



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA REABSORCIÓN DE  
BICARBONATO EN EL TÚBULO CONTORNEADO  
PROXIMAL DE RATAS SENILES**

Tesis presentada para optar por el título de  
Doctor de la Universidad de Buenos Aires  
en el área Ciencias Biológicas

*Autor: Lic. Mariana C. Fiori*

*Director: Dr. Carlos E. Amorena*

*Consejero: Dr. Osvaldo D. Uchitel*

*Lugar de trabajo: Centro de Estudios en Salud y Medio Ambiente, Escuela de  
Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de General San Martín*

Buenos Aires, 2007

# MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA REABSORCIÓN DE BICARBONATO EN EL TÚBULO CONTORNEADO PROXIMAL DE RATAS SENILES

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar los posibles mecanismos involucrados en la disminución de la capacidad de acidificación tubular proximal en ratas seniles.

Mediante experimentos de micropuntura determinamos la contribución del flujo de bicarbonato ( $J_{\text{HCO}_3^-}$ ) sensible a EIPA (inhibidor del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ) y a bafilomicina (inhibidor de la  $\text{V-H}^+\text{ATPasa}$ ) en túbulo contorneado proximal (TCP) de ratas adultas jóvenes (3 meses) y seniles (18-20 meses).

Por Western blot evaluamos, en vesículas de membrana luminal de TCP de animales adultos jóvenes y seniles, la abundancia de las isoformas NHE3 y NHE8 del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y de la  $\text{V-H}^+\text{ATPasa}$ . Realizamos experimentos de RT-PCR en homogenatos de corteza renal de ambos grupos experimentales para evaluar la expresión del ARNm de NHE3, NHE8 y  $\text{H}^+\text{ATPasa}$ .

Determinamos la concentración plasmática de la hormona paratiroidea (PTH) y la cantidad de AMPc presente en corteza renal de ambos grupos experimentales.

Las ratas seniles poseen un  $J_{\text{HCO}_3^-}$  30% menor que los animales adultos jóvenes. En ratas jóvenes, EIPA reduce  $J_{\text{HCO}_3^-}$  un 60% y bafilomicina un 30%, mientras que en animales seniles EIPA reduce  $J_{\text{HCO}_3^-}$  aproximadamente un 60% y bafilomicina un 50%.

La abundancia de la proteína y la expresión del ARNm de NHE3 y de la  $\text{V-H}^+\text{ATPasa}$  fueron similares entre ambos grupos experimentales, en tanto que la cantidad de proteína y de ARNm de NHE8 fue menor en los animales seniles que en los adultos jóvenes.

La concentración de PTH se encuentra aumentada en los animales seniles. Si bien la concentración de AMPc observada en la corteza renal de animales adultos jóvenes no fue significativamente diferente, en los animales seniles mostró una tendencia a aumentar.

Estos resultados sugieren que el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  está afectado en la reabsorción de bicarbonato en el TCP de ratas seniles y que la isoforma, sensible a EIPA, responsable de la reducción del flujo de bicarbonato en estos animales es NHE8. Sin embargo, no podemos descartar mecanismos de regulación de la actividad de la  $\text{V-H}^+\text{ATPasa}$  o de la isoforma NHE3 no relacionados con la transcripción o traducción de estas proteínas. Una de las alternativas para la regulación del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  sería la inhibición de la PTH sobre su actividad por medio de un mecanismo alternativo al mediado por AMPc.

Palabras claves: envejecimiento, riñón, acidificación proximal, intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , NHE3, NHE8,  $\text{V-H}^+\text{ATPasa}$ , AMPc, PTH.

# MECHANISMS INVOLVED IN BICARBONATE REABSORPTION IN PROXIMAL CONVOLUTED TUBULES OF SENILE RATS

## ABSTRACT

The aim of the present work was to evaluate the possible mechanisms involved in the diminution of proximal tubular acidification in old rats.

We evaluate the contribution of EIPA, inhibitor of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger, and bafilomycin, inhibitor of  $\text{V-H}^+\text{ATPase}$ , sensitive bicarbonate flux ( $J_{\text{HCO}_3^-}$ ) in proximal convoluted tubules (PCT) of young (3 months) and aged (18-20 months) rats with micropuncture experiments.

We measure, by Western blot experiments, in brush border membrane vesicles from PCT of young and old rats, the abundance of NHE3 and NHE8 isoforms of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger and the  $\text{V-H}^+\text{ATPase}$ . We performed RT-PCR experiments in homogenates of renal cortex of both experimental groups to evaluate the RNAm expression of NHE3, NHE8 and  $\text{H}^+\text{ATPase}$ .

We measured plasmatic concentrations of parathyroid hormone (PTH) and the amount of cAMP in renal cortex of young and old rats.

Bicarbonate flux in old rats was 30% lower than in young rats. EIPA reduced it by 60% and bafilomycin by 30% in young rats. EIPA reduced  $J_{\text{HCO}_3^-}$  by 60% and bafilomycin by 50% in old rats.

The abundance of the protein and the expression of the RNAm of NHE3 and  $\text{V-H}^+\text{ATPase}$  were similar in 18-month-old and 3-month-old rats. However, the amount of protein and RNAm of NHE8 was lower in old than in young rats.

PTH plasmatic concentration was increased in old rats. Even though cAMP concentration in renal cortex of young rats was not significantly different, cAMP concentration in old rats showed a tendency to increase.

These results suggest that the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger is affected in proximal convoluted tubules from aged rats. The isoform, EIPA sensitive, responsible for the reduction in bicarbonate reabsorption in these animals is NHE8. However, we can not rule out mechanisms of regulation of the  $\text{V-H}^+\text{ATPase}$  or NHE3 isoform activity not related with transcription and translation of this proteins. One possibility for  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger activity regulation could be its inhibition by PTH through a mechanism different of the cAMP.

Key words: aging, kidney, proximal acidification,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger, NHE3, NHE8,  $\text{V-H}^+\text{ATPase}$ , cAMP, PTH.

*A Alfredo y Emilia*

*A Mirta, a Nati y muy especialmente a Rubén*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi Director, el Dr. Carlos Amorena, quien me brindó la oportunidad de realizar mi tesis en su laboratorio y me formó en la investigación científica.

A la Dra. Angélica Müller, por su infinita ayuda, por haber compartido conmigo todos estos años y por su incondicional apoyo y cariño.

Al Dr. Eduardo García Gras, por guiarme en la realización de los experimentos de biología molecular, por los consejos para la escritura de mi tesis y por su buena predisposición.

A la Dra. Valentina Martin, por su interés constante y por los consejos brindados tanto en el ámbito académico como fuera del mismo.

A la Dra. Deborah Tasat por su apoyo y estímulo permanente.

A la Dra. Alejandra Goldman, por su lectura de este trabajo y por sus sugerencias.

Al Dr. Aníbal Altamirano, por aliviarme el trabajo docente para que pudiera hacer experimentos y por su aporte artístico a esta tesis.

A todas las personas que me han acompañado en el trabajo diario en el laboratorio: Mariano, Tomás, Anahí, Rosario, Eugenio, Nadia, Nacho, Gisela, Andrea, Cecilia y Ezequiel.

A Rubén, mi novio/esposo, por escucharme, aconsejarme, acompañarme y ayudarme siempre.

A mi familia, por su apoyo incondicional en TODO.

**GRACIAS!!!!**

Algunos de los resultados presentados en esta tesis  
fueron publicados bajo el título:

***Relative contribution of V-H<sup>+</sup>ATPase and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger to bicarbonate reabsorption in proximal convoluted tubules of old rats.*** Fiori M, Radrizzani M, Díaz-Sylvester P, Müller A, Corti T, Monserrat A, Amorena C. Aging Cell 5: 367-372, 2006.



# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
HISTOFISIOLOGÍA RENAL	1
MECANISMOS DE ACIDIFICACIÓN TUBULAR PROXIMAL	6
Acople de la secreción de protones al transporte de otros iones	8
Influencia de la acidificación luminal sobre la reabsorción de Na <sup>+</sup> y agua	11
Intercambiador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>	13
<i>Características generales</i>	13
<i>Localización</i>	15
<i>Diversidad genética y estructura molecular</i>	15
<i>Isoformas</i>	17
NHE1	17
NHE2	18
NHE3	18
NHE4	19
NHE5	19
NHE6	20
NHE7	20
NHE8	20
NHE9	21
<i>Identificación de la isoforma responsable de la acidificación tubular proximal</i>	21
<i>Regulación de la actividad de la isoforma NHE3 del intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup></i>	23
Alosterismo	24
Fosforilación	24
Interacciones proteína- proteína	25
<i>Interacción con subunidades de proteína G</i>	26
<i>Interacción con proteínas regulatorias y citoesqueleto</i>	26
Síntesis de novo-degradación	29
Tráfico vesicular y reciclado	29
<i>Hormona paratiroidea</i>	31
Transporte electrogénico de protones	34
<i>Propiedades generales de las bombas de protones</i>	34
V-H <sup>+</sup> ATPasa	35
<i>Función general</i>	35
<i>Estructura y organización molecular</i>	36
Dominio citoplasmático	37
Tallo	39
Dominio transmembrana	39
<i>Mecanismo enzimático</i>	41
<i>Localización de la proteína en riñón</i>	41
<i>Regulación de la actividad de la V-H<sup>+</sup>ATPasa</i>	42

Ensamble y desensamble de la enzima	42
Cambios en la abundancia de la V-H <sup>+</sup> ATPasa	43
Interacción de la V-H <sup>+</sup> ATPasa con otras proteínas	43
Otros mecanismos	44
Regulación de la H <sup>+</sup> ATPasa presente en el túbulo proximal	44
Mecanismos de regulación de la acidificación proximal	45
<i>pH y concentración de bicarbonato luminal</i>	45
<i>Tasa de flujo luminal</i>	45
<i>Capacidad buffer peritubular</i>	46
<i>pH peritubular</i>	46
<i>Volumen extracelular</i>	47
<i>Presión parcial de CO<sub>2</sub></i>	47
<i>Depleción de potasio</i>	47
<i>Concentración de calcio y fosfato</i>	48
<i>Angiotensina II</i>	48
<i>“Shear stress”</i>	48
<i>Hormona paratiroidea</i>	50
ENVEJECIMIENTO Y FUNCIÓN RENAL	50
<b>OBJETIVOS</b>	<b>56</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>58</b>
GRUPOS EXPERIMENTALES	58
ENSAYOS BIOQUÍMICOS	58
<i>Parámetros metabólicos</i>	58
Obtención de muestras de sangre y orina	58
Mediciones de laboratorio	59
Creatinina plasmática	59
Uremia	60
Proteinuria	61
Excreción urinaria de sodio y potasio	62
Osmolaridad plasmática y urinaria	62
Parámetros ácido-base	62
<i>Determinación de la concentración de hormona paratiroidea</i>	63
<i>Determinación de la concentración de AMPc</i>	64
EXPERIMENTOS DE MICROPUNTA	65
<i>Experimentos de micropuntura con perfusión luminal y peritubular simultánea</i>	66
Preparación de micropipetas	67
Micropipetas peritubulares	68
Micropipetas lumbales	68
Microelectrodos de resina	69
Calibración de los electrodos	69
Preparación de los animales y procedimiento general	71
Soluciones	72
Grupos experimentales	73
Fundamentos teóricos	73

ENSAYOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	74
<i>Preparación de vesículas de membrana luminal de túbulo contorneado proximal</i>	74
Determinación del grado de pureza de vesículas de membrana luminal de túbulo contorneado proximal	75
Medición de la actividad de la $\gamma$ -glutamyl transferasa	75
Medición de la actividad de la $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPasa	76
<i>Determinación de la abundancia de proteínas por Western blot</i>	77
Preparación de las muestras	77
Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS	78
Transferencia a una membrana de nitrocelulosa	80
Bloqueo	81
Inmunodetección	81
<u>Intercambiador <math>\text{Na}^+/\text{H}^+</math></u> : Isoforma NHE3	82
<u>Intercambiador <math>\text{Na}^+/\text{H}^+</math></u> : Isoforma NHE8	82
<u>V-<math>\text{H}^+</math>ATPasa</u> : subunidad E	82
<i>Análisis de la expresión génica mediante la técnica de RT-PCR</i>	83
Preparación de las muestras	84
Aislamiento de ARN total	85
Transcripción reversa	86
Reacción en cadena de la polimerasa	86
Análisis de los productos de PCR	88
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	88
DISCUSIÓN DE LOS MÉTODOS	89
EXPERIMENTOS DE MICROPUNTURA	89
<i>Necesidad del uso de rafirosa en la solución perfusora luminal</i>	89
<i>Tiempo de respuesta de los electrodos</i>	92
<b>RESULTADOS</b>	<b>93</b>
Parámetros metabólicos	93
Parámetros ácido-base	94
Determinación de la concentración de hormona paratiroidea	95
Determinación de la concentración de AMPc	95
Cinética de acidificación luminal proximal en experimentos de micropuntura	96
Determinación de la abundancia de proteínas por Western blot	99
<u>Intercambiador <math>\text{Na}^+/\text{H}^+</math></u> : Isoforma NHE3	99
<u>Intercambiador <math>\text{Na}^+/\text{H}^+</math></u> : Isoforma NHE8	100
<u>V-<math>\text{H}^+</math>ATPasa</u> : subunidad E	101
Análisis de la expresión génica mediante la técnica de RT-PCR	102
<u>Intercambiador <math>\text{Na}^+/\text{H}^+</math></u> : Isoforma NHE3	102
<u>Intercambiador <math>\text{Na}^+/\text{H}^+</math></u> : Isoforma NHE8	102
<u>V-<math>\text{H}^+</math>ATPasa</u> : subunidad E	105

<b>DISCUSIÓN</b>	<b>106</b>
ENVEJECIMIENTO Y FUNCIÓN RENAL	106
ACIDIFICACIÓN TUBULAR PROXIMAL	107
Transportadores involucrados en la acidificación proximal	109
<u>Intercambiador <math>\text{Na}^+/\text{H}^+</math>: Isoformas NHE3 y NHE8</u>	109
<u><i>V-H<sup>+</sup>ATPasa</i></u>	114
Mecanismos de control de la acidificación proximal	116
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>119</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>120</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>158</b>

# **INTRODUCCIÓN**

## **HISTOFISIOLOGIA RENAL**

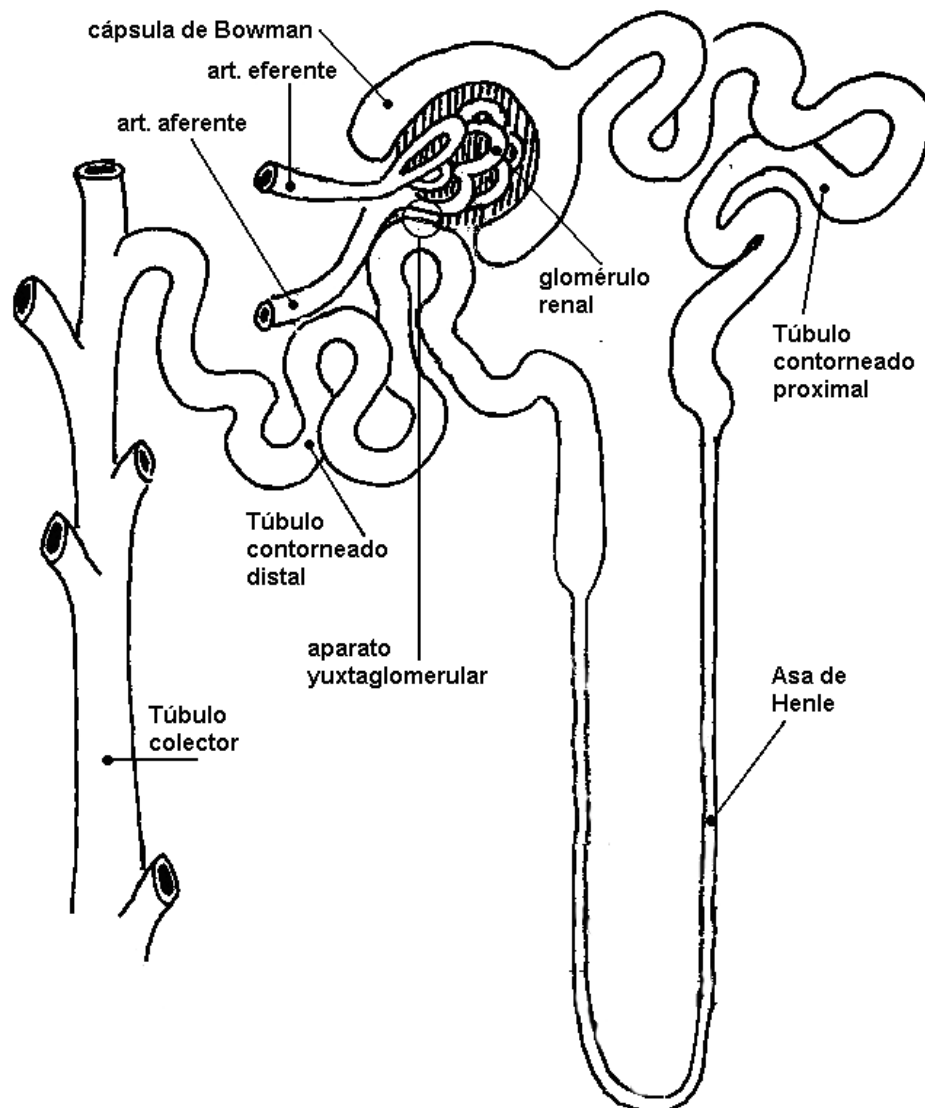
El riñón cumple diversas funciones en el organismo, entre las que podemos mencionar regulación del balance hidrosalino, equilibrio ácido-base y presión arterial, secreción de hormonas y excreción de productos del metabolismo y xenobióticos.

En la estructura del riñón se distinguen dos regiones: una externa llamada corteza y otra interna denominada médula.

La unidad funcional del riñón es el nefrón. Consiste en un ramillete de capilares que forma parte del glomérulo y un túbulo compuesto por una monocapa de células epiteliales de variada estructura y función, que se origina en la cápsula de Bowman. El túbulo comienza en la corteza y está constituido por los túbulos contorneados proximal y distal conectados por las ramas delgada y gruesa del Asa de Henle. El túbulo contorneado distal desemboca en el tubo colector, el cual puede recibir los túbulos de diversos nefrones (*Figura 1*).

El glomérulo está formado por una red de capilares revestida por una capa de células epiteliales viscerales (podocitos) que se continúa en las células epiteliales parietales formando la cavidad urinaria o de Bowman. Los capilares glomerulares están localizados entre las arteriolas aferente y eferente formando un sistema porta.

Por los riñones de un adulto de 70 kg de peso corporal circula alrededor del 20% del volumen minuto cardíaco, alrededor de un litro de sangre o 600 ml de plasma por minuto. El ultrafiltrado formado diariamente en los glomérulos es aproximadamente de 180 L (125 ml/min), esto es 60 veces el volumen plasmático; de este ultrafiltrado solamente 1,5 L será eliminado como orina.



**Figura 1:** Esquema del nefrón (Gentileza del Dr. Aníbal Altamirano).

La barrera de filtración se comporta como un filtro de tamaño, carga y configuración particular. Está constituida por el endotelio fenestrado, la membrana basal glomerular, las células mesangiales, la membrana basal y el epitelio visceral de la cápsula de Bowman. Esta barrera es altamente permeable al agua y a los pequeños solutos (radio menor de 2.5 nm), dificultándose el pasaje cuando el radio de la molécula es mayor de 4 nm, e impermeable a las proteínas plasmáticas. Las moléculas con carga eléctrica negativa son

más excluidas del filtrado que aquellas neutras o positivas. Se cree que esto se debe a que cargas negativas existentes en las células endoteliales, podocitos y en la membrana basal influyen en la filtración de macromoléculas cargadas, a través de interacciones electrostáticas (Berne & Levi, 1992). Un ejemplo de esto es la albúmina, que a pesar de su radio de 3.6 nm es excluida debido a su punto isoeléctrico de 4.6. La conformación tridimensional de las macromoléculas también influye en la tasa de filtración glomerular ya que las macromoléculas de estructura elipsoidal, que presentan mayor flexibilidad y deformabilidad se filtran más fácilmente que las moléculas globulares (Berne & Levi, 1992).

El ultrafiltrado posee una composición similar a la del plasma en cuanto a concentración de sodio, cloruro, creatinina, glucosa, ácido úrico, urea y fosfato pero, a diferencia del plasma, no contiene proteínas.

El túbulo proximal nace de la cápsula de Bowman y se lo suele dividir en tres segmentos (S1, S2 y S3) correspondiendo S1 y S2 a la “*pars convoluta*” y S3 a la “*pars recta*”. La división en tres segmentos se basó en la morfología y en la tasa de secreción de para-aminohipurato (Woodhall *et al.*, 1978).

Las células epiteliales del túbulo proximal poseen gran actividad metabólica, están estructuralmente polarizadas y son capaces de realizar el transporte vectorial de agua y solutos (Rector, 1983). El epitelio del túbulo proximal está compuesto por una sola capa de células cuboidales que poseen especializaciones de la membrana plasmática. Las células tubulares proximales presentan una amplia membrana apical, denominada ribete en cepillo, que mira hacia la luz tubular. Esta membrana está compuesta por largas, delgadas y densamente empaquetadas microvellosidades que multiplican la superficie de contacto entre la célula y la luz incrementando la absorción aproximadamente unas veinte veces (Guyton, 1992). En la región subapical se observan pequeñas vesículas endocíticas y vacuolas (Kinne-Saffran, 1989). También poseen una membrana basolateral (cara hemática de la célula) con numerosas invaginaciones e interdigitaciones y pequeñas vellosidades que varían en cantidad según el segmento del túbulo proximal, siendo más abundantes en el primer segmento de la “*pars convoluta*”, y menos abundantes o inexistentes en la “*pars recta*”. Las células tubulares proximales de mamíferos poseen núcleos esféricos y abundantes mitocondrias localizadas principalmente en las regiones media y basal de las mismas y ocupando la mayor parte del citoplasma de las interdigitaciones. Las



mitocondrias, a través de la síntesis de ATP, mantienen el importante sistema de transporte activo celular.

Las células tubulares adyacentes están unidas por contactos intercelulares especializados. Las uniones estrechas o “*zonula occludens*” se localizan cerca del lumen tubular, dejando un espacio intercelular lateral entre células adyacentes, desde la unión estrecha hasta la membrana basal. Dichas uniones separan los dos dominios de la membrana plasmática (apical y basolateral) y evitan que las proteínas del dominio basolateral migren al dominio apical y viceversa, manteniendo la polaridad del epitelio. El túbulo proximal presenta uniones intermedias (“*zonula adherens*”), adyacentes a las uniones estrechas, pero más anchas que separan el espacio intercelular de la luz tubular. Los desmosomas (“*macula adherens*”) son pequeños e infrecuentes y se encuentran entre las uniones estrechas y la membrana basal. Las uniones “*gap*” (“*nexus*”) se ubican en la membrana lateral. Por medio de estas uniones existe comunicación entre célula y célula y se forman vías de baja resistencia entre células adyacentes que hacen que las células proximales estén eléctricamente acopladas (Berne & Levi, 1992; Ross *et al.*, 2005).

La membrana basal del epitelio tubular proximal funciona como soporte mecánico para las células tubulares y ofrece muy poca resistencia al pasaje de iones y otros solutos de bajo peso molecular (Rector, 1983).

El asa delgada de Henle continúa en forma abrupta a la “*pars recta*” y está constituida por células aplanadas cuyo núcleo protruye en la luz tubular. Las propiedades especiales de permeabilidad de estas células son importantes para el mantenimiento de una médula hipertónica y para la concentración de la orina. La longitud de este segmento varía entre 1 y 10 mm de acuerdo a si son asas cortas que pertenecen a nefrones corticales, o largas que pertenecen a nefrones yuxtaglomerulares.

El túbulo distal comprende tres segmentos: “*pars recta*” del tubo distal (rama gruesa ascendente del asa de Henle), mácula densa y túbulo contorneado distal. La rama gruesa ascendente del asa de Henle se reconoce por la presencia de células cuboidales con abundantes mitocondrias y profundas invaginaciones de la membrana basolateral. Estas características están asociadas a un activo transporte de sodio hacia el intersticio.

La “*pars recta*” se aproxima al polo vascular del glomérulo del que proviene y finaliza en la mácula densa, cuyas células se caracterizan por la proximidad de sus núcleos y su relación con el mesangio extraglomerular. Esta estructura se comporta como un

quimiorreceptor involucrado en la regulación de la circulación y filtrado glomerular. La mácula densa responde a la concentración y/o carga de NaCl en el túbulo distal regulando la resistencia de la arteriola aferente por medio de la liberación de renina y posterior formación de angiotensina II, por las células yuxtaglomerulares. El sistema renina-angiotensina regula el filtrado glomerular y aumenta la reabsorción tubular facultativa de Na<sup>+</sup> y agua.

El tubo contorneado distal se caracteriza por poseer una luz amplia y carecer, a diferencia del proximal, de ribete en cepillo.

Los túbulos colectores de la corteza se caracterizan por tener células claras o principales (que reabsorben Na<sup>+</sup> y agua) y células oscuras o intercalares (que secretan protones o bicarbonato). Los túbulos colectores, en respuesta a la hormona antidiurética, controlan la reabsorción de agua determinando el volumen y la concentración de la orina.

La sangre entra al riñón a través de la arteria renal, que se divide en arterias progresivamente más pequeñas: interlobar, arcuata y radial cortical (interlobular), que se resuelven en arteriolas aferentes, cada una de las cuales irriga un glomérulo. La arteriola eferente sale del glomérulo y se divide en los capilares peritubulares que se sitúan en la corteza renal a lo largo de los tubos proximales, túbulos distales y túbulos colectores corticales. Desde las porciones más profundas de la red peritubular salen unas largas asas capilares, llamados vasos rectos, que penetran en profundidad hacia la médula, situándose paralelos a las asas de Henle durante todo su recorrido, hasta las papilas renales. A partir de allí, estos capilares regresan a la corteza renal desembocando en las venas corticales que confluyen en la vena renal (Kerr, 1999).

## **MECANISMOS DE ACIDIFICACIÓN TUBULAR PROXIMAL**

Las reacciones químicas que ocurren en los organismos vivos requieren un pH óptimo. Los procesos enzimáticos, la estructura de las proteínas y la carga neta de las moléculas orgánicas dependen de la actividad de protones ( $H^+$ ) en el citosol y en el líquido extracelular. Es por esto que la concentración normal de  $H^+$  en el líquido extracelular debe ser mantenida en un rango muy estrecho para que sea compatible con la vida.

Como resultado del metabolismo celular (especialmente de la oxidación de aminoácidos sulfurados, la hidrólisis de ésteres fosfóricos y la degradación de proteínas) se incorporan al organismo alrededor de  $10^{-3}$  moles  $\times$   $kg^{-1}$   $\times$   $día^{-1}$  de iones hidrógeno. La carga ácida diaria llevaría al pH de los fluidos corporales a valores próximos a 3. Sin embargo, la concentración de  $H^+$  en el líquido extracelular se mantiene prácticamente constante por la existencia de mecanismos capaces de amortiguar dicha carga ácida.

La homeostasis del pH corporal es controlada principalmente por la reabsorción, generación o secreción de bicarbonato así como por la excreción de ácidos y equivalentes ácidos por el riñón (Hamm & Alpern, 2000). La regulación global del pH del medio extracelular es posible debido a la presencia en todos los fluidos corporales de sistemas amortiguadores o buffers ( $HCO_3^-/CO_2$ ;  $HNa_2PO_4$ , hemoglobina, proteínatos, etc.) que operan simultáneamente. Estas sustancias amortiguadoras evitan variaciones significativas en la concentración de  $H^+$  y son “consumidas” por la generación permanente de  $H^+$  como resultado del metabolismo y de la ingestión de ácidos en la dieta. Junto con la hemoglobina, el principal sistema amortiguador en la sangre es el  $HCO_3^-/CO_2$ , debido a las siguientes razones: el bicarbonato ( $HCO_3^-$ ) representa aproximadamente el 50% de la capacidad amortiguadora de la sangre, la presión parcial de  $CO_2$  ( $P_{CO_2}$ ) de la sangre se mantiene en equilibrio con el  $CO_2$  alveolar, lo que lo hace un sistema abierto y, finalmente, el  $HCO_3^-$  es el único amortiguador que puede ser regenerado por el riñón. Esta última condición determina que la carga ácida normal sólo pueda ser compensada totalmente a partir de la neoformación de  $HCO_3^-$ .

La filtración glomerular libera diariamente 4500 mEq de bicarbonato al túbulo proximal y en este segmento se reabsorbe el 80-90% del bicarbonato filtrado y se acidifican otros buffers luminales. Este proceso de reabsorción involucra el flujo neto de  $H^+$  ( $J_{H^+}$ ) hacia el lumen tubular a través de la membrana luminal de las células epiteliales proximales.

La acidificación de los fluidos en el túbulo proximal renal es importante para la recuperación del agua y las sales filtradas por el glomérulo, en vista de que el 70-80% de la reabsorción proximal de  $\text{Na}^+$  y agua está acoplada a la acidificación tubular.

La regulación de la secreción de protones en este segmento del nefrón provee un mecanismo importante para la corrección de los desórdenes del metabolismo ácido-base del organismo (Jehmlich *et al.*, 1991), ya que pequeños cambios en la concentración de protones pueden producir grandes alteraciones en las reacciones químicas celulares y es uno de los aspectos más importantes de la homeostasis.

Para mantener el equilibrio ácido-base los riñones deben evitar la pérdida urinaria de bicarbonato y reemplazar el buffer perdido. El primer proceso lo llevan a cabo reabsorbiendo la enorme cantidad de bicarbonato filtrado y el segundo proceso incluye la formación de ácidos que titulan el buffer filtrado y la formación de amonio. En el estado estacionario, la excreción neta ácida urinaria se define como los ácidos titulables más la eliminación de amonio menos la excreción de bicarbonato residual y es equivalente a la ingestión de ácidos en la dieta más la producción de ácido a partir de las reacciones metabólicas.

La necesidad de mantener un balance igual a cero entre los ingresos y egresos de  $\text{H}^+$  es satisfecha, en última instancia, por la capacidad renal de acidificar o alcalinizar la orina, dependiendo del estado ácido-base del organismo.

La regulación final de la excreción de ácido ocurre en el segmento distal del nefrón donde el transporte de protones es llevado a cabo por una  $\text{H}^+$ ATPasa. La eliminación distal de ácidos es regulada primariamente por las células intercalares que poseen acúmulos de la enzima  $\text{H}^+$ ATPasa, distribuidos en forma polarizada en la membrana plasmática, para realizar la secreción neta de protones (Bastani *et al.*, 1991).

***Acople de la secreción de protones al transporte de otros iones***

Se define como transporte activo primario a aquel que es producido en contra de su gradiente de potencial y que está además acoplado a una reacción química exergónica (Kedem & Katchalsky, 1961). Un ejemplo clásico de este tipo, es el transporte de  $\text{Na}^+$  mediado por la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa. Cuando un soluto cualquiera, se transporta utilizando en forma indirecta los gradientes electroquímicos creados por mecanismos como el recién mencionado, se dice que el mecanismo es “activo secundario”. Casos típicos son la absorción de glucosa y aminoácidos mediante su acople con el transporte de  $\text{Na}^+$ , tal como se observa en la membrana apical de ciertos epitelios (Aronson & Sacktor, 1975; Beck & Sacktor, 1975; Schultz, 1977; Sigrist-Nelson *et al.*, 1975; Ullrich, 1979).

Para cualquier ion, el potencial de equilibrio a través de la membrana apical es:

$$E_{\text{ion}} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{C_1}{C_2}$$

donde R es la constante de los gases, T es la temperatura en grados Kelvin, z es la valencia del ion, F es la constante de Faraday y  $C_1$  y  $C_2$  son las concentraciones de dicho ion en dos compartimientos.

Los valores informados de pH intracelular en células tubulares proximales están en torno a 7.2 (Henderson *et al.*, 1986; Sasaki *et al.*, 1985; Yoshitomi & Fromter, 1984) y el pH del filtrado glomerular es 7.4. A una temperatura de 37°C, el potencial de equilibrio para los  $\text{H}^+$  es +12 mV.

En el túbulo proximal, la diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana luminal ( $V_m$ ) es similar a la que existe a través de la membrana basolateral (aproximadamente -60 mV). Por lo tanto, la fuerza impulsora para los protones ( $V_m + E_{\text{H}^+}$ ) equivale a -48 mV, en contra de su salida pasiva. De este modo, el gradiente de potencial electroquímico a través del epitelio tubular proximal sugiere la presencia de mecanismos de transporte activo para la transferencia de  $\text{H}^+$  desde el citoplasma de la célula tubular hacia el lumen.

Dado que las concentraciones de  $\text{Na}^+$  intracelular y luminal son 15 mM y 140 mM respectivamente, la fuerza impulsora para este ion se halla a favor de la entrada pasiva de  $\text{Na}^+$  a la célula proximal. Esto hace posible que la disipación del gradiente de  $\text{Na}^+$

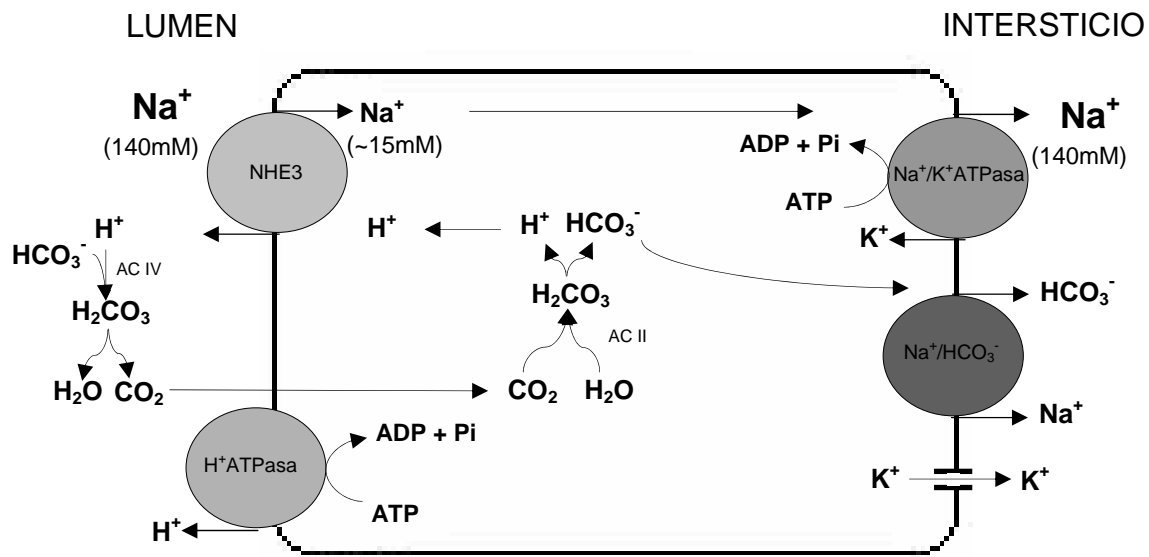
favorezca la secreción de  $H^+$ . En experimentos realizados en vesículas aisladas de ribete en cepillo del túbulo proximal (Aronson, 1983; Kinsella & Aronson, 1980; Murer *et al.*, 1998; Warnock *et al.*, 1982) así como en experimentos de micropuntura (de Mello & Malnic, 1979; Ullrich *et al.*, 1975) y en túbulos aislados y perfundidos (Bichara *et al.*, 1980 y 1983; Burg & Green, 1977; Schwartz, 1981) se demostró que el gradiente de  $Na^+$  cumple un papel fundamental en la secreción de  $H^+$ . Dicho gradiente de  $Na^+$  a través de la membrana apical proveería la fuerza impulsora para la secreción de  $H^+$ . El gradiente estaría dado por la baja concentración de  $Na^+$  intracelular, debida al transporte activo primario de  $Na^+$ , realizado por la  $Na^+/K^+$ ATPasa ubicada en la membrana basolateral de la célula proximal que genera un gradiente electroquímico favorable a la entrada de  $Na^+$  a través de la membrana luminal. La  $Na^+/K^+$ ATPasa no se halla presente en la membrana luminal y esta distribución asimétrica de la enzima provee las bases para el transporte vectorial de  $Na^+$  desde el fluido luminal a la sangre. Este complejo enzimático bombea  $Na^+$  fuera de la célula intercambiándolo por  $K^+$ , utilizando energía proveniente de la hidrólisis de ATP, manteniendo una baja concentración de sodio y una alta de potasio dentro de la misma. El interior celular se encuentra eléctricamente polarizado porque el potasio difunde fuera de la célula a favor de su gradiente de concentración y porque la bomba  $Na^+/K^+$ ATPasa es electrogénica. El gradiente de concentración de sodio y la diferencia de potencial generados entre el interior celular y los fluidos extracelulares proveen la fuerza por la cual el transporte de muchos otros solutos está energizado (Rector, 1983). El  $Na^+$  ingresa a la célula a través del intercambiador  $Na^+/H^+$  ubicado en la membrana apical produciendo la secreción activa de  $H^+$  hacia el lumen del túbulo. Este  $H^+$  titula al  $HCO_3^-$  a  $H_2CO_3$  que luego se convierte en  $CO_2$  y  $H_2O$ . Esta reacción está favorecida por la anhidrasa carbónica (isoenzima tipo IV) que se encuentra unida a la membrana luminal y facilita la reabsorción de bicarbonato por catalizar la hidrólisis del  $H_2CO_3$  luminal. La isoenzima tipo II de la anhidrasa carbónica, localizada en el citoplasma, cataliza la interconversión de  $CO_2$  y  $OH^-$  a  $HCO_3^-$  (Mackovic-Basic & Kurtz, 1990), manteniendo un suplemento intracelular adecuado de  $H^+$  para los procesos secretorios (Rector, 1983). Como la secreción de  $H^+$  mediada por el intercambiador  $Na^+/H^+$  utiliza la fuerza del gradiente de  $Na^+$  generado por la  $Na^+/K^+$ ATPasa, el intercambiador es un sistema de transporte activo secundario.

Por cada protón secretado dentro del lumen tubular un ion bicarbonato es generado dentro de la célula proximal. El ion bicarbonato es transportado, a través de la membrana

basolateral, mediante el cotransportador  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  (Aronson, 1983; Chen & Boron, 1991). El cotransporte de  $\text{Na}^+$  y  $\text{HCO}_3^-$  es electrógeno. Si bien en principio se propuso que la estequiometría de este transporte era de tres iones  $\text{HCO}_3^-$  por cada  $\text{Na}^+$  (Yoshitomi *et al.*, 1985), posteriormente se postuló un transporte de  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{CO}_2$  y  $\text{Na}^+$  con una relación 1:1:1 (Soleimani & Aronson, 1989). Se ha observado que la inhibición específica de este transportador provoca una disminución en la tasa de acidificación luminal ya que la acumulación intracelular de  $\text{HCO}_3^-$  debida al bloqueo del cotransportador  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ , produciría una alcalinización del citoplasma de la célula proximal, afectando la actividad del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Alpern, 1985; Aronson *et al.*, 1982). Algunos de los factores que afectan la actividad del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , tales como la presencia de angiotensina II (Coppola & Fromter, 1994; Geibel *et al.*, 1990) o variaciones crónicas en el estado ácido-base (Ruiz *et al.*, 1989), también afectan la actividad del cotransportador  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  basolateral.

La presencia de un mecanismo de secreción de protones independiente de sodio, dependiente de ATP y resistente a oligomicina (un inhibidor de la  $\text{H}^+$ ATPasa mitocondrial) ha sido demostrado en las células del túbulo proximal (Kinne-Saffran & Kinne, 1974) y en vesículas de membrana apical de tubo contorneado proximal (Kinne-Saffran *et al.*, 1982). Una  $\text{H}^+$ ATPasa mediaría la secreción activa primaria de  $\text{H}^+$  en el túbulo proximal, responsable de la fracción de reabsorción de  $\text{HCO}_3^-$  independiente de  $\text{Na}^+$  (Zimolo *et al.*, 1992). La existencia de esta enzima fue postulada en base a la inhibición de la reabsorción proximal de bicarbonato por bafilomicina, un inhibidor específico de este transportador (Malnic & Geibel, 2000) (*Figura 2*).

Una fracción significativa (35%) del transporte de protones ocurre a través de la  $\text{H}^+$ ATPasa independientemente de la actividad del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  a quien corresponde el 65% restante (Kinsella & Aronson, 1980).



**Figura 2:** Modelo de célula de túbulo contorneado proximal en la cual el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y la  $\text{H}^+$ ATPasa median la secreción activa de protones a través de la membrana apical. Los  $\text{H}^+$  secretados se combinan con el  $\text{HCO}_3^-$  filtrado, por acción de la enzima anhidrasa carbónica unida a membrana (AC IV), para formar  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{CO}_2$ . El  $\text{CO}_2$  difunde al interior de la célula y es transformado por acción de la anhidrasa carbónica citosólica (AC II) en  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{H}^+$ . El  $\text{H}^+$  es secretado y el  $\text{HCO}_3^-$  es liberado al intersticio a través del cotransportador  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  basolateral.

### *Influencia de la acidificación luminal sobre la reabsorción de $\text{Na}^+$ y agua*

Una de las funciones principales del nefrón es la reabsorción de la mayor parte del agua y los electrolitos filtrados y su estricto control es esencial para el mantenimiento del balance hídrico. A través de la disociación de la absorción de agua y solutos, los animales terrestres poseen la capacidad de excretar una orina en un amplio rango de osmolaridades. El proceso de reabsorción de volumen implica el movimiento de agua a través de la capa de células epiteliales de varias regiones del nefrón, en respuesta a diferencias de osmolaridad, a través de las membranas plasmáticas individuales y/o de las uniones



intercelulares y los espacios paracelulares que separan células adyacentes. Sin embargo, las características de los diferentes segmentos del nefrón, con respecto al movimiento de agua y su acople al transporte de solutos, varía considerablemente debido a la existencia de una variedad de mecanismos para la reabsorción de volumen. De acuerdo con sus características eléctricas, los epitelios se han clasificado en dos grupos: epitelios absortivos con baja resistencia eléctrica o “leaky” y epitelios de alta resistencia o “tight”. Con respecto a la permeabilidad al agua, los epitelios “leaky” son muy permeables y los epitelios “tight” son relativamente impermeables. Se puede definir un tercer grupo cuya permeabilidad al agua está regulada hormonalmente y puede ser alta o baja.

