes en el desarrollo de la hipertensión. La angiotensina II, precursora de la aldosterona promueve la liberación de OUA en células de la corteza suprarrenal de bovinos (Laredo et al., 1997).

9. CONCLUSIÓN

La activación del mecanismo de desensamble de la UE inducido por OUA involucra la activación de la ruta de señalización EGFR-ERK1/2-cSrc, promoviendo la internalización por la ruta canónica de endocitosis y la degradación de las proteínas de la UE en el lisosoma. Este mecanismo está involucrado en la expresión diferencial de proteínas de la UE a lo largo de la nefrona y a su modificación en la patología de hipertensión esencial.

10. MATERIALES Y MÉTODOS

10.1 Cultivo celular.

La línea celular Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) obtenida de la American Type Culture Collection se cultivo en cajas de Petri de plástico a 37° C y en una mezcla atmosférica de aire y CO₂ 95% y 5% respectivamente (incubadora IncuSafe, Forma Sanyo Scientific). Las células crecieron en un medio esencial Eagle Dulbecco modificado (GIBCO Invitrogen Carlsbad CA), al cual se le adicionan 1000 UI/ ml de penicilina, 1000UI/ ml de estreptomina (In Vitro Acayucan, México DF), y 10% de suero fetal (GIBCO Invitrogen).

Cuando las células presentan un crecimiento a confluencia (crecimiento masivo en monocapa total), son lavadas tres veces con solución salina amortiguadora (PBS) sin Ca²⁺ (GIBCO 450-1300) y levantadas con una mezcla de tripsina-EDTA (In Vitro S.A. México DF.), resultando una suspensión celular concentrada utilizada para resembrar sobre insertos (3.0 μm de tamaño de poro 6.5 mm de diámetro, 0.33 cm² Transwell, Corning Costar, Cambridge, MA); alrededor de 2.25·10⁵ células/cm², las cuales se mantienen 55 h en CDMEM, seguido de un periodo de ayuno (24 h en DMEM) y posteriormente fueron incubadas con los diferentes medios de tratamiento.

10.2 Resistencia eléctrica transepitelial (RET)

El grado de sellado de la Unión Estrecha (UE) a solutos iónicos se evalúa por la medición de la Resistencia Eléctrica Transepitelial (TER) utilizando un sistema EVOM -EndOhm-6 (World Precision Instruments, Sarasota, FL). Las células cultivadas en insertos de soportes permeables y se equilibraron a temperatura ambiente durante 10 min. Los valores finales se obtuvieron restando la resistencia que ofrece la solución de cultivo con un inserto vacío y los resultados se expresan en ohmios/cm² (Ω·cm²).

10.3 Inmunofluorescencia (IF) a partir de cultivo celular

Después de medida la TER, las monocapas sembradas en los insertos se lavaron tres veces con PBS con Ca²⁺ frío, se fijaron y permeabilizaron con paraformaldehído 4% (PFA) y se incuban a 4° C durante 30 min., se lavaron tres veces con PBS + Ca²⁺, se incubaron con NH₄Cl 10mM por 3 min. a temperatura ambiente, se lavaron con TBS triton X-100 al 0.1% por 5 min. y se lavaron tres veces con PBS + Ca²⁺, y se bloquearon por 30 min. con BSA al 3% y se incubaron con el anticuerpo primario por 1 h a 37° C, pasado este tiempo se realizaron 3 lavados con PBS + Ca²⁺ y se incubó con el anticuerpo secundario marcado con

una molécula fluorescente (FTIC-Ac ó ALEXA-Ac) por 30 min. a temperatura ambiente y en oscuridad, se lavaron 3 veces con PBS + Ca²⁺ y dos veces con agua desionizada (milliQ). Las preparaciones se montaron sobre portaobjetos colocando 2.5 µL de medio de montaje Vectashield (Vector Labs), para fijar la membrana del inserto al portaobjetos y se adicionaron 2.5 µl sobre el inserto para colocar el cubreobjeto; y la preparación quedó sellada con barniz. Las inmunofluorescencias obtenidas fueron analizadas en microscopio confocal (Leica SP8).

10.4 Westernblot (WB) a partir de cultivo celular

Después de medida la TER, las monocapas sembradas en los insertos se lavaron tres veces con PBS con Ca²⁺ frío, y se incubaron durante 20 min. a -20° C con una solución amortiguadora de lisis celular (Tris pH 7.5 0.5M, EGTA 2 mM, EGTA 5 mM, Fluoruro de Sodio 30 mM, β-glicerofosfato 40 mM, fosfato de sodio 20 mM, Ortovanadato de Sodio (OVN) 1 mM, Nonidet P-40 0.5% y Complete 1X (Roche), para la extracción de la proteína. Los extractos se pasaron 10 veces a través de una jeringa de insulina y se centrifugaron a 14000 rpm durante 20 min. a 4° C. Se recuperó el sobrenadante y el contenido total de proteínas se mide por el ensayo BCA (Pierce), al resto del sobrenadante se le adicionó amortiguador de muestra (50% glicerol, 125 mM Tris HCl, pH 6.8, 4% SDS, 0.125% de azul de bromofenol, 5% de mercaptoetanol), y se hirvieron por 5 min. en un baño a 99° C (eppendorf thermomixer), las muestras procesadas fueron resueltas por electroforesis en gel de poliacrilamida y transferidas a membranas de PVDF (Hybond-P, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Las membranas se bloquearon con BSA 3% durante 1h, y las proteínas de interés se detectaron con el anticuerpo específico, seguido por especies apropiadas de los anticuerpos conjugados a la peroxidasa y un sistema para la detección de quimioluminiscencia (ECL Amersham Biosciences). Las bandas resueltas se analizaron con el software Kodak 1D 3.5.4 (Eastman Kodak, Rochester, NY) y los datos se procesan mediante GraphPad Prisma 5 (GraphPad Software, San Diego, CA). Los valores densitométricos se normalizaron con la señal obtenida para la actina, ya que se ha observado que el contenido de esta proteína no cambia significativamente en los diferentes experimentos.