El nefrón proximal de mamíferos es un buen ejemplo de epitelio del primer grupo. Existe una vía transepitelial de baja resistencia a través del epitelio tubular proximal que indicaría que las uniones estrechas son permeables a iones y que una fracción del flujo de volumen procedería por la vía paracelular, a través de las uniones intercelulares y los espacios laterales entre células vecinas (Whittembury *et al.*, 1985).

En el riñón de mamíferos, el volumen total de líquido absorbido a través del epitelio del túbulo proximal es mayor que el absorbido a través de cualquier otro epitelio (Schafer, 1987). Desde los primeros experimentos de micropuntura se estableció que este proceso ocurría en ausencia de un gradiente transepitelial de osmolaridad (Gottschalk & Mylle, 1959). Aunque la osmolaridad final de la orina puede variar en un amplio rango, alrededor del 70% del volumen de filtrado glomerular se reabsorbe isoosmóticamente en el túbulo proximal. El mecanismo subyacente se explicó como la difusión de agua a través del epitelio, siguiendo al soluto que se reabsorbe (Smith, 1951). La alta permeabilidad del túbulo proximal permite que el agua se equilibre rápidamente entre ambos lados del epitelio previniendo el desarrollo de un gradiente transepitelial de osmolaridades. Esta característica promueve un acople estrecho entre la absorción de agua y de solutos y el movimiento rápido de volumen.

En el túbulo proximal, el flujo osmótico de agua está acoplado al transporte de  $\text{Na}^+$ . Aproximadamente un 80% de la reabsorción proximal de  $\text{Na}^+$  depende del intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Por lo tanto, el estudio de los mecanismos involucrados en el control de la acidificación proximal, podría aportar datos relevantes para la comprensión de los procesos de regulación de la reabsorción de  $\text{Na}^+$  y agua a este nivel.

### **Intercambiador $\text{Na}^+/\text{H}^+$**

#### *Características generales*

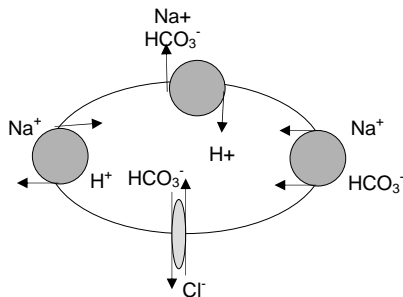
Los intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHEs) son un conjunto de proteínas de membrana que median el intercambio electroneutro de  $\text{Na}^+$  que ingresa a la célula, por  $\text{H}^+$  que se secreta al medio extracelular con una estequiometría 1:1. Esta proteína se encuentra ubicuamente expresada y está involucrada en la regulación del pH intracelular e intraorganelar y del volumen celular así como en el transporte transepitelial de electrolitos:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}^+$  y  $\text{HCO}_3^-$  (Lang *et al.*, 2003; Rector, 1983). La extrusión de protones mediada por los NHEs elimina el exceso de ácidos acumulados dentro de la célula por su metabolismo, jugando un importante papel en la mantención de la homeostasis del pH intracelular. También, la actividad de los NHEs contribuye a procesos como adhesión celular y migración, y facilita la iniciación del crecimiento y proliferación celular en respuesta a varios factores de crecimiento y mitógenos (Moe, 1999). Varias isoformas de NHEs han sido localizadas en endomembranas. Dentro de las organelas es indispensable el mantenimiento del pH para permitir que se lleven a cabo correctamente los eventos de compartimentalización celular tales como modificaciones postraduccionales, envío de proteínas recién sintetizadas al exterior celular y degradación o reciclado de los complejos ligando-receptor internalizados (Mellman, 1992; Nishi & Forgac, 2002). Una representación esquemática de los roles fisiológicos llevados a cabo por los NHEs puede observarse en la *figura 3*.

La secreción de protones mediada por el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  es dependiente de la presencia de  $\text{Na}^+$  extracelular (Chan & Giebisch, 1981; Ullrich *et al.*, 1977) y de una bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPasa intacta. La cinética para el transporte de  $\text{Na}^+$  sigue un modelo de Michaelis-Menten, con un coeficiente de Hill igual a 1, lo cual sugiere la existencia de un solo sitio de unión para el  $\text{Na}^+$  extracelular (Mahnensmith & Aronson, 1985) mientras que el  $\text{H}^+$  intracelular actúa como sustrato y como activador alostérico (Aronson *et al.*, 1982).

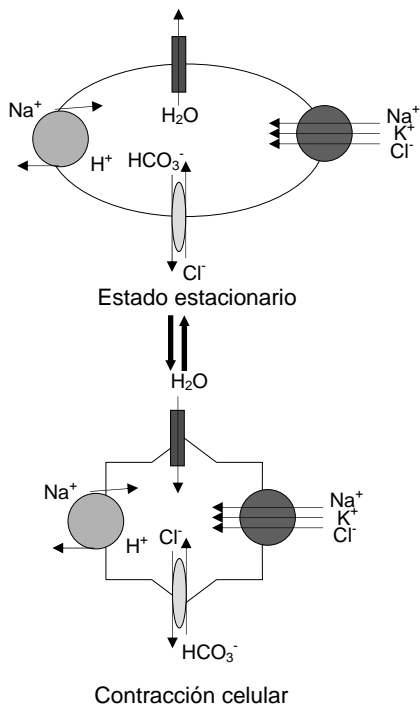
Las isoformas del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  son inhibidas por varias clases de compuestos farmacológicos de manera reversible y competitiva. Los inhibidores identificados para esta enzima son el diurético amiloride y sus análogos, compuestos de benzoil-guanidinio como los HOE694 (cariporide) y HOE642, cimetidina, clonidina, y harmalina (Bookstein *et al.*, 1996; Chambrey *et al.*, 1997; Counillon *et al.*, 1993; Numata & Orłowski, 2001; Orłowski,

1993; Scholz *et al.*, 1995; Szabó *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 1993). Estos compuestos bloquean la actividad del intercambiador compitiendo con el  $\text{Na}^+$  por el sitio externo de unión de este ion a la proteína (Benos, 1988) e interactuando con otros sitios no involucrados en la unión de cationes (Mahnensmith & Aronson, 1985; Warnock *et al.*, 1988). La inhibición es casi inmediata y reversible (Aronson, 1983; Counillon *et al.*, 1993; Kinsella & Aronson, 1981).

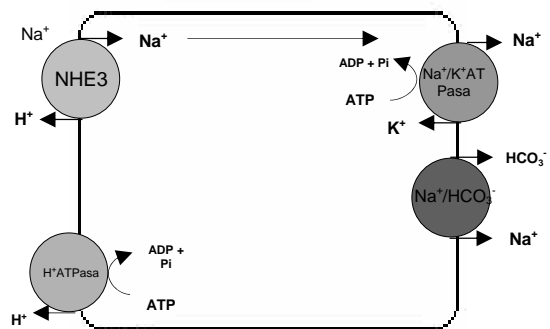
**A) Homeostasis pH citoplasmático**



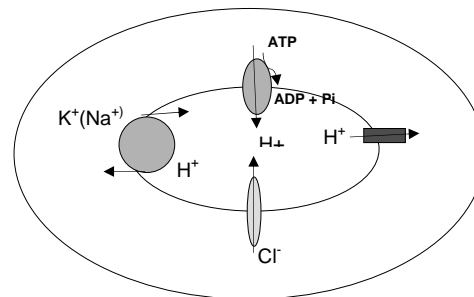
**B) Regulación del volumen celular**



**C) Reabsorción de  $\text{Na}^+$  y  $\text{HCO}_3^-$**



**D) Homeostasis pH de organelas**



**Figura 3:** Funciones llevadas a cabo por los intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en mamíferos. **A)** Homeostasis del pH celular, **B)** Regulación del volumen celular, **C)** Reabsorción de  $\text{Na}^+$  y  $\text{HCO}_3^-$  epitelial y **D)** Homeostasis del pH de las organelas.

Recientemente, ha sido sintetizado un antagonista exclusivo de NHE3, el dihidrocloruro de 3-[2-(3-guanidino-2-metil-3-oxo-propenil)-5-metil-fenil]-N-isopropilideno-2-metil-acrilamida (S3226), que ha facilitado el estudio funcional de esta isoforma (Schwark *et al.*, 1998).

### *Localización*

Los intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  son fosfoproteínas altamente reguladas que se encuentran presentes en todos los tejidos de mamíferos estudiados hasta el momento. Todas las isoformas de los NHEs están expresadas en el riñón en distintos niveles en base a la heterogeneidad de los fenotipos celulares que podemos encontrar a lo largo del nefrón. En células de mamíferos la actividad de los NHEs se encuentra localizada tanto en la membrana plasmática como en las membranas de varias organelas.

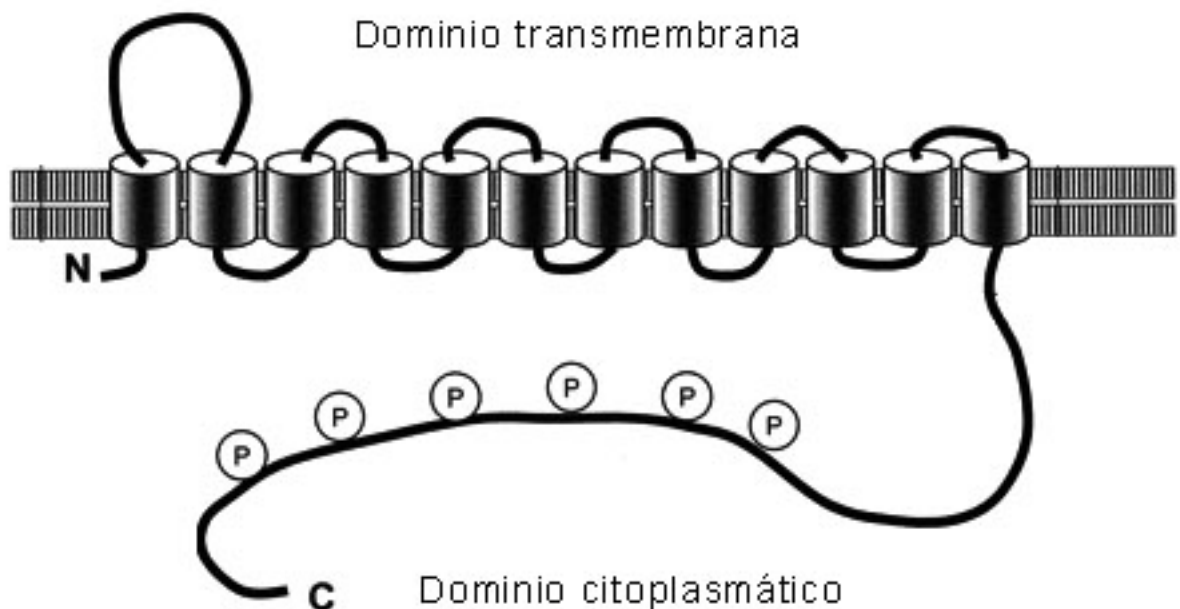
### *Diversidad genética y estructura molecular*

Hasta el momento se han identificado nueve isoformas, denominadas NHE1-NHE9, que están codificadas por una familia de genes clonados y caracterizados (Brant *et al.*, 1995; Goyal *et al.*, 2003; Klanke *et al.*, 1995; Nakamura *et al.*, 2005; Numata *et al.*, 1998; Numata & Orłowski, 2001; Orłowski *et al.*, 1992; Sardet *et al.*, 1989; Tse *et al.*, 1992 y 1993a). El análisis filogenético de las secuencias de aminoácidos revela que las nueve isoformas pueden ser clasificadas en dos grupos NHE1-NHE5, ubicadas en membrana plasmática y NHE6, NHE7 y NHE9 situadas en membranas de organelas (Nakamura *et al.*, 2005). La isoforma NHE8 se localiza en ambos sitios.

Mediante análisis estructural y modelado computarizado, basado en la predicción de estructuras secundarias y en la naturaleza hidrofóbica e hidrofílica ( $\alpha$ -hélice y lámina  $\beta$ ), de los NHEs se determinó que todas estas proteínas presentan un dominio aminoterminal formado por 10-12 hélices transmembrana (M) y un largo dominio hidrofóbico carboxiterminal citoplasmático (*Figura 4*) (Igarashi *et al.*, 1991; Orłowski & Grinstein, 1997; Zizak *et al.*, 2000).

La máxima homología de secuencias se encontró en las regiones transmembrana (40-70%), específicamente en segmentos supuestamente involucrados en el reconocimiento del

H<sup>+</sup> y/o en el transporte de cationes. Los aminoácidos cargados de las porciones transmembrana están conservados en todos los miembros de esta familia de transportadores. La secuencia de aminoácidos del segmento carboxiterminal presenta la mayor divergencia entre las distintas isoformas y contiene varios sitios consenso para fosforilación por distintas proteínas quinasas de serina/treonina, sitios de unión para factores complementarios y secuencias consenso para la internalización. Esta región determina la naturaleza de la regulación de la actividad del intercambiador (Borgese *et al.*, 1994; Moe, 1999). Se cree que el dominio aminoterminal podría contener secuencias que definen la especificidad de expresión (especie, tejido y/o localización subcelular).



**Figura 4:** Estructura general de los NHEs. Todos los miembros de la familia NHE comparten una estructura semejante con un extremo aminoterminal de aproximadamente 400 aminoácidos con 10-12 dominios transmembrana. El dominio carboxiterminal es citoplasmático y posee secuencias consenso para la fosforilación mediada por quinasas y sitios de unión para varios factores regulatorios (Moe, 1999).

Aunque está ampliamente aceptado que la porción carboxiterminal mira hacia el citoplasma, análisis inmunológicos han sugerido que ciertos epitopes ubicados en esa porción de las isoformas NHE1 y NHE3 podrían estar expuestos hacia el lado extracelular (Biemesderfer *et al.*, 1992; Khan, 2001)

NHE1 contiene residuos N- y O- glicosilados (Cournillon *et al.*, 1994), NHE2 exhibe O-glicosilación (Tse *et al.*, 1994) y NHE8 está N-glicosilada (Goyal *et al.*, 2003) mientras que NHE3 no se encuentra glicosilada (Biemesderfer *et al.*, 1993). La glicosilación de estas proteínas está involucrada en el proceso de distribución hacia las membranas (Reithmeier, 1994) pero no tiene un rol evidente en la actividad de los NHEs.

NHE1 y NHE3 pueden formar homodímeros y el sitio para la dimerización está localizado en las regiones transmembrana del dominio aminoterminal (Fafournoux *et al.*, 1994). NHE1 y NHE3 no forman heterodímeros, lo cual indicaría que las secuencias para la dimerización son diferentes en cada isoforma. A pesar de la existencia de formas oligoméricas, no se ha determinado aún si la unidad funcional del intercambiador es un monómero o un oligómero.

### *Isoformas*

La existencia de distintas isoformas de NHEs ha sido postulada en base a la sensibilidad diferencial a la inhibición por amiloride y a las diferencias halladas en la regulación por proteínas quinasas en los distintos tipos y localizaciones celulares (Clark & Limbird, 1991; Tse *et al.*, 1993b).

### **NHE1**

El NHE activado por factores de crecimiento (NHE1) fue el primero en ser clonado (Sardet *et al.*, 1989) con un tamaño que oscila entre 815 y 820 aminoácidos.

Dicho intercambiador está presente en casi todos los tipos celulares analizados (Tse *et al.*, 1991). Se localiza exclusivamente en la membrana plasmática acumulándose en pequeños microdominios de la misma, dependiendo del tipo celular. En el riñón, se expresa en segmentos tubulares corticales que presentan intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en la membrana basolateral. No se detectó esta isoforma en el túbulo proximal de rata (Biemesderfer *et al.*,

1992; Krapf & Solioz, 1991). Sin embargo, el túbulo proximal de conejo muestra NHE1 en la membrana basolateral. (Biemesderfer *et al.*, 1992).

NHE1 cumple dos funciones fundamentales. Por un lado, es el principal mecanismo de alcalinización que poseen las células para contrarrestar los efectos dañinos producidos por la acumulación de ácidos provenientes del metabolismo y por ello, junto con los sistemas de transporte de bicarbonato, mantiene el balance ácido-base citoplasmático. Por otro lado, es una de las principales vías de entrada de sodio, acoplada a la reabsorción de cloro y agua, necesaria para la mantención del volumen celular en el estado estacionario (Rotin & Grinstein, 1989).

### **NHE2**

NHE2 ha sido identificado en conejo (Tse *et al.*, 1993a), en rata (Wang *et al.*, 1993) y en humano (Ghishan *et al.*, 1995). Contiene 809 aminoácidos en conejo y 813 aminoácidos en rata. Es expresado predominantemente en estómago, útero, riñón, intestino, glándula adrenal y en menor cantidad en tráquea y músculo esquelético (Tse *et al.*, 1993a; Wang *et al.*, 1993). Se expresa preferencialmente en células epiteliales polarizadas del tracto intestinal y del riñón y se lo asoció al transporte vectorial transepitelial de Na<sup>+</sup> (Hoogerwerf *et al.*, 1996). NHE2 está localizado en membranas apicales de varios segmentos del nefrón (Wang *et al.*, 1999), se encuentra en túbulo contorneado proximal, en asa gruesa ascendente de Henle, en mácula densa, en túbulo contorneado distal y en tubo colector (Chambrey *et al.*, 1998; Peti-Peterdi *et al.*, 2000).

### **NHE3**

La isoforma NHE3 del intercambiador posee un peso molecular entre 80 y 100 kDa (Soleimani *et al.*, 1995). El gen codificante para la isoforma NHE3 se clonó en conejo (Tse *et al.*, 1992), rata (Orlowski *et al.*, 1992), humano (Brant *et al.*, 1995) y ratón (Pathak *et al.*, 1996). La expresión de la proteína NHE3 en la membrana apical de corteza renal fue demostrada por primera vez en conejo (Biemesderfer *et al.*, 1993). Más tarde, mediante análisis por western blot, se confirmó la expresión de NHE3 en corteza y médula externa renal de rata. La distribución de NHE3 se estudió con técnicas inmunohistoquímicas (Amemiya *et al.*, 1995a) y mediante el uso de anticuerpos monoclonales desarrollados para su detección (Biemesderfer *et al.*, 1997). Esta isoforma está presente exclusivamente en

membranas apicales, principalmente en el ribete en cepillo de los segmentos S1 y S2 del túbulo proximal y en el asa gruesa ascendente de Henle.

La isoforma NHE3 se encuentra asimétricamente ubicada en la membrana luminal de las células del segmento proximal (Ives *et al.*, 1983) y allí cataliza el intercambio electroneutro de Na<sup>+</sup> luminal y H<sup>+</sup> celular.

Además, NHE3 fue detectado en una población de endosomas subapicales asociados a clatrina, los cuales podrían servir como un reservorio de esta proteína que se mueve desde y hacia la membrana luminal en respuesta a estímulos hormonales (D'Souza *et al.*, 1998). Los ratones *NHE3*<sup>-/-</sup> presentan diarrea y alcalinización de los contenidos intestinales lumbinales con una disminución de la reabsorción de H<sub>2</sub>O y HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> en el túbulo contorneado proximal, acidosis y presión arterial baja. Estas características muestran la importancia fundamental de NHE3 en las funciones absortivas del aparato digestivo y del riñón, que influyen profundamente el nivel de electrolitos, el balance ácido-base y la presión arterial (Ledoussal *et al.*, 2001; Schultheis *et al.*, 1998).

#### **NHE4**

La isoforma NHE4 está presente en estómago, intestino, útero, riñón, cerebro y músculo esquelético. En el riñón, se localiza en fracciones de membrana basolateral de corteza (Orlowski *et al.*, 1992; Pizzonia *et al.*, 1998) con altos niveles de expresión en asa gruesa ascendente de Henle y túbulo contorneado distal. Niveles menores se han detectado en túbulo proximal y conducto colector cortical (Chambrey *et al.*, 2001). Se ha postulado que participa en la regulación del volumen celular (Bookstein *et al.*, 1994).

#### **NHE5**

En 1995, Klanke y colaboradores clonaron la isoforma NHE5 en humanos (Klanke *et al.*, 1995). Los análisis por northern blot (Baird *et al.*, 1999) y por hibridación “*in situ*” (Attaphitaya *et al.*, 1999) revelaron que esta isoforma se expresa en el sistema nervioso central. NHE5 muestra un 50% de homología con NHE3 y propiedades similares. Su rol en la función neuronal es desconocido pero se ha sugerido que participaría en la regulación del volumen celular, complementando la actividad de NHE1 (Attaphitaya *et al.*, 2001) o que podría modular la acidificación de las vesículas sinápticas cumpliendo un rol en la concentración del neurotransmisor en las mismas (Liu & Edwards, 1997).



**NHE6**

NHE6, fue detectado por northern blot en casi todos los tipos celulares, con los más altos niveles de expresión en células ricas en mitocondrias. En base a resultados obtenidos utilizando una proteína de fusión NHE6-“*green fluorescent protein*” y técnicas de microscopía de fluorescencia, se postuló que dicha isoforma se localizaba en la membrana interna mitocondrial (Numata *et al.*, 1998). Sin embargo, más tarde se demostró que NHE6 posee un péptido señal para su direccionamiento al retículo endoplasmático y se comprobó su localización en fracción microsomal de hígado de rata (Miyazaki *et al.*, 2001). Dicho resultado fue complementado por los resultados obtenidos por Brett y colaboradores, quienes observaron que NHE6 no colocaliza con marcadores mitocondriales ni del sistema de Golgi pero sí con marcadores endosomales y de membrana plasmática (Brett *et al.*, 2002). Mediante observaciones al microscopio electrónico NHE6 se localizó en endosomas tempranos (Nakamura *et al.*, 2005) y por ello se cree que esta isoforma del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  podría contribuir a la regulación del pH de estas organelas.

**NHE7**

NHE7 se localiza principalmente en las membranas de la red trans-Golgi y endosomas de cerebro, músculo esquelético, páncreas, riñón y glándulas salivales. Se distingue de las otras isoformas por su capacidad de transportar  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$  en lugar de  $\text{H}^+$  en condiciones fisiológicas y funciona regulando la concentración de  $\text{K}^+$  y el volumen celular de la red trans-Golgi (Aronson, 1985; Numata & Orłowski, 2001).

**NHE8**

En 2003 Goyal y colaboradores clonaron la isoforma NHE8 detectada principalmente en las membranas apicales del túbulo proximal de corteza renal (Goyal *et al.*, 2003). NHE8 es una proteína de 85 kDa que fue localizada únicamente en los segmentos S1 a S3 del túbulo proximal aunque no se excluye la posibilidad de que la misma se encuentre en un compartimiento intracelular (Goyal *et al.*, 2005). Posteriormente, Nakamura y colaboradores hallaron esta isoforma principalmente en la red trans-Golgi de músculo esquelético y riñón de humanos (Nakamura *et al.*, 2005).

Hasta hoy no se ha podido caracterizar funcionalmente a la proteína nativa en células de mamíferos pero, en base a su secuencia de aminoácidos y su localización en la membrana apical proximal, se ha postulado que esta isoforma participaría en la reabsorción proximal de  $\text{HCO}_3^-$  en este segmento del riñón. Zhang y colaboradores mostraron, por western blot, inmunohistoquímica fluorescente confocal y microscopía inmunoelectrónica, que NHE8 se expresa en la membrana luminal de células de riñón de rata normal (NRK) y que la proteína actúa como un intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , dependiente de  $\text{Na}^+$  y altamente sensible a EIPA (Zhang *et al.*, 2007).

### **NHE9**

Recientemente, se clonó una nueva isoforma (NHE9), detectada principalmente en endosomas tardíos de todos los tejidos humanos analizados. NHE9 causa alcalinización de los compartimientos en los que se encuentra, sugiriendo una función de intercambio de protones por cationes citosólicos (Nakamura *et al.*, 2005).

#### *Identificación de la isoforma responsable de la acidificación tubular proximal*

Existen controversias acerca de la participación de la isoforma NHE2 en el proceso de acidificación tubular proximal. El ARN mensajero para la isoforma NHE2 se encuentra presente en el túbulo proximal de rata (Azuma *et al.*, 1996). Por otra parte, se detectó la proteína NHE2 en vesículas de ribete en cepillo de corteza renal de rata, mediante western blot (Hoogerwerf *et al.*, 1996). Sin embargo, Chambrey y colaboradores mostraron que, en la rata, el NHE2 se localiza en las membranas apicales de túbulos renales que carecen de ribete en cepillo. Estos autores, no detectaron NHE2 en túbulo proximal pero sí en túbulo contorneado distal y concluyeron que esta isoforma podría estar involucrada en la reabsorción distal de  $\text{HCO}_3^-$  (Chambrey *et al.*, 1998). Debido a las diferencias observadas en cuanto a la expresión de NHE2 en el túbulo proximal, se realizaron experimentos complementarios para determinar la posible participación de dicho intercambiador en la secreción proximal de  $\text{H}^+$  (Choi *et al.*, 2000; Vallon *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001). Utilizando túbulos aislados y perfundidos “*in vitro*”, Choi y colaboradores observaron una reducción del 80% en la secreción proximal de  $\text{H}^+$  dependiente de  $\text{Na}^+$  en presencia de EIPA (un inhibidor con gran afinidad por NHE3) y no observaron cambios en dicho

parámetro con HOE-694 (un inhibidor de las isoformas NHE1 y NHE2) (Choi *et al.*, 2000). El compuesto S3226, que inhibe en forma específica a NHE3, produjo un descenso dosis dependiente en la reabsorción de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y fluido en el túbulo proximal de animales normales (Vallon *et al.*, 2000). Wang y colaboradores, observaron que S3226 produce una inhibición del 56% en la reabsorción proximal de bicarbonato y agua (Wang *et al.*, 2001). Los parámetros mencionados no se vieron afectados por la administración intratubular de HOE-694 (Wang *et al.*, 2001) o de HOE-642, un inhibidor de NHE1 (Vallon *et al.*, 2000).

El desarrollo de animales con disrupción de los genes codificantes para las proteínas NHE2 y NHE3 también permitió evaluar la contribución de dichos transportadores en el proceso de acidificación tubular proximal. Los animales con genotipo  $NHE2^{-/-}$ , que carecen de NHE2 funcional, no presentan alteraciones en la secreción proximal de  $\text{H}^+$  dependiente de  $\text{Na}^+$  (Choi *et al.*, 2000). Sin embargo, se demostró que la reabsorción de volumen en el túbulo proximal está directamente relacionada con el número de copias del gen  $NHE3$ , de modo que la reabsorción es mayor en los ratones con genotipo  $NHE3^{+/+}$ , menor en los animales heterocigotas  $NHE3^{+/-}$  y menor aún en aquellos con genotipo  $NHE3^{-/-}$  (Lorenz *et al.*, 1999; Schultheis *et al.*, 1998). Los animales con genotipo  $NHE3^{-/-}$  presentaban una reducción del 60% en reabsorción proximal de bicarbonato y agua (Schultheis *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2001) y en la secreción de  $\text{H}^+$  dependiente de  $\text{Na}^+$  (Choi *et al.*, 2000). En estos animales la fracción remanente de reabsorción de bicarbonato y agua es insensible a inhibidores de NHE2, sugiriendo la no participación de este transportador en la acidificación proximal de los animales  $NHE3^{-/-}$  (Wang *et al.*, 1999).

Dado que la inhibición de la secreción de  $\text{H}^+$  fue del 80% en animales normales en presencia de EIPA, y de solamente el 60% en los animales con genotipo  $NHE3^{-/-}$ , sin EIPA, se sugirió la presencia de una nueva isoforma del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , activa en el túbulo proximal y sensible a EIPA (Choi *et al.*, 2000). Recientemente, se detectó la presencia de NHE8 en las membranas apicales del túbulo proximal. La isoforma NHE8 es sensible a EIPA, y se ha postulado que, junto con NHE3, participaría en el proceso de acidificación proximal (Goyal *et al.*, 2003 y 2005; Zhang *et al.*, 2007).

Todos estos resultados indicarían que el proceso de acidificación tubular proximal estaría mediado, en su mayor parte, por el intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , catalizado principalmente por la isoforma NHE3, con una participación menor de la isoforma NHE8.

*Regulación de la actividad de la isoforma NHE3 del intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>*

El intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> se encuentra estrechamente regulado para mantener la homeostasis ácido-base y del volumen celular. Dado que la contribución de NHE3 en el proceso de acidificación proximal es mayoritaria, es de esperar que la mayor parte de los mecanismos de control de dicho proceso operen a través de la modulación de la tasa de intercambio Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> apical.

La observación de alteraciones macroscópicas en procesos dependientes de la actividad de transportadores puede deberse básicamente a: *a*) cambios en la actividad intrínseca del transportador debidos a variaciones en la afinidad ( $K_m$ ) de dicha molécula por su sustrato; *b*) cambios en la cantidad de moléculas de transportador disponibles, o *c*) una combinación de ambos efectos. En general, los estímulos aplicados en forma aguda, modulan la actividad del NHE3 a corto plazo mediante cambios en el  $K_m$  del intercambiador por los H<sup>+</sup>. En cambio, la regulación a largo plazo, en respuesta a estímulos crónicos, se realiza a través de cambios en el número de sitios disponibles para el intercambio Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (Moe, 1999).

NHE3 responde a estímulos de variada naturaleza. Entre otros se han citado las variaciones en el estado-ácido base (Eladari *et al.*, 2002; Igarashi *et al.*, 1992) y en el volumen celular (Hoffman, 2000; Soleimani *et al.*, 1994). Diversas hormonas afectan al intercambio Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> en membrana apical de túbulo proximal, entre ellas, mineralocorticoides (Krug *et al.*, 2003), glucocorticoides (Ambuhl *et al.*, 1999; Baum *et al.*, 1996; Bidet *et al.*, 1987), corticosterona (Zallocchi *et al.*, 2003), hormona paratiroidea (Collazo *et al.*, 2000; Fan *et al.*, 1999; Girardi *et al.* 2000; McKinney & Myers, 1980a), hormona tiroidea (Azuma *et al.*, 1996; Baum *et al.*, 1998; Cano *et al.*, 1999), insulina (Klisic *et al.*, 2002), glucagon (Amemiya *et al.*, 2002), adenocorticotropina (Khan & Cheng, 2001), péptido natriurético atrial (Eitle *et al.*, 1998; Harris *et al.*, 1996), endotelina (Laghmani *et al.*, 2002) y angiotensina II (Baum *et al.*, 1997; Harris & Navar 1985; Jourdain *et al.*, 1992; Liu & Cogan, 1988). Algunos factores de crecimiento, tales como FGF (“*fibroblast growth factor*”) (Yip *et al.*, 1997), EGF (“*epidermal growth factor*”) (Donowitz *et al.*, 2000) e IGF (“*insulin-like growth factor*”) (Johnson *et al.*, 1997) modifican la actividad del intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>. Han sido descritas modulaciones sobre

NHE3 por acetilcolina, bradiquinina, ATP (Amorena & Castro, 1997) y dopamina (Gomes *et al.*, 2001; Wiederkehr *et al.*, 2001). El óxido nítrico (NO), también afecta la secreción proximal de H<sup>+</sup> dependiente de Na<sup>+</sup> (Amorena & Castro, 1997; Baines & Ho, 2002; Linas & Repine, 1999; Rocznik & Burns, 1996; Wang, 1997).

En muchos casos, los cambios en la actividad de NHE3 en respuesta a un estímulo, implican la interacción de dicho estímulo con receptores de membrana acoplados a proteína G, la transducción de las señales mediante una variedad de segundos mensajeros como AMPc, GMPc, Ca<sup>2+</sup>, fosfoinosítidos, derivados del ácido araquidónico y la activación de proteínas quinasas (Kandasamy *et al.*, 1995).

Además, NHE3 se encuentra sujeto a regulaciones de corto y largo plazo que involucran múltiples procesos: fosforilación/desfosforilación del transportador, regulación transcripcional, eventos de endocitosis/exocitosis y mecanismos de división entre un pool subapical inactivo y uno activo de proteínas localizadas en membrana apical (Biemesderfer *et al.*, 1999; D'Souza *et al.*, 1998; Janecki *et al.*, 1998; Ponting *et al.*, 1997).

### **Alosterismo**

El transporte de H<sup>+</sup> por NHE3 obedece a una cinética que se ajusta mejor a un modelo alostérico que a un modelo de Micaelis-Menten como la cinética que sigue el transporte de Na<sup>+</sup>. Por ello, se propuso que además del sitio al que se unen los H<sup>+</sup> para ser transportados, existiría otro sitio de unión que activa el proceso de intercambio (sitio alostérico o “modificador”) (Aronson *et al.*, 1982; Aronson, 1985). La activación alostérica del intercambiador ocurre de manera casi instantánea. Sin embargo, en un trabajo reciente, Hayashi y colaboradores informaron que la acidificación del medio intracelular produce una activación lenta de NHE3, sugiriendo la existencia de un mecanismo adicional de regulación alostérica. Estos autores propusieron que NHE3 sufre una transición lenta y dependiente del pH desde un estado menos activo a uno más activo, con cambios en su conformación o en su estado de asociación (Hayashi *et al.*, 2002).

### **Fosforilación**

Casi todas las hormonas que modulan la actividad de NHE3 están acopladas a proteínas quinasas como parte de sus cascadas de señalización intracelular y los efectos de dichas

hormonas pueden ser bloqueados total o parcialmente por inhibidores de quinasas (Moe *et al.*, 1995; Moe, 1999; Yun *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 1999).

El dominio carboxiterminal citosólico de NHE3 presenta una región involucrada en la estimulación y otra en la inhibición de la actividad del intercambiador (Levine *et al.*, 1995). Allí se han identificado secuencias consenso para la fosforilación mediada por la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA), por la proteína quinasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , diacilglicerol y fosfolípidos (PKC), por la calcio-calmodulina quinasa (CaM-K) y por otras serina/treonina quinasas (Moe, 1999; Orłowski *et al.*, 1992; Yun *et al.*, 1995). Se ha demostrado que NHE3 existe como una fosfoproteína en la célula intacta (Kurashima *et al.*, 1997; Peng *et al.*, 1999; Yip *et al.*, 1997) y que el dominio citoplasmático de NHE3 es un sustrato directo de PKA y PKC “*in vitro*”, sugiriendo que estas dos proteínas quinasas fosforilan al intercambiador “*in vivo*” (Moe *et al.*, 1995; Wiederkehr *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 1999).

Existe fosforilación constitutiva de NHE3 pero, si aumentan los niveles de AMPc se produce una fosforilación adicional dependiente de PKA (Moe *et al.*, 1995). La fosforilación de dos serinas (Ser<sup>605</sup> y Ser<sup>634</sup>) parece ser crítica para la inhibición funcional de NHE3 que ocurre tras un aumento agudo de la concentración intracelular de AMPc. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que PKA fosforile a otras proteínas distintas de NHE3 o que otras quinasas activadas por PKA fosforilen a NHE3 en otras regiones del intercambiador (Kurashima *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 1999).

Dependiendo del sistema usado, la fosforilación por PKC puede guiar a la estimulación o a la inhibición de la actividad del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Kandasamy *et al.*, 1995; Levine *et al.*, 1995; Weinman & Shenolikar, 1986; Wiederkehr *et al.*, 1999).

### **Interacciones proteína-proteína**

Si bien la fosforilación de NHE3 por quinasas es una parte integral de la regulación aguda de la actividad de este transportador, la hipótesis de la regulación de NHE3 mediada exclusivamente por fosforilación no es capaz de explicar la observación de que algunos estímulos activen al intercambiador sin cambios detectables en su estado de fosforilación (Yip *et al.*, 1997). Se ha sugerido que la regulación de NHE3 es el resultado de su interacción con otros componentes celulares y que la fosforilación constitutiva del intercambiador podría facilitar esta interacción (Orłowski & Grinstein, 1997).

Estudios recientes indicaron que NHE3 forma complejos macromoleculares con otras proteínas en la membrana plasmática, los cuales podrían estar modificando su función. Entre ellos podemos mencionar: CHP1 y CHP2 (“*Calcineurin homologous protein*”), las que son esenciales para la óptima actividad del transportador (Pang *et al.*, 2001 y 2002), megalina, un receptor que interactúa con NHE3 en vesículas recubiertas de clatrina de la membrana luminal renal inactivándolo (Biemesderfer *et al.*, 1999 y 2001) y dipeptidil peptidasa IV (DPPIV), una proteasa presente en la membrana externa de células epiteliales de la que se desconoce su acción sobre NHE3 (Girardi *et al.*, 2001).

#### *Interacción con subunidades de proteínas G*

En un trabajo reciente, se estudió la regulación de NHE3 mediada por subunidades de proteína G en vesículas de ribete en cepillo de corteza renal. Este sistema permitió estudiar la actividad del intercambiador en ausencia de componentes citoplasmáticos y segundos mensajeros. Se demostró que la subunidad  $G_{s\alpha}$  interactúa directamente con NHE3 inhibiendo su actividad, mientras que la subunidad  $G_{i\alpha}$ , no tiene ningún efecto sobre la actividad de NHE3. El dímero  $G_{\beta/\gamma}$  estimula al intercambiador de manera indirecta, por la formación del trímero  $G_{s\alpha/\beta/\gamma}$  y la consecuente remoción del efecto inhibitorio de  $G_{s\alpha}$ . Experimentos de coimmunoprecipitación demostraron que existe una asociación física entre NHE3 y  $G_{s\alpha}$ , y que esta interacción es mayor cuando se activan la vías regulatorias que inhiben la actividad de NHE3 (Albrecht *et al.*, 2000).

#### *Interacción con proteínas regulatorias y citoesqueleto*

En base a experimentos de fraccionamiento y reconstitución se ha demostrado que existe un cofactor proteico dissociable llamado NHERF1 (Factor regulador del intercambiador  $Na^+/H^+$ ) esencial para la regulación de la actividad de NHE3 por AMPc (Weinman *et al.*, 1993 y 1995). Es una fosfoproteína de 42-44 kDa que funciona como sustrato de la PKA (Zizak *et al.*, 1999). También se identificó un segundo miembro de esta familia de factores regulatorios denominado NHERF2 (Yun *et al.*, 1997). NHERF1 y NHERF2 son codificados por genes únicos, no contienen dominios catalíticos y muestran un 52% de homología en sus secuencias de aminoácidos. Son considerados miembros de una familia de proteínas estructurales porque poseen en común una estructura modular con dos dominios PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) homólogos, uno a continuación del otro, y un

dominio carboxiterminal que se une a todos los miembros de la familia de proteínas estructurales ezrina/raidixina/moesina (ERM), conocidos por mediar interacciones proteína-proteína (Harrison, 1996; Reczek *et al.*, 1997).

NHERF1 y NHERF2 se expresan en la membrana apical de las células del túbulo contorneado proximal (Wade *et al.*, 2001 y 2003) y el dominio citoplasmático de estas proteínas está física y funcionalmente asociado con la isoforma NHE3 (Gisler *et al.*, 2001; Hernando *et al.*, 2002; Lamprecht *et al.*, 1998; Zizak *et al.*, 1999).

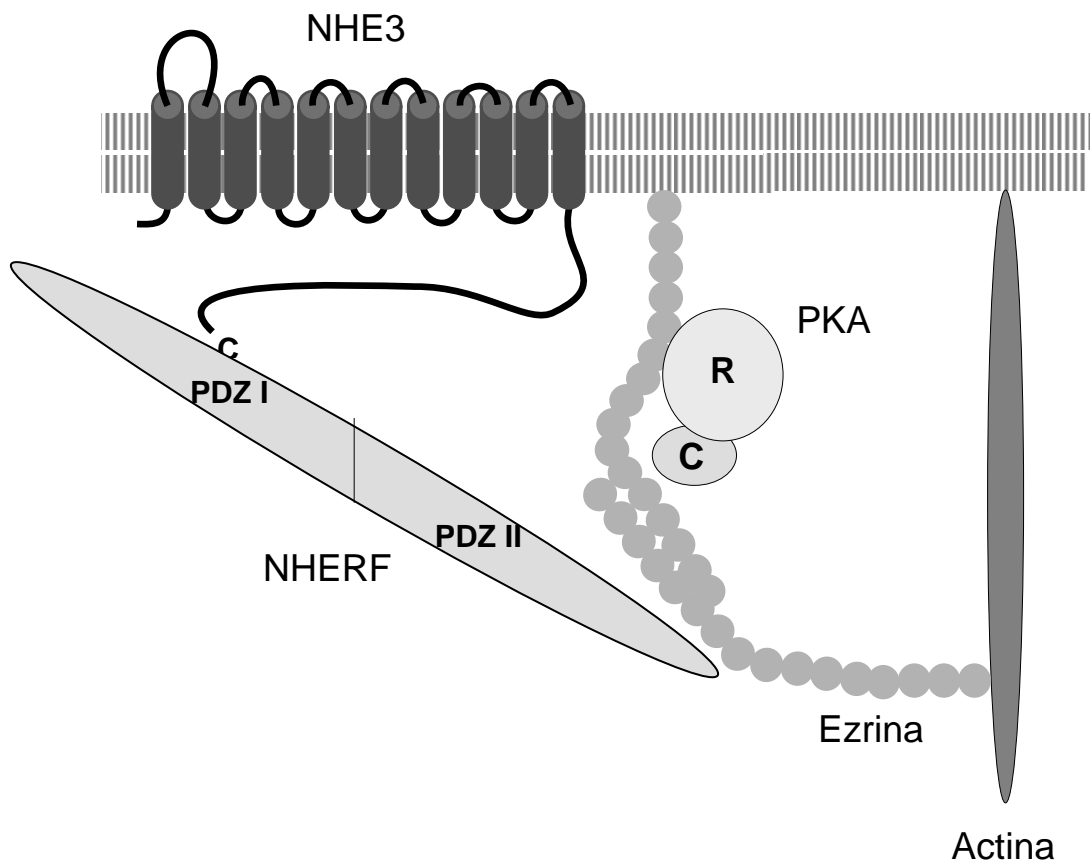
Las bases bioquímicas que median el efecto inhibitorio de PKA sobre la actividad de NHE3 por las proteínas NHERFs fueron dilucidadas por la demostración de que NHERF1 y NHERF2 se unen a NHE3 y al dominio aminoterminal de ezrina (Reczek *et al.*, 1997; Yun *et al.*, 1998). Ezrina es un miembro de la familia ERM que posee un rol regulatorio y estructural. Esta proteína sirve de nexo entre el citoesqueleto de actina y proteínas de la membrana plasmática (Algrain *et al.*, 1993; Berryman *et al.*, 1993). La ezrina también puede unirse a la subunidad regulatoria de PKA (Dransfield *et al.*, 1997). La relación entre NHE3, NHERF y ezrina ha sido estudiada en células PS120 cotransfectadas con NHE3 y NHERF. Pudo observarse por coimmunoprecipitación que la unión de NHE3 con NHERF no se vio afectada por AMPc, indicando que la asociación entre estas dos proteínas es continua e independiente de la estimulación de PKA. Además, la fosforilación por PKA de NHE3 o NHERF no es necesaria para la unión entre estas dos proteínas (Zizak *et al.*, 1999). Se ha propuesto que el complejo NHERF/ezrina funciona como una unión estructural no solo entre NHE3 y los filamentos de actina sino también entre NHE3 y PKA (Lamprecht *et al.*, 1998). De esta forma, NHERF y ezrina acercan físicamente PKA a NHE3 promoviendo la fosforilación del intercambiador en los residuos serina de su extremo carboxiterminal (Kurashima *et al.*, 1999; Zizak *et al.*, 1999), y permiten una posible regulación de NHE3 por su asociación con el citoesqueleto de actina. Asimismo, la disrupción de la unión del complejo NHERF/ezrina atenúa el efecto inhibitorio de AMPc sobre la actividad de NHE3 en células OK (opossum kidney), mostrando que la formación del complejo entre NHERF, ezrina, NHE3 y PKA median la fosforilación del intercambiador disminuyendo su actividad (Weinman *et al.*, 2001).