10.5 Animales

Ratas Wistar machos de 300-350 g de peso corporal fueron divididos en 4 grupos: control, tratados con dieta de NaCl 4% (alta sal, administrada en el alimento durante 3 semanas), L-NAME (inhibidor de la sintasa de óxido nítrico, administrado en el agua de beber durante 3 semanas) y L-NAME + NaCl 4% (hipertensas). Los animales de todos los grupos tuvieron una disposición de agua y alimento *ad libitum*; así mismo fueron sometidos a ciclos luz-oscuridad de 12x12 y mantenidos a una temperatura de 24 a 26 C con una humedad del 55%.

El cuidado y manejo de los animales se realizó de acuerdo con las normas oficiales internacionales.

10.6 Aislamiento de tejido renal, obtención de fracciones solubles e insolubles de corteza renal y Westernblot

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico, se localizó la arteria abdominal para obtener muestras sanguíneas y posteriormente por esa misma vía se perfundieron los riñones con una solución de PBS (GIBCO-Invitrogen) adicionado con calcio (PBS-Ca²⁺). Posteriormente los riñones fueron crioprotectados con 2-metilbutano (Fluka) y congelados en nitrógeno líquido.

A un riñón de cada animal se le separó la corteza renal de la médula y se realizaron cortes finos de la corteza los cuales fueron colocados en una solución de colagenasa durante 30 min. a 37 C, con agitación vigorosa y aireación constante con carbógeno. Después se retira la colagenasa y se hacen 3 lavados con una solución Ringer-Krebs para detener la reacción. Una vez realizados los lavados, se centrifuga a 1000 rpm durante 1 min. y al botón obtenido se le adiciona el amortiguador de lisis MBL y se centrifuga a 14000 rpm durante 20 min. a 4 C, para obtener la fracción soluble (sobrenadante), posteriormente al botón se le adiciona el amortiguador de lisis RIPA, la muestra es sonicada y posteriormente centrifugada a 14000 rpm durante 20 min. a 4 C, para obtener la fracción insoluble. Se recuperó el sobrenadante de cada fracción y se le determinó la cantidad de proteínas totales mediante el ensayo de proteínas BCA (Pierce). Subsecuentemente, las muestras obtenidas por los procedimientos anteriormente descritos se mezclaron con alícuotas de amortiguador de muestra 4X (glicerol 50%; Tris-HCl 125 mM, pH 6.8; SDS 4%; azul de bromofenol 0.125%; β-mercaptoetanol 5%). Se llevaron a ebullición por 12 min y se corrieron en geles de poliacrilamida-SDS. Las proteínas fueron transferidas electroforéticamente a una membrana de PVDF en cámara semiseca (Trans-Blot BioRad). Estas membranas fueron bloqueadas toda la noche con BSA 3% o leche 5% en TBS con Tween (TBS-T: TRIS 100 mM, pH 7.5; NaCl 100 mM; Tween 20 0.4%). Las proteínas de interés fueron detectadas con anticuerpos monoclonales o policlonales específicos seguidos de anticuerpos conjugados con peroxidasa apropiados para la especie del primer anticuerpo y detectados con un sistema de quimioluminiscencia (ECL Amersham).

Una vez que se detectó una de las proteínas de interés, las membranas de PVDF fueron tratadas para eliminar los anticuerpos unidos con una solución de ditionito de sodio al 2% en TBS-T y reutilizadas para la detección de otra proteína de interés. Las bandas resueltas fueron analizadas con el software Kodak 1D 3.5.4 (Eastman Kodak) y los datos fueron procesados con Microsoft EXCEL 2008 (Microsoft Corporation) y GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) de manera que los datos graficados fueron normalizados dividiendo el valor densitométrico de las bandas de la proteína de interés entre el valor obtenido de bandas reveladas con el anticuerpo que reconoce a la actina.

10.7 Inmunofluorescencia en cortes congelados de riñón

Un riñón de cada rata fue cortado en tercios, crioprotegido con 2-metilbutano y congelado en nitrógeno líquido. Posteriormente se tomó uno de los tercios de cada condición y se realizaron cortes de 8 micras en un criostato (Leica), las rebanadas obtenidas fueron colocadas en cubreobjetos previamente gelatinizados. Una vez obtenidos los cortes, comienza la fijación y permeabilización del tejido primeramente con etanol absoluto 10 min a 4 C, enseguida se colocan en acetona por 2 min a -20 C. Se hidrataron los tejidos con PBS-Ca²⁺ por 5 min, enseguida se transfieren a una solución de tritón X-100 al 0.2% durante 5 min, se enjuagan dos veces con PBS-Ca²⁺ 5 min cada vez y se realiza el bloqueo de la marca inespecífica con BSA al 0.5% por 30 min. Las proteínas de interés fueron detectadas con anticuerpos monoclonales o policlonales específicos seguidos de anticuerpos secundarios acoplados con algún fluoróforo.