Mediante el uso de diferentes drogas que interfieren con la organización normal del citoesqueleto se demostró que la isoforma NHE3 requiere un citoesqueleto intacto para su funcionamiento óptimo. Cambios en el volumen celular que alteran la organización del



citoesqueleto modifican la actividad de NHE3 (Szasi *et al.*, 2000). Kurashima y colaboradores demostraron que la despolimerización de la actina con citocalasina B produce una disminución de la actividad de NHE3, sin cambios en la expresión de NHE3 en las membranas apicales. Estos autores postularon que el citoesqueleto afectaría la actividad intrínseca del intercambiador y sugirieron que la unión de NHE3 al citoesqueleto sería esencial para el mantenimiento de la conformación de la proteína activa (Kurashima *et al.*, 1999).

La *figura 5* muestra el modelo propuesto de interacción entre proteínas para la regulación por AMPc de la actividad de la isoforma NHE3 del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ .



**Figura 5:** Organización del complejo proteico involucrado en la regulación de la actividad de la isoforma NHE3 del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  por PKA. NHERF y ezrina unen a NHE3 al citoesqueleto de actina y ezrina funciona como una proteína de anclaje para PKA. Estas interacciones proteicas permiten la fosforilación por PKA de residuos específicos en el extremo carboxiterminal de NHE3, inhibiendo la actividad del intercambiador. NHERF: Factor regulador del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , R y C: subunidades reguladora y catalítica de PKA respectivamente, PKA: Proteína quinasa dependiente de AMPc, C: extremo carboxiterminal de NHE3.

**Síntesis de novo – degradación**

En condiciones fisiológicas se han informado cambios en la tasa de acidificación tubular debidos a variaciones en los niveles de expresión de NHE3 por cambios en la transcripción de su ARN mensajero (ARNm) (Shah *et al.*, 2000). De hecho, en las regiones promotoras del gen *NHE3*, se han caracterizado secuencias correspondientes a elementos que responden a distintos reguladores (Cano, 1996; Kandasamy & Orłowski, 1996). En condiciones fisiopatológicas o de exposición crónica a diferentes agentes también se han observado variaciones en la síntesis “*de novo*” del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  evidenciadas por cambios en los niveles del ARNm de NHE3. En células OK, la transcripción de NHE3 varía en respuesta a hiperosmolaridad crónica (Ambuhl *et al.*, 1998), incubación en un medio ácido (Amemiya *et al.*, 1995b) o con baja concentración de  $\text{K}^+$  (Amemiya *et al.*, 1999), exposición crónica a endotelina (Chu *et al.*, 2000), glucocorticoides (Baum *et al.*, 1996), insulina (Klusic *et al.*, 2002), hormona tiroidea (Cano *et al.*, 1999) o glucagón (Amemiya *et al.*, 2002). Experimentos “*in vivo*” también muestran la importancia de la activación transcripcional como mecanismo de regulación de NHE3. Túbulos proximales aislados de conejo inyectados con dexametazona, tienen aumentada la transcripción del gen *NHE3* (Baum *et al.*, 1994). En animales neonatos, el hipertiroidismo produce un aumento en los niveles del ARNm de NHE3 de corteza renal (Baum *et al.*, 1998). La contracción de volumen crónica aumenta los niveles del ARNm de NHE3 en túbulo proximal (Fisher *et al.*, 2001) y la acidosis metabólica crónica estimula la transcripción de NHE3 en asa gruesa ascendente de Henle (Laghmani *et al.*, 1997).

Otro factor que determina la disponibilidad de intercambiador en la membrana apical es su degradación. Estudios realizados en células de cáncer de colon y en fibroblastos PS120 revelaron que la vida media de NHE3 en la membrana plasmática es de 14 horas (Cavet *et al.*, 2001).

**Tráfico vesicular y reciclado**

Se ha sugerido la existencia de mecanismos de control de la actividad del intercambiador basados en la regulación de la disponibilidad, en membrana plasmática, de NHE3. En efecto, se han registrado cambios en el intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  apical debidos a alteraciones en la presencia de la proteína NHE3 en las membranas apicales, sin

modificaciones en los niveles del correspondiente ARNm (Ambuhl *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1996).

La isoforma NHE3 ha sido detectada, por microscopía electrónica, en vesículas subapicales (Biemesderfer *et al.*, 1997). El NHE3 presente en el compartimiento endosomal es funcional y participa en el mantenimiento del pH vesicular (Gekle *et al.*, 2002). NHE3 se recicla entre la membrana apical y el compartimiento endosomal. La regulación de la densidad apical de NHE3 depende en gran parte del proceso de endocitosis mediado por vesículas recubiertas de clatrina. El reciclado a la membrana plasmática está regulado por una vía dependiente de PKC (D'Souza *et al.*, 1998). Kurashima y colaboradores mostraron que el bloqueo del reciclado de vesículas endocíticas, produce una inhibición de la actividad de NHE3 acompañada de una disminución en la densidad de intercambiadores presentes en las membranas apicales (Kurashima *et al.*, 1998).

La incorporación de moléculas de NHE3 a la membrana apical por exocitosis o su remoción por endocitosis podría constituir un mecanismo de control que modifica la cantidad de NHE3 disponible para la acidificación luminal, ya que algunos de los agentes que modulan la actividad de los NHEs, entre ellos el AMPc, la PKC y la acidificación intracelular, alteran las tasas de endo- o exocitosis o afectan la redistribución de vesículas dentro de las células (Janecki *et al.*, 1998; Kurashima *et al.*, 1998). Por otra parte, en el dominio citoplasmático de los NHEs existen secuencias consenso para su internalización encargadas de dirigir a estas proteínas hacia los endosomas, los cuales servirían como reservorio funcional de NHEs (Akhter *et al.*, 2000).

Los cambios en la distribución subcelular de NHE3 se han observado en respuesta a estímulos tanto agudos (Collazo *et al.*, 2000; Janecki *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1996) como crónicos (Ambuhl *et al.*, 1996; Amemiya *et al.*, 2002) mostrando que la redistribución intracelular del intercambiador depende de la modificación de su tasa de transporte por acción de distintos agentes.

### ***Hormona paratiroidea***

La hormona paratiroidea (PTH) es un polipéptido producido en las glándulas paratiroides compuesto por 84 aminoácidos. Es sintetizada como una pre-hormona en la cual los primeros 25 residuos de la secuencia forman un dominio hidrofóbico que es importante para el pasaje de la molécula a través de la membrana del retículo endoplasmático (Haberner *et al.*, 1976). Estos 25 residuos son removidos antes de que la hormona sea almacenada en las vesículas secretorias (Kemper *et al.*, 1975). La PTH es secretada por las células principales de la glándula paratiroidea en respuesta a una disminución del nivel de calcio extracelular. La liberación de PTH es inhibida por el aumento en el nivel de calcio plasmático.

La PTH actúa principalmente en hueso y riñón manteniendo los niveles de calcio extracelular dentro de límites fisiológicos. En hueso, estimula la formación de osteoclastos que liberan calcio y fosfato desde la matriz ósea hacia el torrente sanguíneo. En el riñón posee un importante rol en la regulación de procesos de transporte tubular. Reduce la excreción de calcio y magnesio aumentando la reabsorción de estos iones en el túbulo contorneado distal y en la rama gruesa ascendente del asa de Henle. En el túbulo proximal disminuye la reabsorción de fosfato y bicarbonato (Klahr *et al.*, 1983). Sus efectos en el tubo proximal son llevados a cabo por la inhibición de transportadores (cotransporte Na/Pi e intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ) ubicados en la membrana apical (Muff *et al.*, 1992).

El receptor de la hormona paratiroidea es una proteína con siete segmentos transmembrana acoplada a proteína G. Su activación inicia una cascada de procesos intracelulares mediados principalmente por la subunidad  $\alpha$  de la proteína G estimuladora  $\text{G}_{\text{s}\alpha}$  (Schwindinger *et al.*, 1998), que incrementa la síntesis de AMPc y activa PKA (Abou-Samra *et al.*, 1992). Sin embargo, hay dos caminos de señalización adicionales que la unión de PTH a su receptor puede desencadenar. El receptor puede activar la fosfolipasa C por medio de la proteína  $\text{G}_{\text{q}\alpha}$  (Offermanns *et al.*, 1996), aumentando los niveles intracelulares de inositol trifosfato y calcio, de esta manera, activando a PKC (Abou-Samra *et al.*, 1992). Existen evidencias de que la PTH unida a su receptor activa la vía de señalización de MAP quinasas (MAPK, proteína quinasa activada por mitógenos) en varios tejidos (Chan *et al.*, 2001; Miao *et al.*, 2001).

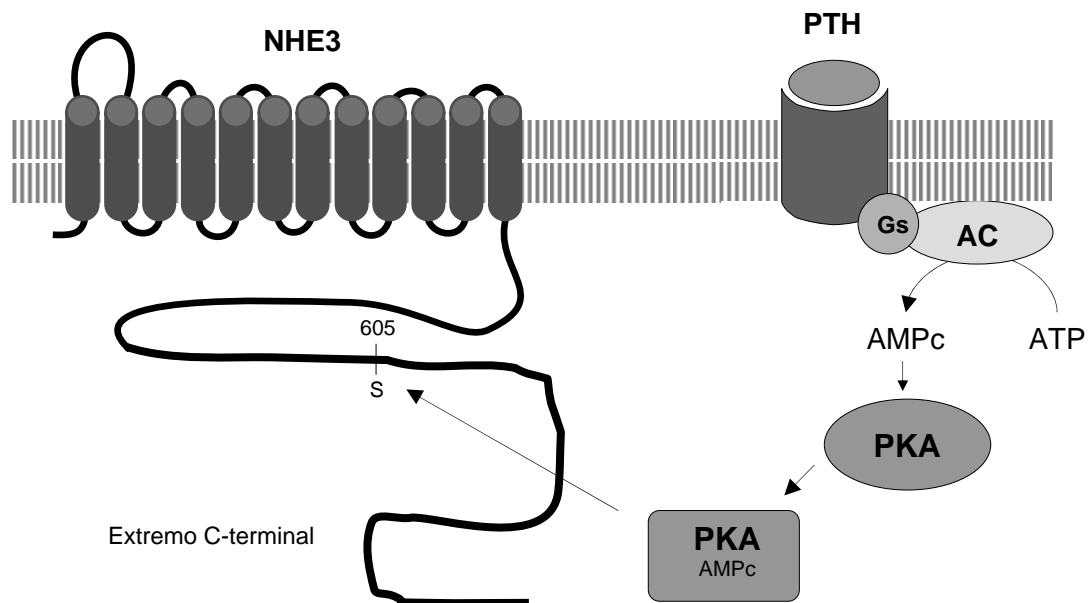
La cola carboxiterminal intracelular del receptor de PTH se asocia con NHERF1 o NHERF2 a través de los dominios PDZ de NHERF. Esta unión incrementa la formación de inositol trifosfato y reduce la síntesis de AMPc. NHERF1 y/o NHERF2 actúan como interruptores moleculares del receptor de PTH, ya que en ausencia de la unión del receptor a NHERF, el complejo hormona-receptor activa principalmente la vía de señalización mediada por PKA mientras que la de PKC es inhibida (Mahon *et al.*, 2002). Este resultado ha sido confirmado en cultivos primarios de células tubulares proximales de ratón *NHERF*<sup>-/-</sup> (Cunningham *et al.*, 2004).

Estudios de micropuntura en rata han demostrado que la hormona paratiroidea disminuye la absorción neta de bicarbonato en el túbulo proximal (Bank & Aynedjian, 1976). McKinney y Myers hallaron un incremento en la concentración de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> luminal en el estado estacionario luego del tratamiento con PTH (McKinney & Myers, 1980b). Pollock y colaboradores examinaron los efectos de PTH, 8-bromo-AMPc y forskolina, un activador de la adenilato ciclasa, en células de la línea OK (opossum kidney). Esta línea celular retiene varios rasgos característicos de las células del túbulo proximal que incluyen la presencia de un intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> sensible a amiloride y receptores de alta afinidad para PTH con respuesta acoplada a la generación de AMPc. Todos los agentes ensayados disminuyeron el pH intracelular e inhibieron el transporte de Na<sup>+</sup> sensible a amiloride. Estos resultados sugieren un efecto de la PTH mediado por AMPc sobre el intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (Pollock *et al.*, 1986). Por su parte, Cohn y colaboradores hallaron un incremento en la actividad del intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> en vesículas de membrana apical de perros a los que se les había extraído la glándula paratiroidea (Cohn *et al.*, 1983). Kahn y colaboradores detectaron una disminución en la actividad del intercambiador en vesículas preparadas a partir de túbulos incubados con PTH o AMPc (Kahn *et al.*, 1985). En base a estas evidencias experimentales puede concluirse que la hormona paratiroidea, a través de la generación de AMPc, inhibe al intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> ubicado en la membrana luminal proximal. Esta inhibición es producida por un cambio en la V<sub>max</sub> del intercambiador y no parece alterar la sensibilidad del mismo al pH intracelular ni la afinidad de la proteína por el sodio (Helmle-Kolb *et al.*, 1990).

La inhibición no requiere entrada de calcio en la célula (Dolson *et al.*, 1985) y es debida a la fosforilación del intercambiador por PKA. El transporte de Na<sup>+</sup>, sensible a amiloride, en vesículas de membrana luminal de túbulo proximal se inhibe cuando se coloca AMPc o

la subunidad catalítica de PKA en su interior. Este efecto es abolido cuando se agrega un inhibidor de PKA (Weinman *et al.*, 1988).

Un modelo esquemático de la inhibición del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  por PTH vía AMPc puede observarse en la *figura 6*.



**Figura 6:** Modelo estructural de la acción de la hormona paratiroidea sobre la actividad de la isoforma NHE3 del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . PTH: hormona paratiroidea, PKA: proteína quinasa dependiente de AMPc, AC: Adenilato ciclasa, S: residuo serina.

En túbulos proximales aislados de conejo los ésteres de forbol y el diacilglicerol inhiben la reabsorción de bicarbonato a través de la activación de PKC (Baum & Hays, 1988). Sin embargo, se ha demostrado activación de NHE3 por ésteres de forbol (Alpern, 1990; Wang & Chan, 1990). Por otra parte, Pastoriza-Muñoz y colaboradores probaron que la PTH inhibe la salida de bases, a través de un mecanismo dependiente de la activación de PKC, alcalinizando el interior celular. Este efecto podría inhibir en forma alostérica al intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Pastoriza-Muñoz *et al.*, 1992).

La hormona paratiroidea, además de reducir la actividad del intercambiador al estimular su fosforilación, induce una disminución de la cantidad de NHE3 en membrana apical en presencia de un citoesqueleto celular intacto (Collazo *et al.*, 2000). Al inyectar PTH en ratas paratiroidectomizadas se produce una respuesta bifásica a la hormona, con una inhibición temprana (1-2 horas) de la actividad de NHE3, mediada por un aumento en la fosforilación del mismo, y una tardía (más de 2 horas) donde la inhibición del intercambiador está asociada a la disminución de la presencia de NHE3 en la membrana apical (Fan *et al.*, 1999).

### ***Transporte electrogénico de protones***

#### *Propiedades generales de las bombas de protones*

Las H<sup>+</sup>ATPasas se ubican dentro de una gran familia dividida en tres subclases. Las bombas de protones ubicadas en membrana plasmática (tipo P), las cuales son ejemplificadas por la H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPasa de la mucosa gástrica. La segunda clase de bombas son designadas como de tipo F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasas y pertenecen a este grupo las ATPasas/ATP sintetasas de mitocondrias, cloroplastos y membranas bacterianas. El tercer tipo corresponde a las vacuolares o V-H<sup>+</sup>ATPasas. La purificación de estas proteínas en animales, plantas y hongos reveló que están compuestas por múltiples subunidades (Arai *et al.*, 1987; Bowman *et al.*, 1986; Moriyama & Nelson, 1987; Randall & Sze, 1986; Uchida *et al.*, 1985; Xie & Stone, 1986). Teniendo en cuenta la localización de las V-ATPasas en las membranas de organelas, la similitud entre las subunidades de V-ATPasas de distintas fuentes, su perfil común de respuesta a inhibidores y la ausencia de intermediarios fosforilados covalentemente en el ciclo de reacción se las ha colocado en una subclase de la familia de las ATPasas.

Teniendo en cuenta su origen vacuolar se las llamó V-ATPasas (Nelson, 1989; Pedersen & Carafoli, 1987) y como todas las V-ATPasas eucarióticas transportan H<sup>+</sup> se las denominó V-H<sup>+</sup>ATPasa (Nelson & Harvey, 1999).

Las V-H<sup>+</sup>ATPasas y las F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasas presentes en bacterias, cloroplastos y mitocondrias, muestran muchas características estructurales en común, como composición de subunidades, alto grado de homología entre las secuencias de aminoácidos de sus

subunidades y similitud en el arreglo estructural de sus subunidades (Gruber *et al.*, 2001; Nelson & Harvey, 1999). Funcionalmente pueden distinguirse por el hecho de que las  $F_1F_0$ -ATPasas usan el gradiente de protones para la síntesis de ATP mientras que las  $V-H^+$ ATPasas utilizan la hidrólisis de ATP para generar un gradiente de protones. A pesar de esto, se cree que ambas proteínas están evolutivamente relacionadas y derivan de un ancestro común (Wilkins & Forgac, 2001).

Las  $V-H^+$ ATPasas están presentes en virtualmente casi todas las células eucariotas y su composición de subunidades es casi idéntica en todas las células (Nelson & Harvey, 1999).

### **V- $H^+$ ATPasa**

#### *Función general*

La  $V-H^+$ ATPasa es una bomba electrogénica de protones altamente conservada en eucariotas y procariotas que acopla la hidrólisis de ATP citosólico al transporte de protones a través de membranas biológicas creando una diferencia de potencial a través de ellas. Generalmente se localiza en la membrana apical de células epiteliales mirando hacia el lado citoplasmático y bombea protones hacia afuera del citosol a través de la membrana celular (Nelson & Harvey, 1999). Realiza un transporte activo primario de  $H^+$  y la energía para hacerlo procede directamente de la degradación metabólica de ATP. Este sistema que transporta cargas positivas desde el interior celular al lumen puede ocurrir en ausencia de sodio extracelular (Rector, 1983), está desacoplado del transporte de sodio y es insensible al amiloride (Preisig *et al.*, 1987).

La  $V-H^+$ ATPasa es una enzima que participa en el establecimiento y mantenimiento del pH de las organelas y del citoplasma (Forgac, 1989), energiza y acidifica compartimientos intracelulares del sistema vacuolar de las células eucariotas. Es esencial para el normal funcionamiento de las vesículas de secreción, la red trans-Golgi, los endosomas, lisosomas y otros compartimientos de membrana intracelulares (Lu *et al.*, 2002).

Las bombas de protones vacuolares han sido localizadas en muchas organelas incluyendo vesículas recubiertas de clatrina, endosomas, vesículas de almacenamiento, vesículas del aparato de Golgi, lisosomas, vesículas sinápticas, gránulos cromafines, retículo endoplasmático y en la vacuola central de plantas y hongos (Stevens & Forgac,



1997). También se encuentran en membrana plasmática de riñón, oído interno, osteoclastos, macrófagos y en una subpoblación de células del tracto genital masculino (Stone *et al.*, 1990).

En los lisosomas y en vacuolas de plantas y hongos, la H<sup>+</sup>ATPasa disminuye el pH activando la liberación de las enzimas hidrolasas ácidas que lisan proteasas, glicosidasas, lipasas, nucleasas y fosfatasas. En las vacuolas, contribuye a la regulación del pH citosólico y a la recaptación de cationes como Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> y Cd<sup>2+</sup> a través de un antiporter dirigido por el gradiente de H<sup>+</sup> (Dietz *et al.*, 2001). La secreción de protones, hacia el interior de los gránulos cromafines y las vesículas sinápticas, activada por la V-H<sup>+</sup>ATPasa facilita la recaptación de sodio y el transporte de pequeñas moléculas como los neurotransmisores o proteasas (Wagner *et al.*, 2004). En los endosomas la acidificación generada por esta proteína es necesaria para la disociación de los complejos ligando-receptor internalizados y para el reciclado de receptores (Nakhoul & Hamm, 2002).

Las V-H<sup>+</sup>ATPasas localizadas en membranas plasmáticas celulares pueden acidificar los compartimientos extracelulares permitiendo que se cumplan diversas funciones como resorción de hueso por osteoclastos (Schlesinger *et al.*, 1997), maduración y depósito de espermatozoides en el lumen del epidídimo (Breton *et al.*, 1996), reabsorción de bicarbonato en el túbulo proximal (Wagner *et al.*, 2004), acidificación urinaria en la porción distal del nefrón (Al-Awqati, 1996) y regulación del pH en el oído interno (Stankovic *et al.*, 1997). La importancia de la H<sup>+</sup>ATPasa se manifiesta por la aparición de enfermedades genéticas que resultan de la ausencia de subunidades específicas de la enzima (Karet *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2000).

### *Estructura y organización molecular*

La estructura de las V-H<sup>+</sup>ATPasas ha sido modelada en base a resultados obtenidos para las F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasas y mucha de la información con la que se cuenta sobre la estructura y función de estas proteínas proviene de experimentos llevados a cabo en estudios de la H<sup>+</sup>ATPasas de levaduras (Nelson & Harvey, 1999). El modelo estructural actual está basado en estudios de microscopía electrónica de complejos enzimáticos aislados de vacuolas de “*Neurospora crassa*”, fragmentos de membrana de vejiga urinaria de anfibios y de gránulos cromafines bovinos (Nelson & Harvey, 1999). La estructura molecular de la

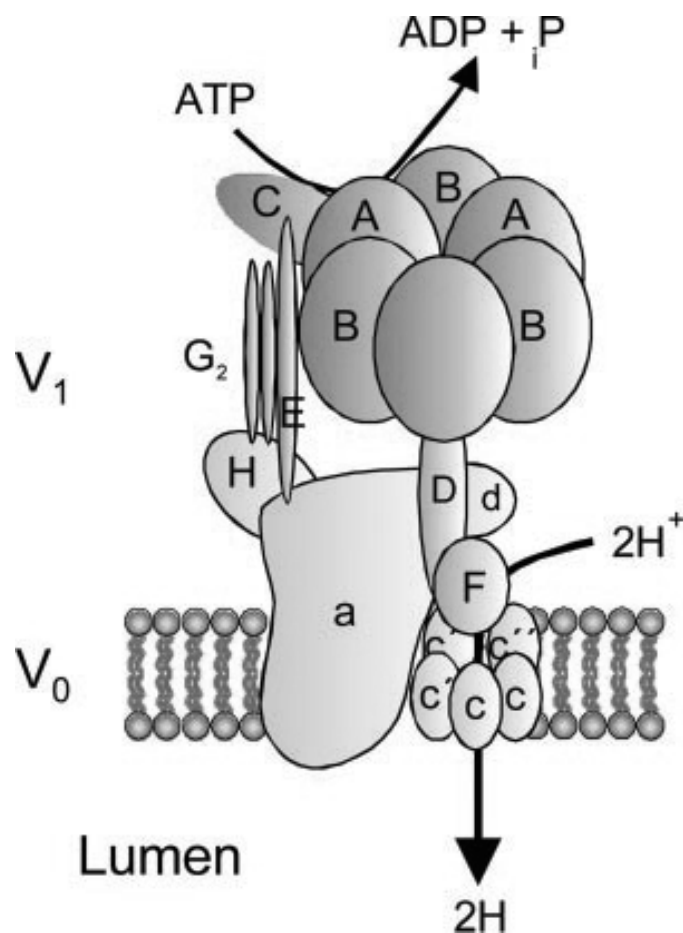
H<sup>+</sup>ATPasa fue caracterizada mediante homología de secuencia con las F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasas de varias fuentes incluyendo mitocondrias (Nakhoul & Hamm, 2002).

La V-H<sup>+</sup>ATPasa es un complejo proteico de al menos 13 subunidades diferentes con un peso molecular de aproximadamente 900 kDa. Consiste en dos secciones principales: un dominio catalítico citoplasmático o soluble, V<sub>1</sub>, de 640 kDa y un dominio unido a membrana, V<sub>0</sub>, de 240 kDa (*Figura 6*). Ambos dominios están conectados a través de una estructura en forma de tallo que pertenece al dominio V<sub>1</sub> (Arata *et al.*, 2002a, 2002b y 2002c; Forgac, 2000; Gruber *et al.*, 2001; Wilkens *et al.*, 1999). Por convención, las subunidades de los complejos V<sub>1</sub> y V<sub>0</sub> se denominan con letras mayúsculas y minúsculas respectivamente.

### **Dominio citoplasmático**

El dominio V<sub>1</sub> es un complejo periférico que contiene ocho subunidades diferentes con masas moleculares que oscilan entre 70 y 14 kDa y que se designan con las letras A-H en orden decreciente de masa. Está compuesto por una cabeza globular que posee tres pares de copias alternadas de la subunidad A (67-73 kDa) y B (55-60 kDa) formando un anillo, un tallo central rotatorio compuesto por las subunidades D y F (14 kDa) y un tallo periférico fijo formado por las subunidades C (41 kDa), E (31 kDa), G (15 kDa) y H (50-57 kDa). Las subunidades están presentes en una estequiometría A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub>D<sub>1</sub>E<sub>1</sub>F<sub>1</sub>G<sub>2</sub>H<sub>1</sub> (Blake-Palmer *et al.*, 2007). El tallo central y el periférico conectan los dominios V<sub>1</sub> y V<sub>0</sub>. El tallo periférico fijo sostiene al complejo V<sub>1</sub> en una correcta ubicación con la ayuda de la unión de las subunidades B y C al citoesqueleto de actina (Holliday *et al.*, 2000; Vitavska *et al.*, 2003).

Las V-H<sup>+</sup>ATPasas de células eucariotas presentan invariablemente su dominio V<sub>1</sub> en el citoplasma, de manera tal que la bomba transporta protones hacia el interior de vesículas y vacuolas cuando se encuentra expresada en membranas endosomales o hacia el fluido extracelular cuando se encuentra ubicada en la membrana plasmática.



**Figura 7:** Modelo estructural de la  $V\text{-H}^+$ ATPasa. El dominio citosólico  $V_1$  se encuentra formado por las subunidades A-H (en letras mayúsculas) y el dominio unido a membrana  $V_0$  comprende las subunidades  $a$ - $d$  (en letras minúsculas) con varias isoformas de la subunidad  $c$  (Kawasaki-Nishi *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2004).

La principal función del sector catalítico  $V_1$  es unir ATP y catalizar su hidrólisis, suministrando la energía necesaria para el transporte de protones a través del dominio integral de membrana  $V_0$ . Las subunidades A y B median la hidrólisis de ATP, ya que los sitios de unión a nucleótidos se localizan sobre estas subunidades (Zhang *et al.*, 1995). Sin embargo, evidencias genéticas y bioquímicas sugieren que es el sitio de unión de nucleótidos localizado en la subunidad A el que es catalítico, mientras que el que está

localizado en la subunidad B tendría un rol en la regulación de la actividad de la enzima (Feng & Forgac, 1992a; Walker *et al.*, 1985). La subunidad A también posee los sitios de unión para N-etilmaleimida (NEM) y 7-cloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazilcloro (NBD-Cl), los cuales son inhibidores específicos de la actividad de la enzima.

### **Tallo**

Las subunidades G y E forman parte del tallo periférico que conecta los dominios  $V_1$  y  $V_0$  mientras que la subunidad D parece estar localizada en el tallo central (Arata *et al.*, 2002a). Interacciones proteína-proteína han sido demostradas entre las subunidades E y H. La delección del extremo carboxiterminal de la subunidad E disminuye la hidrólisis de ATP y el transporte de protones (Lu *et al.*, 2002).

### **Dominio transmembrana**

El dominio  $V_0$  es un complejo integral de membrana compuesto por cinco subunidades transmembrana que transporta los protones a través de la bicapa lipídica (Arata *et al.*, 2002c). Las subunidades que lo conforman son: *a* (100-116 kDa), *d* (38 kDa) y la subunidad *c* que posee tres isoformas: *c* (16 kDa), *c'* (17 kDa) y *c''* (19 kDa) (Nakhoul & Hamm, 2002; Powell *et al.*, 2000). Las subunidades están presentes en una estequiometría  $a_1c''_1d_1(c, c')_6$  (Forgac, 1998).

Las subunidades *c*, *c'* y *c''* son llamadas proteolípidos por su alto carácter hidrofóbico (Forgac, 1998) y están acomodadas en la membrana en una forma semejante a un anillo con la subunidad *a* unida en la parte de afuera del mismo (Wilkins & Forgac, 2001).

La subunidad *c* posee cuatro dominios transmembrana con sus mitades amino y carboxiterminal homólogas. Esta subunidad forma parte del canal de protones transmembrana y contiene potenciales elementos regulatorios. La translocación de protones a través del canal es inhibida por los antibióticos bafilomicina y concanamicina (Bowman *et al.*, 1988; Dröse & Altendorf, 1997). Estos inhibidores selectivos de la  $V\text{-H}^+$ ATPasa interactúan con las subunidades *c'* y *c''* del complejo  $V_0$  (Bowman & Bowman, 2002; Crider *et al.*, 1994; Huss *et al.*, 2002).

La topología transmembrana de la subunidad *a* es controvertida. Estudios estructurales y de cristalografía son necesarios para aclararla. No obstante es sabido que es una proteína con nueve dominios transmembrana, con su extremo aminoterminal formando un canal

hidrofílico y orientado hacia el lado citoplasmático, mientras que el carboxiterminal forma un poro hidrofóbico expuesto hacia el lumen (Leng *et al.*, 1999).

La subunidad *d* es un polipéptido orientado hacia el lado citoplasmático, no posee dominios transmembrana pero permanece asociado al dominio  $V_0$  a través de interacciones con el resto de las subunidades de este complejo (Wang *et al.*, 1988).

Se ha determinado que existen múltiples variantes de las subunidades B, C, E, G, *a* y *d* codificadas por distintos genes (Crider *et al.*, 1997; Imai-Senga *et al.*, 2002; Nelson *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 2001 y 2002), de las cuales hay 2, 2, 2, 3, 4 y 2 genes respectivamente. Las diferencias entre las formas de algunas subunidades pueden ser importantes en la localización o actividad de la bomba de protones en tipos celulares específicos y compartimientos subcelulares.

La  $V\text{-H}^+$ ATPasa de membrana luminal de riñón bovino es estructuralmente diferente de la  $H^+$ ATPasa microsomal (Wang & Gluck, 1990), con diferentes subunidades B y E. La subunidad B1 de la  $V\text{-H}^+$ ATPasa localizada en el segmento distal del riñón ha sido recientemente identificada, posee un dominio PDZ de unión a proteína y se localiza en células intercalares tipo B que poseen al factor NHERF (Breton *et al.*, 2000). La enzima ubicada en túbulo proximal posee la subunidad B2 al igual que la localizada en cerebro (Nakhoul & Hamm, 2002). Estas dos isoformas de la subunidad B podrían conferir diferencias en la actividad enzimática de la  $H^+$ -ATPasa o en su capacidad para regular la densidad en membrana de la enzima (Nelson *et al.*, 1992).

Blake-Palmer y colaboradores demostraron la existencia de dos isoformas de la subunidad E. Mientras que E1 se encuentra ubicuamente expresada, la expresión de E2 es detectable principalmente en corazón, cerebro y riñón. Aparentemente la diferencia entre ambas isoformas radica en la región carboxiterminal, ya que E2 contiene una secuencia YVRF en ese extremo que se encuentra ausente en E1. La presencia de esta secuencia predice una posible interacción con proteínas adaptadoras involucradas en el tráfico de la enzima a membrana (Blake-Palmer *et al.*, 2007).

### *Mecanismo enzimático*

El mecanismo propuesto para el transporte de protones acoplado a la hidrólisis de ATP es similar al de las  $F_1F_0$ -ATPasas por las similitudes estructurales y moleculares que presentan con las  $V$ - $H^+$ ATPasas. La hidrólisis de ATP por el sitio catalítico de la subunidad A produce la rotación de la estructura del tallo central sobre el dominio  $A_3B_3$  (Yasuda *et al.*, 2001). Este cambio conformacional provoca el movimiento del anillo formado por las subunidades  $c$  y  $a$  induciendo la transferencia de protones a través de la membrana (Gruber *et al.*, 2001; Nelson & Harvey, 1999). El tallo posee una estructura en forma de  $\alpha$ -hélice íntimamente unida a los proteolípidos de membrana de la enzima. La rotación de este tallo provoca el giro del complejo de subunidades  $c$  ( $c$ ,  $c'$  y  $c''$ ) sobre la subunidad  $a$ . La subunidad  $a$  es mantenida rígida formando dos hemicanales separados espacialmente. Para que el transporte ocurra un protón debe unirse a la subunidad  $c$ , rotar a través de la bicapa lipídica y ser disociado en el segundo hemicanal. De esta manera, el movimiento rotacional del complejo de subunidades  $c$  se transmite en un gradiente lineal de protones a través de la membrana (Nakhoul & Hamm, 2002). Es decir que, la translocación de protones a través de  $V_0$  ocurre vía una protonación/deprotonación de lípidos expuestos en el extremo carboxiterminal de la subunidad  $c$  en el sitio donde ésta interactúa con la subunidad  $a$  (Wilkens & Forgac, 2001).

La enzima transloca dos protones por la hidrólisis de una molécula de ATP (Tomashek & Brusilow, 2000). La estequiometría funcional 2:1 es consistente con la estequiometría estructural de seis sitios de unión de  $H^+$  en el anillo formado por las subunidades  $c$  del dominio  $V_0$  y los tres sitios de unión de ATP presentes en el complejo  $V_1$ .

### *Localización de la proteína en riñón*

La distribución de la  $V$ - $H^+$ ATPasa en el nefrón de la rata ha sido determinada por inmunohistoquímica usando anticuerpos monoclonales y policlonales que reconocen a la enzima bovina (Bastani *et al.*, 1991; Brown *et al.*, 1988).

La proteína fue hallada en las microvellosidades de la membrana apical de los segmentos S1 y S2 del túbulo proximal y en la zona endocítica de la base de las microvellosidades (invaginaciones subapicales y vesículas) en todos los segmentos

proximales (S1, S2 y S3). La V-H<sup>+</sup>ATPasa está presente en las membranas apical y basolateral de la parte inicial de la rama delgada descendente del asa de Henle y en la membrana y vesículas apicales en la rama gruesa ascendente del asa de Henle (Brown *et al.*, 1988).

En el segmento distal del nefrón la H<sup>+</sup>ATPasa reside en las células intercalares. Existen dos subtipos de células con distinta morfología y propiedades fisiológicas. Las células intercalares de tipo A poseen la H<sup>+</sup>ATPasa principalmente en la membrana apical. Las células de tipo B tienen una distribución basolateral, difusa o bipolar de la enzima (Bastani & Gluck, 1997). La enzima no se encuentra presente en las células principales del túbulo colector (Gluck *et al.*, 1993).

#### *Regulación de la actividad de la V-H<sup>+</sup>ATPasa*

La regulación de la actividad de la V-H<sup>+</sup>ATPasa ocurre a diferentes niveles. Estos incluyen el incremento en la transcripción de genes y síntesis de la enzima, el transporte a membrana y redistribución de la misma (Lu *et al.*, 2001), el ensamble y desensamble de los dominios V<sub>1</sub> y V<sub>0</sub> (Lu *et al.*, 2002) y la inhibición alostérica a través de la unión de distintos compuestos en diferentes sitios de la proteína (Finbow & Harrison, 1997).

#### **Ensamble y desensamble de la enzima**

La V-H<sup>+</sup>ATPasa es ensamblada en el retículo endoplasmático. El dominio V<sub>0</sub> se ensambla, independientemente del sector V<sub>1</sub>, en el retículo sarcoplasmático (Nakhoul & Hamm, 2002). Se requiere un complejo estable V<sub>0</sub> para el ensamble correcto del dominio V<sub>1</sub> (Finbow & Harrison, 1997). Hay varias proteínas del retículo endoplasmático que colaboran en el ensamble de la H<sup>+</sup>ATPasa pero no forman parte del complejo final funcional. Estas proteínas forman asociaciones transientes con determinadas subunidades de la enzima y colaboran en el proceso de asociación de los dominios V<sub>1</sub> y V<sub>0</sub> (Hill & Stevens, 1994 y 1995; Hirata *et al.*, 1993).

El complejo V<sub>1</sub> solo no cataliza la hidrólisis de ATP (Gräf *et al.*, 1996) y el dominio V<sub>0</sub> libre no permite el pasaje de protones (Beltran & Nelson, 1992; Zhang *et al.*, 1992a).

La subunidad C del complejo V<sub>1</sub> es la única subunidad que se libera cuando se disocian los dos dominios de la enzima (Gräf *et al.*, 1996; Kane, 1995; Merzendorfer *et al.*, 2000;

Vitavska *et al.*, 2003). Estudios recientes sugieren que la subunidad C podría jugar un rol clave en el ensamble y desensamble, ya que sería el puente entre los dominios  $V_1$  y  $V_0$  uniendo las subunidades E y G del complejo  $V_1$  a la subunidad *a* del complejo  $V_0$  (Inoue & Forgac, 2005).

La asociación y disociación de los dominios  $V_0$  y  $V_1$  regulan la actividad de la enzima (Kane, 2000). La regulación de la actividad de la  $V\text{-H}^+$ ATPasa por ensamble/desensamble y reclutamiento de los dominios  $V_0$  y  $V_1$  ha sido demostrada recientemente durante la maduración de las células dendríticas (Trombetta *et al.*, 2003) y durante el ciclo de muda de los insectos (Sumner *et al.*, 1995; Zeiske *et al.*, 2002). El desensamble de la enzima requiere la presencia de microtúbulos intactos mientras que el ensamble es insensible a compuestos que rompan la red de microtúbulos, sugiriendo que la asociación y la disociación entre  $V_0$  y  $V_1$  ocurren por mecanismos diferentes (Xu & Forgac, 2001). Sin embargo, hasta el momento no hay evidencias de que el ensamble y desensamble de la proteína juegue algún rol en la regulación de la actividad de la  $V\text{-H}^+$ ATPasa ubicada en la membrana renal.

### **Cambios en la cantidad de la $V\text{-H}^+$ ATPasa**

Los cambios en la cantidad de la  $V\text{-H}^+$ ATPasa o de algunas de sus subunidades podrían estar involucrados en la regulación de la actividad de la enzima en riñón. Se han detectado cambios en la expresión del ARNm de la subunidad E en células intercalares (Fejes-Toth & Naray-Fejes-Toth, 1995) y variaciones en la cantidad de la misma subunidad en la médula renal de ratas tratadas con acetazolamida (Bagnis *et al.*, 2001).

### **Interacción de la $V\text{-H}^+$ ATPasa con otras proteínas**

La  $V\text{-H}^+$ ATPasa tiene la capacidad de unirse a varias proteínas regulatorias. Entre ellas, podemos mencionar proteínas de bajo peso molecular que se encuentran en el citoplasma celular y que modulan directamente la actividad de la enzima interaccionando con ella (Xie *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1992b y 1992c).

Algunas subunidades de la  $V\text{-H}^+$ ATPasa tienen la capacidad de unirse a proteínas SNARE (“*soluble NEM-sensitive factor attachment protein receptor*”) y facilitar el reciclado de la enzima. La subunidad B1 contiene una secuencia PDZ que le permite unirse



a NHERF en células intercalares renales de tipo B y modular la polaridad de la proteína en estas células frente a distintos estímulos (Blake-Palmer *et al.*, 2007).

La interacción de la subunidad C con la actina sugiere que esta subunidad jugaría un rol fundamental en controlar la unión de la V-H<sup>+</sup>ATPasa al citoesqueleto cuando la enzima se inserta en la membrana plasmática (Vitavska *et al.*, 2003).

### **Otros mecanismos**

La formación de puentes disulfuro entre residuos cisteína del sitio catalítico de la V-H<sup>+</sup>ATPasa produce una inhibición reversible de la actividad de la enzima (Forgac, 1999a; Stevens & Forgac, 1997). Una vez formados, estos puentes no son fácilmente clivados por concentraciones citoplasmáticas normales de glutatión reducido (Forgac, 1999b), lo cual estaría indicando que se produce un rearrreglo interno en el sitio activo de la proteína.

Cambios en la eficiencia de acople de la H<sup>+</sup>ATPasa también han sido propuestos como un mecanismo de regulación de la acidificación (Forgac, 1999a; Nelson *et al.*, 2000; Stevens & Forgac, 1997).

### **Regulación de la H<sup>+</sup>ATPasa presente en el túbulo proximal**

La V-H<sup>+</sup>ATPasa ubicada en las microvellosidades de la membrana luminal del túbulo proximal está regulada predominantemente por la concentración de bicarbonato en el medio y/o por la presión parcial de dióxido de carbono pero no por el pH (Soleimani *et al.*, 1995). Dicha enzima no posee requerimientos de cationes monovalentes ni aniones (Wang & Gluck, 1990).

### ***Mecanismos de regulación de la acidificación proximal***

La regulación del proceso de acidificación en el túbulo proximal afecta en gran medida la acidificación renal debido a que la mayor parte de la reabsorción renal de bicarbonato ocurre en este sector del nefrón. Este proceso es modulado por varios factores de relevancia fisiológica.

#### *pH y concentración de bicarbonato luminal*

La tasa de absorción neta de bicarbonato está linealmente relacionada con la concentración luminal de este ion (de Mello-Aires & Malnic, 1979). Un incremento en la concentración de  $\text{HCO}_3^-$  luminal aumenta la velocidad de absorción de bicarbonato (Alpern *et al.*, 1982) porque principalmente estimula la velocidad de secreción activa de protones.

Cuando Aronson y colaboradores examinaron los efectos del pH luminal sobre la actividad del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en vesículas de membrana “*brush border*”, hallaron un aumento de la actividad del intercambiador a un pH de 8.5 y una disminución de la misma cuando el valor de pH fue aumentado o disminuido (Aronson *et al.*, 1983), mostrando que cambios en el pH afectan la secreción de protones por el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  a través de la membrana apical. Condiciones que alteran el pH intracelular tienen efecto sobre el intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  debido a la modificación alostérica de NHE3 (Soleimani *et al.*, 1995). La salida de bicarbonato por la membrana basolateral también varía sensiblemente en respuesta a cambios en el pH celular.

#### *Tasa de flujo luminal*

El balance glomérulo-tubular ha sido definido como la capacidad del túbulo proximal de ajustar su transporte de sales y fluido en proporción a las variaciones de la tasa de filtración glomerular.

Existe una correlación estrecha entre la tasa de filtración glomerular y la tasa de reabsorción de  $\text{HCO}_3^-$  (Maddox & Gennari, 1985),  $\text{Cl}^-$  (Corman *et al.*, 1980), fosfato (Hellman *et al.*, 1964), glucosa (von Bayer *et al.*, 1980), aminoácidos (Ullrich, 1979) y para-aminohipurato (Haberle *et al.*, 1978). Dichas sustancias se reabsorben casi

exclusivamente en forma dependiente del transporte transcelular de  $\text{Na}^+$  (Dennis *et al.*, 1979; Ullrich, 1979).

#### *Capacidad buffer peritubular*

Aumentos en la capacidad buffer peritubular inducen un incremento en la acidificación proximal. Tanto los inhibidores de la anhidrasa carbónica como los bloqueantes del transporte basolateral de bases, anulan el efecto de los cambios en la concentración de buffer peritubular sobre la acidificación luminal. La presencia de buffers peritubulares, que provocan una disminución de la concentración de  $\text{HCO}_3^-$ , conduce a un aumento en la fuerza impulsora para la extrusión basolateral de  $\text{HCO}_3^-$  y por lo tanto, se incrementa la reabsorción de este ion (Amorena & Malnic, 1983). Variaciones agudas de la concentración peritubular de  $\text{HCO}_3^-$  afectan la reabsorción neta de este ion. Disminuciones en la concentración peritubular de  $\text{HCO}_3^-$  estimulan su reabsorción, mientras que aumentos en la concentración de  $\text{HCO}_3^-$  tienen el efecto opuesto (Amorena & Malnic, 1983; Chan *et al.*, 1982; de Mello-Aires & Malnic, 1975; Giebisch *et al.*, 1977).

#### *pH peritubular*

El pH peritubular no afecta la permeabilidad paracelular al  $\text{HCO}_3^-$ , por lo tanto, su efecto operaría principalmente sobre la tasa de secreción transcelular de  $\text{H}^+$ . Afecta la tasa de transporte de bases de la membrana basolateral que, secundariamente, altera el pH intracelular. Los cambios en el pH intracelular afectan la tasa de transporte de  $\text{H}^+$  a través de la membrana apical (Alpern *et al.*, 1983). Los cambios en el pH intracelular alterarían la “fuerza impulsora” a través de la membrana apical, pero los cambios de pH son pequeños y la variación de la fuerza impulsora no es suficiente para explicar el efecto sobre el transporte apical de  $\text{H}^+$  (Alpern *et al.*, 1982). Dicho transporte estaría afectado principalmente por la regulación alostérica de NHE3 (Aronson *et al.*, 1982).

### *Volumen extracelular*

Estudios de microperfusión in vivo mostraron que un aumento del volumen causa un incremento del 50% en la permeabilidad del bicarbonato (Alpern *et al.*, 1983). Esto se produce por una disminución en la resistencia paracelular con un consiguiente aumento de la permeabilidad paracelular del bicarbonato.

### *Presión parcial de CO<sub>2</sub>*

La presión parcial de CO<sub>2</sub> (P<sub>CO2</sub>) en el lumen del túbulo proximal y en los capilares peritubulares ha sido estudiada extensivamente por DuBose y Maddox. Estos autores hallaron que el valor de la P<sub>CO2</sub> está entre 55 y 65 mm Hg en ratas (DuBose *et al.*, 1978 y 1979; Maddox *et al.*, 1984).

Se ha observado que aumentos en la P<sub>CO2</sub> peritubular estimulan la secreción de H<sup>+</sup>, mientras que descensos en la P<sub>CO2</sub> tienen el efecto contrario (Amorena *et al.*, 1984; Cogan, 1984; de Mello-Aires & Malnic, 1975). El túbulo proximal es altamente permeable al CO<sub>2</sub>, por lo tanto, los cambios en la P<sub>CO2</sub> peritubular están acompañados por cambios en la P<sub>CO2</sub> y el pH del medio intracelular y del lumen tubular. Aumentos en la P<sub>CO2</sub> disminuyen el pH en el espacio peritubular, el medio intracelular y el lumen. En consecuencia, la secreción de H<sup>+</sup> a través de la membrana apical aumenta por activación alostérica del intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>. Este efecto evita o minimiza el descenso de pH intracelular provocado por el exceso de CO<sub>2</sub> peritubular. Por lo tanto, el pH intracelular no disminuye tanto como el peritubular, de modo que aumenta la fuerza impulsora para el influjo de H<sup>+</sup> o el eflujo de bases a través de la membrana basolateral.

Soleimani y colaboradores han detectado que un aumento en la P<sub>CO2</sub> incrementa la abundancia de la H<sup>+</sup>ATPasa en membrana luminal de túbulo proximal. (Soleimani *et al.*, 1995)

### *Depleción de potasio*

Chan y colaboradores hallaron que una disminución de la concentración de potasio peritubular no afecta la velocidad de absorción de bicarbonato pero que la depleción crónica de este ion estimula un 23% la reabsorción de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Chan *et al.*, 1982). La deficiencia crónica de potasio aumenta la actividad del transportador Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ubicado

en la membrana basolateral (Soleimani *et al.*, 1990) generando una disminución del pH celular que explica la estimulación de la reabsorción de bicarbonato.

#### *Concentración de calcio y fosfato*

En túbulos proximales de conejo perfundidos “*in vitro*” el incremento de la concentración luminal y peritubular de calcio aumenta la reabsorción de bicarbonato mientras que una disminución de la concentración de este ion no posee efecto sobre este proceso. Cambios en la concentración de fosfato no afectan la acidificación proximal (McKinney & Myers, 1982).

#### *Angiotensina II*

La angiotensina II (Ang II) es un potente regulador de la acidificación proximal, principalmente en el segmento S1 del túbulo, a través de receptores que se distribuyen uniformemente, tanto en las membranas lumbales como en las basolaterales (Brown & Douglas, 1982 y 1983; Mujais *et al.*, 1986).

La Ang II, dependiendo de su concentración, tiene un efecto bifásico sobre la acidificación tubular proximal y la reabsorción de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$  y agua (Harris, 1992). El flujo transepitelial de  $\text{Na}^+$  en túbulos aislados, aumenta en presencia de Ang II ( $10^{-11}\text{M}$  a  $10^{-7}\text{M}$ ) debido a la estimulación sinérgica de la actividad del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  apical y el cotransportador  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  basolateral (Geibel *et al.*, 1990; Reilly *et al.*, 1995). A concentraciones mayores de Ang II ( $10^{-6}\text{M}$ – $10^{-5}\text{M}$ ) el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  es inhibido (Reilly *et al.*, 1995).

#### *“Shear stress”*

La síntesis de óxido nítrico (NO) está involucrada en el control de las funciones tubulares y hemodinámicas del riñón (Kone & Baylis, 1997; Liang & Knox, 2000; Ortiz & Garvin, 2002; Romero *et al.*, 1992).

El NO está formado por un átomo de nitrógeno unido covalentemente a un átomo de oxígeno. El NO difunde rápidamente a través de las membranas biológicas y, de esta forma, puede alcanzar los compartimientos intracelulares e interactuar con diferentes moléculas blanco. Las propiedades paramagnéticas del NO le confieren una alta afinidad por el hierro presente en grupos hemo y esto hace que el NO reaccione con numerosas

hemoproteínas (Ignarro *et al.*, 1981). Entre estas proteínas se encuentra la guanilato ciclasa citosólica. La interacción con el NO produce la activación de la proteína, aumentando su actividad catalítica, lo cual implica un incremento de 50 a 200 veces de la velocidad de conversión de GTP a GMPc (Ignarro & Kadowitz, 1985; Ignarro *et al.*, 1986). El GMPc es un segundo mensajero que participa en múltiples vías de transducción de señales que incluyen la activación de quinasas y otras enzimas (Castro *et al.*, 1998).

La síntesis del NO es catalizada por un grupo de enzimas denominadas sintetasas de óxido nítrico (NOS). Las sintetasas de NO, constituyen una familia de isoenzimas con propiedades estructurales, funcionales y regulatorias diferentes. Hasta el momento, se han clonado y caracterizado los genes pertenecientes a tres categorías de sintetasas de NO en roedores y humanos. Las isoformas constitutivas, fueron descritas originalmente en neuronas (Bredt *et al.*, 1991) y en células endoteliales (Lamas *et al.*, 1992), y se las denominó nNOS (o NOS-I) y eNOS (o NOS-III) respectivamente. En 1992 fue clonada en macrófagos la isoforma inducible (iNOS o NOS II) (Xie *et al.*, 1992).

En el riñón, se ha detectado actividad de síntesis de NO y expresión de todas las isoformas conocidas de la NOS (Kone, 1999; Kone & Baylis, 1997; Liang & Knox, 2000). La actividad de NOS, evaluada a partir de la conversión de L-arginina marcada a L-citrulina, fue demostrada en homogenatos de corteza y médula renal (Nava *et al.*, 1996), así como en diferentes segmentos de nefrón aislados (Wu *et al.*, 1999). Por otra parte, se registró la presencia de NO en el fluido tubular mediante experimentos de micropuntura, utilizando microelectrodos sensibles a NO (Levine *et al.*, 2001).

Las células endoteliales afectan la función de las células epiteliales del túbulo proximal mediante un mecanismo parácrino que involucra la liberación de NO (Amorena & Castro, 1997; Linas & Repine, 1999; Stoos *et al.*, 1992; Wang, 1997). El NO induce un incremento en la acidificación proximal que depende de la producción de GMPc en las células epiteliales del túbulo proximal (Amorena & Castro, 1997; Wang, 1997).

Una consecuencia de la filtración glomerular es el incremento en la concentración de las proteínas plasmáticas y del hematocrito en la sangre de la arteriola eferente, con el consiguiente incremento en la viscosidad de la misma. Díaz-Sylvester y colaboradores detectaron que un incremento en la viscosidad de soluciones perfusoras artificiales en los capilares peritubulares induce un incremento en la acidificación proximal (Díaz-Sylvester *et al.*, 2001). La viscosidad de una solución está directamente relacionada con el “*shear*

*stress*” y se ha demostrado, que el “*shear stress*” es un fuerte agonista de la liberación de NO en arterias sistémicas (Burnstock, 1999; Furchgott & Vanhoutte, 1989; Papadaki *et al.*, 1998).

El incremento en la secreción de  $H^+$ , inducido por un aumento en la viscosidad, depende de la liberación de NO. El NO estimula la producción de GMPc en la célula epitelial tubular, activando al intercambiador  $Na^+/H^+$ , acoplado la carga de  $Na^+$  filtrada a la reabsorción proximal de  $Na^+$  y agua (Díaz-Sylvester *et al.*, 2001).

#### *Hormona paratiroidea*

La reabsorción de bicarbonato en el túbulo proximal se encuentra sujeta a la acción de la hormona paratiroidea sobre la isoforma NHE3 del intercambiador  $Na^+/H^+$  como se describió más arriba.

### **ENVEJECIMIENTO Y FUNCIÓN RENAL**

El envejecimiento, desde el punto de vista fisiológico, se caracteriza por un gradual acotamiento de la reserva homeostática y progresivo deterioro de la función de los diversos órganos, que es evidente a partir de la tercera década de vida de los seres humanos (Braunwald *et al.*, 2001). Con el transcurso de los años se producen cambios, estructurales y funcionales en la mayoría de los órganos influidos por factores genéticos y ambientales tales como la nutrición y el tipo de vida. Distintas funciones celulares se deterioran y una de las características celulares del envejecimiento es la acumulación de pigmento lipofuscínico en células cardíacas y neuronas.

Diversas teorías se han propuesto para explicar este proceso. Actualmente hay dos en consideración, la de la existencia de un reloj genéticamente determinado que modula el envejecimiento y la de efectos ambientales que inducen progresivamente lesiones celulares y moleculares (Cotran *et al.*, 2000). Los mecanismos moleculares incluyen mutaciones en el ADN, daños producidos por radicales libres, acumulación de proteínas aberrantes, etc. (Kirkwood & Wolf, 1995). El proceso biológico de envejecimiento y sus manifestaciones clínicas reflejan la interacción entre la herencia genética y el medio ambiente. Mientras que el máximo tiempo de vida de cada persona probablemente esté genéticamente estipulado,

la probabilidad de llegar a vivir ese tiempo gozando de buena salud parece estar en gran parte determinado por el medio ambiente y el estilo de vida (Khaw, 1997). Muchos autores creen que hay múltiples procesos de envejecimiento, por ello estas dos teorías no son mutuamente excluyentes (Kalu & Masoro, 1988).

Uno de los más importantes órganos afectados por el envejecimiento es el riñón. Estudios recientes han revelado que los cambios renales relacionados con el envejecimiento son acelerados por condiciones patológicas como la hipertensión, la aterosclerosis y la insuficiencia cardíaca (Bleyer *et al.*, 2000; Fliser *et al.*, 1997; Kasiske, 1987; Lindemann *et al.*, 1984; Ribstein *et al.*, 2001).

La función renal durante el envejecimiento en el hombre presenta un lento declinamiento en la tasa de filtración glomerular de aproximadamente  $1 \text{ ml min}^{-1}/1.73 \text{ m}^2/\text{año}$  a partir de los cuarenta años y la tasa de disminución se acelera luego de los sesenta y cinco años (Davies & Shock, 1950; Lamb *et al.*, 2003; Lindeman *et al.*, 1985). El flujo sanguíneo renal disminuye aproximadamente un 10% por década (Anderson & Brenner, 1986) desde 1200 ml/minuto a los 30-40 años hasta 600 ml/minuto a los 80 años (Long *et al.*, 2005a). La resistencia vascular intrarrenal aumenta con la edad (Lamb *et al.*, 2003) y se produce un incremento progresivo de la proteinuria (Heudes *et al.*, 1994; Rowe *et al.*, 1976). El envejecimiento también afecta la función tubular disminuyendo la capacidad para reabsorber agua y sales y concentrar la orina, aunque los mecanismos involucrados en este proceso no se hallan bien definidos (Lindeman, 1995).

El valor del clearance de creatinina en humanos permanece estable hasta los 30-40 años, declinando linealmente a una tasa de  $8 \text{ ml/ minuto}^{-1}/1.73 \text{ m}^2$  por década en la mayoría de las personas seniles sin enfermedad renal (Csiszar *et al.*, 2007). La excreción de albúmina aumenta con la edad (Hillege *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2002). El balance de sodio también se encuentra alterado, produciéndose una conservación defectuosa en presencia de una restricción de sodio y una excreción incorrecta frente a una sobrecarga incrementada de este ion (Long *et al.*, 2005a), con un aumento de la secreción de hormona antidiurética y una disminución de renina (Anderson & Brenner, 1986; Braunwald *et al.*, 2001).

La cantidad de agua corporal total disminuye con la edad debido al aumento del tejido graso y a la disminución de la masa magra, cayendo del 55-60% de la masa corporal en un varón de 20 años al 45-50% a los 80 años (Davis & Minaker, 2001). El balance de agua es particularmente vulnerable en sujetos seniles, resultando en una fuerte tendencia hacia la



deshidratación y la hiperosmolaridad (Beck, 2000). La homeostasis de los fluidos y los electrolitos depende del balance entre la ingesta y la excreción. Durante el envejecimiento cambios en el balance hidrosalino pueden generar en el individuo senil disturbios del balance de sodio y agua (Rolls & Phillips, 1990). Estos cambios incluyen disminución en la sensación de sed y alteraciones en la concentración plasmática de hormona antidiurética (Beck *et al.*, 2000; Kositzke, 1990), acotando los límites para la excreción de agua, sodio, potasio e iones hidrógeno (Bossingham *et al.*, 2005).

El riñón sufre cambios estructurales que incluyen disminución de su peso (reducción del 10% por década a partir de los 50 años), del área total renal, del área cortical y del número de glomérulos funcionales, acompañados de esclerosis glomerular, desarrollo de fibrosis túbulointersticial y pérdida de masa tubular (Lamb *et al.*, 2003).

No está claramente dilucidado si esta declinación de la función renal con el incremento de la edad representa una patología o es inherente al proceso normal de envejecimiento.

En los humanos la insuficiencia renal es predominantemente una enfermedad de la gente mayor y el uso de terapéuticas de reemplazo de la función renal en este grupo etario está aumentando rápidamente (Lamb *et al.*, 2003). Estas personas no sólo pueden tener diversas alteraciones crónicas progresivas, sino también un riesgo incrementado de responder adversamente a la terapéutica con diversas drogas, deteriorando su calidad de vida e implicando un alto costo asistencial que podría ser derivado a la prevención de la enfermedad y no a su tratamiento. Las razones subyacentes son variables, pero este hecho incrementa el valor de un mejor conocimiento de los cambios fisiopatológicos y morfológicos asociados con el envejecimiento (Goldstein *et al.*, 1988).

El envejecimiento ha sido estudiado en seres humanos, cultivos celulares y animales de laboratorio. Los animales más empleados han sido los ratones y las ratas. El uso de estas dos especies se basa principalmente en: *a*) numerosos estudios con respecto a su longitud de vida, *b*) vida corta que permite la realización de numerosos estudios en relación con la longitud de vida de los investigadores, *c*) bajo costo en cuanto a mantenimiento y prevención de enfermedades (Masoro, 1991).

La rata exhibe un deterioro dependiente de la edad en la función renal pero en esta especie los cambios que se producen son más rápidos y más severos que en los humanos (Reckelhoff *et al.*, 1992) debido a que la vida de la rata de laboratorio es relativamente corta (de dos a tres años).

Las modificaciones en la función del riñón de la rata durante el envejecimiento incluyen proteinuria, que se correlaciona con la patología glomerular y en menor medida con la tubular (Goldstein *et al.*, 1988), deterioro de la respuesta renal a cambios agudos en la composición de los fluidos corporales y una reducción en la capacidad de concentración de la orina (Corman *et al.*, 1985).

La proteinuria precede al incremento en la excreción urinaria de enzimas, lo que refleja el daño tubular (Casadevall *et al.*, 1995) y, como en el hombre, la microalbuminuria en la rata es un indicador temprano de enfermedad renal crónica (Damsgaard *et al.*, 1990; Van Liew *et al.*, 1992).

La extensión de la injuria depende del sexo, la cepa y la ingesta proteica/calórica del animal (Baylis & Schmidt, 1996). En varias cepas de ratas la enfermedad renal se manifiesta tempranamente y en una forma más severa en machos que en hembras (Baylis & Corman, 1998). La mayor susceptibilidad de los machos a desarrollar injuria glomerular estaría relacionada con la presencia de andrógenos (Baylis, 1994), los cuales pueden aumentar la síntesis de matriz extracelular (Baylis & Corman, 1998).

Los primeros signos de una morfología renal alterada ocurren a los tres meses de edad y se caracterizan por un engrosamiento de las membranas basales glomerulares y expansión del mesangio. Estas lesiones se hacen más severas a medida que transcurre el tiempo. Progresivamente se puede acumular matriz mesangial, sustancia hialina (hialinosis), lípidos y lesiones en los podocitos con pérdida de los mismos llegando a producirse adherencias con la cápsula de Bowman, desarrollándose así la esclerosis glomerular focal y segmentaria. La esclerosis glomerular avanzada es acompañada por el desarrollo de “*shunts*” directos entre las arteriolas aferente y eferente en los glomérulos yuxtamedulares (Lamb *et al.*, 2003).

Diferentes mecanismos patogénicos han sido postulados para el desarrollo de la glomeruloesclerosis que ocurre en las ratas seniles. Dentro de los mismos podemos mencionar a la hipertensión glomerular, la hipertrofia glomerular, la coagulación intraglomerular, la acumulación de lípidos, etc. (Fujihara *et al.*, 1992).

Los túbulos renales de ratas seniles también sufren cambios degenerativos que se caracterizan por un engrosamiento de la membrana basal de los túbulos proximales con atrofia de sus células epiteliales produciéndose el deterioro de la reabsorción tubular de

fosfato, glucosa y aminoácidos (Goldstein *et al.*, 1988). Se desarrollan así áreas de atrofia tubular y marcada fibrosis intersticial (Abrass *et al.*, 1995).

Las causas de la glomerulopatía relacionada con la edad son multifactoriales e incluyen desbalance entre la síntesis y la degradación de la matriz extracelular así como alteraciones hemodinámicas, no siendo fácil separar lo que es cambio inherente al envejecimiento y cambio debido a enfermedad.

Uno de los rasgos característicos del riñón senil es un tono vascular basal aumentado ya que hay una respuesta atenuada a los vasodilatadores como el óxido nítrico (NO), el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) y la prostaciclina, mientras que se encuentra aumentada la respuesta a vasoconstrictores como la Ang II (Fliser *et al.*, 1993; Fuiano *et al.*, 2001; Higashi *et al.*, 1997). La declinación de la actividad de renina en plasma ha sido observada en ratas seniles y se podría ser atribuir al incremento del factor natriurético auricular que es un potente inhibidor de la liberación de renina. Los cambios de la Ang II en general siguen a los de la renina. Estos cambios en el eje renina-angiotensina pueden explicar el rol protector de los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (Ferder *et al.*, 2002).

En el envejecimiento, la producción total de NO, medida como excreción de nitratos y nitritos, se encuentra disminuida y coincide con la progresión de la injuria renal y la disminución del flujo sanguíneo (Hill *et al.*, 1997; Kielstein *et al.*, 2003; Reckelhoff *et al.*, 1994).

También los niveles séricos de varios compuestos relacionados con la regulación de la función renal se modifican durante el envejecimiento. La concentración plasmática de hormona paratiroidea aumenta progresivamente durante este proceso en humanos (Halloran *et al.*, 1990; Marcus *et al.*, 1984; Orwoll & Meier, 1986; Wiske *et al.*, 1979; Young *et al.*, 1987) y en ratas (Armbrecht *et al.*, 1984 y 1988; Fox, 1991; Kalu & Hardin, 1984; Kalu *et al.*, 1988; Peng *et al.*, 1986; Wada *et al.*, 1992). La elevación de PTH en plasma de ratas seniles es causada por un incremento en la secreción de la hormona (Fox & Mathew, 1991). Al aumentar la edad, disminuye la sensibilidad de la glándula paratiroidea para responder a la reducción de calcio extracelular ya que, es necesaria una elevada concentración de calcio en sangre, para suprimir la secreción de PTH (Uden *et al.*, 1992). La capacidad de PTH para aumentar la producción renal de 1,25(OH)<sub>2</sub>D (1,25-dihidroxitamina D) y AMPc declina con la edad tanto en ratas como en humanos

(Armbrecht *et al.*, 1982 y 1986). Estos resultados sugieren que la habilidad del riñón para responder al estímulo de PTH disminuye al aumentar la edad (Hanai *et al.*, 1989 y 1990).

Mac Laughlin y colaboradores encontraron una disminución de la capacidad de acidificación tubular proximal en ratas seniles. En experimentos de micropuntura el flujo de protones ( $J_{H^+}$ ) de animales seniles (18-22 meses) estaba reducido un 50%, y en vesículas aisladas de ribete en cepillo 80%, comparados ambos con el de animales adultos jóvenes (3 meses) (Mac Laughlin *et al.*, 2001). Este resultado coincide con datos de Kinsella y Sacktor, quienes observaron una reducción en la actividad del intercambiador en vesículas de membrana luminal de túbulo proximal en ratas seniles (Kinsella & Sacktor, 1987).

La acidificación proximal y por consiguiente la recuperación del  $HCO_3^-$  filtrado en los animales seniles es un proceso complejo al que deben estar contribuyendo diferentes factores. La disminución de la capacidad de acidificación en animales seniles podría deberse a una variación en la expresión/actividad de la  $V-H^+ATPasa$  y/o del intercambiador  $Na^+/H^+$  o a cambios en los mecanismos de control de la acidificación.

## OBJETIVOS

El objetivo de esta tesis es evaluar los mecanismos operantes en el túbulo contorneado proximal de ratas seniles responsables de la captura del bicarbonato filtrado, teniendo en cuenta que los sujetos seniles presentan condiciones lábiles en lo que respecta a su equilibrio ácido-base y que en un trabajo previo hemos detectado una disminución de la acidificación proximal en animales seniles. Para cumplir dicho objetivo, fue necesario:

~ Evaluar parámetros metabólicos en animales control y seniles como: peso, presión arterial, balance de agua, creatinina plasmática, BUN (nitrógeno ureico sanguíneo), proteinuria, osmolaridad plasmática y urinaria, excreción urinaria de sodio y excreción urinaria de potasio.

~ Analizar el transporte de  $H^+$  mediante experimentos de micropuntura con bafilomicina, un inhibidor específico de la  $V-H^+ATPasa$  (Nakhoul y Hamm, 2002), y con EIPA, inhibidor del intercambiador  $Na^+/H^+$ , isoformas NHE3 (Aronson, 1983) y NHE8 (Goyal *et al.*, 2003 y 2005; Zhang *et al.*, 2007).

~ Evaluar los niveles plasmáticos de hormona paratiroidea en ratas adultas jóvenes y seniles.

~ Evaluar los niveles de AMPc en corteza renal de animales seniles y adultos jóvenes.

~ Evaluar la expresión de la V-H<sup>+</sup>ATPasa y las isoformas NHE3 y NHE8 del intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> en vesículas de membrana de ribete en cepillo de túbulo contorneado proximal mediante la técnica de Western blot utilizando anticuerpos específicos que reconozcan dichas proteínas.

~ Evaluar la expresión del ARN mensajero de las isoformas NHE3 y NHE8 del intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> y de la V-H<sup>+</sup>ATPasa en el túbulo contorneado proximal de animales seniles y adultos jóvenes mediante la técnica de RT-PCR.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## **GRUPOS EXPERIMENTALES**

Para analizar los mecanismos responsables de la captura del bicarbonato filtrado operantes en el túbulo contorneado proximal de animales seniles se realizaron experimentos de micropuntura, análisis bioquímicos y de biología molecular en ratas Wistar macho pertenecientes a dos grupos experimentales:

*Control:* 3 meses de edad.

*Seniles:* 18 a 20 meses de edad.

Las ratas tuvieron libre acceso a alimento y agua y estuvieron sometidas a un régimen de 12 horas luz: 12 horas oscuridad hasta el momento de los experimentos.

## **ENSAYOS BIOQUÍMICOS**

### *Parámetros metabólicos*

~ Obtención de muestras de sangre y orina

Las ratas fueron pesadas y colocadas en jaulas metabólicas, teniendo acceso libre al agua, sin comida. Se recogió orina en frascos de plástico desde la 08:00 horas hasta las 08:00 horas del día siguiente, se midió el volumen de la misma (diuresis), se centrifugó durante siete minutos a 2500 rpm en una centrífuga refrigerada (Sorvall®, RC 5C Plus) y se guardó a -20°C hasta su posterior uso. También se determinó la cantidad de agua ingerida por los animales (ingesta). El balance de agua se calculó como la diferencia entre la ingesta y la diuresis.

A las 13:00 horas del segundo día se registró la presión arterial sistólica (PAS) de las ratas por plestimografía utilizando un tensiómetro de columna de mercurio con un manguito para insuflar adaptado a la cola del roedor, un sensor (Pneumatic sensor, International Biomedical, Inc), con un transductor (Pneumatic pulse transducer, Narco Bio Systems, Houston, Texas, USA) y un osciloscopio (Handy monitor Model VC – 21 A, Serial N° 20002, Nihon Kohden Corporation) conectados a un fisiógrafo (Type RM 125 Power supply for Type 122 Preamplifier Tektronik Inc. Portland, Oregon, USA).



Luego de tomarles la presión arterial, se extrajeron muestras de sangre de la cola de los animales en situación de mínimo stress. Dichas muestras fueron colocadas en tubos eppendorf conteniendo EDTA (100mg/ml) y se refrigeraron inmediatamente. Posteriormente fueron centrifugadas a 2300 rpm durante quince minutos en una centrífuga refrigerada (Sorvall®, RC 5C Plus) y se separó el plasma, el cual fue guardado a -20°C hasta su posterior uso.

Las pruebas se realizaron respetando las normas éticas del trabajo experimental con animales de laboratorio (Goldberg *et al.*, 1996).

~ Mediciones de laboratorio:

≈ Creatinina plasmática

La determinación de creatinina plasmática es utilizada como un índice de función renal. La concentración de creatinina plasmática ( $C_{rP}$ ) fue determinada por un método colorimétrico de punto final sin desproteización, utilizando el kit de Wiener (Wiener lab. 2000, Rosario, Argentina). Para la determinación de  $C_{rP}$  se realizaron las diluciones correspondientes de las muestras de plasma pertenecientes a ambos grupos experimentales.

Se colocó en un tubo de ensayo 0.1 ml de la muestra correspondiente más 1 ml de reactivo de trabajo (mezcla en partes iguales de ácido pícrico 41.4 mM y buffer/PLE: Solución 0.4% de polioxietilén lauril éster (PLE) en buffer glicina/NaOH 1 M, pH 12.4). También se efectuó un blanco con 0.1 ml de agua bidestilada en lugar de la muestra y un tubo estándar colocando 0.1 ml de solución de creatinina 20 mg/l. A ambos tubos se les adicionó 1 ml del reactivo de trabajo. Se mezcló el contenido de cada tubo y se los incubó durante 10 minutos en un baño termostático a 37°C. Dentro de los 15 minutos de retirados los tubos del baño, se leyó la absorbancia del estándar y de las muestras en un espectrofotómetro (SHIMADZU UV-visible recording spectrophotometer UV-240) a 510 nm llevando a 0 con el blanco ( $L_1$ ).

Luego se agregó al blanco y a las muestras 50  $\mu$ l del “stopper” (ácido acético 20%), se mezcló el contenido de los tubos y se los incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido dicho tiempo, se volvió a leer el valor de absorbancia de las muestras llevando a 0 con el blanco ( $L_2$ ).

Este método se basa en que la creatinina y otros compuestos de la muestra reaccionan con el ácido pícrico en medio alcalino dando un complejo de color rojo que se cuantifica mediante lectura fotométrica. La adición del ácido acético (“*stopper*”) al medio, destruye el picrato de creatinina pero no el color formado por los demás compuestos. Por lo tanto la diferencia entre la lectura fotométrica antes ( $L_1$ ) y después ( $L_2$ ) del agregado del ácido permite cuantificar la creatinina presente en la muestra en forma específica.

$$Cr_P = \text{Creatinina en plasma (mg/l)} = (L_1 - L_2) * f * \text{factor de dilución}$$

Siendo:

$$f = \frac{20 \text{ mg/l}}{E}$$

E

E= lectura fotométrica del estándar y 20 mg/l= concentración del estándar.

≈ Uremia

La urea constituye la fracción de nitrógeno no proteico que se produce en el hígado como producto final del metabolismo proteico y es excretada por la orina a través de los riñones.

La urea plasmática ( $U_P$ ) fue determinada por un método enzimático específico utilizando el kit de Wiener (Wiener lab. 2000, Rosario, Argentina).

Para la determinación de urea plasmática se colocó en un tubo de ensayo 20  $\mu$ l de la muestra correspondiente más 1 gota de ureasa. También se efectuó un estándar colocando 20  $\mu$ l de solución de urea 0.6 g/l y un blanco con 20  $\mu$ l de agua bidestilada en lugar de la muestra, a ambos tubos se les adicionó 1 gota de ureasa. Se mezcló el contenido de cada tubo por agitación suave y se los incubó durante 5 minutos en un baño termostático a 37°C. Se agregó a cada tubo 1 ml de Reactivo 1 (Fenol 532 mM y Nitroferrocianuro de sodio 0.5 mM) y 1 ml de Reactivo 2 (Hipoclorito de sodio 36.6 mM e Hidróxido de sodio 0.625 mM) y se incubaron durante 5 minutos a 37°C. Se agregaron 10 ml de agua bidestilada a cada tubo, se mezclaron por inversión y se retiraron del baño termostático. Luego de 10 minutos se leyó la absorbancia del estándar y de las muestras en espectrofotómetro (SHIMADZU UV-visible recording spectrophotometer UV-240) a 540 nm llevando a 0 con el blanco.

La determinación de  $U_P$  por este método se basa en que la ureasa adicionada descompone específicamente a la urea presente en la muestra produciendo dióxido de carbono y amoníaco. Este último reacciona con fenol e hipoclorito en medio alcalino produciendo azul de indofenol que se determina colorimétricamente. La concentración de urea plasmática se reporta comúnmente como nitrógeno ureico en sangre (BUN). Los niveles de BUN se utilizan para evaluar la función renal ya que una elevación de la concentración sérica de urea se interpreta como una posible disfunción.

$$\text{BUN (g/l)} = D * f$$

Siendo:

$$f = \frac{0.28\text{g/l}}{E}$$

E

E= lectura fotométrica del estándar

D = lectura fotométrica de la muestra

≈ Proteinuria

La determinación de la concentración de proteínas en orina se realizó en base al método de cuantificación espectrofotométrica de Bradford (1976).

Se realizó una solución estándar de seroalbúmina bovina, conteniendo 3 mg disueltos en 100 ml de agua bidestilada, (30  $\mu\text{g/ml}$ ), y se preparó el reactivo de Bradford disolviendo 100 mg de azul brillante de Coomasie G-250 en 50 ml de etanol al 95%. A esta solución se le agregaron 100 ml de ácido fosfórico al 85% y la solución resultante se diluyó a un volumen final de 1 litro.

Se realizó una curva de calibración con diluciones conocidas de la solución estándar. Se colocó 1 ml de cada dilución, 1 ml de muestra o 1 ml de agua bidestilada (Blanco) y a cada tubo se le agregó 1 ml de reactivo de Bradford, se mezcló en vortex y se leyó la absorbancia a 595 nm.

Se confeccionó un gráfico patrón de proteínas basado en la curva de calibración: cantidad de albúmina (eje de las abscisas) contra absorbancia obtenida a una longitud de onda de 595 nm (eje de las ordenadas). La absorbancia resultante de cada muestra se

interpoló a la curva patrón y se extrapoló de ésta al eje de las X para conocer la concentración de proteína contenida en la muestra.

El método de Bradford se basa en la unión de la forma más aniónica del colorante Coomassie G-250 azul a la proteína, dicha estructura tiene un máximo de absorbancia a 595 nm. Por esto, la cantidad de proteína puede ser estimada determinando la absorbancia de la solución a esa longitud de onda.

≈ Excreción urinaria de sodio y potasio

La concentración urinaria de sodio ( $\text{Na}^+_u$ ) y de potasio ( $\text{K}^+_u$ ) fue medida con electrodos ion-selectivos en un autoanalizador Roche / Hitachi 917.

$$U_{\text{Na}^+} V = \text{Excreción urinaria de sodio } (\mu\text{E/d}) = \text{Na}^+_u * V$$

$$U_{\text{K}^+} V = \text{Excreción urinaria de potasio } (\mu\text{E/d}) = \text{K}^+_u * V$$

Siendo:

V = Volumen minuto

≈ Osmolaridad plasmática y urinaria

La osmolalidad plasmática ( $\text{Osm}_p$ ) y urinaria ( $\text{Osm}_u$ ) se midió en un osmómetro de presión de vapor Wescor (Model 5100C, Wescor, Logan, UT, USA).

≈ Parámetros ácido-base

Se canuló la arteria femoral derecha de los animales, durante el experimento de micropuntura, y se tomaron muestras para la medición del pH sanguíneo y de la presión parcial de  $\text{CO}_2$  ( $P_{\text{CO}_2}$ ). Los parámetros ácido-base (pH sanguíneo y  $P_{\text{CO}_2}$ ) fueron medidos en un analizador de gases Radiometer (Modelo ABL 330). La concentración de bicarbonato en plasma se calculó utilizando la ecuación de Henderson-Hasselbalch, con un  $\text{pK} = 6.03$  (Edsall & Wyman, 1958).

Determinación de la concentración de hormona paratiroidea

Para la obtención del suero se extrajeron muestras de sangre utilizando una cánula de polietileno (Intramedic®, PE190) colocada en la arteria aorta de los animales anestesiados con éter sulfúrico, a los cuales posteriormente se les realizó la nefrectomía. Las muestras fueron colocadas en tubos eppendorf conteniendo EDTA (100mg/ml) y se refrigeraron inmediatamente. Posteriormente se centrifugaron a 2300 rpm durante quince minutos en una centrífuga refrigerada y se separó el plasma que se guardó a -20°C hasta su posterior uso.

La concentración de hormona paratiroidea (PTH) se midió mediante un ensayo inmunoradiométrico en suero de animales adultos jóvenes y seniles.

El método se basa en la habilidad de la hormona paratiroidea, presente en la muestra, para competir con [<sup>131</sup>I]PTH por la unión a anticuerpos que reconocen dicha hormona específicamente (Arnaud *et al.*, 1971).

Se tomaron 20 µl de suero de animales adultos jóvenes o seniles y se incubaron durante cuatro días a 4°C con 100 µl de una solución diluida 1:15000 del anticuerpo anti-PTH. Al mismo tiempo, se realizó una curva estándar con concentraciones conocidas de PTH. Luego, se agregaron 200 µl de [<sup>131</sup>I]PTH a cada tubo y se incubaron durante tres días a 4°C. Finalizada la incubación, se agregaron 2 ml de dextran recubierto con carbón vegetal y se centrifugaron los tubos a 3000 rpm. Dicha centrifugación permite la separación de la [<sup>131</sup>I]PTH unida al anticuerpo (B) de [<sup>131</sup>I]PTH libre (F). Se determinó la actividad de [<sup>131</sup>I]PTH en todos los tubos utilizando un contador gama (LKB Wallac Clinigamma 1272).

Las concentraciones de PTH presentes en las muestras se calcularon como:

$$\%B/F = \frac{\text{cpm } [^{131}\text{I}]\text{PTH unido estándar o muestra} \times 100}{\text{cpm } [^{131}\text{I}]\text{PTH libre}}$$

Se graficó %B/F en función del logaritmo de la concentración de PTH estándar y los picogramos de hormona paratiroidea presentes en las muestras se determinaron por interpolación en la curva estándar.

### Determinación de la concentración de AMPc

Se midieron los niveles de AMPc en corteza renal por radioinmunoensayo utilizando un kit de Immunotech (RIA cyclic AMP). El método se basa en la competencia entre un antígeno radioactivo ( $[^{125}\text{I}]\text{AMPc}$ ) y un antígeno no radioactivo (AMPc presente en la muestra o AMPc estándar) por un número fijo de sitios de unión a un anticuerpo (Cailla *et al.*, 1973).

Las ratas pertenecientes a ambos grupos experimentales fueron anestesiadas con éter sulfúrico y se practicó una incisión longitudinal en el abdomen. Se lavaron los riñones con PBS (en mM: NaCl 150, KCl 3,  $\text{HNa}_2\text{PO}_4$  10,  $\text{H}_2\text{NaPO}_4$  2, pH 7.4) a 4°C utilizando una cánula de polietileno (Intramedic®, PE190) colocada en la arteria aorta y cortando las venas renales para dejar salir la sangre que perfundía los riñones. Cuando los riñones tomaron un color rosa pálido se efectuó la nefrectomía. Los riñones lavados se transfirieron a un vaso de precipitado con PBS y utilizando una tijera se retiró la cápsula de tejido conectivo que los recubría. Se separó la corteza de la médula y las cortezas fueron lavadas tres veces con PBS y una cuarta vez con PBS en presencia de isobutilmetil xantina (IBMX) 1 mM para prevenir la degradación del AMPc por fosfodiesterasas. Las cortezas fueron pesadas y congeladas rápidamente a -80°C hasta el momento de realizar el experimento.

Para obtener los homogenatos, se colocó el tejido descongelado en un sonicador (Branson, modelo 250) con 2 ml de buffer de homogeneización (en mM: HEPES 20, EDTA 1, IBMX 1, pH 7.4) por gramo de tejido. La concentración de proteínas totales presentes en los homogenatos se determinó por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

Para extraer los nucleótidos cíclicos de las muestras de corteza renal, se mezclaron 10 volúmenes de homogenato completo con un volumen de ácido perclórico concentrado bajo agitación con vortex. La mezcla se incubó durante 20 minutos a 4°C y posteriormente se centrifugó durante 20 minutos a 10000 rpm en una centrífuga para eppendorfs (MSE, Mistral 1000). La determinación de AMPc debe realizarse a pH neutro, por lo tanto, los sobrenadantes obtenidos luego de la precipitación con ácido perclórico debieron ser neutralizados. Para esto, se tomaron 240  $\mu\text{l}$  de sobrenadante y se mezclaron con 75  $\mu\text{l}$  de una dilución 1:2.18 de una solución de KOH 4.55 N, bajo agitación con vortex. La mezcla se mantuvo durante 5 minutos a 4 °C y se centrifugó durante 1 minuto a 10000 rpm.

Se tomaron 100 µl de una dilución 1:300 o 1:100 (animales adultos jóvenes o seniles respectivamente) y se incubaron durante 18 horas a 4°C con 500 µl de la mezcla de reacción conteniendo [<sup>125</sup>I]AMPc en tubos recubiertos con un anticuerpo que reconoce en forma específica al AMPc. Paralelamente, se realizó una curva estándar con concentraciones conocidas de AMPc.