10.8 Sustancias, anticuerpos e inhibidores

La ouabaína, de origen vegetal fue adquirida de SIGMA (St. Louis, MO, at. No. G-6649). Los inhibidores de cSrc PP2 y SU6656; así como el inhibidor del EGFR y ERK1/2, PD153035 y PD98059 respectivamente, fueron adquiridos de Calbiochem (EMD Biosciences, La Jolla, CA). Los anticuerpos rabbit anti-Claudin-2 y ocludina, mouse anti-Claudina-4, y la peroxidasa de rábano picante (HRP)-goat anti-mouse, FITC-goat antirabbit, y anti-mouse fueron obtenidos de Zymed (South San Francisco, CA). HRP-donkey anti-rabbit fue obtenido de Promega (Madison, WI). El anticuerpo mouse anti-actina fue donado por el Dr. J. M. Hernández (Departamento de Biología Celular, CINVESTAV).

10.9 Estadística

Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete GraphPad Prism 5. Los resultados se presentan como el promedio \pm error estándar. En los resultados de esta tesis se muestran las diferencias significativas según el resultado de una prueba de análisis de varianza (ANOVA) seguida de una post-prueba de comparación múltiple de Dunnett en las comparaciones vs CTL, o una post-prueba de comparación múltiple de Bonferroni en las comparaciones entre todos los grupos experimentales. Las diferencias estadísticas se señalan con *P < 0.05, **P < 0.005, ***P < 0.001. n indica el número de observaciones.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abarquez, R.F., 1967. Digitalis in the treatment of hypertension. A preliminary report. *Acta medica Philippina*, 3(3), pp.161–170.
- Abuazza, G. et al., 2006. Claudins 6, 9, and 13 are developmentally expressed renal tight junction proteins. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 291(6), pp.F1132–41.
- Al-Awqati, Q., 2013. Cell biology of the intercalated cell in the kidney. *FEBS Letters*, 587(13), pp.1911–1914.
- Alexandre, M.D., Lu, Q. & Chen, Y.-H., 2005. Overexpression of claudin-7 decreases the paracellular Cl⁻ conductance and increases the paracellular Na⁺ conductance in LLC-PK1 cells. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 12), pp.2683–2693.
- Alpern, R.J., Howlin, K.J. & Preisig, P.A., 1985. Active and passive components of chloride transport in the rat proximal convoluted tubule. *Journal of Clinical Investigation*, 76(4), pp.1360–1366.
- Altamirano, J. et al., 2006. The inotropic effect of cardioactive glycosides in ventricular myocytes requires Na⁺-Ca²⁺ exchanger function. *The Journal of Physiology*, 575(Pt 3), pp.845–854.
- Amasheh, S. et al., 2002. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *Journal of Cell Science*, 115(Pt 24), pp.4969–4976.
- Angelow, S., El-Husseini, R., et al., 2007a. Renal localization and function of the tight junction protein, claudin-19. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 293(1), pp.F166–77.
- Angelow, S., Schneeberger, E.E. & Yu, A.S.L., 2007b. Claudin-8 expression in renal epithelial cells augments the paracellular barrier by replacing endogenous claudin-2. *The Journal of membrane biology*, 215(2-3), pp.147–159.
- Anon, 2004. Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a tight junction disease. *Gastroenterology*, 127(5), pp.1386–1390.
- Anon, 1993. Long-term ouabain administration produces hypertension in rats., 22(2), pp.178–187. Available at:
<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/efetch.fcgi?dbfrom=pubmed&id=8340153&retmode=ref&cmd=prlinks>.

- Anon, 2003. Na⁺ pump alpha 2-subunit expression modulates Ca²⁺ signaling., 284(2), pp.C475–86. Available at:
<http://ajpcell.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpcell.00383.2002>.
- Antolovic, R. et al., 2000. Endogenous ouabain and its binding globulin: effects of physical exercise and study on the globulin's tissue distribution. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*, 23 Suppl, pp.S93–8.
- Antunes-Rodrigues, J. et al., 2004. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiological Reviews*, 84(1), pp.169–208.
- Aperia, A., 2007. New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. *Journal of Internal Medicine*, 261(1), pp.44–52.
- Arystarkhova, E. et al., 2006. Multiplicity of expression of FXYD proteins in mammalian cells: dynamic exchange of phospholemman and α -subunit in response to stress. *AJP: Cell Physiology*, 292(3), pp.C1179–C1191.
- Arystarkhova, E. et al., 1999. The gamma subunit modulates Na(+) and K(+) affinity of the renal Na,K-ATPase. *The Journal of biological chemistry*, 274(47), pp.33183–33185.
- Ashton, N. ed., 2012. Claudin-4 deficiency results in urothelial hyperplasia and lethal hydronephrosis. *PloS one*, 7(12), p.e52272.
- Bagrov, A.Y., Shapiro, J.I. & Fedorova, O.V., 2009. Endogenous Cardiotonic Steroids: Physiology, Pharmacology, and Novel Therapeutic Targets. *Pharmacological Reviews*, 61(1), pp.9–38.
- Balkovetz, D.F., Chumley, P. & Amlal, H., 2009. Downregulation of claudin-2 expression in renal epithelial cells by metabolic acidosis. *AJP: Renal Physiology*, 297(3), pp.F604–F611.
- Bauer, N., 2005. Ouabain-Like Compound Changes Rapidly on Physical Exercise in Humans and Dogs: Effects of β -Blockade and Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition. *Hypertension*, 45(5), pp.1024–1028.
- Ben-Yosef, T. et al., 2003. Claudin 14 knockout mice, a model for autosomal recessive deafness DFNB29, are deaf due to cochlear hair cell degeneration. *Human molecular genetics*, 12(16), pp.2049–2061.
- Biancardi, V.C. et al., 2007. Sympathetic activation in rats with L-NAME-induced hypertension. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]*, 40(3), pp.401–408.
- Blaustein, M.P., 1985. How salt causes hypertension: the natriuretic hormone-Na/Ca exchange--hypertension hypothesis. *Klinische Wochenschrift*, 63 Suppl 3, pp.82–85.