Finalizada la incubación, se aspiró la fase líquida de los tubos utilizando una aguja larga conectada a una bomba de vacío y se determinó la actividad de [<sup>125</sup>I]AMPc en todos los tubos utilizando un contador gama (LKB Wallac Clinigamma 1272).

Las concentraciones de AMPc presentes en las muestras se calcularon de la siguiente forma:

Las cpm de [<sup>125</sup>I]AMPc de cada muestra o estándar se expresaron porcentualmente en función de las cpm correspondientes al estándar 0 (%B/B<sub>0</sub>). El estándar 0 representa las cpm unidas al anticuerpo en ausencia de AMPc estándar o muestra. De modo que:

$$\%B/B_0 = \frac{\text{cpm } [^{125}\text{I}]\text{AMPc estándar o muestra} \times 100}{\text{cpm } [^{125}\text{I}]\text{AMPc unido en ausencia de estándar o muestra}}$$

Se graficó %B/B<sub>0</sub> en función del logaritmo de la concentración de AMPc estándar. Estos datos se ajustaron a una línea recta.

Los fentomoles de AMPc presentes en las muestras se determinaron por interpolación en la curva estándar y se expresaron en función de los microgramos de proteínas totales presentes en ellas.

### **EXPERIMENTOS DE MICROPUNTURA**

La superficie del riñón, está compuesta mayoritariamente por túbulos contorneados proximales. Dichas estructuras pueden observarse utilizando una lupa estereoscópica. En menor cantidad, se distinguen túbulos contorneados distales. Se han utilizado colorantes aniónicos (como verde de lisamina) para identificar asas proximales o distales en la superficie del riñón. El colorante se administra por vía endovenosa (bolo de 25 µl de una solución al 10%). Cuando el colorante llega al riñón, la superficie completa se tiñe momentáneamente. El verde de lisamina es capaz de atravesar la barrera de filtración glomerular. A medida que el filtrado coloreado fluye a través del túbulo proximal y el asa

de Henle, los sucesivos segmentos se colorean. Después de pasar por el asa de Henle, el colorante se concentra y llega al túbulo distal dando una tonalidad más intensa a ese segmento. Aunque esta técnica es de gran utilidad para la identificación de segmentos, el observador entrenado puede diferenciarlos sin colorearlos debido a que existen diferencias morfológicas visibles al microscopio. Los túbulos distales son más delgados, menos sinuosos y más cortos que los proximales.

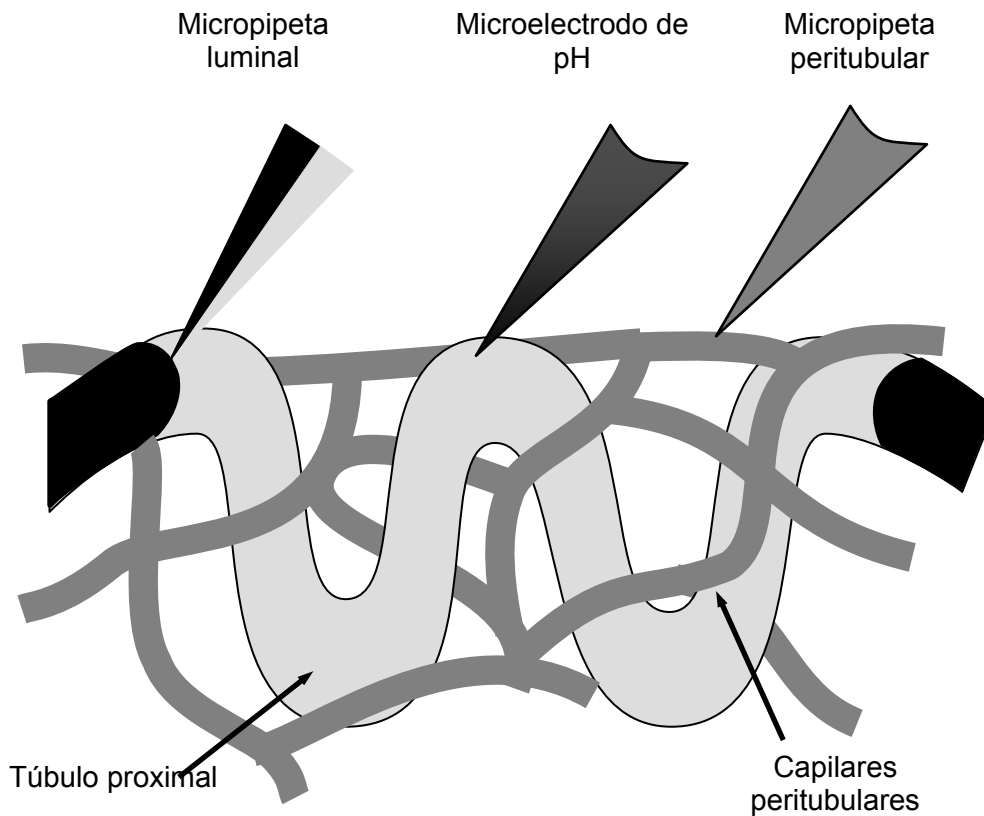
Los capilares peritubulares se ven como líneas rojas delgadas que corren longitudinalmente entre los túbulos. Las primeras ramificaciones de las arteriolas eferentes de los glomérulos más superficiales pueden ser reconocidas como estructuras en forma de estrella con vasos saliendo radialmente de la arteriola eferente localizada en el centro. Las ramas de un vaso estrellado, generalmente rodean segmentos del túbulo proximal de un único nefrón. Esta característica anatómica permite la perfusión de capilares peritubulares que rodean un nefrón en particular. Entonces, es posible imponer sobre estas células soluciones lumbales y peritubulares artificiales de composiciones conocidas, aislando efectivamente el túbulo del resto del animal. Los experimentos de micropuntura con perfusión luminal y peritubular simultánea permiten mantener intacta la geometría de las estructuras estudiadas en un entorno de características conocidas y controladas, por lo tanto, es posible el estudio de fenómenos de transporte en el epitelio tubular, independizándose de factores extraepiteliales que pudieran dificultar la interpretación de los resultados.

#### *Experimentos de micropuntura con perfusión luminal y peritubular simultánea*

La técnica utilizada para estudiar la cinética de acidificación en túbulo contorneado proximal por mediciones continuas del pH intratubular fue previamente descrita (Díaz-Sylvester *et al.*, 2001) y se resume en la *figura 8*. Utilizando una micropipeta de dos ramas, se inyecta una gota de solución luminal en la luz tubular, entre dos columnas mayores de aceite mineral coloreado con negro de Sudán. Un microelectrodo de resina sensible a protones se pone en contacto con dicha gota y registra los cambios en el pH luminal, mientras se perfunden los capilares peritubulares en torno al túbulo puncionado por medio de una micropipeta simple con solución peritubular. La solución peritubular es de composición conocida así como la solución luminal pero esta última se modifica de



acuerdo con el grupo experimental para poder evaluar el efecto de diferentes agentes sobre la acidificación proximal.



**Figura 8:** Modelo experimental. Un microelectrodo de resina sensible a H<sup>+</sup> situado en el lumen del túbulo contorneado proximal registra los cambios en el pH de una gota de solución luminal. La gota se genera inyectando la solución por una de las ramas de la micropipeta de perfusión luminal y queda aislada por gotas de aceite coloreado inyectadas por la otra rama de la misma micropipeta. Simultáneamente se perfunde el capilar peritubular.

~ Preparación de micropipetas y microelectrodos

El éxito de un experimento de micropuntura radica fuertemente en la calidad de las micropipetas y microelectrodos.

## ≈ Micropipetas peritubulares

Las micropipetas peritubulares fueron preparadas utilizando capilares de vidrio borosilicato de 1.5 mm de diámetro externo (Hilhenberg). Este vidrio tiene alto punto de fusión y paredes relativamente delgadas, para optimizar el tamaño del lumen de la punta de la pipeta, pero a la vez, suficientemente gruesas para tener estabilidad mecánica. La flexibilidad de las pipetas depende de la longitud de la zona delgada terminal. Las pipetas buenas tienen una punta con la rigidez necesaria para poder perforar el tejido y la flexibilidad suficiente para no dañarlo por pequeños movimientos que pudiera tener el riñón una vez que la pipeta fue posicionada. El vidrio es estirado a mano, sobre la llama de un mechero de Bunsen hasta obtener un capilar de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  de diámetro en la punta. Con la ayuda de la llama, la punta se tuerce formando un gancho que permite colgarle una pesa y reestirar el capilar hasta alcanzar un diámetro de punta final de 5 a 10  $\mu\text{m}$  utilizando una microfragua de Fonbrune, bajo lupa.

La punta de la pipeta debe tener un bisel de entre 30° y 45° para poder penetrar en el tejido provocando el mínimo daño. Pipetas poco afiladas requieren una fuerza mayor para perforar el tejido. Esto hace que una vez puncionado el tejido, la pipeta avance por inercia más allá del sitio deseado, rompiendo los túbulos y/o capilares cercanos. Un afilado excesivo produce puntas más frágiles con un lumen más grande, que pueden dañar el tejido. Para afilar las micropipetas, se utiliza un equipo que consta de un motor que hace girar un disco de material abrasivo. Las micropipetas se fijan al soporte de un micromanipulador que permite mover con precisión la micropipeta en el eje vertical. Todo el equipo está montado sobre un sistema antivibratorio. El proceso de afilado se realiza bajo lupa (Nikon).

## ≈ Micropipetas lumbales

La construcción de estas pipetas es esencialmente similar a la de las pipetas peritubulares. Para su construcción se utilizaron capilares de vidrio “*theta*” de 2 mm de diámetro externo (Style I, Theta tubing, R&D Optical Systems Inc.). Estos capilares poseen un “*septum*” central que permite la fabricación de pipetas con doble vía, de modo que es posible utilizar cada rama separadamente. Por lo tanto, se pueden perfundir

soluciones de diferente composición y/o naturaleza por cada rama. El diámetro de punta final de estas micropipetas es de 10  $\mu\text{m}$ .

#### ≈ Microelectrodos de resina

Los electrodos de membrana líquida sensible al pH se prepararon como se describió previamente (Amorena *et al.*, 1990). Los capilares de vidrio borosilicato con filamento interno (Hilhenberg) se estiran en un puller vertical (David Kopf Instruments, 700 D). Los electrodos se calientan a 375°C en una estufa de calor seco durante dos horas. Dentro de la estufa caliente, se deposita una gota de silicona (dicloro metil xilano, Sigma-Aldrich) sobre la base del recipiente que contiene a los electrodos. La silicona se evapora y se impregna rápidamente en los electrodos, que se dejan a 200°C durante dos horas más. Para evitar la hidratación, los microelectrodos se guardan hasta el momento de ser utilizados en un recipiente cerrado conteniendo sílicagel (desecador). Al comienzo del experimento, la punta de cada microelectrodo se llena con una gota de 0.1  $\mu\text{l}$  de ionóforo de  $\text{H}^+$  Cocktail A de Fluka (Ronkonkoma, NY). Los vidrios con filamento interno permiten el llenado de la punta del electrodo con la resina líquida de intercambio iónico por acción de la capilaridad y sin burbujas que pudieran interrumpir la continuidad eléctrica. El resto del microelectrodo se llena con solución de Amán y se conecta al preamplificador del electrómetro mediante una hemicelda de Ag/AgCl.

#### ~ Calibración de los electrodos

Dados dos compartimientos separados por una membrana permeable a un soluto cargado, la diferencia de potencial registrada entre los compartimientos se relaciona con la diferencia de concentraciones del soluto a ambos lados de la membrana mediante la ecuación de Nernst:

$$V = (RT/zF) \ln (C_1/C_2)$$

donde V es la diferencia de potencial, R es la constante de los gases ideales, T es la temperatura en grados Kelvin, z es el número de cargas por ion, F es la constante de Faraday (96500 coul \*  $\text{mol}^{-1}$ ) y  $C_1$  y  $C_2$  son las concentraciones del ion en los compartimientos respectivos.

La resina de los microelectrodos utilizados en este trabajo funciona como una membrana selectiva permeable únicamente a los protones. Esta membrana separa dos compartimientos: la solución de prueba cuyo pH se desea determinar y la solución de Amán, contenida dentro del electrodo. Considerando una temperatura de 22°C, sabiendo que para los protones  $z = +1$ , reemplazando la constante R, y realizando el cambio de base de logaritmo natural a logaritmo decimal, la ecuación de Nernst queda expresada de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} V &= 58 \text{ mV} \log \left( \frac{[\text{H}^+]_s}{[\text{H}^+]_{\text{am}}} \right) \\ V &= 58 \text{ mV} (\log [\text{H}^+]_s - \log [\text{H}^+]_{\text{am}}) \\ V &= 58 \text{ mV} (\text{pH}_{\text{am}} - \text{pH}_s) \end{aligned}$$

donde V es el potencial registrado,  $\text{pH}_s$  y  $\text{pH}_{\text{am}}$  son los pH en la solución de prueba y en la solución de Amán respectivamente y  $[\text{H}^+]_s$  y  $[\text{H}^+]_{\text{am}}$  son las concentraciones de protones en ambas soluciones. Si  $V_1$  y  $V_2$  son los potenciales registrados para dos soluciones con  $\text{pH}_1$  y  $\text{pH}_2$  respectivamente, entonces se cumple:

$$\begin{aligned} V_1 &= 58 \text{ mV} (\text{pH}_{\text{am}} - \text{pH}_1) \\ V_2 &= 58 \text{ mV} (\text{pH}_{\text{am}} - \text{pH}_2) \\ \hline (V_1 - V_2) &= 58 \text{ mV} (\text{pH}_2 - \text{pH}_1) \end{aligned}$$

$$\Delta V = -58 \text{ mV} (\Delta \text{pH})$$

Para obtener una estimación correcta del pH intraluminal medido, es necesario calibrar los microelectrodos en soluciones de pH conocido. Para esto se utilizan soluciones de Sørensen de pH 6.8 y pH 7.8. El voltaje registrado entre el microelectrodo de pH y un electrodo de calomel utilizado como referencia, es proporcional al pH de la solución. El electrodo de referencia se pone en contacto eléctrico con la solución mediante un puente de agar disuelto al 3% en una solución 3.5 M de Cloruro de Potasio. Se seleccionaron solamente aquellos electrodos que tenían pendientes de 54 a 58 mV/unidad de pH.

## ~ Preparación de los animales y procedimiento general

Se utilizaron ratas Wistar, machos, adultos jóvenes (3 meses) y seniles (18-20 meses), que tuvieron libre acceso a comida y agua hasta el momento del experimento. Los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de pentobarbital ( $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). Se canularon la vena yugular, por donde se seguirá administrando la anestesia durante el experimento, y la arteria femoral. Se practicó una traqueotomía para facilitar la ventilación del animal. El riñón izquierdo se exteriorizó mediante una incisión practicada en el flanco. Una vez separado de la grasa perirrenal, el riñón fue montado sobre una cámara de acrílico fijada al borde de la mesa termostatizada a  $37^\circ\text{C}$  donde yace el animal. La cámara que contiene al riñón se llena con agar disuelto al 1.1% en solución fisiológica (NaCl 0.9%). La superficie del riñón se dejó descubierta de agar y fue bañada por vaselina líquida a  $37^\circ\text{C}$ . De esta manera, se formó sobre el riñón una capa de aceite que lo mantiene a la temperatura deseada. La superficie renal fue iluminada lateralmente con una luz fría (Chiu Technical Corporation FO-150), y observada a través de una lupa estereoscópica (Wild Heerbrugg M5A). De este modo, pudieron distinguirse los túbulos proximales y los capilares peritubulares y acceder a ellos con electrodos y micropipetas mediante el uso de micromanipuladores. La mesa termostatizada, los micromanipuladores y la lupa estereoscópica están montados sobre un sistema antivibratorio y dentro de una jaula de Faraday.

La micropipeta doble, que se utilizó para perfundir la luz tubular, se llenó con solución perfusora luminal en una de sus ramas, y con vaselina líquida, teñida con negro sudán, en la otra. Cada rama se conectó, mediante un catéter de polietileno, a una jeringa conteniendo vaselina líquida. De este modo, es posible controlar la inyección de las soluciones de una u otra rama ejerciendo presión sobre la jeringa respectiva. La micropipeta se montó sobre un soporte ligado a un micromanipulador mecánico (Leitz). La micropipeta perfusora del capilar peritubular, montada en soporte y micromanipuladores similares a los recién descritos, se conectó a una fuente de aire comprimido, que sirve como fuerza impulsora. El microelectrodo, conectado al preamplificador, se colocó sobre un tercer soporte ligado a un micromanipulador hidráulico (Narishige).

Utilizando los micromanipuladores, se aproximaron las micropipetas y el microelectrodo a la superficie renal hasta que éstos se encuentran en el campo de la lupa. Comprobando previamente el funcionamiento de todos los elementos, se puncionó un

capilar peritubular. Si la ubicación de la micropipeta es correcta, generalmente se observa una columna de sangre ascendiendo por la punta de la pipeta. Se conectó el sistema de presión y se observó inmediatamente el cambio de coloración del área perfundida. Dentro de esta área, se localizó un túbulo contorneado proximal y se impaló con la pipeta luminal. En esta especie de ratas, el túbulo contorneado proximal es accesible a partir del tercio medio de su longitud (segmento S2). Una vez impalado el túbulo, se inyectó una gota de aceite y se observó la dirección del flujo tubular. Posteriormente se inyectó una gota de solución perfusora luminal que partió en dos a la gota de aceite previamente inyectada. De este modo, la gota de solución luminal quedó aprisionada entre las dos gotas de aceite y aislada del resto del fluido tubular. El pH inicial de la solución perfusora luminal es de 7.4. Como resultado de la secreción de protones desde el epitelio tubular, se acidificó la solución luminal. Las variaciones en el pH se registraron utilizando el microelectrodo.

En el caso del túbulo contorneado proximal, el potencial transepitelial es despreciable, por lo tanto, no es necesario ubicar al electrodo de referencia en la luz del túbulo. El pH luminal es proporcional a la diferencia de potencial medida entre el microelectrodo y el electrodo de referencia (calomel) que está conectado al circuito en contacto con el líquido extracelular de la rata. Para ésto, el electrodo de referencia y la cola pelada del animal se colocaron en un recipiente con una solución conductora (KCl 3.5M).

Las variaciones de voltaje se midieron con un electrómetro de alta impedancia (World Precision Instruments, modelo FD 223) y los registros, fueron graficados en un polígrafo (Shimadzu, modelo U-225Z).

#### ~ Soluciones

La Tabla I muestra las composiciones de las soluciones luminales y peritubulares utilizadas.

**TABLA I:** Composición de las soluciones perfusoras luminales y peritubulares

	Solución luminal (mM)	Solución peritubular (mM)
NaCl	75	118
KCl	4	4
CaCl <sub>2</sub>	1	1
H <sub>2</sub> KPO <sub>4</sub>	1	1
MgSO <sub>4</sub>	1.2	1.2
NaHCO <sub>3</sub>	23	23
D-glucosa	10	10
D-rafinosa	90	-----

El pH de las soluciones luminales y peritubulares, medido en un pHmetro (Beckman, Modelo 4500), se ajustó a 7.4. En todas las soluciones utilizadas, la osmolalidad, medida con un osmómetro de presión de vapor (Model 5100C, Wescor, Logan, UT, USA), fue de 290 mOsm \* kg<sup>-1</sup>.

~ Grupos experimentales

La solución perfusora peritubular fue la misma para todos los grupos. La composición de la solución perfusora luminal fue variable.

- *Control*: Solución perfusora luminal y peritubular Ringer Bicarbonato
- *Bafilomicina*: 10<sup>-6</sup> M agregada a la solución luminal
- *EIPA (5-N-etil-N-isopropil amiloride)*: 10<sup>-4</sup> M agregado a la solución luminal

~ Fundamentos teóricos

Durante la perfusión luminal, la secreción de protones resulta en una acidificación de la solución luminal y la titulación del bicarbonato. Por esto, la concentración de bicarbonato en el lumen tubular disminuye hasta alcanzar un valor de estado estacionario. El

tratamiento matemático de los datos deriva de modelos descriptos previamente (Amorena *et al.*, 1984; Cassola *et al.*, 1977; Giebisch *et al.*, 1977).

Utilizando los valores de pH registrados por el microelectrodo se calculó la concentración de  $\text{HCO}_3^-$  a cada tiempo  $t$  según:

$$[\text{HCO}_3^-] = \alpha \times P_{\text{CO}_2} \times 10^{(\text{pH}-\text{pK})}$$

donde  $\alpha$  es la solubilidad del  $\text{CO}_2$  en agua a  $30^\circ\text{C}$  ( $0.024 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ de H}_2\text{O} \cdot \text{mmHg}^{-1}$ ),  $P_{\text{CO}_2}$  es la presión parcial de  $\text{CO}_2$  en la solución (en mmHg) y  $\text{pK} = 6.03$  (Edsall & Wyman, 1958).

Para calcular las constantes de velocidad de acidificación se graficó el logaritmo natural de  $([\text{HCO}_3^-, t] - [\text{HCO}_3^-, t=\infty])$  en función del tiempo en segundos, siendo  $[\text{HCO}_3^-, t=\infty]$  y  $[\text{HCO}_3^-, t]$  las concentraciones de bicarbonato en el estado estacionario, y a tiempo  $t$ , respectivamente. El resultado se ajustó a una línea recta, indicando que la concentración de  $\text{HCO}_3^-$  se aproxima exponencialmente a su estado estacionario. La pendiente de esta recta ( $\kappa$ ) es la constante de velocidad de acidificación.

El flujo neto de una molécula o ion dado se define como la masa de molécula que se transporta por unidad de área de la barrera que atraviesa, en una unidad de tiempo. Se informaron los valores del flujo neto de  $\text{H}^+$  máximo (o flujo neto de  $\text{H}^+$  a tiempo cero) calculados según:

$$J_{\text{H}^+} = ([\text{HCO}_3^-, t=0] - [\text{HCO}_3^-, t=\infty]) \times \kappa \times r/2$$

donde  $r$  es el radio del túbulo en cm ( $1.5 \cdot 10^{-3}$  cm en animales adultos jóvenes y  $1.9 \cdot 10^{-3}$  cm en ratas seniles (Mac Laughlin *et al.*, 2001)),  $\kappa$  es la constante de velocidad de acidificación (expresada en  $\text{seg}^{-1}$ ) y  $r/2$  corresponde al factor de corrección de geometría, considerando al túbulo como un compartimiento cilíndrico. Este factor se utiliza en la transformación volumen-área. El tiempo medio de acidificación ( $t/2$ ) se calculó como el cociente entre el logaritmo natural de 2 y la constante de velocidad de acidificación ( $\kappa$ ).

## **ENSAYOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

### Preparación de vesículas de membrana luminal de túbulo contorneado proximal

Se obtuvieron vesículas de membrana luminal de túbulo proximal de corteza renal de rata en animales control (3 meses) y seniles (18-20 meses de edad) por el método del calcio



(Igarreta *et al.*, 1996). Bajo anestesia se efectuó una incisión abdominal en las ratas y para eliminar la sangre de los riñones se realizó una perfusión vía aorta abdominal (con corte de la vena renal) con PBS frío. Ambos riñones fueron removidos colocándolos en buffer HEPES-sacarosa-EDTA (HSE) frío (en mM: sacarosa 50, Tris 10, HEPES 10, EDTA 0.5, pH 7.5), lavados con el mismo buffer, decapsulados y separada la corteza renal. El tejido extraído, previamente pesado, fue homogeneizado con un Ultraturax (Heidolph, DiAx 900) en 6 ml de buffer HSE por gramo de tejido. Se agregaron 10  $\mu$ l de  $\text{CaCl}_2$  1 M por ml de medio utilizado y se agitó a 4°C durante 15 minutos. La suspensión se centrifugó a 6700 rpm durante 10 minutos descartando el pellet. El sobrenadante fue centrifugado a 20000 rpm por 20 minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 6 ml de buffer HSE por gramo de tejido original. Dicha suspensión se homogeneizó con un homogenizador de teflón y se centrifugó a 4200 rpm por 20 minutos. El pellet se descartó y el sobrenadante se centrifugó 20 minutos a 20000 rpm. El sobrenadante fue descartado y el pellet se resuspendió en 150  $\mu$ l de buffer HSE conteniendo inhibidores de proteasas (aprotinina 10  $\mu$ g/ml, leupeptina 10  $\mu$ g/ml, pepstatina A 10  $\mu$ g/ml, PMSF (fenilmetilsulfonil fluoruro) 2 mM y DTT (ditiotreitól) 1 mM para prevenir la digestión de las proteínas presentes en la muestra.

La concentración de proteínas se determinó según el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

~ Determinación del grado de pureza de las vesículas de membrana luminal de túbulo contorneado proximal

Se evaluó la pureza de la fracción de vesículas de ribete en cepillo midiendo las actividades de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPasa y de la  $\gamma$ -glutamyl transferasa en los homogenatos y en las vesículas de membrana luminal de túbulo contorneado proximal. Dichas proteínas sirven como marcadores de membrana basolateral y apical respectivamente.

≈ Medición de la actividad de la  $\gamma$ -glutamyl transferasa

Se determinó el enriquecimiento de esta enzima en vesículas de membrana apical comparadas con el homogenato inicial mediante el método de Orlowski y Meister (1963).

Este método se basa en la conversión de  $\gamma$ -glutamyl-p-nitroanilida en p-NO<sub>2</sub>-anilida por la  $\gamma$ -glutamyl transferasa presente en la muestra.

Se prepararon 1.52 mg de  $\gamma$ -glutamyl-p-nitroanilida por tubo en 500  $\mu$ l de buffer (en M: Tris 0.1, Glicilglicina 0.02, MgCl<sub>2</sub> 0.01, pH 9), se agregó el volumen correspondiente de cada muestra al mismo y se completó cada tubo con buffer hasta un volumen final de 1 ml. Se incubó a 37°C 3 ó 10 minutos para las vesículas ó el homogenato inicial respectivamente. Se detuvo la reacción agregando 0.3 ml de metanol y 0.5 ml de ácido acético 3.6 N en hielo. Se centrifugaron los tubos a 3000 rpm durante 15 minutos, se descartó el pellet obtenido y se leyó la absorbancia del sobrenadante a 410 nm. Se compararon los valores obtenidos menos el blanco de sustrato contra una curva estándar de p-NO<sub>2</sub>-anilida (0-200 nmoles/tubo) y se calculó la actividad de la enzima en  $\mu$ moles/ml\*min\*mg de proteína.

La actividad de la  $\gamma$ -glutamyl transferasa en vesículas de membrana luminal se encontró enriquecida en 9.3 veces sobre la actividad del homogenato inicial para los animales adultos jóvenes analizados. Mientras que en las vesículas de ratas seniles la actividad se encontró aumentada 6.9 veces con respecto a la del homogenato inicial.

#### ≈ Medición de la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPasa

Se determinó la actividad de la ATPasa total y de la ATPasa-Mg<sup>++</sup> en los homogenatos iniciales y las vesículas de ribete en cepillo, según el método descrito por Schoner y colaboradores (Schoner *et al.*, 1967).

La reacción se llevó a cabo mediante la incubación de 500  $\mu$ l de buffer de reacción con 100  $\mu$ l de muestra diluida 1:10 en agua. Para los homogenatos se colocaron 50  $\mu$ l de una dilución 1:5 del original y para las vesículas 10  $\mu$ l de la preparación tal cual. Se realizó una incubación a 37°C durante 10 minutos.

Buffer de reacción (pH 7,4)		
	<i>ATPasa total</i>	<i>ATPasa-Mg<sup>++</sup></i>
ATP	5 Mm	5 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 Mm	5 mM
Tris	20 mM	20 mM
Ouabaína	----	1 mM

La reacción se detuvo mediante la adición de 600  $\mu$ l de ácido tricloroacético (TCA) 40%. Los tubos se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 minutos. La reacción colorimétrica se realizó colocando 150  $\mu$ l del sobrenadante obtenido junto con 0.35 ml de TCA 5% y 0.5 ml del reactivo de Summer. La mezcla se agitó durante 3 minutos y se leyó la absorbancia a 700 nm. Las actividades de la ATPasa total y de la ATPasa-Mg<sup>++</sup> se calcularon como  $\mu$ mol Pi \* mg proteína<sup>-1</sup> \* hora<sup>-1</sup>. La diferencia entre ambos valores corresponde a la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPasa.

La actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPasa, medida en los homogenatos, fue de 10  $\mu$ mol Pi \* mg proteína<sup>-1</sup> \* hora<sup>-1</sup>. En la preparación de vesículas, no se detectó actividad de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPasa. Este resultado indicó que en las vesículas de membrana apical obtenidas no había contaminación con membranas basolaterales.

#### Determinación de la abundancia de proteínas por Western blot

La técnica de Western blot o “*Immunoblotting*” permite determinar, por medio de un anticuerpo primario específico, la cantidad relativa de una proteína presente en una muestra. Los anticuerpos reconocen un epítopo de la proteína de interés que puede encontrarse en el interior de la estructura terciaria de la proteína. Por esto, para facilitar el acceso del anticuerpo al epítopo, es necesario desnaturalizar la proteína. Para remover la estructura secundaria y terciaria de la proteína se utiliza SDS (“*sodium dodecyl sulfate*”), se hierven las muestras a 100°C y se reducen los puentes disulfuro usando  $\beta$ -mercaptoetanol. Luego la muestra es sometida a un campo eléctrico que la hace migrar a través de un gel de poliacrilamida de un tamaño de poro promedio adecuado para una separación por peso molecular. El SDS confiere una carga negativa uniforme a todos los polipéptidos de manera tal que las proteínas migran al electrodo cargado positivamente, a través del gel, de acuerdo a su peso molecular.

#### *Preparación de las muestras*

Se utilizó, como material de partida para realizar la electroforesis, una suspensión de vesículas de membrana luminal de túbulo contorneado proximal. Dependiendo del contenido de proteínas de la muestra, determinado previamente por el método de Lowry

(Lowry *et al.*, 1951), se toma el volumen necesario para sembrar la cantidad deseada de proteínas. Este volumen debe ser entre 15 y 20  $\mu\text{l}$ . Por lo tanto, en este caso fue necesario efectuar diluciones de las muestras en buffer HSE conteniendo inhibidores de proteasas. La alícuota de muestra a sembrar se mezcló con un volumen igual de buffer de carga y se calentó a 100°C durante 2 minutos.

Buffer de carga (10 ml)	
$\beta$ -mercaptoetanol	1 ml
SDS (10%)	4 ml
Tris-HCl (1 M; pH = 6,8)	1.25 ml
H <sub>2</sub> O (bidestilada)	1.75 ml
Glicerol	2 ml
Azul de Bromofenol	2.5 mg

#### *Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS*

Se realizaron geles de poliacrilamida SDS-PAGE (“*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis*”) de 10  $\times$  12 cm según el método de Laemmli (1970) utilizando los accesorios (soporte, vidrios y peines) de la cuba vertical Mini Protean III (Bio-Rad). Los geles se forman por la polimerización de la acrilamida por medio del agregado de persulfato de amonio y TEMED (“*N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine*”). La separación de las moléculas dentro del gel es determinada por el tamaño relativo de los poros formados dentro del gel; cuando aumenta la concentración de acrilamida, el tamaño del poro disminuye. La concentración de acrilamida determina la resolución del gel, por ello el porcentaje de acrilamida utilizado varía según el peso molecular de la proteína que se desea detectar. En el caso de las isoformas NHE3 y NHE8 del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (aproximadamente 80 kDa) se utilizó un gel separador 8 % de acrilamida mientras que las muestras para la detección de la subunidad E de la V-H<sup>+</sup>ATPasa (31 kDa) se corrieron en un gel 15% de acrilamida. El gel concentrador utilizado es el mismo en los tres casos.

Cada gel consta de 10 calles donde se sembraron las muestras y un marcador de pesos moleculares (Kaleidoscope Prestained Standard, Catálogo N° 161-0324, Bio-Rad). El

marcador de pesos moleculares permite determinar el tamaño de la proteína de interés así como monitorear el progreso de la corrida electroforética. Una vez sembradas las muestras, se realizó la electroforesis en la cuba vertical conectada a una fuente de poder (Power Basic, Bio-Rad) a una corriente constante de 120V hasta que el frente de corrida sale del gel y el marcador de peso molecular de 18 kDa (rojo) llega al extremo inferior.

Gel separador (8% acrilamida, pH 8.8)	
H <sub>2</sub> O (bidestilada)	2.3 ml
Acrilamida (30%)	1.3 ml
Tris-HCl (1.5 M; pH = 8.8)	1.3 ml
SDS (10%)	50 µl
Persulfato de amonio (10%)	50 µl
TEMED	6 µl

Gel separador (15% acrilamida, pH 8.8)	
H <sub>2</sub> O (bidestilada)	1.15 ml
Acrilamida (30%)	2.5 ml
Tris-HCl (1.5 M; pH = 8.8)	1.25 ml
SDS (10%)	50 µl
Persulfato de amonio (10%)	50 µl
TEMED	4 µl

Gel concentrador (5% acrilamida, pH 6.8)	
H <sub>2</sub> O (bidestilada)	3.4 ml
Acrilamida (30%)	830 µl
Tris-HCl (1 M; pH = 6.8)	630 µl
SDS (10%)	50 µl
Persulfato de amonio (10%)	50 µl
TEMED	10 µl

Buffer de electroforesis 1X (pH 8.3)	
Tris base	3.03 g
Glicina	14.41 g
SDS	1 g
H <sub>2</sub> O (bidestilada)	csp 1 L

#### *Transferencia a una membrana de nitrocelulosa*

Las proteínas, previamente separadas en el gel, fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad; 0.45 µm). Sobre la placa anódica, se apoyó una esponja, 4 papeles de filtro Whatmann 3MM y la membrana de nitrocelulosa humedecidos en buffer de transferencia. Se apoyó el gel sobre la nitrocelulosa y luego se cubrió con otros cuatro filtros y una esponja humedecidos en el mismo buffer. Finalmente se cubrió con la placa catódica y la preparación se sumergió en el buffer de transferencia contenido en la cuba, que se conectó a la fuente de poder. La transferencia se realizó a 4°C a una corriente constante de 200 mA.

Buffer de transferencia 1X (pH 8.5)	
Tris-base	5.82 g
Glicina	2.93 g
H <sub>2</sub> O (bidestilada)	csp 800 ml
Metanol	200 ml

Para verificar que la siembra y la transferencia se realizaron de manera uniforme, la membrana se tiñó con Ponceau S (0.5% de Ponceau S en ácido acético 1%). En todos los casos, la intensidad de la tinción fue uniforme entre las calles, indicando que la cantidad de proteínas sembradas fue la misma en todas ellas.

*Bloqueo*

Luego de la transferencia se bloqueó la membrana de nitrocelulosa para evitar la adsorción inespecífica de los reactivos inmunológicos. El bloqueo se realizó por incubación de la membrana con leche en polvo descremada diluida al 5% en buffer TBS-Tween.

Buffer de bloqueo (TBS-Tween) 1X (pH 7.5)	
Tris base	2.42 g
NaCl	8.77 g
Tween 20	1 ml
H <sub>2</sub> O (bidestilada)	csp 1 L.

Finalizado el bloqueo, se descartó la solución y se realizaron 5 lavados de 5 minutos cada uno con buffer TBS-Tween a temperatura ambiente, con agitación suave.

*Inmunodetección*

Para detectar la proteína de interés se incubó la membrana con un anticuerpo primario que la reconozca específicamente. Para remover el exceso de anticuerpo primario no unido a la membrana, se realizaron 5 lavados de 5 minutos cada uno con buffer TBS-Tween a temperatura ambiente, con agitación. La membrana se transfirió a otro recipiente conteniendo un anticuerpo secundario que reconoce al anticuerpo primario y está acoplado a la enzima fosfatasa alcalina. La solución se descartó y se realizaron 5 lavados de 5 minutos cada uno para remover el exceso de anticuerpo secundario.

Para el revelado de las bandas se realizó una detección colorimétrica de la actividad de la fosfatasa alcalina usando el sustrato BCIP (“5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate”) en conjunción con NBT (“nitro blue tetrazolium”) (BCIP/NBT Color Development Substrate, Promega).

El proceso descrito se repitió para detectar una proteína estructural, cuya abundancia no varía entre muestras (control de carga). Esto nos da la posibilidad de corregir por la cantidad total de proteínas en caso de errores en el procedimiento o de incompleta transferencia. En este caso el control de carga fue la proteína  $\beta$ -actina.

~ Intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>: Isoforma NHE3

Se corrieron 40 µg de proteínas de la suspensión de vesículas de membrana de ribete en cepillo en un gel SDS-PAGE 8% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 4°C durante 5 horas. Se bloqueó la membrana con 5% de leche descremada en TBS-Tween durante una hora a temperatura ambiente con agitación. Luego de realizar los lavados, la membrana se incubó con un anticuerpo primario monoclonal de ratón anti NHE3 (MAB 3138, Chemicon Internacional, USA) en una dilución 1:750 en TBS-Tween durante una hora con agitación a temperatura ambiente. Se realizaron cinco lavados con TBS-Tween de 5 minutos cada uno y se incubó la membrana con el anticuerpo secundario Anti IgG de ratón conjugado a fosfatasa alcalina (anti-Mouse IgG (H+L), AP conjugate, Catálogo N° S3721, Promega Corporation) en una dilución 1:7500 en TBS-Tween durante una hora con agitación, a temperatura ambiente.

~ Intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>: Isoforma NHE8

Se corrieron 100 µg de proteínas en un gel SDS-PAGE 8% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 4°C durante 5 horas. Se bloqueó la membrana con una solución 5% leche descremada, 1% BSA (seroalbúmina bovina) en TBS-Tween durante dos horas a temperatura ambiente con agitación y se realizaron cinco lavados con TBS-Tween de 5 minutos cada uno. La membrana se incubó con el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti NHE8 (MAB 3908, Chemicon Internacional, USA) en una dilución 1:2000 en 5% leche descremada, 1% BSA TBS-Tween durante toda la noche con agitación a 4°C. Luego de los lavados, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario Anti IgG de ratón conjugado a fosfatasa alcalina (anti-Mouse IgG (H+L), AP conjugate, Catálogo N° S3721, Promega Corporation) en una dilución 1:7500 en TBS-Tween durante una hora con agitación, a temperatura ambiente.

~ V-H<sup>+</sup>ATPasa: subunidad E

Se corrieron 100 µg de proteínas de la suspensión de vesículas de membrana apical en un gel SDS-PAGE 15% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 4°C durante 2



horas. Se bloqueó la membrana con 5% de leche descremada en TBS-Tween durante una hora a temperatura ambiente con agitación. Se realizaron cinco lavados con TBS-Tween de 5 minutos cada uno y dicha membrana se incubó con el anticuerpo primario policlonal de conejo anti subunidad E de la V-H<sup>+</sup>ATPasa (Catálogo N° sc-20946, Santa Cruz Biotechnology, USA), dilución 1:500 en TBS-Tween durante una hora con agitación a temperatura ambiente. Se realizaron cinco lavados con TBS-Tween de 5 minutos cada uno y se incubó la membrana con el anticuerpo secundario de cabra anti conejo acoplado a fosfatasa alcalina (Catálogo N° sc-2004, Santa Cruz Biotechnology, USA), dilución 1:2000 durante una hora con agitación, a temperatura ambiente.

En los tres casos las membranas conteniendo las mismas muestras fueron incubadas, luego del bloqueo, con el anticuerpo primario anti  $\beta$ -actina (antibody against actin Ab5, Catálogo N° 612656, BD Biosciences), dilución 1:5000. Luego de cinco lavados con TBS-Tween, se incubaron con el anticuerpo secundario Anti IgG de ratón conjugado a fosfatasa alcalina (anti-Mouse IgG (H+L), AP conjugate, Catálogo N° S3721, Promega Corporation) en una dilución 1:7500 en TBS-Tween durante una hora con agitación a temperatura ambiente.

La intensidad de las bandas obtenidas fue determinada mediante análisis densitométrico utilizando el programa ScionImage (<http://www.scioncorp.com>) y su valor fue normalizado usando la intensidad de la banda de  $\beta$ -actina correspondiente a cada membrana.

#### Análisis de la expresión génica mediante la técnica de RT-PCR

RT-PCR (Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa) es una técnica utilizada para detectar y hacer una cuantificación relativa de ARNm (ARN mensajero). La amplificación exponencial por medio de la transcripción reversa provee un método altamente sensible por medio del cual pueden detectarse un muy bajo número de copias de ARNm.

El primer paso consiste en la conversión de los ARNm en ADN complementario (ADNc) usando “*oligodT*” y una enzima llamada transcriptasa reversa. Este paso debe realizarse porque el ARN no sirve como templado para realizar una reacción de PCR. Luego de que la transcripción reversa se ha completado se agregan “*primers*” específicos

para amplificar por PCR la región de interés, una enzima ADN polimerasa termoestable y desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs). Un ciclo de la reacción de PCR consiste en un paso de separación de las hebras de ADNc (94°C), un paso de “*annealing*” para permitir que los “*primers*” se apareen con el ADNc simple cadena (cuya temperatura depende de los “*primers*” utilizados) y un último paso de elongación de la cadena de ADN a partir del “*primer*” unido al ADNc (72°C). Estos tres pasos se repiten en ciclos y 20-30 ciclos son necesarios para realizar una efectiva amplificación del ADN, donde los productos de cada ciclo sirven de templado para el siguiente. La duración y la temperatura de cada uno de los pasos son determinadas por el tipo de termociclador utilizado.

Los “*primers*” son oligonucleótidos de aproximadamente 20 bases que fueron diseñados para hibridar en hebras opuestas de la secuencia de interés flanqueando un intrón. Si los “*primers*” reconocen secuencias en el ADNc la reacción de PCR procede y podemos estimar la abundancia relativa del ARNm de interés en la muestra original.

Siendo que los “*primers*” fueron diseñados flanqueando un intrón, la evaluación de los productos de RT-PCR por electroforesis en gel de agarosa permite determinar si el ADN con la secuencia de interés se ha amplificado y si no han sido amplificadas secuencias contaminantes de ADN genómico en el proceso, ya que la amplificación del intrón generaría una banda de mayor tamaño.