- Blaustein, M.P., 1977. Sodium ions, calcium ions, blood pressure regulation, and hypertension: a reassessment and a hypothesis. *The American journal of physiology*, 232(5), pp.C165–73.
- Blaustein, M.P. & Hamlyn, J.M., 2010. Biochimica et Biophysica Acta. *BBA - Molecular Basis of Disease*, 1802(12), pp.1219–1229.
- Blaustein, M.P. et al., 2012. How NaCl raises blood pressure: a new paradigm for the pathogenesis of salt-dependent hypertension. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 302(5), pp.H1031–49.
- Brenner, B.M. & Livine, S.A., 1999. Brenner and Rector's the Kidney, 2-Volume Set.
- Calderón, V. et al., 1998. Tight junctions and the experimental modifications of lipid content. *The Journal of membrane biology*, 164(1), pp.59–69.
- Camici, M., 2005. Renal glomerular permselectivity and vascular endothelium. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomédecine & pharmacothérapie*, 59(1-2), pp.30–37.
- Caulfield, J.P., Reid, J.J. & FARQUHAR, M.G., 1976. Alterations of the glomerular epithelium in acute aminonucleoside nephrosis. Evidence for formation of occluding junctions and epithelial cell detachment. *Laboratory Investigation*, 34(1), pp.43–59.
- Cereijido, M., 2004. Cell Adhesion, Polarity, and Epithelia in the Dawn of Metazoans. *Physiological Reviews*, 84(4), pp.1229–1262.
- Cereijido, M. et al., 1978. Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support. *The Journal of Cell Biology*, 77(3), pp.853–880.
- Cereijido, M. et al., 2008. Tight junction and polarity interaction in the transporting epithelial phenotype. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(3), pp.770–793.
- Cereijido, M., Contreras, R.G. & Gonzalez-Mariscal, L., 1989. Development and alteration of polarity. *Annual Review of Physiology*, 51(1), pp.785–795.
- Cereijido, M., Gonzalez-Mariscal, L. & Borboa, L., 1983. Occluding junctions and paracellular pathways studied in monolayers of MDCK cells. *The Journal of experimental biology*, 106, pp.205–215.
- Cereijido, M., Shoshani, L. & Contreras, R.G., 2000. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. I. Biogenesis of tight junctions and epithelial polarity. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 279(3), pp.G477–82.
- Chen, J.-Q. et al., 2006. Sodium/potassium ATPase (Na⁺, K⁺-ATPase) and ouabain/related cardiac glycosides: A new paradigm for development of

- anti-breast cancer drugs? *Breast cancer research and treatment*, 96(1), pp.1–15.
- Cole, D.E. & Quamme, G.A., 2000. Inherited disorders of renal magnesium handling. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 11(10), pp.1937–1947.
- Colegio, O.R. et al., 2003. Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture. *AJP: Cell Physiology*, 284(6), pp.C1346–C1354.
- Contreras, R.G. et al., 2006. Na^+ , K^+ -ATPASE AND HORMONE OUABAIN: NEW ROLES FOR AN OLD ENZYME AND AN OLD INHIBITOR. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 52(8), pp.31–40.
- Contreras, R.G. et al., 2004. Ouabain binding to Na^+ , K^+ -ATPase relaxes cell attachment and sends a specific signal (NACos) to the nucleus. *The Journal of membrane biology*, 198(3), pp.147–158.
- Contreras, R.G. et al., 1999. Relationship between Na^+ , K^+ -ATPase and cell attachment. *Journal of Cell Science*, 112 (Pt 23), pp.4223–4232.
- Danino, D., Moon, K.-H. & Hinshaw, J.E., 2004. Rapid constriction of lipid bilayers by the mechanochemical enzyme dynamin. *Journal of structural biology*, 147(3), pp.259–267.
- De Mello, W.C., 1989. *Cell Intercommunication*, CRC Press.
- Diamond, J.M., 1977. Twenty-first Bowditch lecture. The epithelial junction: bridge, gate, and fence. *The Physiologist*, 20(1), pp.10–18.
- Doris, P.A. et al., 1996. Ouabain production by cultured adrenal cells. *Endocrinology*, 137(2), pp.533–539.
- Dostanic-Larson, I., 2005. Physiological role of the 1- and 2-isoforms of the Na^+ - K^+ -ATPase and biological significance of their cardiac glycoside binding site. *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 290(3), pp.R524–R528.
- Dostanic-Larson, I. et al., 2005. The highly conserved cardiac glycoside binding site of Na^+ , K^+ -ATPase plays a role in blood pressure regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(44), pp.15845–15850.
- Eladari, D., Chambrey, R. & Peti-Peterdi, J., 2012. A new look at electrolyte transport in the distal tubule. *Annual Review of Physiology*, 74(1), pp.325–349.
- Enck, A.H., Berger, U.V. & Yu, A.S.L., 2001. Claudin-2 is selectively expressed in proximal nephron in mouse kidney. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 281, pp.F966–F974.

- FARQUHAR, M.G. & PALADE, G.E., 1963. Junctional complexes in various epithelia. *The Journal of Cell Biology*, 17, pp.375–412.
- Fujita, H. et al., 2008. Tight junction proteins claudin-2 and -12 are critical for vitamin D-dependent Ca²⁺ absorption between enterocytes. *Molecular biology of the cell*, 19(5), pp.1912–1921.
- Furuse, M. et al., 1998. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *The Journal of Cell Biology*, 141(7), pp.1539–1550.
- Furuse, M. et al., 2002. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *The Journal of Cell Biology*, 156(6), pp.1099–1111.
- Furuse, M. et al., 2001. Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *The Journal of Cell Biology*, 153(2), pp.263–272.
- Gamba, G., 2004. Role of WNK kinases in regulating tubular salt and potassium transport and in the development of hypertension. *AJP: Renal Physiology*, 288(2), pp.F245–F252.
- Geleijnse, J.M. et al., 1997. Long-term effects of neonatal sodium restriction on blood pressure. *Hypertension*, 29(4), pp.913–917.
- Giebisch, G. & Windhager, E.E., 1964. RENAL TUBULAR TRANSFER OF SODIUM, CHLORIDE AND POTASSIUM. *The American journal of medicine*, 36, pp.643–669.
- Giebisch, G. et al., 1964. SODIUM MOVEMENT ACROSS SINGLE PERFUSED PROXIMAL TUBULES OF RAT KIDNEYS. *The Journal of General Physiology*, 47, pp.1175–1194.
- Gloor, S. et al., 1990. The adhesion molecule on glia (AMOG) is a homologue of the beta subunit of the Na,K-ATPase. *The Journal of Cell Biology*, 110(1), pp.165–174.
- Gonzalez-Mariscal, L., 2006. The tight junction proteins claudin-7 and -8 display a different subcellular localization at Henle's loops and collecting ducts of rabbit kidney. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 21(9), pp.2391–2398.
- Gonzalez-Mariscal, L. et al., 2003. Tight junction proteins. *Progress in biophysics and molecular biology*, 81(1), pp.1–44.
- González-Mariscal, L. et al., 2000. Tight junction proteins ZO-1, ZO-2, and occludin along isolated renal tubules. *Kidney International*, 57(6), pp.2386–2402.
- Goto, A. et al., 1992. Ouabain as endogenous digitalis-like factor in animals? *Clinical chemistry*, 38(1), pp.161–162.

- Gottlieb, S.S. et al., 1992. Elevated concentrations of endogenous ouabain in patients with congestive heart failure. *Circulation*, 86(2), pp.420–425.
- Gow, A. et al., 1999. CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in Osp/claudin-11 null mice. *Cell*, 99(6), pp.649–659.
- Gow, A. et al., 2004. Deafness in Claudin 11-null mice reveals the critical contribution of basal cell tight junctions to stria vascularis function. *Journal of Neuroscience*, 24(32), pp.7051–7062.
- Gunzel, D. et al., 2009. Claudin-10 exists in six alternatively spliced isoforms that exhibit distinct localization and function. *Journal of Cell Science*, 122(10), pp.1507–1517.
- Haas, M., 2002. Src-mediated Inter-receptor Cross-talk between the Na⁺/K⁺-ATPase and the Epidermal Growth Factor Receptor Relays the Signal from Ouabain to Mitogen-activated Protein Kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 277(21), pp.18694–18702.
- Haddy, F.J. & Overbeck, H.W., 1976. The role of humoral agents in volume expanded hypertension. *Life Sciences*, 19(7), pp.935–947.
- Hall, J.E. & Guyton, A.C., 2007. *Compendio de fisiología médica*, Elsevier España.
- Hamlyn, J.M. et al., 1991. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(14), pp.6259–6263.
- Hamlyn, J.M., Hamilton, B.P. & Manunta, P., 1996. Endogenous ouabain, sodium balance and blood pressure: a review and a hypothesis. *Journal of hypertension*, 14(2), pp.151–167.
- Haraldsson, B.S., 2014. The endothelium as part of the integrative glomerular barrier complex. *Kidney International*, 85(1), pp.8–11.
- Hasegawa, T. et al., 1987. Increase in plasma ouabainlike inhibitor of Na⁺, K⁺-ATPase with high sodium intake in patients with essential hypertension. *Journal of clinical hypertension*, 3(4), pp.419–429.
- Hauptman, P.J. & Kelly, R.A., 1999. Digitalis. *Circulation*, 99(9), pp.1265–1270.
- Hauptman, P.J., Garg, R. & Kelly, R.A., 1999. Cardiac glycosides in the next millennium. *Progress in cardiovascular diseases*, 41(4), pp.247–254.
- Hebert, S.C., 2004. Calcium and salinity sensing by the thick ascending limb: a journey from mammals to fish and back again. *Kidney international. Supplement*, 66(91), pp.S28–33.
- Hebert, S.C., Culpepper, R.M. & Andreoli, T.E., 1981a. NaCl transport in mouse medullary thick ascending limbs. I. Functional nephron heterogeneity and ADH-stimulated NaCl cotransport. *The American journal of physiology*,

- 241(4), pp.F412–31.
- Hebert, S.C., Culpepper, R.M. & Andreoli, T.E., 1981b. NaCl transport in mouse medullary thick ascending limbs. II. ADH enhancement of transcellular NaCl cotransport; origin of transepithelial voltage. *The American journal of physiology*, 241(4), pp.F432–42.
- Hebert, S.C., Culpepper, R.M. & Andreoli, T.E., 1981c. NaCl transport in mouse medullary thick ascending limbs. III. Modulation of the ADH effect by peritubular osmolality. *The American journal of physiology*, 241(4), pp.F443–51.
- Hou, J. et al., 2010. Claudin-4 forms paracellular chloride channel in the kidney and requires claudin-8 for tight junction localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(42), pp.18010–18015.
- Hou, J., Paul, D.L. & Goodenough, D.A., 2005. Paracellin-1 and the modulation of ion selectivity of tight junctions. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 21), pp.5109–5118.
- Hou, J., Rajagopal, M. & Yu, A.S.L., 2013. Claudins and the Kidney. *Annual Review of Physiology*, 75(1), pp.479–501.
- Huang, L., Li, H. & Xie, Z., 1997. Ouabain-induced hypertrophy in cultured cardiac myocytes is accompanied by changes in expression of several late response genes. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 29(2), pp.429–437.
- Hughes, J. et al., 1975. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature*, 258(5536), pp.577–580.
- Inai, T., Kobayashi, J. & Shibata, Y., 1999. Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDCK cells. *European journal of cell biology*, 78(12), pp.849–855.
- Jorgensen, P.L., 1976. The function of (Na⁺, K⁺)-ATPase in the thick ascending limb of Henle's loop. *Current problems in clinical biochemistry*, 6, pp.190–199.
- Kahle, K.T., Macgregor, G.G., et al., 2004a. Paracellular Cl⁻ permeability is regulated by WNK4 kinase: insight into normal physiology and hypertension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(41), pp.14877–14882.
- Kahle, K.T., Wilson, F.H., et al., 2004b. WNK kinases: molecular regulators of integrated epithelial ion transport. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 13(5), pp.557–562.
- Kaplan, N.M., 2010. *Kaplan's Clinical Hypertension*, Lippincott Williams & Wilkins.
- Kaplan, N.M., 1990. New evidence on the role of sodium in hypertension. The Intersalt Study. *American Journal of Hypertension*, 3(2), pp.168–169.