#### ~ Preparación de las muestras

Los niveles de ARNm se determinaron en homogenatos de corteza renal de ratas adultas jóvenes (3 meses) y seniles (18-20 meses). Bajo anestesia se efectuó una incisión abdominal y para eliminar la sangre de los riñones se realizó una perfusión vía aorta abdominal (con corte de la vena renal) con PBS frío. Ambos riñones fueron removidos y se separó la corteza de la médula renal. Se realizó el homogenato de 100 mg de tejido en 1 ml de TRIzol (Invitrogen) utilizando un homogenizador de vidrio (dounce tissue grinder, Wheaton). Estos homogenatos se guardaron a -80°C hasta su posterior uso.

La operación de los animales así como la realización de los homogenatos se efectuó con estricto cuidado de no contaminar las muestras con ARNsas.

## ~ Aislamiento de ARN total

Para aislar ARN total de corteza renal se incubaron los homogenatos obtenidos durante 5 minutos a 15-30°C para permitir la completa disociación de los complejos núcleo-proteicos. Se agregaron 0.2 ml de cloroformo por ml de TRIzol y se sacudieron vigorosamente los tubos con la mano durante 15 segundos. Se incubaron las muestras a 15-30°C durante 2-3 minutos y se centrifugaron a 12000 g durante 15 minutos a 2-8°C. Luego de la centrifugación se obtuvo una fase inferior roja (fase de fenol-cloroformo) que contiene membranas extracelulares, polisacáridos y ADN de alto peso molecular y una fase superior incolora (fase acuosa) que contiene el ARN.

Se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se mezcló con 0.5 ml de alcohol isopropílico por ml de TRIzol. Se incubaron las muestras a 15-30°C durante 10 minutos y se centrifugaron a 12000 g durante 10 minutos a 2-8°C, siendo el precipitado obtenido el ARN.

Se retiró cuidadosamente el sobrenadante y se lavó el pellet de ARN con etanol 75%. Se mezclaron por vortex y se centrifugaron las muestras a 7500 g durante 5 minutos a 2-8°C. Se retiró el sobrenadante y se dejó secar el ARN a tubo abierto al aire durante 10-15 minutos. Luego se resuspendió el ARN en 50 µl de agua “*RNAse free*”, se incubó durante 10 minutos a 55-60°C en baño termostático (Vicking, Modelo N° 1002) y se guardó a -80°C.

La concentración de ARN de cada muestra fue determinada midiendo la absorbancia a 260 nm en espectrofotómetro (Nano Drop, modelo ND1000). Para asegurar que en la muestra hay una cantidad significativa de ARN las lecturas obtenidas deben ser mayores a 0.15. Una unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a 40 µg de ARN por ml. También se leyó la absorbancia a 280 nm ya que la relación entre las lecturas obtenidas a 260 y 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) indica un estimado de la pureza del ARN con respecto a los contaminantes que absorben en 280 nm como proteínas y fenol. Dicha relación debe ser un número mayor a 1.8 para considerar que el ARN obtenido está puro.

## ~ Transcripción reversa

El ARN obtenido se utilizó para sintetizar el ADN complementario mediante transcripción reversa utilizando el kit “*SuperScript II Reverse Transcriptase*” (Invitrogen).

En un primer paso se colocaron en un tubo eppendorf “*RNAse free*” 2 µg de ARN total junto con 1 µl de “*Oligo(dT)<sub>12-18 primer</sub>*” (0.5µg/µl, Invitrogen), 1 µl de una mezcla de desoxirribonucleótidos (dNTPs) (10 mM cada uno, Invitrogen) y agua MLQ autoclavada hasta completar un volumen de 12 µl. Se incubó la mezcla a 65°C en baño termostático (Vicking, Modelo N° 1002) durante 5 minutos y se enfrió en hielo rápidamente. Se realizó una centrifugación de 1 minuto a 3500 rpm y se agregaron 4 µl de buffer 5X “*First Strand*”, 2 µl de ditioneitol (0.1 M) y 1 µl agua MLQ autoclavada. Se mezcló suavemente el contenido del tubo y se incubó a 42°C durante 2 minutos. Se agregó 1 µl de “*SuperScript Reverse Transcriptase*” (200 U/µl) y se incubó a 42 °C durante 50 minutos. Luego se calentó a 70°C durante 15 minutos para inactivar la reacción y se guardó el ADNc obtenido a -20°C.

Para minimizar las variaciones en la eficiencia de la transcripción reversa, a todas las muestras de un mismo experimento se las sometió a la reacción al mismo tiempo.

## ~ Reacción en cadena de la polimerasa

En la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) pueden introducirse errores en la amplificación del producto de interés o debido a diferencias en la cantidad de muestra colocada, por esto deben corregirse las variaciones entre muestras amplificando, simultáneamente con el producto deseado, un ARNm celular que sirva como referencia interna y contra el cual los valores obtenidos de los ARNm de interés puedan ser normalizados. En este caso el gen “*housekeeping*” elegido fue GADPH (gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa) ya que se expresa de manera uniforme en los animales adultos jóvenes y seniles y no se ve afectado por las condiciones experimentales.

Los ADNc obtenidos fueron usados como templado para la amplificación por PCR de los ARNm de interés utilizando “*primers*” específicos para las isoformas NHE3 y NHE8 del intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, la subunidad E de la V-H<sup>+</sup>ATPasa y el gen “*housekeeping*” GADPH.

Los “*primers*” utilizados para la detección del ARNm correspondiente a las isoformas NHE3 y NHE8 del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y a la subunidad E de la  $\text{V-H}^+$ ATPasa fueron diseñados utilizando el programa Primer3 mientras que la secuencia de los “*primers*” para la detección del gen “*housekeeping*” GADPH utilizada es la misma que la usada por Borensztein y colaboradores (Borensztein *et al.*, 1995) (Tabla II).

**Tabla II:** “*Primers*” utilizados para el análisis por RT-PCR.

	Secuencia de primers	Tamaño del producto de PCR
NHE3	ACATCCTCTCAGCCATTGAGGACA TGCCAGATTCTCCATAAGGCAGCTT	662 pb
NHE8	CCCTCATCCGCCTCGTGGACAT TGGGAGGCACTGTGGGCTCAGAA	443 pb
V- $\text{H}^+$ ATPasa	TGCCTTCAGTTAGAGAGGCCGTGA TGCCAAGAAGAGTCTGGGACAAGG	221 pb
GADPH	CCAGTATGATTCTACCCACGGCAA ATACTTGGCAGGTTTCTCCAGGCG	625 pb

Las secuencias de los “*primers*” se muestran en la dirección 5’ a 3’. RT-PCR: Transcripción Reversa- Reacción en Cadena de la Polimerasa, NHE3 y NHE8: isoformas del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , GADPH: gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa.

La reacción de amplificación se realizó en un volumen total de 20  $\mu\text{l}$  conteniendo: 2  $\mu\text{l}$  de Buffer 10 X PCR Minus Mg, 0.4  $\mu\text{l}$  de mezcla de dNTPs (10 mM cada uno), 0.6  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50 mM), 1  $\mu\text{l}$  de ADNc, 1  $\mu\text{l}$  de mezcla de “*primers*” (“*forward*” y “*reverse*”, 10  $\mu\text{M}$  cada uno), 0.16  $\mu\text{l}$  de “*Taq*” polimerasa (5U/ $\mu\text{l}$ , Invitrogen) y agua MLQ autoclavada.

La reacción de amplificación por PCR se realizó en un termociclador (Modelo Genecycler, Bio-Rad). Las muestras fueron desnaturalizadas a 94°C durante 4 minutos y fueron sometidas a 32 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 66°C (temperatura de “*annealing*” para los “*primers*” de GADPH, V- $\text{H}^+$ ATPasa y NHE8 o 64°C para los

“primers” de NHE3) y 30 segundos a 72°C cada uno. La reacción fue completada por un paso de extensión final a 72°C durante 10 minutos.

~ Análisis de los productos de PCR

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio (0.5 µg/ml). Los geles de agarosa se realizaron en una cuba horizontal (Mini Sub Cell GT, Bio-Rad) conectada a una fuente de poder (Power Basic, Bio-Rad) a una corriente constante de 100V. El porcentaje de agarosa utilizado varía según el tamaño del producto que se desea visualizar en el gel. Por esto, para la detección del producto correspondiente a la subunidad E de la H<sup>+</sup>ATPasa (221 pb) se utilizó un gel 2% de agarosa mientras que para la detección de los productos correspondientes a las isoformas NHE3 (662 pb) y NHE8 (443 pb) se utilizó un gel 1.5% de agarosa. Junto con las muestras se sembró un marcador de peso molecular de ADN en un rango de 100 pb a 1000 pb con incrementos discretos de a 100 pb y un fragmento adicional de 1434 pb (Ladder 100 pb, ready to use, Productos Bio-Lógicos, Universidad Nacional de Quilmes).

Las bandas obtenidas se visualizaron bajo un transiluminador UV (DyNA Light, DNA Intensity UV Transilluminator. Labnet, Nacional Labnet Company) y la cuantificación de las mismas se realizó mediante análisis densitométrico utilizando el programa ScionImage. Los valores de densidad integrados para los productos de PCR fueron corregidos en base a la cantidad de GADPH en cada muestra.

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados se muestran como promedio ± error estándar (SEM). En los experimentos de micropuntura, así como en la determinación de parámetros metabólicos, contenido de AMPc y PTH los datos fueron evaluados con ANOVA de un factor y se realizaron contrastes con Student-Newman-Keuls “*a posteriori*”. Los datos obtenidos mediante la cuantificación de las bandas pertenecientes a los distintos Western blots y productos de amplificación por PCR fueron analizados utilizando Tests de T de Student. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas para  $P < 0.05$ .

## DISCUSIÓN DE LOS MÉTODOS

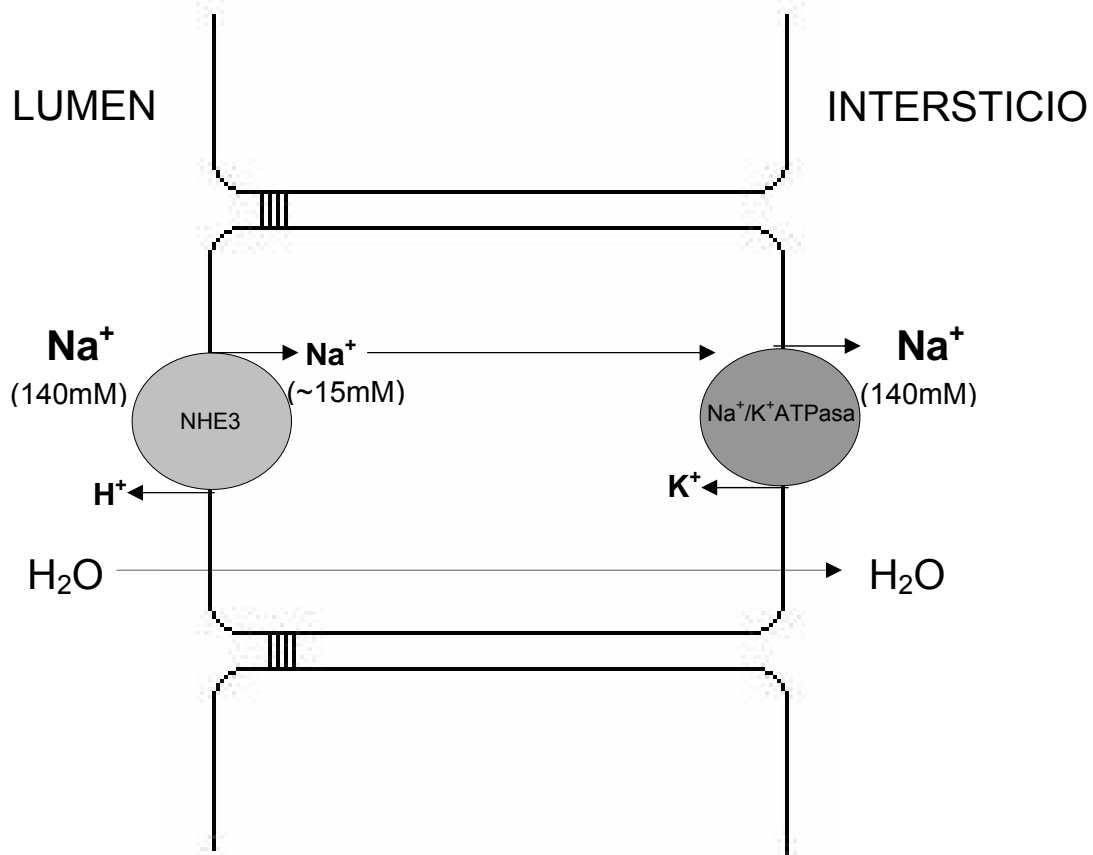
### EXPERIMENTOS DE MICROPUNтура

Los experimentos de micropuntura permiten evaluar la capacidad de reabsorción intrínseca en diferentes segmentos del nefrón, independientemente de la tasa de filtración glomerular y de la concentración de bicarbonato en plasma. En esta tesis, dichos experimentos fueron utilizados para evaluar el mecanismo de reabsorción de bicarbonato en el túbulo contorneado proximal de ratas adultas jóvenes y seniles en condiciones normales y en respuesta a drogas que afectan a las proteínas transportadoras que llevan a cabo este proceso.

#### *Necesidad del uso de rafinosa en la solución perfusora luminal*

El sodio presente en la luz tubular proximal se reabsorbe a través de la vía transcelular. Este proceso involucra el ingreso de  $\text{Na}^+$  a la célula tubular proximal a favor de su gradiente de potencial electroquímico, mediante diferentes mecanismos de transporte activo secundario. En esta etapa interviene principalmente el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Luego de atravesar el citosol de la célula tubular, el  $\text{Na}^+$  es extruido al intersticio peritubular por la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPasa, localizada en la membrana basolateral. La actividad de dicha bomba, mantiene el gradiente de concentración de  $\text{Na}^+$ , a través de la membrana de la célula tubular, que hace posible el funcionamiento de los transportadores apicales. En condiciones normales, la concentración de  $\text{Na}^+$  en el lumen tubular y en el líquido intersticial es de 140 mM, mientras que en el citosol de la célula tubular es de aproximadamente 15 mM. Por lo tanto, el gradiente químico de  $\text{Na}^+$  a través de la membrana de la célula tubular es de aproximadamente 125 mM.

La reabsorción de sodio está acompañada por la reabsorción isoosmótica de agua. Por lo tanto, las concentraciones de  $\text{Na}^+$  en el lumen tubular y en el intersticio peritubular, se mantienen constantes, pero, existe un flujo neto de  $\text{Na}^+$  desde la luz tubular hacia el peritúbulo, con una contracción de volumen del fluido tubular (*Figura 9*).



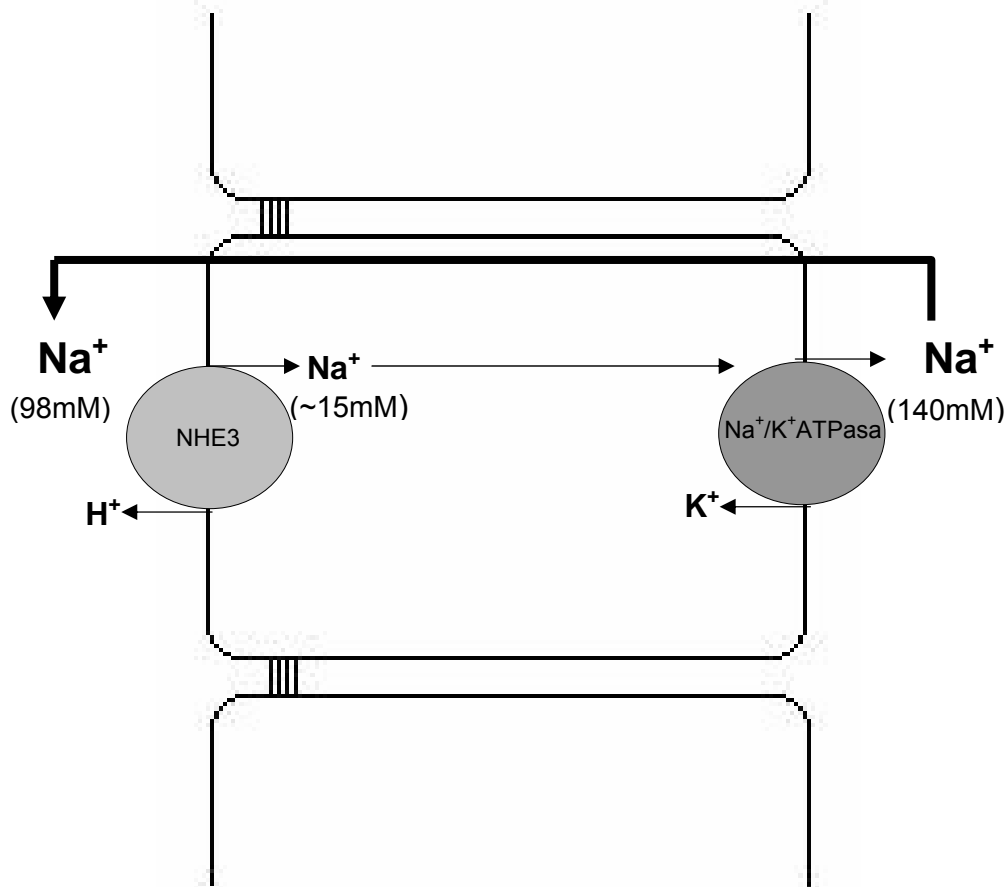
**Figura 9:** Reabsorción de  $\text{Na}^+$  y agua en condiciones normales. La reabsorción de sodio es isoosmótica. Por lo tanto, existe contracción del volumen del fluido luminal.

Teniendo en cuenta lo antedicho, la gota de solución luminal aislada entre las columnas de aceite coloreado debería disminuir en volumen hasta ser reabsorbida completamente. En nuestro sistema, reemplazamos una parte del sodio luminal con rafinosa, de modo que la concentración luminal de  $\text{Na}^+$  es de 98 mM. La rafinosa es una partícula osmóticamente activa que no se reabsorbe, por lo tanto, permanece en la luz del túbulo y retiene agua. La concentración de  $\text{Na}^+$  en el intersticio peritubular es de 140 mM. Dado que el túbulo contorneado proximal es un epitelio de baja resistencia (*"leaky"*), el  $\text{Na}^+$  reabsorbido por la vía transcelular regresa desde el intersticio al lumen tubular, a favor de gradiente, por la vía paracelular (Figura 10). A causa de esto, el flujo transepitelial neto de  $\text{Na}^+$  y agua es nulo.



De modo que, las concentraciones de  $\text{Na}^+$  en el lumen tubular y el intersticio peritubular se mantienen constantes y no hay contracción de volumen del fluido luminal.

El uso de rafinosa nos permite medir cambios en el pH luminal de una gota de buffer, aislada de los segmentos proximal y distal del túbulo por gotas de aceite de castor. De esta manera, es posible registrar los cambios del pH debidos a la actividad del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , hasta alcanzar el estado estacionario, en una gota de volumen constante. Si no usáramos rafinosa, el volumen de reabsorción y el  $\text{Na}^+$  guiarían al encogimiento de la gota y a cambios en la concentración de  $\text{HCO}_3^-$  o a un colapso de la gota, lo que invalidaría las suposiciones teóricas hechas en los materiales y métodos.



**Figura 10:** Flujo cíclico de  $\text{Na}^+$  y agua en experimentos de micropuntura con rafinosa luminal. El flujo neto de sodio y agua es cero. Por lo tanto, el volumen del fluido luminal se mantiene constante.

*Tiempo de respuesta de los electrodos*

Siempre que se lleva a cabo el registro de una variable dependiente del tiempo, es necesario comprobar que el tiempo de respuesta del instrumento de medición utilizado sea mínimo, de modo que interfiera lo menos posible con la señal a medir. Esto es de especial importancia cuando se quiere registrar eventos o procesos que ocurran a gran velocidad. El tiempo de respuesta de los electrodos, es el tiempo necesario para llegar al 95% del pico obtenido en respuesta a un “escalón” de pH. Dicha variación rápida del pH luminal se logra mediante la inyección de una gota de buffer luminal. Los electrodos utilizados en esta tesis tuvieron tiempos de respuesta en torno a los 0.1 segundos. Este valor es muy pequeño en comparación con los tiempos medios de las curvas de acidificación obtenidas en este trabajo (2.5 a 6 segundos). Por lo tanto, los microelectrodos de resina son aptos para evaluar la cinética de acidificación en las condiciones utilizadas en esta tesis.

# **RESULTADOS**

### Parámetros metabólicos

El balance hídrico de las ratas adultas jóvenes y seniles se evaluó analizando la ingesta y la diuresis de los animales colocados en jaula metabólica. Se calculó el balance de agua, expresado como ml por 100g de peso corporal, y se midió la osmolaridad plasmática y urinaria. La función renal de estos animales se analizó midiendo la creatinina plasmática, la excreción urinaria de sodio y potasio (expresadas como  $\mu\text{E}$  por día y por 100 gramos de peso del animal), la proteinuria y el nitrógeno ureico sanguíneo (BUN).

Los valores de los parámetros metabólicos analizados se muestran en la Tabla III.

**Tabla III:** Parámetros metabólicos analizados en animales adultos jóvenes (3 meses) y seniles (18 meses).  $\text{Cr}_p$ : Creatinina plasmática,  $\text{U}_{\text{Na}^+V}$ : excreción urinaria de sodio,  $\text{U}_{\text{K}^+V}$ : excreción urinaria de potasio, BUN: nitrógeno ureico sanguíneo,  $\text{Osm}_p$ : osmolaridad plasmática y  $\text{Osm}_u$ : osmolaridad urinaria.

Parámetros	3 meses	18 meses
Peso corporal (g)	448 $\pm$ 10.39 (6)	678.80 $\pm$ 18.56 (5) *
Presión arterial sistólica (mmHg)	125 $\pm$ 2 (6)	125 $\pm$ 5 (5)
Balance de agua (ml/100g)	0.32 $\pm$ 0.94 (6)	-1.42 $\pm$ 0.11 (5) $\Psi$
$\text{Cr}_p$ (mg/l)	6.33 $\pm$ 0.33 (6)	8.21 $\pm$ 0.64 (5) *
$\text{U}_{\text{Na}^+V}/100\text{g}$ ( $\mu\text{E}/\text{d}$ )	11.97 $\pm$ 4.77 (9)	5.99 $\pm$ 1.55 (9)
$\text{U}_{\text{K}^+V}/100\text{g}$ ( $\mu\text{E}/\text{d}$ )	42.32 $\pm$ 12.17 (9)	131.55 $\pm$ 26.70 (9) *
BUN (g/l)	0.23 $\pm$ 0.01 (6)	0.21 $\pm$ 0.02 (5)
Proteinuria (mg/24 Hs)	18.31 $\pm$ 3 (6)	266.84 $\pm$ 28.28 (5) *
$\text{Osm}_p$ (mosm/kg agua)	302 $\pm$ 3 (13)	300 $\pm$ 2 (6)
$\text{Osm}_u$ (mosm/kg agua)	474 $\pm$ 26 (13)	823 $\pm$ 102 (6) *

Los valores se muestran como promedio  $\pm$  error estándar, (n) número de animales. \* $p < 0.05$  3 meses vs 18 meses,  $\Psi$  Distinto de cero.

No se observaron diferencias en los valores de presión arterial o de nitrógeno ureico sanguíneo entre los animales adultos jóvenes y seniles.

En los animales de 18 meses el balance de agua fue negativo mientras que en las ratas de 3 meses fue cero. La osmolaridad urinaria se encontró elevada en los animales seniles con respecto a los animales adultos jóvenes.

La creatinina plasmática y la proteinuria se encontraron aumentadas significativamente en los animales seniles. La excreción urinaria de sodio no mostró diferencias significativas entre los grupos experimentales mientras que en los animales de 18 meses la excreción urinaria de potasio fue mayor con respecto a la de los animales de 3 meses.

### Parámetros ácido-base

Los valores de los parámetros ácido-base se muestran en la Tabla IV.

**Tabla IV:** Parámetros ácido-base analizados en animales adultos jóvenes (3 meses) y seniles (18 meses).  $P_{CO_2}$ : Presión parcial de dióxido de carbono,  $[HCO_3^-]_p$ : concentración de bicarbonato en plasma.

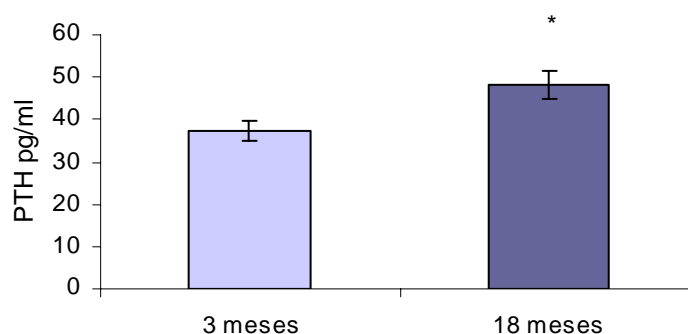
Parámetros	3 meses	18 meses
pH sanguíneo	$7.36 \pm 0.02$ (6)	$7.35 \pm 0.02$ (6)
$P_{CO_2}$	$42.6 \pm 0.60$ mmHg (6)	$43.5 \pm 0.42$ mmHg (6)
$[HCO_3^-]_p$	$23.3 \pm 0.34$ mEq/l (6)	$23.2 \pm 0.34$ mEq/l (6)

Los valores se muestran como promedio  $\pm$  error estándar, (n) número de animales.

Los parámetros ácido-base de los animales seniles fueron normales, no presentando diferencias significativas con los de los animales adultos jóvenes.

### Determinación de la concentración de hormona paratiroidea

La concentración de hormona paratiroidea, expresada en pg/ml, fue encontrada significativamente aumentada en los animales de 18 meses como se observa en la *figura 11*. Los resultados obtenidos coinciden con los valores reportados para dicha hormona en animales adultos jóvenes y seniles (Fox J, 1991; Kalu & Hardin, 1984; Uden *et al.*, 1992).

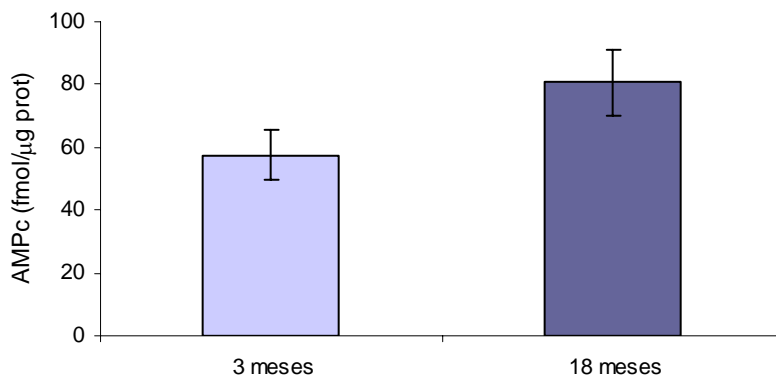


**Figura 11:** Concentración de hormona paratiroidea determinada en suero de animales adultos jóvenes (3 meses) y seniles (18 meses) por ensayo inmunoradiométrico. Se muestran los valores promedio  $\pm$  error estándar, \* $p < 0.05$  3 meses vs 18 meses.

### Determinación de la concentración de AMPc

Se determinó la concentración de AMP cíclico (AMPc) en extractos de corteza renal de animales adultos jóvenes y seniles mediante la técnica de radioinmunoensayo.

La concentración de AMPc observada en la corteza renal de las ratas de 3 meses de edad fue  $57.59 \pm 8.10$  fmol  $\cdot \mu\text{g}^{-1}$  prot. Este resultado está dentro del rango de valores descritos previamente para el contenido de AMPc en extractos de corteza renal (Steiner *et al.*, 1972). Los animales de 18 meses no mostraron un aumento significativo en los niveles de AMPc con respecto a los animales adultos jóvenes ( $80.61 \pm 10.29$  fmol  $\cdot \mu\text{g}^{-1}$  prot). Sin embargo, el AMPc de la corteza renal de los animales seniles mostró una tendencia a aumentar, como puede observarse en la *figura 12*.



**Figura 12:** Concentración de AMPc determinada por radioinmunoensayo en homogenatos de corteza renal de animales adultos jóvenes (3 meses) y seniles (18 meses). Se muestran los valores promedio  $\pm$  error estándar.

### **Cinética de acidificación luminal proximal**

Mediante experimentos de micropuntura, se cuantificó el flujo de bicarbonato y la fracción sensible a EIPA y a bafilomicina en túbulo contorneado proximal de ratas adultas jóvenes (3 meses) y seniles (18 meses). Se utilizó 5-N-etil-n-isopropil amiloride (EIPA,  $10^{-4}$ M) como inhibidor del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y bafilomicina ( $10^{-6}$  M) como inhibidor de la  $\text{V-H}^+\text{ATPasa}$ .

La Tabla V muestra los valores del tiempo medio de acidificación ( $t/2$ ), el pH luminal ( $\text{pH}_{\text{ss}}$ ) y el flujo de bicarbonato ( $J_{\text{HCO}_3^-}$ ) de los distintos grupos experimentales.

**Tabla V:** Cinética de acidificación luminal proximal en experimentos con perfusión luminal y peritubular realizados en animales de 3 meses y 18 meses no tratados (Control) o tratados con 5-N-etil-n-isopropil amiloride (EIPA,  $10^{-4}$ M) o bafilomicina ( $10^{-6}$  M):  $t/2$  (tiempo medio de acidificación) =  $0.693/k$ ,  $k$ : constante de velocidad de acidificación,  $pH_{ss}$ : pH en el estado estacionario,  $J_{HCO_3^-}$ : flujo de bicarbonato.

Grupos Experimentales	$t/2$ (seg)	$pH_{ss}$	$J_{HCO_3^-}$ (nmol $cm^{-2}$ $sec^{-1}$ )
Control 3 meses (39)	$4.79 \pm 0.31$	$6.89 \pm 0.012$	$2.12 \pm 0.16$
Control 18 meses (41)	$7.90 \pm 0.61$	$6.82 \pm 0.010$	$1.46 \pm 0.12$ *
EIPA 3 meses (39)	$11.27 \pm 0.72$	$6.92 \pm 0.010$	$0.86 \pm 0.05$ *
EIPA 18 meses (37)	$21.84 \pm 1.51$	$6.81 \pm 0.014$	$0.61 \pm 0.05$ **
Bafilomicina 3 meses (43)	$6.62 \pm 0.56$	$6.90 \pm 0.007$	$1.50 \pm 0.10$ ***
Bafilomicina 18 meses (29)	$11.38 \pm 0.95$	$6.90 \pm 0.008$	$0.75 \pm 0.06$ **

Los valores se muestran como promedio  $\pm$  error estándar, (n) número de observaciones. \* $p < 0.05$  vs. Control 3 meses, \*\*  $p < 0.05$  vs. Control 18 meses, \*\*\*  $p < 0.05$  vs. EIPA 3 meses.

El flujo de bicarbonato en ratas seniles se encontró disminuido en un 30% con respecto al de los animales adultos jóvenes.

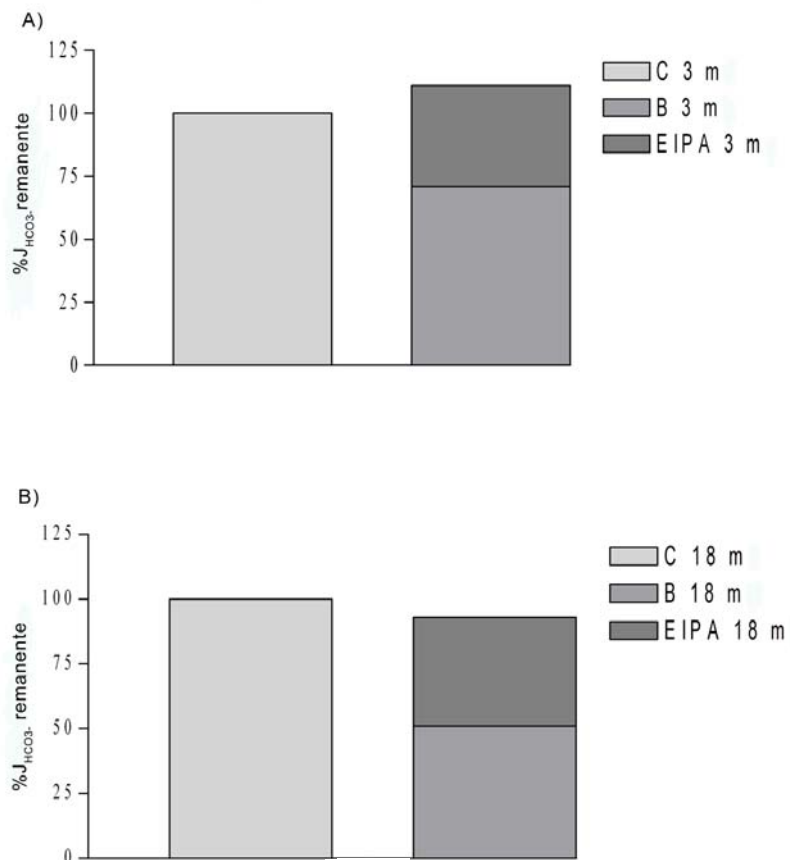
EIPA redujo el  $J_{HCO_3^-}$  un 60 % en animales adultos jóvenes y seniles, correspondiendo esto a una reducción de  $1.26 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  y  $0.85 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  respectivamente.

La reducción en el  $J_{HCO_3^-}$  luego del tratamiento con bafilomicina fue similar en las ratas de 3 meses y de 18 meses. Bafilomicina disminuyó el  $J_{HCO_3^-}$  un 30% ( $0.62 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) en animales adultos jóvenes y un 50% ( $0.71 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) en animales seniles.

La suma de la fracción de reabsorción de bicarbonato sensible a EIPA más la sensible a bafilomicina en ratas jóvenes fue  $2.36 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , un valor  $0.24 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  mayor que el valor correspondiente al flujo de bicarbonato sin ningún inhibidor en animales de 3 meses (*Figura 13A*). La suma de la fracción de reabsorción de bicarbonato sensible a EIPA más la sensible a bafilomicina en ratas seniles fue  $1.36 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , un valor 7% menor que el valor correspondiente al flujo de bicarbonato sin ningún inhibidor en animales de 18 meses (*Figura 13B*). La magnitud de los componentes de la



acidificación tubular proximal sensibles a EIPA y sensibles a bafilomicina fue la misma en animales seniles pero no en ratas adultas jóvenes.

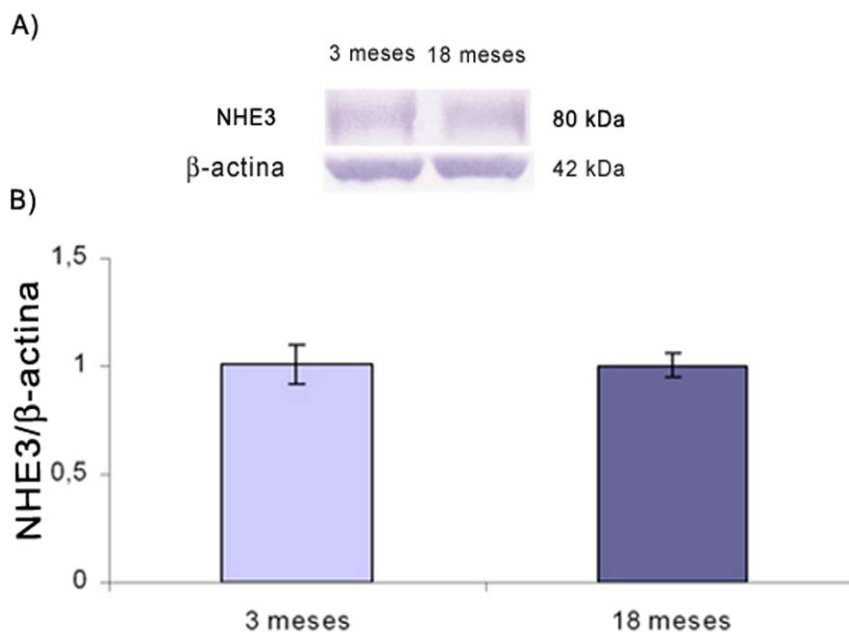


**Figura 13:** Suma del porcentaje del flujo de bicarbonato ( $J_{\text{HCO}_3^-}$ ) remanente luego del tratamiento con bafilomicina ( $10^{-6}\text{M}$ ) (B) y con EIPA ( $10^{-4}\text{M}$ ) (EIPA) en animales adultos jóvenes (3 meses) **A**) y seniles (18 meses) **B**) comparados con el valor de  $J_{\text{HCO}_3^-}$  observado en animales sin tratamiento (C).

## Determinación de la abundancia de proteínas por Western blot

### ~ Intercambiador $\text{Na}^+/\text{H}^+$ : Isoforma NHE3

Se determinó la abundancia de la isoforma NHE3 del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en vesículas de membrana luminal de túbulo contorneado proximal de animales adultos jóvenes y seniles mediante el método de western blot. El anticuerpo monoclonal reconoce una proteína de aproximadamente 80 kDa en las muestras analizadas y las bandas obtenidas se muestran en la *figura 14A*. El análisis densitométrico mostró que la cantidad de NHE3 es la misma en ratas seniles que en ratas adultas jóvenes (*Figura 14B*).

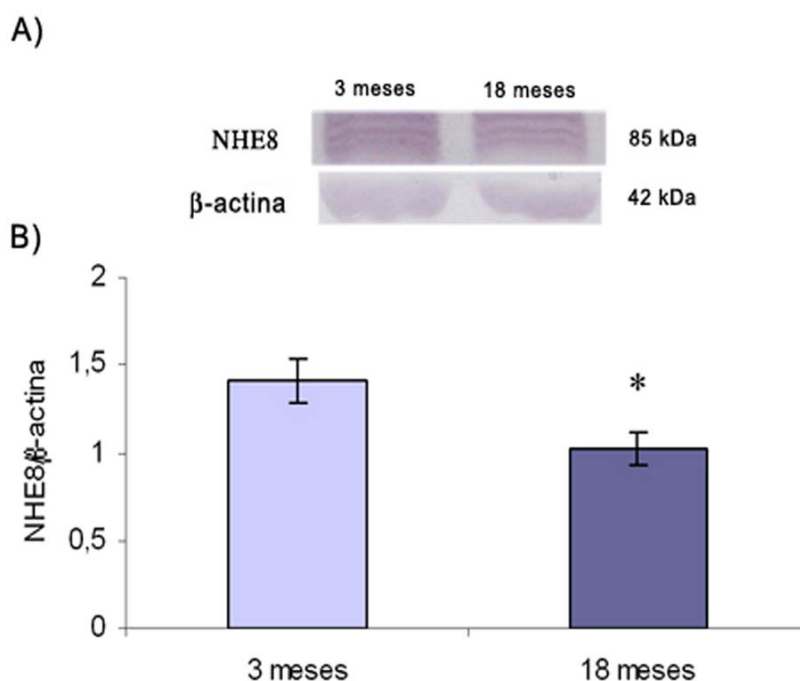


**Figura 14:** A) Western blot realizado utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce la isoforma NHE3 del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en vesículas de membrana luminal de túbulo contorneado proximal de ratas adultas jóvenes (3 meses) y seniles (18 meses). NHE3 es visualizada como una banda de aproximadamente 80 kDa. La banda de 42 kDa corresponde a la proteína  $\beta$ -actina. B) Análisis densitométrico: los datos son presentados como el cociente de NHE3 respecto a  $\beta$ -actina y corresponden al valor promedio  $\pm$  error estándar.

~ Intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ : Isoforma NHE8

Utilizando la técnica de western blot, se determinó el contenido de la isoforma NHE8 del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en vesículas de ribete en cepillo obtenidas a partir de riñones provenientes de animales de ambos grupos experimentales. Como se muestra en la *figura 15A*, el anticuerpo utilizado reconoce una serie de bandas de aproximadamente 85 kDa, correspondientes a NHE8. La presencia de este patrón de bandas consecutivas podría deberse a que la proteína presenta distintos niveles de glicosilación, como se describió previamente (Goyal *et al.*, 2003).

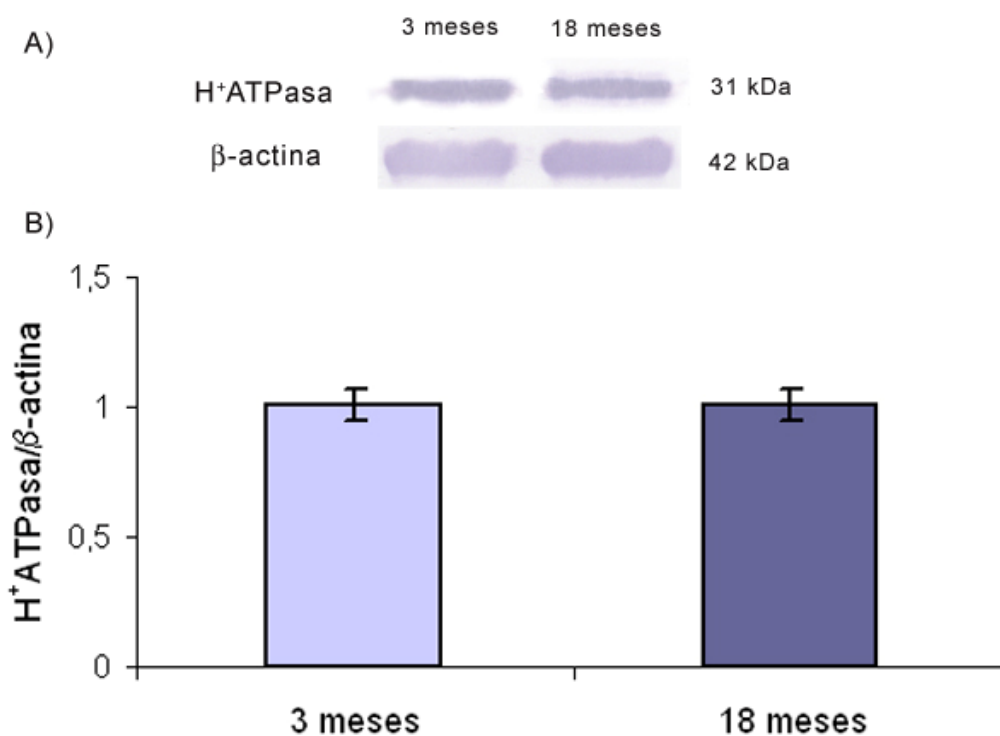
Al realizar la cuantificación densitométrica se detectó una disminución de los niveles de expresión de la isoforma NHE8 del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en los animales seniles comparados con los animales adultos jóvenes (*Figura 15B*).