- Karniski, L.P. et al., 2002. Formate-stimulated NaCl absorption in the proximal tubule is independent of the pendrin protein. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 283(5), pp.F952–6.
- Khundmiri, S.J. et al., 2006. Ouabain induces cell proliferation through calcium-dependent phosphorylation of Akt (protein kinase B) in opossum kidney proximal tubule cells. *AJP: Cell Physiology*, 291(6), pp.C1247–C1257.
- Kitajiri, S.-I. et al., 2004. Compartmentalization established by claudin-11-based tight junctions in stria vascularis is required for hearing through generation of endocochlear potential. *Journal of Cell Science*, 117(Pt 21), pp.5087–5096.
- Kitano, S. et al., 1998. Exogenous ouabain is accumulated in the adrenals and mimics the kinetics of endogenous digitalis-like factor in rats. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*, 21(1), pp.47–56.
- Kiuchi-Saishin, Y. et al., 2002. Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 13(4), pp.875–886.
- Koda, R. et al., 2011. Novel expression of claudin-5 in glomerular podocytes. *Cell and Tissue Research*, 343(3), pp.637–648.
- Komiyama, Y. et al., 2001. Identification of endogenous ouabain in culture supernatant of PC12 cells. *Journal of hypertension*, 19(2), pp.229–236.
- Konrad, M. et al., 2006. Mutations in the tight-junction gene claudin 19 (CLDN19) are associated with renal magnesium wasting, renal failure, and severe ocular involvement. *American journal of human genetics*, 79(5), pp.949–957.
- Kotova, O. et al., 2006. Cardiotonic steroids stimulate glycogen synthesis in human skeletal muscle cells via a Src- and ERK1/2-dependent mechanism. *The Journal of biological chemistry*, 281(29), pp.20085–20094.
- Krause, G. et al., 2008. Structure and function of claudins. *Biochimica et biophysica acta*, 1778(3), pp.631–645.
- Krug, S.M. et al., 2012. Claudin-17 forms tight junction channels with distinct anion selectivity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(16), pp.2765–2778.
- Kulikov, A. et al., 2007. Ouabain activates signaling pathways associated with cell death in human neuroblastoma. *Biochimica et biophysica acta*, 1768(7), pp.1691–1702.
- Laredo, J. et al., 1997. Angiotensin II Stimulates Secretion of Endogenous Ouabain From Bovine Adrenocortical Cells via Angiotensin Type 2 Receptors. *Hypertension*, 29(1), pp.401–407.
- Laredo, J., Hamilton, B.P. & Hamlyn, J.M., 1994. Ouabain is secreted by bovine adrenocortical cells. *Endocrinology*, 135(2), pp.794–797.

- Laredo, J., Hamilton, B.P. & Hamlyn, J.M., 1995. Secretion of Endogenous Ouabain from Bovine Adrenocortical Cells: Role of the Zona Glomerulosa and Zona Fasciculata. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 212(2), pp.487–493.
- Le Moellic, C., 2005. Aldosterone and tight junctions: modulation of claudin-4 phosphorylation in renal collecting duct cells. *AJP: Cell Physiology*, 289(6), pp.C1513–C1521.
- Li, W.Y., Huey, C.L. & Yu, A.S.L., 2004. Expression of claudin-7 and -8 along the mouse nephron. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 286(6), pp.F1063–71.
- Liang, M. et al., 2007. Identification of a Pool of Non-pumping Na/K-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 282(14), pp.10585–10593.
- Lopatin, D.A. et al., 1999. Circulating bufodienolide and cardenolide sodium pump inhibitors in preeclampsia. *Journal of hypertension*, 17(8), pp.1179–1187.
- MacGregor, G. & Kaplan, N.M., 2006. *Hypertension*, Health Press.
- Macia, E. et al., 2006. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Developmental Cell*, 10(6), pp.839–850.
- Madsen, K.M., Verlander, J.W. & Tisher, C.C., 1988. Relationship between structure and function in distal tubule and collecting duct. *Journal of electron microscopy technique*, 9(2), pp.187–208.
- Mancilha-Carvalho, J. de J. & Souza e Silva, N.A., 2003. The Yanomami Indians in the INTERSALT Study. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, 80(3), pp.289–300.
- Manunta, P. et al., 2010. ARTICLE IN PRESS. *BBA - Molecular Basis of Disease*, pp.1–5.
- Masugi, F. et al., 1986. Circulating factor with ouabain-like immunoreactivity in patients with primary aldosteronism. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 135(1), pp.41–45.
- Masugi, F. et al., 1987. Ouabain-like and non-ouabain-like factors in plasma of patients with essential hypertension. *Clinical and experimental hypertension. Part A, Theory and practice*, 9(7), pp.1233–1242.
- Miyakawa-Naito, A. et al., 2003. Cell signaling microdomain with Na,K-ATPase and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor generates calcium oscillations. *The Journal of biological chemistry*, 278(50), pp.50355–50361.
- Moeller, M.J. & Tenten, V., 2013. Renal albumin filtration: alternative models to the standard physical barriers. *Nature reviews. Nephrology*, 9(5), pp.266–277.