**Figura 15:** **A)** Western blot realizado utilizando un anticuerpo que reconoce la isoforma NHE8 del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en vesículas de membrana luminal de túbulo contorneado proximal de ratas adultas jóvenes (3 meses) y seniles (18 meses). NHE8 es visualizada como una banda de aproximadamente 85 kDa. La banda de 42 kDa corresponde a la proteína  $\beta$ -actina. **B)** Análisis densitométrico: los datos son presentados como el cociente de NHE8 respecto a  $\beta$ -actina y corresponden al valor promedio  $\pm$  error estándar, \* $p < 0.05$  3 meses vs 18 meses.

~ V-H<sup>+</sup>ATPasa: subunidad E

Se determinó la abundancia de la subunidad E de la V-H<sup>+</sup>ATPasa en vesículas de membrana luminal de túbulo contorneado proximal. Las bandas de 31 kDa correspondientes a esta proteína obtenidas en ratas adultas jóvenes y seniles se observan en la *figura 16A*. El análisis densitométrico mostró que el contenido de la subunidad E de la V-H<sup>+</sup>ATPasa es el mismo en ambos grupos experimentales (*Figura 16B*).



**Figura 16:** **A)** Western blot realizado utilizando un anticuerpo que reconoce la subunidad E de la V-H<sup>+</sup>ATPasa en vesículas de membrana luminal de túbulo contorneado proximal de ratas adultas jóvenes (3 meses) y seniles (18 meses). La subunidad E de la V-H<sup>+</sup>ATPasa es visualizada como una banda de aproximadamente 31 kDa. La banda de 42 kDa corresponde a la proteína β-actina. **B)** Análisis densitométrico: los datos son presentados como el cociente de la H<sup>+</sup>ATPasa respecto a β-actina y corresponden al valor promedio ± error estándar.

## **Análisis de la expresión génica mediante la técnica de RT-PCR**

Se analizó el nivel de expresión de las isoformas NHE3 y NHE8 del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y de la subunidad E de la  $\text{V-H}^+\text{ATPasa}$  mediante la técnica de RT-PCR en homogenatos de corteza renal de animales adultos jóvenes (3 meses) y seniles (18 meses). Los productos de PCR obtenidos utilizando “*primers*” específicos para los tres ARNm analizados muestran los pesos moleculares esperados.

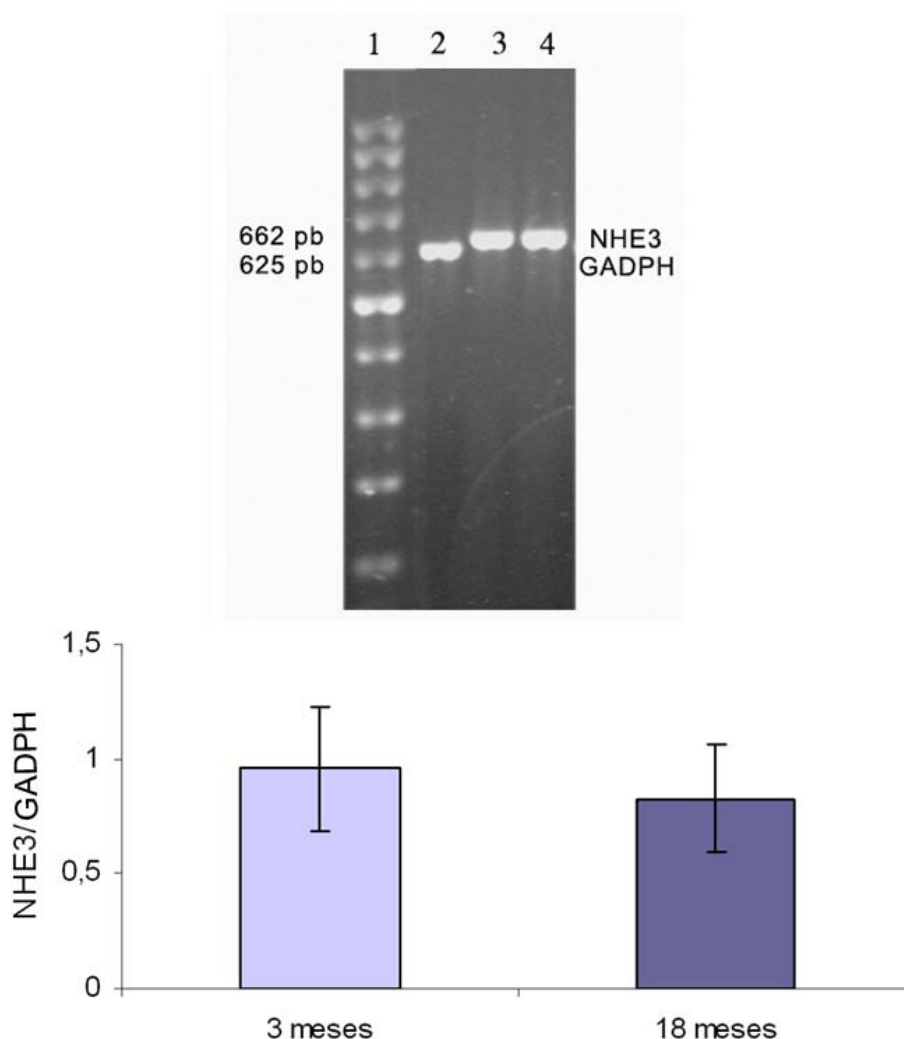
No se obtuvieron productos de RT-PCR cuando la enzima transcriptasa reversa no fue colocada en la reacción de transcripción reversa (control negativo). Como control positivo, para los ensayos de RT-PCR realizados, se utilizó el producto de amplificación correspondiente al ARNm de la gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa (GADPH) en homogenatos de corteza renal de animales adultos jóvenes y seniles.

### ~ Intercambiador $\text{Na}^+/\text{H}^+$ : Isoforma NHE3

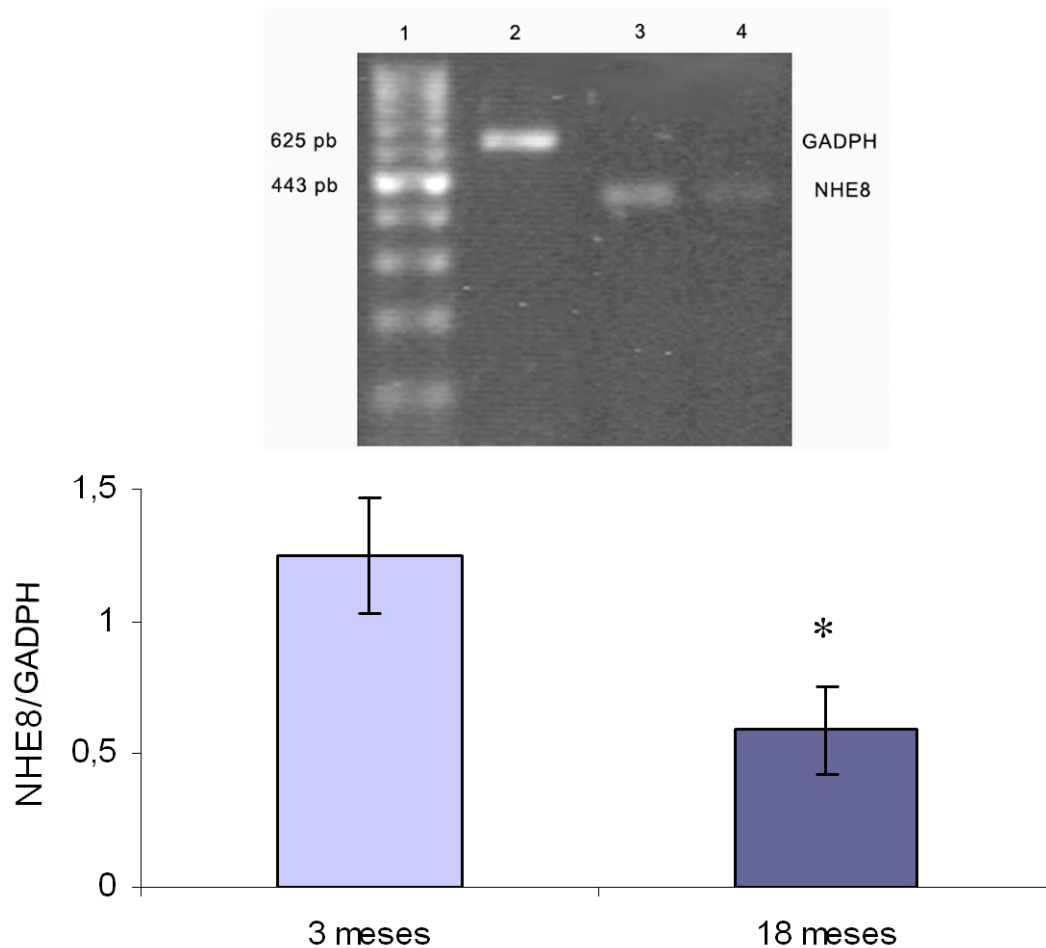
Al determinar la expresión del ARNm de la isoforma NHE3 del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  por PCR obtuvimos la amplificación de un ADNc que mostró un tamaño molecular de 662 pb al ser analizado en un gel de agarosa 1.5% tanto en ratas adultas jóvenes como seniles (*Figura 17A*). Como puede observarse en la *figura 17B* la cuantificación densitométrica realizada muestra que no hay diferencias significativas en la expresión génica de NHE3 entre los animales adultos jóvenes y los seniles.

### ~ Intercambiador $\text{Na}^+/\text{H}^+$ : Isoforma NHE8

El ADNc amplificado por PCR correspondiente al ARNm de la isoforma NHE8 del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  apareció como una banda de 443 pb al ser corrido en un gel de agarosa 1.5% en ambos grupos experimentales (*Figura 18A*). Al realizar el análisis densitométrico y normalizar los valores de NHE8 con el valor de GADPH observamos que el nivel de expresión detectado es menor en ratas de 18 meses que en ratas de 3 meses (*Figura 18B*). Esto coincide con los resultados obtenidos por western blot indicando que la expresión génica así como la abundancia de esta proteína disminuye en los animales seniles.



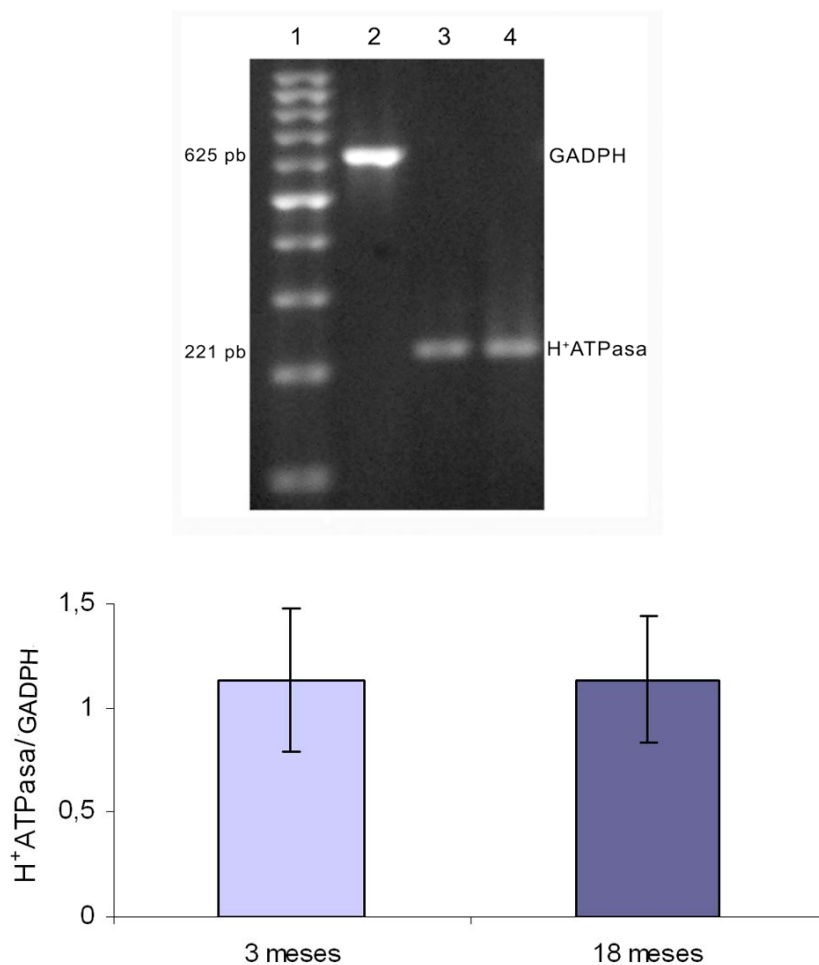
**Figura 17:** Análisis por RT-PCR del ARNm de la isoforma NHE3 del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en homogenatos de corteza renal de animales adultos jóvenes (3 meses) y seniles (18 meses). **A)** Gel de agarosa 1.5%, teñido con bromuro de etidio, para los productos de PCR obtenidos utilizando “primers” para NHE3 (662 pb) y para el gen “housekeeping” GADPH (625 pb). Calle 1: marcador de peso molecular de ADN, Calle 2: gen “housekeeping” GADPH, Calle 3: NHE3 correspondiente a animales adultos jóvenes, Calle 4: NHE3 correspondiente a animales seniles. **B)** Análisis densitométrico: los datos son presentados como valores de densidad integrados para el producto de PCR perteneciente a NHE3 corregidos en base a la cantidad de GADPH en cada muestra y corresponden al valor promedio  $\pm$  error estándar.



**Figura 18:** Análisis por RT-PCR del ARNm de la isoforma NHE8 del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en homogenatos de corteza renal de animales adultos jóvenes (3 meses) y seniles (18 meses). **A)** Gel de agarosa 1.5%, teñido con bromuro de etidio, para los productos de PCR obtenidos utilizando “primers” para NHE8 (443 pb) y para el gen “housekeeping” GADPH (625 pb). Calle 1: marcador de peso molecular de ADN, Calle 2: gen “housekeeping” GADPH, Calle 3: NHE8 correspondiente a animales adultos jóvenes, Calle 4: NHE8 correspondiente a animales seniles. **B)** Análisis densitométrico: los datos son presentados como valores de densidad integrados para el producto de PCR perteneciente a NHE8 corregidos en base a la cantidad de GADPH en cada muestra y corresponden al valor promedio  $\pm$  error estándar. \* $p < 0.05$  3 meses vs 18 meses.

~ V-H<sup>+</sup>ATPasa: subunidad E

La *figura 19A* muestra una banda de 221 pb que pertenece al ADNc de la subunidad E de la V-H<sup>+</sup>ATPasa obtenido por PCR en los dos grupos experimentales estudiados. No se detectaron diferencias significativas en la expresión del ARNm de dicha subunidad de la H<sup>+</sup>ATPasa entre los animales adultos jóvenes y seniles (*Figura 19B*).



**Figura 19:** Análisis por RT-PCR del ARNm de la subunidad E de la V-H<sup>+</sup>ATPasa en homogenatos de corteza renal de animales adultos jóvenes (3 meses) y seniles (18 meses). **A)** Gel de agarosa 2%, teñido con bromuro de etidio, para los productos de PCR obtenidos utilizando “*primers*” para V-H<sup>+</sup>ATPasa (221 pb) y para el gen “*housekeeping*” GADPH (625 pb). Calle 1: marcador de peso molecular de ADN, Calle 2: gen “*housekeeping*” GADPH, Calle 3: Subunidad E de la V-H<sup>+</sup>ATPasa correspondiente a animales adultos jóvenes, Calle 4: Subunidad E de la V-H<sup>+</sup>ATPasa correspondiente a animales seniles. **B)** Análisis densitométrico: los datos son presentados como valores de densidad integrados para el producto de PCR perteneciente a V-H<sup>+</sup>ATPasa corregidos en base a la cantidad de GADPH en cada muestra y corresponden al valor promedio ± error estándar.



# **DISCUSIÓN**

## **ENVEJECIMIENTO Y FUNCIÓN RENAL**

El proceso normal de envejecimiento está acompañado por un deterioro progresivo de la función renal con importantes cambios morfológicos glomerulares y túbulo-intersticiales (Goldstein *et al.*, 1988; Levi & Rowe, 1992; Lindemann & Goldman, 1986).

En el presente trabajo determinamos parámetros metabólicos de animales adultos jóvenes (3 meses) y seniles (18-20 meses). Los resultados obtenidos nos permitieron evaluar la función renal en los animales seniles y coinciden con datos publicados previamente por otros autores (Corman *et al.*, 1985; Reckelhoff *et al.*, 1992).

El aumento de la creatinina plasmática y la proteinuria en las ratas de 18 meses obedece al deterioro de la función renal característico del envejecimiento (Goldstein *et al.*, 1988).

Los animales de 18 meses son normotensos y mostraron un aumento en la excreción urinaria de  $K^+$  con respecto a los animales de 3 meses.

Las ratas seniles presentan una osmolaridad urinaria mayor que la de las ratas de 3 meses. La diferencia entre la osmolaridad urinaria de ambos grupos experimentales se debe probablemente a que los animales seniles están en balance negativo de agua. Este último resultado es esperable dada la edad de los animales y su estado metabólico.

Las ratas seniles presentan valores normales de pH sanguíneo,  $P_{CO_2}$  y concentración de bicarbonato en plasma. Nuestros resultados coinciden con los de Prasad y colaboradores, quienes no detectaron diferencias en el pH sanguíneo entre ratas de 6 y 24 meses (Prasad *et al.*, 1988). Frassetto y colaboradores mostraron que los parámetros ácido-base sanguíneos cambian en humanos adultos, desde la juventud hasta la vejez. Los humanos desarrollan un leve grado de acidosis metabólica que los autores atribuyen a la insuficiencia renal relacionada con el envejecimiento (Frassetto *et al.*, 1996). En nuestros experimentos evaluamos el estado ácido-base de un grupo de seis ratas adultas jóvenes y seis seniles mientras que Frassetto y colaboradores realizaron un estudio extensivo diseñado para detectar pequeños cambios en la composición ácido-base de 64 individuos, cuyas edades varían desde 17 a 74 años.

### **ACIDIFICACIÓN TUBULAR PROXIMAL**

Los experimentos de micropuntura descritos en este trabajo fueron realizados utilizando un modelo experimental “*in vivo*” (Amorena & Malnic, 1983; Amorena *et al.*, 1984), que permite evaluar la capacidad de acidificación del túbulo proximal trabajando en condiciones en las que se preserva la anatomía del órgano. Los resultados obtenidos en este tipo de experimentos son independientes de la tasa de filtración glomerular y de cualquier otra variable sistémica o hemodinámica debido a la perfusión luminal y peritubular simultánea.

La reabsorción de bicarbonato se encuentra directamente ligada a la reabsorción de  $\text{Na}^+$ , ya que los mecanismos responsables de la reabsorción electroneutra de  $\text{NaCl}$  son el intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y la salida de  $\text{Cl}^-$  (Preisig & Rector, 1988). Si bien la disminución de la acidificación proximal, observada en animales seniles, no se tradujo en una mayor eliminación urinaria de sodio, es interesante destacar que en los animales seniles se detectó un aumento significativo de la excreción urinaria de  $\text{K}^+$ . Es sabido que la mayor oferta distal de  $\text{Na}^+$  induce un aumento en la secreción de  $\text{K}^+$  por el nefrón distal (Stanton & Giebisch, 1992), de modo que el aumento en la eliminación de  $\text{K}^+$  podría estar reflejando la disminución de la reabsorción proximal de bicarbonato.

Normalmente existen mecanismos de compensación operando en segmentos del nefrón distal que balancean la función del túbulo proximal, manteniendo la homeostasis en general y para el  $\text{Na}^+$  en particular. Estos mecanismos están preservados en el proceso de envejecimiento (Corman *et al.*, 1985; Epstein & Hollenberg, 1976; Papper, 1973; Shock, 1986).

En el presente estudio realizamos experimentos de micropuntura cuantificando la contribución del flujo de bicarbonato ( $J_{\text{HCO}_3^-}$ ) sensible a EIPA y a bafilomicina en túbulo contorneado proximal de ratas adultas jóvenes (3 meses) y seniles (18-20 meses). Utilizamos EIPA ( $10^{-4}$  M) como inhibidor del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (isoformas NHE3 y NHE8) y bafilomicina ( $10^{-6}$  M) como inhibidor de la  $\text{V-H}^+$ ATPasa respectivamente.

En ambos grupos experimentales la suma de los componentes sensibles a EIPA y a bafilomicina da por resultado un valor de flujo de bicarbonato similar al medido en los animales sin tratamiento. Esto sugiere que la reabsorción de bicarbonato en el túbulo

contorneado proximal de ambos grupos experimentales es debida a la suma de componentes sensibles a EIPA y a bafilomicina.

En los experimentos de micropuntura en ratas seniles el flujo de bicarbonato se encuentra disminuido un 30% con respecto al de los animales adultos jóvenes, confirmando estudios previos en ese sentido (Mac Laughlin *et al.*, 2001).

Kinsella y Sacktor han observado que la actividad del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , sensible a amiloride, en vesículas de membrana apical de túbulo proximal de riñón de rata no se modifica a los 18 meses, pero está disminuida a los 24 meses de edad (Kinsella & Sacktor, 1987). Este resultado no coincide con la disminución en la acidificación proximal en ratas de 18 meses observada por nosotros. La diferencia entre nuestros resultados y los de los experimentos de Kinsella y Sacktor podría deberse a los diferentes modelos utilizados. Las células de los epitelios absortivos están polarizadas, presentando especializaciones de las membranas apical y basolateral que son esenciales para su normal funcionamiento. En los experimentos de micropuntura los mecanismos reguladores presentes en la célula se conservan intactos. Las vesículas de membrana apical de túbulo proximal carecen de las características morfológicas y funcionales de la célula intacta. Los valores de las actividades de los transportadores obtenidos por Kinsella y Sacktor reflejan la actividad de los intercambiadores aislados, mientras que las mediciones del flujo de bicarbonato realizadas en los experimentos de micropuntura reflejan la actividad de los transportadores “*in vivo*”.

Una fracción (aproximadamente 60%) de la reabsorción de bicarbonato en el túbulo proximal de ratas es dependiente de un mecanismo sensible a EIPA (Bailey, 2004; Preisig *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 1999 y 2001) y un componente significativo en túbulo contorneado proximal de ambos grupos experimentales es mediado por una  $\text{V-H}^+$ ATPasa sensible a bafilomicina (Wang *et al.*, 1999 y 2001). En experimentos realizados con ratones *NHE3*<sup>-/-</sup> la reabsorción de bicarbonato en el túbulo contorneado proximal es dependiente de la  $\text{V-H}^+$ ATPasa (Choi *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1999).

En ratas adultas jóvenes EIPA reduce el  $\text{J}_{\text{HCO}_3^-}$  un 60 % mientras que el tratamiento con bafilomicina lo disminuye un 30% respecto de las condiciones control (sin tratamiento). Estos resultados concuerdan con los datos de reabsorción de bicarbonato obtenidos con un enfoque experimental semejante al utilizado en este trabajo (Bailey, 2004) y con la reducción de 50-60% en la reabsorción de bicarbonato hallada en ratones que no poseen el

gen que codifica para la isoforma NHE3 del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ,  $NHE3^{-/-}$  (Schultheis *et al.*, 1998). Choi y colaboradores han detectado una reducción del 40% en la tasa de reabsorción de bicarbonato al microperfundir túbulos proximales con EIPA. Estos autores han utilizado microperfusión de segmentos aislados de túbulo contorneado proximal en los que la membrana basal del túbulo está en contacto con el baño, careciendo de las estructuras peritubulares normales. El control peritubular juega un importante rol en la regulación de la acidificación proximal (Amorena & Castro, 1997; Amorena & Malnic, 1983; Díaz-Sylvester *et al.*, 2001).

En ratas seniles no detectamos diferencias significativas entre la reducción del flujo de bicarbonato con los tratamientos con EIPA o con bafilomicina. Esto indica que la contribución de mecanismos sensibles a EIPA y a bafilomicina al proceso de acidificación en estos animales es similar. Estos resultados indican, nuevamente, que los mecanismos responsables de la acidificación proximal son el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y la  $\text{V-H}^+$ ATPasa.

### ***Transportadores involucrados en la acidificación proximal***

#### ***Intercambiador $\text{Na}^+/\text{H}^+$ : Isoformas NHE3 y NHE8***

En túbulo contorneado proximal se encuentran presentes cuatro isoformas del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ : NHE1, NHE2, NHE3 y NHE8 (Biemesderfer *et al.*, 1993; Goyal *et al.*, 2003; Tse *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1993). No se detectó NHE1 en túbulo proximal de rata (Biemesderfer *et al.*, 1992; Krapf & Solioz, 1991), que si está presente en la membrana basolateral del túbulo proximal de conejo (Biemesderfer *et al.*, 1992).

El compuesto S3226, que inhibe en forma específica a NHE3, produce un descenso dosis dependiente en la reabsorción de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y fluido en el túbulo proximal de animales normales (Vallon *et al.*, 2000). Se ha demostrado que la reabsorción de volumen en el túbulo proximal está directamente relacionada con el número de copias del gen  $NHE3$ , de modo que la reabsorción es mayor en los ratones con genotipo  $NHE3^{+/+}$ , menor en los animales  $NHE3^{+/-}$  y menor aún en aquellos con genotipo  $NHE3^{-/-}$  (Lorenz *et al.*, 1999; Schultheis *et al.*, 1998). Los animales con genotipo  $NHE3^{-/-}$  presentan una reducción del 60% en la reabsorción proximal de bicarbonato y agua (Schultheis *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2001) y en la secreción de  $\text{H}^+$  dependiente de  $\text{Na}^+$  (Choi *et al.*, 2000).

La cantidad de la isoforma NHE3 del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , determinada por western blot en vesículas de membrana luminal de túbulo contorneado proximal, es similar en los animales adultos jóvenes y seniles. La expresión del ARNm de NHE3 en corteza renal no presenta diferencias significativas entre los grupos experimentales analizados. Estos resultados indican que una disminución en la expresión y en la cantidad de NHE3 no estaría dando cuenta de la reducción en el componente sensible a EIPA de la acidificación proximal observada en animales seniles.

Sin embargo, no puede descartarse la acción de mecanismos de regulación de la actividad de NHE3 independientes de cambios en la cantidad de ARNm o proteína, que estén presentes en los animales seniles y que justifiquen la reducción detectada en el flujo de bicarbonato sensible a EIPA. Hay evidencias que indican que puede regularse la actividad del intercambiador sin cambiar el número de transportadores presentes en membrana apical. Soleimani y colaboradores han descrito un incremento en la actividad de NHE3 en medio ácido sin aumento en la presencia de la proteína en vesículas de membrana apical de túbulo renal (Soleimani *et al.*, 1995).

El intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  ubicado en la membrana apical del túbulo contorneado proximal está regulado por una amplia variedad de estímulos hormonales (Sacktor & Kinsella, 1985), incluyendo, entre otros, al sistema renina angiotensina (Saccomani *et al.*, 1990), al factor relajante derivado del endotelio (Amorena & Castro, 1997; Manning *et al.*, 1997; Wang, 1997) y a la hormona paratiroidea (Bank & Aynedjain, 1976).

Casi todos los agonistas que modulan la actividad del intercambiador actúan a través de segundos mensajeros con proteínas quinasas como parte de su cascada de señales intracelulares. El dominio carboxiterminal de NHE3 posee numerosos posibles sitios de fosforilación para varias quinasas (Orlowski *et al.*, 1992). Se ha demostrado que NHE3 existe como una fosfoproteína en la célula intacta (Kurashima *et al.*, 1997; Peng *et al.*, 1999; Yip *et al.*, 1997) y que el dominio citoplasmático es sustrato directo de proteína quinasa A (PKA) y proteína quinasa C (PKC) dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , diacilglicerol y fosfolípidos (Moe *et al.*, 1995; Wiederkehr *et al.*, 1999). Wiederkehr y colaboradores han comparado los sitios de fosforilación de NHE3 “*in vitro*” por PKC con la fosforilación producida “*in vivo*” por la adición de ésteres de forbol a la célula intacta y han observado los mismos residuos serina fosforilados en ambos casos (Wiederkehr *et al.*, 1999). Zhao y colaboradores han mostrado que la activación de PKA “*in vivo*” puede ocupar con residuos

fosfato sitios de fosforilación y bloquear así la posterior fosforilación “*in vitro*” de NHE3 por PKA purificada (Zhao *et al.*, 1999). Estos dos hallazgos sugieren que NHE3 es fosforilado “*in vivo*” por PKA y/o PKC y que factores que induzcan una fosforilación de NHE3 pueden regular su actividad.

La cinética del intercambiador puede ser regulada alostéricamente. Esta regulación se propuso dado que el transporte de  $H^+$  por el NHE3 se ajusta a una cinética que no obedece al modelo de Michaelis-Menten, como si lo hace la cinética del transporte de  $Na^+$ . Por ello, se ha postulado que, además del sitio al que se unen los  $H^+$  para ser transportados, existiría otro sitio de unión que activa el proceso de intercambio (sitio alostérico o “modificador”) (Aronson *et al.*, 1982; Aronson, 1985). Hayashi y colaboradores han propuesto que NHE3 sufre una transición lenta y dependiente del pH desde un estado menos activo a uno más activo, con cambios en su conformación o en su estado de asociación (Hayashi *et al.*, 2002).

Otra posible vía de regulación de la cantidad de sitios disponibles para el intercambio  $Na^+/H^+$  es una alteración en el número de transportadores presentes en la superficie celular. Trabajos previos han demostrado la importancia de la incorporación de moléculas de intercambiador preexistentes en el compartimiento endosomal, por fusión de vesículas con la membrana plasmática en respuesta a diversos estímulos (D’Souza *et al.*, 1998; Janecki *et al.*, 1998; Kurashima *et al.*, 1998). Observaciones hechas con inmunofluorescencia confocal indican que una fracción de intercambiadores reside en un conjunto de vesículas intracelulares (Biemesderfer *et al.*, 1997; D’Souza *et al.*, 1998). Los intercambiadores sufren un continuo reciclado, dependiente de PKA (Collazo *et al.*, 2000) y PKC (Janecki *et al.*, 1998), entre la membrana plasmática y las vesículas endosomales (Kurashima *et al.*, 1999). En base a esto se ha sugerido que la modulación de la tasa de transporte de  $Na^+$  y  $H^+$  del intercambiador estaría acoplada a una alteración de la distribución de NHE3 entre la membrana plasmática y las endomembranas (Zhang *et al.*, 1996). Nosotros medimos la cantidad de la isoforma NHE3 en vesículas de ribete en cepillo de ratas adultas jóvenes y seniles y no detectamos diferencias, por lo que alteraciones de este mecanismo de regulación parecen poco probables.

Estudios de microperfusión de túbulo proximal “*in vitro*” con mediciones de pH intracelular han revelado la presencia de un componente dependiente de  $Na^+$  y sensible a

EIPA, que da cuenta del 40% de la secreción de  $H^+$  a través de la membrana apical y que persiste en ratones *NHE3<sup>-/-</sup>* (Choi *et al.*, 2000).

En base a estos experimentos se sugirió la presencia de una nueva isoforma del intercambiador  $Na^+/H^+$  activa en las membranas apicales del túbulo proximal y sensible a EIPA que estaría contribuyendo a la secreción de  $H^+$  en la membrana de los ratones *NHE3<sup>-/-</sup>*.

La presencia de esta nueva isoforma, denominada NHE8, ha sido descrita en células normales de riñón de rata y en túbulo proximal (Goyal *et al.*, 2003 y 2005; Zhang *et al.*, 2007). NHE8 ha sido detectada por Goyal y colaboradores en la membrana apical de los segmentos S1 a S3 del túbulo contorneado proximal (Goyal *et al.*, 2003 y 2005). La actividad de NHE8 es dependiente de  $Na^+$ , altamente sensible a EIPA y, junto con NHE3, participaría en el proceso de acidificación proximal (Goyal *et al.*, 2003 y 2005; Zhang *et al.*, 2007).

La ausencia de diferencias en la cantidad de proteína presente en membrana apical y en la expresión génica de NHE3 entre las ratas adultas jóvenes y seniles nos llevó a investigar si la isoforma NHE8 del intercambiador, sensible a EIPA, podría estar involucrada en los cambios en la reabsorción de bicarbonato observados entre los grupos experimentales. Para ello determinamos la cantidad y la expresión génica de la isoforma NHE8 del intercambiador  $Na^+/H^+$  en ratas adultas jóvenes y seniles. Detectamos que la cantidad de esta proteína y el nivel de expresión de su ARNm se encuentran disminuidos en los animales de 18 meses.

La disminución en la cantidad de NHE8 es paralela a la reducción observada en la expresión del ARNm en los animales seniles. Este resultado estaría indicando que la reducción en la cantidad de proteína observada en membrana apical del túbulo proximal se debe a una disminución en la expresión génica de NHE8.

Es importante destacar que, según nuestro conocimiento, es la primera vez que se describe una variación en la cantidad y en los niveles de expresión de la isoforma NHE8 del intercambiador  $Na^+/H^+$  no sólo en animales seniles sino también en un modelo fisiopatológico.

Las variaciones en el nivel de expresión de NHE8 en membrana apical podrían explicar en forma satisfactoria las variaciones observadas entre los animales seniles y los adultos jóvenes en los experimentos de micropuntura. Estos resultados sugieren que la disminución



en la reabsorción de bicarbonato en animales seniles se debe a la reducción en la expresión del ARNm y de la proteína de la isoforma NHE8 en el envejecimiento.

Si bien, en base a nuestros resultados, el mecanismo más probable de regulación de la isoforma NHE8 del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  sea una disminución en la transcripción y traducción de la proteína, no se conocen aún otros mecanismos que regulen la actividad de dicha isoforma. Sin embargo, es posible que la expresión de NHE8 esté sujeta a los mismos mecanismos de regulación que el resto de las isoformas del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ .

Un aspecto importante a considerar es la ausencia de alteraciones en el equilibrio ácido-base en condiciones basales en los animales seniles. Como señalamos más arriba, modificaciones en la función proximal son compensadas en el nefrón distal. El nefrón distal es responsable del balance final del bicarbonato filtrado (10%), regulando la excreción neta de ácido por el riñón (Schuster, 1990). Efectivamente, el responsable final del volumen y la composición urinaria es el nefrón distal. Capasso y colaboradores mostraron un aumento de la reabsorción de bicarbonato en el asa de Henle en ratas con disminución de la masa renal con aumento en los niveles de ARNm de NHE3 y en la cantidad de la proteína (Capasso *et al.*, 2002). Recientemente se ha demostrado un incremento compensatorio en la tasa de reabsorción de bicarbonato en el túbulo colector cortical y medular de ratones *NHE3*<sup>-/-</sup> (Nakamura *et al.*, 1999). Este resultado es consistente con un aumento en la actividad de la V-H<sup>+</sup>ATPasa. Bastani y Gluck demostraron que la distribución de la V-H<sup>+</sup>ATPasa en las células intercalares del segmento distal del nefrón cambia durante la respuesta adaptativa del riñón a la acidosis crónica. Los mismos autores detectan por inmunocitoquímica, en condiciones basales, la presencia de la H<sup>+</sup>ATPasa en vacuolas ubicadas en células del túbulo colector cortical y medular. La sobrecarga ácida crónica induce translocación de la proteína hacia la membrana apical de estas células (Bastani & Gluck, 1997).

### V-H<sup>+</sup>ATPasa

La actividad del intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> contribuye en aproximadamente un 80% al total de la acidificación proximal, siendo la actividad de la H<sup>+</sup>ATPasa, responsable del 20% restante (Choi *et al.*, 2000). Si bien la contribución de la bomba a la acidificación proximal es menor, las variaciones en su actividad tienen efectos significativos en dicho proceso.

Interesantemente, la contribución porcentual de la V-H<sup>+</sup>ATPasa a la acidificación proximal es mayor en los animales seniles que en los adultos jóvenes, sugiriendo que nuestras observaciones podrían coincidir con las realizadas por Baum, quien ha determinado un fenómeno semejante comparando ratas recién nacidas con adultas (Baum, 1992).

Determinamos, por western blot, la cantidad de la subunidad E de la V-H<sup>+</sup>ATPasa presente en vesículas de membrana apical de túbulo contorneado proximal de ratas adultas jóvenes y seniles. La cantidad de esta proteína no presenta diferencias significativas entre los grupos experimentales analizados.

Tampoco se detectaron diferencias en la expresión del ARNm de la subunidad E de la V-H<sup>+</sup>ATPasa entre los animales adultos jóvenes y seniles. Estos resultados coinciden con los obtenidos al analizar la cantidad de la proteína indicando que ni la expresión génica ni la cantidad de la V-H<sup>+</sup>ATPasa varían significativamente entre ambos grupos experimentales.

No detectamos diferencias en los niveles de la V-H<sup>+</sup>ATPasa en membrana apical de túbulo proximal, por lo que podríamos descartar cambios en la reabsorción de bicarbonato debidos a la inserción, en membrana plasmática, de vesículas conteniendo a la enzima. En la célula proximal hay una colección subapical de organelas, que sirven como depósito de la H<sup>+</sup>ATPasa, que pueden ser insertadas y removidas de la superficie apical en función de las perturbaciones ácido-base del organismo (Stone & Xie, 1988). Gluck y colaboradores han analizado el rol de la fusión de membranas en la regulación del transporte de H<sup>+</sup> en el epitelio urinario. Dichos autores han mostrado que la vejiga de tortuga posee una reserva intracelular de vesículas conteniendo bombas de H<sup>+</sup> y que la estimulación con dióxido de carbono induce una rápida fusión de estas vesículas en la membrana luminal (Gluck *et al.*, 1982).

En experimentos realizados con ratones que no poseen el gen que codifica para el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  ( $NHE3^{-/-}$ ) la reabsorción de bicarbonato está mediada por una mayor actividad de la  $\text{H}^+$ ATPasa que en los animales  $NHE3^{+/+}$  (Wang *et al.*, 1999). El aumento en la actividad de la bomba no se debe a una mayor expresión de su ARNm sino que se produce por una alteración en la tasa de inserción (exocitosis) y recuperación (endocitosis) de la enzima hacia o desde la membrana celular (Nakamura *et al.*, 1999).

Otro mecanismo que puede estar participando en la regulación de la actividad de la V- $\text{H}^+$ ATPasa “*in vivo*” en los animales seniles. Proteínas citosólicas activadoras (Xie *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1992a) e inhibidoras (Zhang *et al.*, 1992b) han sido aisladas de extractos de tejidos, aunque su rol fisiológico en el control de la actividad de la bomba aún no ha sido establecido. El desacople entre el transporte de protones y la hidrólisis de ATP también ha sido sugerido como un mecanismo regulatorio (Arai *et al.*, 1989; Nelson, 1992).

Asimismo, otro mecanismo potencial de regulación de la actividad de la V- $\text{H}^+$ ATPasa involucra la modificación covalente del sitio activo de la enzima a través de la formación de un puente disulfuro (Feng & Forgac, 1994) entre dos cisteínas, Cys 254 y Cys 539, localizadas en la subunidad A. La formación de esta unión covalente produce una inactivación reversible de la bomba (Kane, 1995) y al menos, la mitad de la  $\text{H}^+$ ATPasa presente en vesículas recubiertas de clatrina existen en este estado inactivo (Feng & Forgac, 1992b). La formación de este puente disulfuro podría jugar un rol importante en la regulación de la actividad de la enzima “*in vivo*” (Forgac, 1998).

El ensamble y desensamble de la enzima también ha sido propuesto como una forma de regulación de la actividad de la bomba, ya que la existencia de fracciones separadas de dominios  $V_1$  y  $V_0$  (Myers & Forgac, 1993) sugieren que podría existir un mecanismo de asociación y disociación de los dominios de la enzima y que la actividad de la  $\text{H}^+$ ATPasa puede verse modificada por el ensamble de los dominios  $V_1$  y  $V_0$  de la enzima para conformar una bomba funcional. Sin embargo, las señales que producen la asociación/disociación de los dominios permanecen desconocidas.

### ***Mecanismos de control de la acidificación proximal***

Se han descrito, en el riñón de animales seniles, alteraciones de la respuesta vasodilatadora dependiente del endotelio (Erdely *et al.*, 2003; Long *et al.*, 2005a y 2005b). Los niveles de óxido nítrico (NO) y la actividad total de la óxido nítrico sintetasa (NOS) se encuentran reducidos en la corteza renal de animales seniles (De Lutiis *et al.*, 2004; Erdely *et al.*, 2003; Long *et al.*, 2005a y 2005b; Xiong *et al.*, 2001). Los niveles de eNOS (óxido nítrico sintetasa endotelial) y nNOS (óxido nítrico sintetasa neuronal) están disminuidos en ratas Sprague-Dawley seniles (Erdely *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 1998). A partir de experimentos realizados “*in vivo*” e “*in vitro*” se obtuvieron evidencias de la participación del NO en la regulación de la acidificación luminal y la reabsorción de Na<sup>+</sup> en distintos segmentos del nefrón. Algunos transportadores cuya actividad es afectada por el NO son: el intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (Amorena & Castro, 1997; Green *et al.*, 1991; Linas & Repine, 1999; Rocznik & Burns, 1996; Wang, 1997), la bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPasa (Guzman *et al.*, 1995; Kone & Higham, 1999; McKee *et al.*, 1994), los canales de Na<sup>+</sup> sensibles a amiloride (Lu *et al.*, 1997) y la H<sup>+</sup>ATPasa (Valles & Manucha, 2000). Dos laboratorios informaron simultáneamente que en condiciones basales o de estimulación moderada de la síntesis de NO, existe un efecto estimulador sobre la reabsorción de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Wang, 1997) o secreción de protones (Amorena & Castro, 1997).

La reducción de la producción de NO en animales seniles podría explicar, al menos en parte, la reducción detectada en la reabsorción de bicarbonato. La disminución en los niveles de NO en estos animales estaría amentando la actividad de la H<sup>+</sup>ATPasa (Valles & Manucha, 2000) así como inhibiendo al intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (Linas & Repine, 1999; Rocznik & Burns, 1996). Parte de nuestros resultados podrían explicarse a la luz de estos hechos.

La hormona paratiroidea (PTH) acoplada a su receptor inhibe al intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (Pollock *et al.*, 1986). Esta hormona media este efecto a través de múltiples vías de señalización que incluyen AMPc-PKA, fosfolipasa C- PKC y fosfolipasa A<sub>2</sub> (Baum & Hays, 1988; Kahn *et al.*, 1985; Pollock *et al.*, 1986).