- Mohammadi, K. et al., 2003. Positive inotropic effect of ouabain on isolated heart is accompanied by activation of signal pathways that link Na⁺/K⁺-ATPase to ERK1/2. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 41(4), pp.609–614.
- Morita, K. et al., 1999. Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *The Journal of Cell Biology*, 147(1), pp.185–194.
- Mulvany, M.J., Aalkjaer, C. & Jensen, P.E., 1991. Sodium-calcium exchange in vascular smooth muscle. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 639, pp.498–504.
- Murray, F., MacLean, M.R. & Pyne, N.J., 2003. An assessment of the role of the inhibitory gamma subunit of the retinal cyclic GMP phosphodiesterase and its effect on the p42/p44 mitogen-activated protein kinase pathway in animal and cellular models of pulmonary hypertension. *British Journal of Pharmacology*, 138(7), pp.1313–1319.
- Muto, S. et al., 2010. Claudin-2-deficient mice are defective in the leaky and cation-selective paracellular permeability properties of renal proximal tubules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(17), pp.8011–8016.
- Nitta, T. et al., 2003. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *The Journal of Cell Biology*, 161(3), pp.653–660.
- Nusrat, A. et al., 2000. Tight junctions are membrane microdomains. *Journal of Cell Science*, 113 (Pt 10), pp.1771–1781.
- O'Neil, R.G. & Boulpaep, E.L., 1982. Ionic conductive properties and electrophysiology of the rabbit cortical collecting tubule. *The American journal of physiology*, 243(1), pp.F81–95.
- O'Neil, R.G. & Sansom, S.C., 1984. Electrophysiological properties of cellular and paracellular conductive pathways of the rabbit cortical collecting duct. *The Journal of membrane biology*, 82(3), pp.281–295.
- Obeidat, M., Obeidat, M. & Ballermann, B.J., 2012. Glomerular endothelium: a porous sieve and formidable barrier. *Experimental Cell Research*, 318(9), pp.964–972.
- Ogawa, H. et al., 2009. Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na⁺,K⁺-ATPase) with bound potassium and ouabain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(33), pp.13742–13747.
- Ohse, T. et al., 2008. Establishment of conditionally immortalized mouse glomerular parietal epithelial cells in culture. *Journal of the American Society of Nephrology*, 19(10), pp.1879–1890.
- Osanai, T. et al., 2002. Relationship between salt intake, nitric oxide and asymmetric dimethylarginine and its relevance to patients with end-stage

- renal disease. *Blood purification*, 20(5), pp.466–468.
- Padilla-Benavides, T. et al., 2010. The polarized distribution of Na⁺,K⁺-ATPase: role of the interaction between {beta} subunits. *Molecular biology of the cell*, 21(13), pp.2217–2225.
- Perrin, A. et al., 1997. Bovine adrenocortical cells in culture synthesize an ouabain-like compound. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 126(1), pp.7–15.
- Pierdomenico, S.D. et al., 2001. Endogenous ouabain and hemodynamic and left ventricular geometric patterns in essential hypertension. *American Journal of Hypertension*, 14(1), pp.44–50.
- Pricam, C. et al., 1975. Intercellular junctions in podocytes of the nephrotic glomerulus as seen with freeze-fracture. *Laboratory Investigation*, 33(3), pp.209–218.
- Rajasekaran, S.A. et al., 2003. Na,K-ATPase inhibition alters tight junction structure and permeability in human retinal pigment epithelial cells. *AJP: Cell Physiology*, 284(6), pp.C1497–C1507.
- Ramirez-Ortega, M. et al., 2002. Mecanismo de toxicidad celular inducida por digitálicos. Estudio con ouabaína. *Archivos de Cardiología de México*, pp.1–7.
- Rector, F.C., 1983. Sodium, bicarbonate, and chloride absorption by the proximal tubule. *The American journal of physiology*, 244(5), pp.F461–71.
- Revel, J.P. & Karnovsky, M.J., 1967. Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *The Journal of Cell Biology*, 33(3), pp.C7–C12.
- Reyes, J.L. et al., 2002. The renal segmental distribution of claudins changes with development. *Kidney International*, 62(2), pp.476–487.
- Rosenbluth, J., 1965. Ultrastructure of somatic muscle cells in *Ascaris lumbricoides*. II. Intermuscular junctions, neuromuscular junctions, and glycogen stores. *The Journal of Cell Biology*, 26(2), pp.579–591.
- Rosenthal, R. et al., 2010. Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *Journal of Cell Science*, 123(11), pp.1913–1921.
- Rossi, G. et al., 1995. Immunoreactive endogenous ouabain in primary aldosteronism and essential hypertension: relationship with plasma renin, aldosterone and blood pressure levels. *Journal of hypertension*, 13(10), pp.1181–1191.
- Ryan, G.B., Leventhal, M. & Karnovsky, M.J., 1975a. A freeze-fracture study of the junctions between glomerular epithelial cells in aminonucleoside nephrosis. *Laboratory Investigation*, 32(3), pp.397–403.

- Ryan, G.B., Rodewald, R. & Karnovsky, M.J., 1975b. An ultrastructural study of the glomerular slit diaphragm in aminonucleoside nephrosis. *Laboratory Investigation*, 33(5), pp.461–468.
- San-Cristobal, P. et al., 2008. WNK Kinases, Renal Ion Transport and Hypertension. *American Journal of Nephrology*, 28(5), pp.860–870.
- Sansom, S.C., Weinman, E.J. & O'Neil, R.G., 1984. Microelectrode assessment of chloride-conductive properties of cortical collecting duct. *The American journal of physiology*, 247(2 Pt 2), pp.F291–302.
- SCHATZMANN, H.J., 1953. [Cardiac glycosides as inhibitors of active potassium and sodium transport by erythrocyte membrane]. *Helvetica physiologica et pharmacologica acta*, 11(4), pp.346–354.
- scheiner-bobis, 2010. Accepted Manuscript. pp.1–12.
- Schoner, W., 2002. Endogenous cardiac glycosides, a new class of steroid hormones. *European Journal of Biochemistry*, 269(10), pp.2440–2448.
- Shimizu, H. et al., 2007. Glial Nax channels control lactate signaling to neurons for brain [Na⁺] sensing. *Neuron*, 54(1), pp.59–72.
- Shoshani, L., 2005. **The Polarized Expression of Na⁺,K⁺-ATPase in Epithelia Depends on the Association between -Subunits Located in Neighboring Cells**
. Molecular biology of the cell, 16(3), pp.1071–1081.
- Simon, D.B., 1999. Paracellin-1, a Renal Tight Junction Protein Required for Paracellular Mg²⁺ Resorption. *Science*, 285(5424), pp.103–106.
- Stahelin, L.A., Mukherjee, T.M. & Williams, A.W., 1969. Fine structure of frozen-etched tight junctions. *Die Naturwissenschaften*, 56(3), p.142.
- Staessen, J.A. & Bianchi, G., 2005. Adducin and hypertension. *Pharmacogenomics*, 6(7), pp.665–669.
- Stolarz-Skrzypek, K. et al., 2013. Sodium and Potassium and the Pathogenesis of Hypertension. *Current Hypertension Reports*, 15(2), pp.122–130.
- Sugawara, T. et al., 2013. Tight junction dysfunction in the stratum granulosum leads to aberrant stratum corneum barrier function in claudin-1-deficient mice. *Journal of dermatological science*, 70(1), pp.12–18.
- Tojo, A. & Kinugasa, S., 2012. Mechanisms of glomerular albumin filtration and tubular reabsorption. *International journal of nephrology*, 2012(5), pp.481520–9.
- Tsukita, S., Furuse, M. & Itoh, M., 2001. Multifunctional strands in tight junctions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(4), pp.285–293.

- Van Huysse, J.W. et al., 2011. Hypertension from chronic central sodium chloride in mice is mediated by the ouabain-binding site on the Na,K-ATPase α_2 -isoform. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 301(5), pp.H2147–53.
- Van Itallie, C., Rahner, C. & Anderson, J.M., 2001. Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *Journal of Clinical Investigation*, 107(10), pp.1319–1327.
- Van Itallie, C.M. & Anderson, J.M., 2006. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annual Review of Physiology*, 68(1), pp.403–429.
- Van Itallie, C.M. et al., 2006. Two splice variants of claudin-10 in the kidney create paracellular pores with different ion selectivities. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 291(6), pp.F1288–99.
- Van Itallie, C.M., Fanning, A.S. & Anderson, J.M., 2003. Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 285(6), pp.F1078–84.
- Vu, H.V. et al., 2005. Involvement of Marinobufagenin in a Rat Model of Human Preeclampsia. *American Journal of Nephrology*, 25(5), pp.520–528.
- Wagner, C.A. et al., 2002. Regulation of the expression of the Cl⁻/anion exchanger pendrin in mouse kidney by acid-base status. *Kidney International*, 62(6), pp.2109–2117.
- Wetzel, R.K. & Sweadner, K.J., 2003. Phospholemman expression in extraglomerular mesangium and afferent arteriole of the juxtaglomerular apparatus. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 285(1), pp.F121–9.
- Wetzel, R.K., Arystarkhova, E. & Sweadner, K.J., 1999. Cellular and subcellular specification of Na,K-ATPase alpha and beta isoforms in the postnatal development of mouse retina. *Journal of Neuroscience*, 19(22), pp.9878–9889.
- Xie, J.X., Li, X. & Xie, Z., 2013. Regulation of renal function and structure by the signaling Na/K-ATPase. *IUBMB life*, 65(12), pp.991–998.
- Xie, Z. & Askari, A., 2002. Na⁺/K⁺-ATPase as a signal transducer. *European Journal of Biochemistry*, 269(10), pp.2434–2439.
- Yamauchi, K. et al., 2004. Disease-causing mutant WNK4 increases paracellular chloride permeability and phosphorylates claudins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(13), pp.4690–4694.
- Yu, A.S.L. et al., 2009. Molecular Basis for Cation Selectivity in Claudin-2-based Paracellular Pores: Identification of an Electrostatic Interaction Site. *The Journal of General Physiology*, 133(1), pp.111–127.

- Zatti, A. et al., 2005. The C-terminal tail of the polycystin-1 protein interacts with the Na,K-ATPase alpha-subunit. *Molecular biology of the cell*, 16(11), pp.5087–5093.
- Zhao, L. et al., 2008. Claudin-6 localized in tight junctions of rat podocytes. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 294(6), pp.R1856–62.
- Zhuo, J.L. & Li, X.C., 2013. Proximal nephron. *Comprehensive Physiology*, 3(3), pp.1079–1123.