El aumento que detectamos en los niveles de PTH en ratas seniles coincide con los valores de esta hormona reportados por la literatura (Armbrecht *et al.*, 1986; Fox, 1991).

El AMPc, cuya formación es inducida por PTH, disminuye la actividad del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Kahn *et al.*, 1985). Si bien no detectamos un aumento significativo en los niveles de AMPc en las ratas seniles respecto de los animales adultos jóvenes, observamos una tendencia del AMPc a aumentar en los primeros.

El hecho de que el AMPc no aumente, a pesar de los valores elevados de PTH registrados, puede responder a un mecanismo de desensibilización del receptor de PTH o de la insuficiente activación del complejo hormona-receptor sobre la enzima adenilato ciclasa durante el envejecimiento. Es sabido que la capacidad de la hormona paratiroidea para aumentar los niveles intracelulares de AMPc en riñón disminuye con la edad, y que esto se debe a una disminución de la estimulación de PTH sobre la adenilato ciclasa (Armbrecht *et al.*, 1986, Hanai *et al.*, 1989 y 1990).

Si bien especulativo, es necesario considerar que la PTH podría estar actuando sobre la isoforma NHE8 del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , a través del AMPc activando a la PKA o a la PKC.

Por otra parte, el efecto de PTH sobre la actividad del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  podría deberse a la acción de la hormona por un mecanismo alternativo a la cascada de AMPc. En efecto, Pastoriza-Muñoz y colaboradores proponen un modelo en el cual la hormona paratiroidea inhibe la salida de bicarbonato de la célula tubular proximal (vía PKC), lo que causa alcalinización celular con la consiguiente inhibición de los sistemas de secreción de protones. Las dos cascadas de señalización activadas por PTH juegan diferentes roles. La estimulación de la vía del inositol trifosfato produce la activación de la PKC ubicada en la membrana basolateral a través de un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. La PKC activada impide la salida de bicarbonato al inhibir la actividad del cotransportador  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ . La inhibición de la salida de bases alcaliniza el interior celular y disminuye la actividad del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  por alteración de la fuerza motriz y por inhibición alostérica. Por otro lado, la PTH a través del AMPc disminuye la actividad del intercambiador luminal. Si bien la PKC luminal estimula al intercambiador (Khalifa *et al.*, 1983), este efecto no se refleja en la actividad final del transportador porque el efecto global de la PTH es la inhibición del mismo (Pastoriza-Muñoz *et al.*, 1992).

En conclusión, los resultados obtenidos muestran una disminución en la reabsorción de bicarbonato, sensible a EIPA, en animales seniles. Una posibilidad para explicar esta disminución podría involucrar la regulación de las isoformas NHE3 y NHE8 por la hormona paratiroidea ya sea a través del AMPc o por un mecanismo alternativo.

Si bien no podemos descartar mecanismos de regulación de la actividad de la V-H<sup>+</sup>ATPasa o de la isoforma NHE3 no relacionados con la transcripción o traducción de estas proteínas, claramente los datos obtenidos sugieren que el intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> está afectado en la reabsorción de bicarbonato en el túbulo contorneado proximal de animales seniles y que la isoforma, sensible a EIPA, responsable de la reducción del flujo de bicarbonato en estos animales, es NHE8. También, nuestros resultados muestran que la contribución porcentual de la V-H<sup>+</sup>ATPasa en los animales seniles es significativamente mayor que en los animales adultos jóvenes.

## CONCLUSIONES GENERALES

Los datos presentados en esta tesis indican que los mecanismos responsables de la reabsorción de bicarbonato en el túbulo contorneado proximal de los animales seniles son complejos y que involucran, no solo cambios en la expresión de proteínas de los sistemas relacionados con la secreción de protones, sino también cambios en factores regulatorios de estos sistemas.

Consideramos que los resultados obtenidos contribuyen a un mayor conocimiento de la función renal de la rata senil. Dado que los mecanismos involucrados en el deterioro funcional que ocurre con el envejecimiento son parcialmente conocidos, es importante ahondar en el conocimiento de los cambios asociados al mismo. Esto podría ayudar a una mejor prevención de las alteraciones renales inherentes a la edad.

Lic. Mariana Fiori

Dr. Carlos Amorena

# **BIBLIOGRAFÍA**



**Abou-Samra AB, Juppner H, Force T, Freeman MW, Kong XF, Schipani E, Urena P, Richards J, Bonventre JV, Potts JT Jr, et al.** Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: a single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol trisphosphates and increases intracellular free calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 89(7): 2732-2736, 1992.

**Abrass CK, Acox MJ, Rangi GJ.** Aging-associated changes in renal extracellular matrix. *Am. J. Pathol* 146: 742-752, 1995.

**Akhter S, Cavet ME, Tse CM, Donowitz M.** C-terminal domains of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 3 are involved in the basal and serum-stimulated membrane trafficking of the exchanger. *Biochemistry* 39(8): 1990-2000, 2000.

**Al-Awqati Q.** Plasticity in epithelial polarity of renal intercalated cells: targeting of the H<sup>+</sup>-ATPase and band 3. *Am. J. Physiol.* 270(6 Pt 1): C1571-C1580, 1996.

**Albrecht FE, Xu J, Moe OW, Hopfer U, Simonds WF, Orlowski J, Jose PA.** Regulation of NHE3 activity by G protein subunits in renal brush-border membranes. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 278: R1064-R1073, 2000.

**Algrain M, Turunen O, Vaheri A, Louvard D, Arpin M.** Ezrin contains cytoskeleton and membrane binding domains accounting for its proposed role as a membrane-cytoskeletal linker. *J. Cell Biol.* 120(1): 129-139, 1993.

**Alpern RJ, Cogan MG, Rector FC Jr.** Effect of luminal bicarbonate concentration on proximal acidification in the rat. *Am. J. Physiol.* 243(1): F53-F59, 1982.

**Alpern RJ, Cogan MG, Rector FC.** Effects of extracellular fluid volume and plasma bicarbonate concentration on proximal acidification in the rat. *J. Clin. Invest.* 71: 736-746, 1983.

**Alpern RJ.** Mechanism of basolateral membrane H<sup>+</sup>/OH<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport in the rat proximal convoluted tubule. A sodium-coupled electrogenic process. *J. Gen. Physiol.* 86(5): 613-636, 1985.

**Alpern RJ.** Cell mechanisms of proximal tubule acidification. *Physiol. Rev.* 70(1): 79-114, 1990.

**Ambuhl PM, Amemiya M, Danczkay M, Lotscher M, Kaissling B, Moe OW, Preisig PA, Alpern RJ.** Chronic metabolic acidosis increases NHE3 protein abundance in rat kidney. *Am. J. Physiol.* 271(4 Pt 2): F917-F925, 1996.

**Ambuhl P, Amemiya M, Preisig PA, Moe OW, Alpern RJ.** Chronic hyperosmolality increases NHE3 activity in OKP cells. *J. Clin. Invest.* 101(1): 170-177, 1998.

- Ambuhl PM, Yang X, Peng Y, Preisig PA, Moe OW, Alpern RJ.** Glucocorticoids enhance acid activation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 3 (NHE3). *J. Clin. Invest.* 103(3): 429-435, 1999.
- Amemiya M, Loffing J, Lotscher M, Kaissling B, Alpern RJ, Moe OW.** Expression of NHE-3 in the apical membrane of rat renal proximal tubule and thick ascending limb. *Kidney Int.* 48(4): 1206-1215, 1995a.
- Amemiya M, Yamaji Y, Cano A, Moe OW., Alpern RJ.** Acid incubation increases NHE-3 mRNA abundance in OKP cells. *Am. J. Physiol.* 269: C126-C133, 1995b.
- Amemiya M, Tabei K, Kusano E, Asano Y, Alpern RJ.** Incubation of OKP cells in low-K<sup>+</sup> media increases NHE3 activity after early decrease in intracellular pH. *Am. J. Physiol.* 276(3 Pt 1): C711-C716, 1999.
- Amemiya M, Kusano E, Muto S, Tabei K, Ando Y, Alpern RJ, Asano Y.** Glucagon acutely inhibits but chronically activates Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter 3 activity in OKP cells. *Exp. Nephrol.* 10(1):26-33, 2002.
- Amorena C, Malnic G.** Peritubular buffering power and luminal acidification in proximal convoluted tubules of the rat. *Pflügers Arch.* 398: 331-336, 1983.
- Amorena CE, Fernandes DT, Malnic G.** Factors affecting proximal tubular acidification of non-bicarbonate buffer in the rat. *J. Physiol.* 352: 31-48, 1984.
- Amorena CE, Wilding TJ, Manchester JK, Roos A.** Changes in intracellular pH caused by high K in normal and acidified frog muscle. *J. Gen. Physiol.* 96: 959-972, 1990.
- Amorena C, Castro AF.** Control of proximal tubule acidification by the endothelium of the peritubular capillaries. *Am. J. Physiol.* 272(2 Pt 2): R691-R694, 1997.
- Anderson S, Brenner BM.** Effects of agging on the renal glomerulus. *Am. J. of Medicine* 80:435-442, 1986.
- Arai H, Berne M, Terres G, Terres H, Puopolo K, Forgac M.** Subunit composition and ATP site labeling of the coated vesicle proton-translocating adenosinetriphosphatase. *Biochemistry.* 26(21): 6632-6638, 1987.
- Arai H, Pink S, Forgac M.** Interaction of anions and ATP with the coated vesicle proton pump. *Biochemistry.* 28(7): 3075-3082, 1989.
- Arata Y, Baleja JD, Forgac M.** Localization of subunits D, E, and G in the yeast V-ATPase complex using cysteine-mediated cross-linking to subunit B. *Biochemistry.* 41(37): 11301-11307, 2002a.

**Arata Y, Baleja JD, Forgac M.** Cysteine-directed cross-linking to subunit B suggests that subunit E forms part of the peripheral stalk of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *J. Biol. Chem.* 277(5): 3357-3363, 2002b.

**Arata Y, Nishi T, Kawasaki-Nishi S, Shao E, Wilkens S, Forgac M.** Structure, subunit function and regulation of the coated vesicle and yeast vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1555(1-3): 71-74, 2002c.

**Armbrecht HJ, Wongsurawat N, Zenser TV, Davis BB.** Differential effects of parathyroid hormone on the renal 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 24,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> production of young and adult rats. *Endocrinology.* 111(4): 1339-1344, 1982.

**Armbrecht HJ, Forte LR, Halloran BP.** Effect of age and dietary calcium on renal 25(OH)D metabolism, serum 1,25(OH)<sub>2</sub>D, and PTH. *Am. J. Physiol.* 246(3 Pt 1): E266-E270, 1984.

**Armbrecht HJ, Boltz MA, Forte LR.** Effect of age on parathyroid hormone and forskolin stimulated adenylate cyclase and protein kinase activity in the renal cortex. *Exp. Gerontol.* 21(6): 515-522, 1986.

**Armbrecht HJ, Strong R, Boltz M, Rocco D, Wood WG, Richardson A.** Modulation of age-related changes in serum 1,25-dihydroxyvitamin D and parathyroid hormone by dietary restriction of Fischer 344 rats. *J. Nutr.* 118(11): 1360-1365, 1988.

**Arnaud CD, Tsao HS, Littledike T.** Radioimmunoassay of Human Parathyroid Hormone in Serum. *J. Clin. Invest.* 50(1): 21-34, 1971.

**Aronson PS, Sacktor B.** The Na<sup>+</sup> gradient-dependent transport of D-glucose in renal brush border membranes. *J. Biol. Chem.* 250(15): 6032-6039, 1975.

**Aronson PS, Nee J, Suhm MA.** Modifier role of internal H<sup>+</sup> in activating the Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger in renal microvillus membrane vesicles. *Nature* 299(5879): 161-163, 1982.

**Aronson PS, Suhm MA, Nee J.** Interaction of external H<sup>+</sup> with the Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger in renal microvillus membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 258(11): 6767-6771, 1983.

**Aronson PS.** Mechanisms of active H<sup>+</sup> secretion in the proximal tubule. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 245: F647-F659, 1983.

**Aronson PS.** Kinetic properties of the plasma membrane Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger. *Annu. Rev. Physiol.* 47: 545-560, 1985.

**Attaphitaya S, Park K, Melvin JE.** Molecular cloning and functional expression of a rat Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (NHE5) highly expressed in brain. *J. Biol. Chem.* 274(7): 4383-4388, 1999.

**Attaphitaya S, Nehrke K, Melvin JE.** Acute inhibition of brain-specific Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 5 by protein kinases A and C and cell shrinkage. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 281(4): C1146-C1157, 2001.

**Azuma KK, Balkovetz DF, Magyar CE, Lescale-Matys L, Zhang Y, Chambrey R, Warnock DG, McDonough AA.** Renal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoforms and their regulation by thyroid hormone. *Am. J. Physiol.* 270(2 Pt 1): C585-C592, 1996.

**Bagnis C, Marshansky V, Breton S, Brown D.** Remodeling the cellular profile of collecting ducts by chronic carbonic anhydrase inhibition. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 280(3): F437-F448, 2001.

**Bailey MA.** Inhibition of bicarbonate reabsorption in the rat proximal tubule by activation of luminal P2Y1 receptors. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 287: F789-F796, 2004.

**Baines A, Ho P.** Glucose stimulates O<sub>2</sub> consumption, NOS, and Na/H exchange in diabetic rat proximal tubules. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 283: F286-F293, 2002.

**Baird NR, Orlowski J, Szabo EZ, Zaun HC, Schultheis PJ, Menon AG, Shull GE.** Molecular cloning, genomic organization, and functional expression of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 5 (NHE5) from human brain. *J. Biol. Chem.* 274(7): 4377-4382, 1999.

**Bank N, Aynedjian HS.** A micropuntura study of the effect of parathyroid hormone on renal bicarbonate reabsorption. *J. Clin. Invest.* 58: 336-344, 1976.

**Bastani B, Purcell H, Hemken P, Trigg D, Gluck S.** Expression and distribution of renal vacuolar proton-translocating adenosine triphosphatase in response to chronic acid and alkali loads in the rat. *J. Clin. Invest.* 88(1): 126-136, 1991.

**Bastani B, Gluck S.** Adaptational changes in renal vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in the rat remnant kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* 8: 868-879, 1997.

**Baum M, Hays SR.** Phorbol myristate acetate and dioctanoylglycerol inhibit transport in rabbit proximal convoluted tubule. *Am. J. Physiol.* 254(1 Pt 2): F9-F14, 1988.

**Baum M.** Developmental changes in rabbit juxtamedullary proximal convoluted tubule acidification. *Pediatr. Res.* 31(4 Pt 1): 411-414, 1992.

**Baum M, Moe OW, Gentry DL, Alpern RJ.** Effect of glucocorticoids on renal cortical NHE-3 and NHE-1 mRNA. *Am. J. Physiol.* 267(3 Pt 2): F437-F442, 1994.

**Baum M, Amemiya M, Dwarakanath V, Alpern RJ, Moe OW.** Glucocorticoids regulate NHE3 transcription in OKP cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 270: F164-F169, 1996.

- Baum M, Quigley R, Quan A.** Effect of luminal angiotensin II on rabbit proximal convoluted tubule bicarbonate absorption. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 273: F595-F600, 1997.
- Baum M, Dwarakanath V, Alpern RJ, Moe OW.** Effects of thyroid hormone on the neonatal renal cortical  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter. *Kidney Int.* 53(5): 1254-1258, 1998.
- Baylis C.** Age-dependent glomerular damage in the rat. Dissociation between glomerular injury and both glomerular hypertension and hypertrophy. Male gender as a primary risk factor. *J. Clin. Invest.* 94(5): 1823-1829, 1994.
- Baylis C, Schmidt R.** The aging glomerulus. *Seminars in Nephrology* 16: 265-276, 1996.
- Baylis C, Corman B.** The aging kidney: insights from experimental studies. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9(4): 699-709, 1998.
- Beck JC, Sacktor B.** Energetics of the  $\text{Na}^+$ -dependent transport of D-glucose in renal brush border membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 250(22): 8674-8680, 1975.
- Beck LH.** The aging kidney. Defending a delicate balance of fluid and electrolytes. *Geriatrics.* 55(4): 26-32, 2000.
- Beltran C, Nelson N.** The membrane sector of vacuolar  $\text{H}^+$ -ATPase by itself is impermeable to protons. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 607: 41-47, 1992.
- Benos DJ.** Amiloride: chemistry, kinetics, and structure-activity relationships. En *Na-H exchange*, Ed. Grinstein S., Págs 121-136. Boca Ratón, Florida, USA, 1988.
- Berne RM, Levy MN.** Fisiología. Primera edición. Buenos Aires. Ed Médica Panamericana, 1986.
- Berryman M, Franck Z, Bretscher A.** Ezrin is concentrated in the apical microvilli of a wide variety of epithelial cells whereas moesin is found primarily in endothelial cells. *J. Cell Sci.* 105(Pt 4): 1025-1043, 1993.
- Bichara M, Paillard M, Leviel F, Gardin JP.** Hydrogen transport in rabbit kidney proximal tubules--Na:H exchange. *Am. J. Physiol.* 238(6): F445-F451, 1980.
- Bichara M, Paillard M, Leviel F, Prigent A, Gardin JP.** Na:H exchange and the primary H pump in the proximal tubule. *Am. J. Physiol.* 244(2): F165-F171, 1983.
- Bidet M, Merot J, Tauc M, Poujeol P.**  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger in proximal cells isolated from kidney. II. Short-term regulation by glucocorticoids. *Am. J. Physiol.* 253: F945-F951, 1987.

**Biemesderfer D, Reilly RF, Exner M, Igarashi P, Aronson PS.** Immunocytochemical characterization of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger isoform NHE-1 in rabbit kidney. *Am. J. Physiol.* 263(5 Pt 2): F833-F840, 1992.

**Biemesderfer D, Pizzonia J, Abu-Alfa A, Exner M, Reilly R, Igarashi P, Aronson PS.** NHE3: a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform of renal brush border. *Am. J. Physiol.* 265(5 Pt 2): F736-F742, 1993.

**Biemesderfer D, Rutherford PA, Nagy T, Pizzonia JH, Abu-Alfa AK, Aronson PS.** Monoclonal antibodies for high-resolution localization of NHE3 in adult and neonatal rat kidney. *Am. J. Physiol.* 273(2 Pt 2): F289-F299, 1997.

**Biemesderfer D, Nagy T, DeGray B, Aronson PS.** Specific association of megalin and the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform NHE3 in the proximal tubule. *J. Biol. Chem.* 274(25): 17518-17524, 1999.

**Biemesderfer D, DeGray B, Aronson PS.** Active (9.6 s) and inactive (21 s) oligomers of NHE3 in microdomains of the renal brush border. *J. Biol. Chem.* 276(13): 10161-10167, 2001.

**Blake-Palmer KG, Su Y, Smith AN, Karet FE.** Molecular cloning and characterization of a novel form of the human vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase e-subunit: an essential proton pump component. *Gene.* 393(1-2): 94-100, 2007.

**Bleyer AJ, Shemanski LR, Burke GL, Hansen KJ, Appel RG.** Tobacco, hypertension, and vascular disease: risk factors for renal functional decline in an older population. *Kidney Int.* 57(5): 2072-2079, 2000.

**Bookstein C, Musch M, DePaoli A, Xie Y, Villareal M, Rao M, Chang E.** A unique sodium-hydrogen exchange isoform (NHE4) of the inner medulla of the rat kidney is induced by hyperosmolarity. *J. Biol. Chem.* 269: 29704-29709, 1994.

**Bookstein C, Musch MW, DePaoli A, Xie Y, Rabenau K, Villareal M, Rao MC, Chang EB.** Characterization of the rat Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform NHE4 and localization in rat hippocampus. *Am. J. Physiol.* 271(5 Pt 1): C1629-C1638, 1996.

**Borensztein P, Froissart M, Laghmani K, Bichara M, Paillard M.** RT-PCR analysis of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger mRNAs in rat medullary thick ascending limb. *Am. J. Physiol.* 268 (*Renal Fluid Electrolyte Physiol* 37): F1224-F1228, 1995.

**Borgese F, Malapert M, Fievet B, Pouyssegur J, Motais R.** The cytoplasmic domain of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers (NHEs) dictates the nature of the hormonal response: behavior of a chimeric human NHE1/trout beta NHE antiporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 91(12): 5431-5435, 1994.

**Bossingham MJ, Carnell NS, Campbell WW.** Water balance, hydration status, and fat-free mass hydration in younger and older adults. *Am. J. Clin. Nutr.* 81(6): 1342-1350, 2005.

**Bowman BJ, Bowman EJ.** H<sup>+</sup>-ATPases from mitochondria, plasma membranes, and vacuoles of fungal cells. *J. Membr. Biol.* 94(2): 83-97, 1986.

**Bowman EJ, Siebers A, Altendorf K.** Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 85(21): 7972-7976, 1988.

**Bowman BJ, Bowman EJ.** Mutations in subunit C of the vacuolar ATPase confer resistance to Bafilomycin and identify a conserved antibiotic binding site. *J. Biol. Chem.* 277(6): 3965-3972, 2002.

**Bradford M.M.** A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye Binding. *Analytical Biochem.* 72: 248-254, 1976.

**Brant SR, Yun CH, Donowitz M, Tse CM.** Cloning, tissue distribution, and functional analysis of the human Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform, NHE3. *Am. J. Physiol.* 269(1 Pt 1): C198-C206, 1995.

**Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL.** Harrison's Principles of Internal Medicine. McGraw Hill, New York. págs. 37-39, 2001.

**Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH.** Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 351(6329): 714-718, 1991.

**Breton S, Smith PJ, Lui B, Brown D.** Acidification of the male reproductive tract by a proton pumping (H<sup>+</sup>)-ATPase. *Nat. Med.* 2(4): 470-472, 1996.

**Breton S, Wiederhold T, Marshansky V, Nsumu NN, Ramesh V, Brown D.** The B1 subunit of the H<sup>+</sup>ATPase is a PDZ domain-binding protein. Colocalization with NHE-RF in renal B-intercalated cells. *J. Biol. Chem.* 275(24): 18219-18224, 2000.

**Brett CL, Wei Y, Donowitz M, Rao R.** Human Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 6 is found in recycling endosomes of cells, not in mitochondria. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282(5): C1031-C1041, 2002.

**Brown GP, Douglas JG.** Angiotensin II binding sites on isolated rat renal brush border membranes. *Endocrinology* 111(6): 1830-1836, 1982.

**Brown GP, Douglas JG.** Angiotensin II-binding sites in rat and primate isolated renal tubular basolateral membranes. *Endocrinology* 112(6): 2007-2014, 1983.

- Brown D, Hirsch S, Gluck S.** Localization of a proton-pumping ATPase in rat kidney. *J. Clin. Invest.* 82: 2114-2126, 1988.
- Burg M, Green N.** Bicarbonate transport by isolated perfused rabbit proximal convoluted tubules. *Am. J. Physiol.* 233(4): F307-F314, 1977.
- Burnstock G.** Release of vasoactive substances from endothelial cells by shear stress and purinergic mechanosensory transduction. *J. Anat.* 194: 335-342, 1999.
- Cailla HL, Racine-Weisbuch MS, Delaage MA.** Adenosine 3', 5' -cyclic monophosphate assay at  $10^{-15}$ -mole level. *Anal. Biochem.* 56: 394-407, 1973.
- Cano A.** Characterization of the rat NHE3 promoter. *Am. J. Physiol.* 271(3 Pt 2): F629-F636, 1996.
- Cano A, Baum M, Moe OW.** Thyroid hormone stimulates the renal Na/H exchanger NHE3 by transcriptional activation. *Am. J. Physiol.* 276: C102-C108, 1999.
- Capasso G, Unwin R, Rizzo M, Pica A, Giebisch G.** Bicarbonate transport along the loop of Henle: molecular mechanisms and regulation. *J. Nephrol.* 15 Suppl 5:S88-S96, 2002.
- Casadevall G, Piera C, Setoain J, Queralt J.** Age-dependent enzymuria, proteinuria and changes in renal blood flow and glomerular filtration rate in rats. *Mech. Ageing Dev.* 82(1): 51-60, 1995.
- Cassola AC, Giebisch G, Malnic G.** Mechanism and components of renal tubular acidification. *J. Physiol. (Lond)* 267: 601-624, 1977.
- Castro AF, Amorena C, Müller A, Ottaviano G, Tellez-Iñon MT, Taquini AC.** Extracellular ATP and bradykinin increase cGMP in vascular endothelial cells via activation of PKC. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 275: C113-C119, 1998.
- Cavet ME, Akhter S, Murtazina R, Sanchez de Medina F, Tse CM, Donowitz M.** Half-lives of plasma membrane  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchangers NHE1-3: plasma membrane NHE2 has a rapid rate of degradation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 281(6): C2039-C2048, 2001.
- Chambrey R, Achard JM, Warnock DG.** Heterologous expression of rat NHE4: a highly amiloride-resistant  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger isoform. *Am. J. Physiol.* 272(1 Pt 1): C90-C98, 1997.
- Chambrey R, Warnock DG, Podevin RA, Bruneval P, Mandet C, Belair MF, Bariety J, Paillard M.** Immunolocalization of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger isoform NHE2 in rat kidney. *Am. J. Physiol.* 275(3 Pt 2): F379-F386, 1998.



**Chambrey R, St. John PL, Eladari D, Quentin F, Warnock DG, Abrahamson DR, Podevin RA, Paillard M.** Localization and functional characterization of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform NHE4 in rat thick ascending limbs. *Am. J. Physiol.* 281: F707-F717, 2001.

**Chan GK, Deckelbaum RA, Bolivar I, Goltzman D, Karaplis AC.** PTHrP inhibits adipocyte differentiation by down-regulating PPAR gamma activity via a MAPK-dependent pathway. *Endocrinology.* 142(11): 4900-4909, 2001.

**Chan YL, Giebisch G.** Relationship between sodium and bicarbonate transport in the rat proximal convoluted tubule. *Am. J. Physiol.* 240 (*Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 3): F222-F230, 1981.

**Chan YL, Biagi B, Giebisch G.** Control mechanisms of bicarbonate transport across the rat proximal convoluted tubule. *Am. J. Physiol.* 242 (*Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 11): F532-F543, 1982.

**Chen LK, Boron WF.** Intracellular pH regulation in epithelial cells. *Kidney Int.* 40: S11-S17, 1991.

**Choi JY, Shah M, Lee MG, Schultheis PJ, Shull GE, Muallem S, Baum M.** Novel amiloridesensitive sodium-dependent proton secretion in the mouse proximal convoluted tubule. *J. Clin. Invest.* 105 (8): 1141-1146, 2000.

**Chu TS, Wu KD, Wu MS, Hsieh BS.** Endothelin-1 chronically inhibits Na/H exchanger-3 in ET(B)-overexpressing OKP cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271(3): 807-811, 2000.

**Clark JD, Limbird LE.** Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger subtypes: a predictive review. *Am. J. Physiol.* 261(6 Pt 1): C945-C953, 1991.

**Cogan MG.** Effect of acute alterations in P<sub>CO2</sub> on proximal HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, and H<sub>2</sub>O reabsorption. *Am. J. Physiol.* 246 (*Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 15): F21-F26, 1984.

**Cohn DE, Klahr S, Hammerman MR.** Metabolic acidosis and parathyroidectomy increase Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in brush border vesicles. *Am. J. Physiol.* 245 (*Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 14): F217-F222, 1983.

**Collazo R, Fan L, Hu MC, Zhao H, Wiederkehr MR, Moe OW.** Acute regulation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE3 by parathyroid hormone via NHE3 phosphorylation and dynamin-dependent endocytosis. *J. Biol. Chem.* 275(41): 31601-31608, 2000.

**Coppola S, Fromter E.** An electrophysiological study of angiotensin II regulation of Na-HCO<sub>3</sub> cotransport and K conductance in renal proximal tubules. II. Effect of micromolar concentrations. *Pflugers Arch.* 427(1-2): 151-156, 1994.

**Corman B, Thomas R, McLeod R, de Rouffignac C.** Water and total CO<sub>2</sub> reabsorption along the rat proximal convoluted tubule. *Pflugers Arch.* 389(1): 45-53, 1980.

**Corman B, Pratz J, Poujeol P.** Changes in anatomy, glomerular filtration, and solute excretion in aging rat kidney. *Am. J. Physiol.* 248(3 Pt 2): R282-R287, 1985.

**Cotran RS, Kumar V, Collins T.** *Robbins Patología estructural y funcional.* Mc Graw-Hill. Interamericana Buenos Aires. 2000.

**Counillon L, Scholz W, Lang HJ, Pouyssegur J.** Pharmacological characterization of stably transfected Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter isoforms using amiloride analogs and a new inhibitor exhibiting anti-ischemic properties. *Mol. Pharmacol.* 44(5): 1041-1045, 1993.

**Counillon L, Pouyssegur J, Reithmeier RA.** The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE-1 possesses N- and O-linked glycosylation restricted to the first N-terminal extracellular domain. *Biochemistry.* 33(34): 10463-10469, 1994.

**Crider BP, Xie XS, Stone DK.** Bafilomycin inhibits proton flow through the H<sup>+</sup> channel of vacuolar proton pumps. *J. Biol. Chem.* 269(26): 17379-17381, 1994.

**Crider BP, Andersen P, White AE, Zhou Z, Li X, Mattsson JP, Lundberg L, Keeling DJ, Xie XS, Stone DK, Peng SB.** Subunit G of the vacuolar proton pump. Molecular characterization and functional expression. *J. Biol. Chem.* 272(16): 10721-10728, 1997.

**Csiszar A, Toth J, Peti-Peterdi J, Ungvari Z.** The aging kidney: role of endothelial oxidative stress and inflammation. *Acta Physiol. Hung.* 94(1-2): 107-115, 2007.

**Cunningham R, Steplock D, Wang F, Huang H, E X, Shenolikar S, Weinman EJ.** Defective parathyroid hormone regulation of NHE3 activity and phosphate adaptation in cultured NHERF-1<sup>-/-</sup> renal proximal tubule cells. *J. Biol. Chem.* 279(36): 37815-37821, 2004.

**Damsgaard EM, Froland A, Jorgensen OD, Mogensen CE.** Microalbuminuria as predictor of increased mortality in elderly people. *BMJ.* 300(6720): 297-300, 1990.

**Davies DF, Shock NW.** Age changes in glomerular filtration rate, effective renal plasma flow, and tubular excretory capacity in adult males. *J. Clin. Invest.* 29(5): 496-507, 1950.

**Davis KM, Minaker K.** Disorders of fluid balance. Hazzard WR, Blass JP, Ettinger WH, Halter JB, Ouslander JG. *Principles of Geriatric Medicine and Gerontology.* New York, McGraw-Hill, págs. 271-282, 2001.

**De Lutiis MA, Felaco M, Gizzi F, Patruno A, Speranza L, Di Giulio C, Conti P, Castellani ML, Petrarca C, Grilli A.** A scavenger role for nitric oxide in the aged rat kidney. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 17(3): 265-271, 2004.

- de Mello Aires M, Malnic G.** Sodium in renal tubular acidification kinetics. *Am. J. Physiol.* 236(5): F434-F441, 1979.
- Dennis VW, Stead WW, Myers JL.** Renal handling of phosphate and calcium. *Annu. Rev. Physiol.* 41: 257-271, 1979.
- Díaz-Sylvester P, Mac Laughlin M, Amorena C.** Peritubular fluid viscosity modulates H<sup>+</sup> flux in proximal tubules through NO release. *Am. J. Physiol.* 280 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 2): F239-F243, 2001.
- Dietz KJ, Tavakoli N, Kluge C, Mimura T, Sharma SS, Harris GC, Chardonnens AN, Gollmack D.** Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level. *J. Exp. Bot.* 52(363): 1969-1980, 2001.
- Dolson GM, Hise MK, Weinman EJ.** Relationship among parathyroid hormone, cAMP, and calcium on proximal tubule sodium transport. *Am. J. Physiol.* 249 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 18): F409-F416, 1985.
- Donowitz M, Janecki A, Akhter S, Cavet ME, Sanchez F, Lamprecht G, Zizak M, Kwon WL, Khurana S, Yun CH, Tse CM.** Short-term regulation of NHE3 by EGF and protein kinase C but not protein kinase A involves vesicle trafficking in epithelial cells and fibroblasts. *Ann. N Y Acad. Sci.* 915: 30-42, 2000.
- Dransfield DT, Yeh JL, Bradford AJ, Goldenring JR.** Identification and characterization of a novel A-kinase-anchoring protein (AKAP120) from rabbit gastric parietal cells. *Biochem. J.* 322(Pt 3): 801-808, 1997.
- Dröse S, Altendorf K.** Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases. *J. Exp. Biol.* 200(Pt 1): 1-8, 1997.
- D'Souza S, Garcia-Cabado A, Yu F, Teter K, Lukacs G, Skorecki K, Moore HP, Orłowski J, Grinstein S.** The epithelial sodium-hydrogen antiporter Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 3 accumulates and is functional in recycling endosomes. *J. Biol. Chem.* 273(4): 2035-2043, 1998.
- DuBose TD Jr, Pucacco LR, Seldin DW, Carter NW.** Direct determination of P<sub>CO<sub>2</sub></sub> in the rat renal cortex. *J. Clin. Invest.* 62(2): 338-348, 1978.
- DuBose TD Jr, Pucacco LR, Lucci MS, Carter NW.** Micropuncture determination of pH, P<sub>CO<sub>2</sub></sub>, and total CO<sub>2</sub> concentration in accessible structures of the rat renal cortex. *J. Clin. Invest.* 64(2): 476-482, 1979.
- Edsall JT, Wyman J.** *Biophysical chemistry* Volume I. Edited by Academic Press, INC, New York, 1958.

**Eitle E, Hiranyachattada S, Wang H, Harris PJ.** Inhibition of proximal tubular fluid absorption by nitric oxide and atrial natriuretic peptide in rat kidney. *Am. J. Physiol.* 274(4 Pt 1): C1075-C1080, 1998.

**Eladari D, Leviel F, Pezy F, Paillard M, Chambrey R.** Rat proximal NHE3 adapts to chronic acidbase disorders but not to chronic changes in dietary NaCl intake. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 282(5): F835-F843, 2002.

**Epstein M, Hollenberg NK.** Age as a determinant of renal sodium conservation in normal man. *J. Lab. Clin. Med.* 87(3): 411-417, 1976.

**Erdely A, Greenfeld Z, Wagner L, Baylis C.** Sexual dimorphism in the aging kidney: Effects on injury and nitric oxide system. *Kidney Int.* 63(3): 1021-1026, 2003.

**Fafournoux P, Noel J, Pouyssegur J.** Evidence that Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoforms NHE1 and NHE3 exist as stable dimers in membranes with a high degree of specificity for homodimers. *J. Biol. Chem.* 269(4): 2589-2596, 1994.

**Fan L, Wiederkehr MR, Collazo R, Wang H, Crowder LA, Moe OW.** Dual mechanisms of regulation of Na/H exchanger NHE-3 by parathyroid hormone in rat kidney. *J. Biol. Chem.* 274(16): 11289-11295, 1999.

**Fejes-Toth G, Naray-Fejes-Toth A.** Effect of acid/base balance on H-ATPase 31 kD subunit mRNA levels in collecting duct cells. *Kidney Int.* 48(5): 1420-1426, 1995.

**Feng Y, Forgac M.** A novel mechanism for regulation of vacuolar acidification. *J. Biol. Chem.* 267(28): 19769-19772, 1992a.

**Feng Y, Forgac M.** Cysteine 254 of the 73-kDa A subunit is responsible for inhibition of the coated vesicle (H<sup>+</sup>)-ATPase upon modification by sulfhydryl reagents. *J. Biol. Chem.* 267(9): 5817-5822, 1992b.

**Feng Y, Forgac M.** Inhibition of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase by disulfide bond formation between cysteine 254 and cysteine 532 in subunit A. *J. Biol. Chem.* 269(18): 13224-13230, 1994.

**Ferder LF, Inserra F, Basso N.** Advances in our understanding of aging: role of the renin-angiotensin system. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2(2): 189-194, 2002.

**Finbow ME, Harrison MA.** The vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase: a universal proton pump of eukaryotes. *Biochem J.* 324: 697-712, 1997.

**Fisher KA, Lee SH, Walker J, Dileto-Fang C, Ginsberg L, Stapleton SR.** Regulation of proximal tubule sodium/hydrogen antiporter with chronic volume contraction. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 280(5): F922-F926, 2001.

**Fliser D, Zeier M, Nowack R, Ritz E.** Renal functional reserve in healthy elderly subjects. *J. Am. Soc. Nephrol.* 3(7): 1371-1377, 1993.

**Fliser D, Franek E, Joest M, Block S, Mutschler E, Ritz E.** Renal function in the elderly: impact of hypertension and cardiac function. *Kidney Int.* 51(4): 1196-1204, 1997.

**Forgac M.** Structure and function of vacuolar class of ATP driven proton pumps. *Physiol. Rev.* 69: 765-796, 1989.

**Forgac M.** Structure, function and regulation of the vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases. *FEBS Letters* 440: 258-263, 1998.

**Forgac M.** Structure and properties of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases. *J. Biol. Chem.* 274(19): 12951-12954, 1999a.

**Forgac M.** The vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase of clathrin-coated vesicles is reversibly inhibited by S-nitrosoglutathione. *J. Biol. Chem.* 274(3): 1301-1305, 1999b.

**Forgac M.** Structure, mechanism and regulation of the clathrin-coated vesicle and yeast vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases. *J. Exp. Biol.* 203(Pt 1): 71-80, 2000.

**Fox J, Mathew MB.** Heterogeneous response to PTH in aging rats: evidence for skeletal resistance. *Am. J. Physiol.* 260: E933-E937, 1991.

**Fox J.** Regulation of parathyroid hormone secretion by plasma calcium in aging rats. *Am. J. Physiol.* 260: E220-E225, 1991.

**Frassetto LA, Morris RC Jr, Sebastian A.** Effect of age on blood acid-base composition in adult humans: role of age-related renal functional decline. *Am. J. Physiol.* 271(6 Pt 2): F1114-F1122, 1996.

**Fuiano G, Sund S, Mazza G, Rosa M, Caglioti A, Gallo G, Natale G, Andreucci M, Memoli B, De Nicola L, Conte G.** Renal hemodynamic response to maximal vasodilating stimulus in healthy older subjects. *Kidney Int.* 59(3): 1052-1058, 2001.

**Fujihara CK, Limongi DMZP, De Oliveira HCF, Zatz R.** Absence of focal glomerulosclerosis in aging analbuminemic rats. *Am. J. Physiol.* 262: R947-R954, 1992.

**Furchgott RF, Vanhoutte PM.** Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.* 3: 2007-2017, 1989.

**Geibel J, Giebisch G, Boron WF.** Angiotensin II stimulates both Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange and Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransport in the rabbit proximal tubule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 87(20): 7917-7920, 1990.

**Gekle M, SDerrano OK, Drumm K, Mildenerger S, Freudinger R, Gassner B, Jansen HW, Christensen EI.** NHE3 serves as a molecular tool for cAMP-mediated regulation of receptormediated endocytosis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 283: F549-F558, 2002.

**Ghishan FK, Knobel SM, Summar M.** Molecular cloning, sequencing, chromosomal localization, and tissue distribution of the human  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger (SLC9A2). *Genomics.* 30(1): 25-30, 1995.

**Giebish G, Malnic G, de Mello GB, de Mello-Aires M.** Kinetics of luminal acidification in cortical tabules of the rat kidney. *J. Physiol. (Lond)* 267: 571-599, 1977.

**Girardi ACC, Titan SMO, Malnic G, Rebouças NA.** Chronic effect of parathyroid hormone on NHE3 expression in rat renal proximal tubules. *Kidney Int.* 58: 1623-1631, 2000.

**Girardi AC, Degray BC, Nagy T, Biemesderfer D, Aronson PS.** Association of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger isoform NHE3 and dipeptidyl peptidase IV in the renal proximal tubule. *J. Biol. Chem.* 276(49): 46671-46677, 2001.

**Gisler SM, Stagljar I, Traebert M, Bacic D, Biber J, Murer H.** Interaction of the type IIa Na/Pi cotransporter with PDZ proteins. *J. Biol. Chem.* 276(12): 9206-9213, 2001.

**Gluck S, Cannon C, Al-Awqati Q.** Exocytosis regulates urinary acidification in turtle bladder by rapid insertion of  $\text{H}^+$  pumps into the luminal membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 4327-4331, 1982.

**Gluck SL, Nelson RD, Lee BS.** Properties and regulation of the renal vacuolar  $\text{H}^+$ -ATPase and  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 2: 715-724, 1993.

**Goldberg A, Zurlo J, Rudacille D.** The Three Rs and Biomedical Research. *Science* 272: 1403-1405; 1996.

**Goldstein RS, Tarloff JB, Hook JB.** Age-related nephropathy in laboratory rats. *FASEB J.* 2(7): 2241-2251, 1988.

**Gomes P, Vieira-Coelho MA, Soares-Da-Silva P.** Ouabain-insensitive acidification by dopamine in renal OK cells: primary control of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 281(1): R10-R18, 2001.

**Gottschalk CW, Mylle M.** Micropuncture study of the mammalian urinary concentrating mechanism: evidence for the countercurrent hypothesis. *Am. J. Physiol.* 196(4): 927-936, 1959.

**Goyal S, Vanden Heuvel G, Aronson PS.** Renal expression of novel  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger isoform NHE8. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 284: F467-F473, 2003.

**Goyal S, Mentone S, Aronson PS.** Immunolocalization of NHE8 in rat kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 288: F530-F538, 2005.

**Gräf R, Harvey WR, Wieczorek H.** Purification and properties of a cytosolic V<sub>1</sub>-ATPase. *J. Biol. Chem.* 271(34): 20908-20913, 1996.

**Green M, Ruiz OS, Kear F, Arruda JA.** Dual effect of cyclic GMP on renal brush border Na-H antiporter. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 198(3): 846-851, 1991.

**Gruber G, Wieczorek H, Harvey WR, Muller V.** Structure-function relationships of A-, F- and V-ATPases. *J. Exp. Biol.* 204(Pt 15): 2597-2605, 2001.

**Guyton AC.** *Fisiología y fisiopatología básicas.* Octava edición. México DF. Interamericana, 1992.

**Guzman NJ, Fang MZ, Tang SS, Ingelfinger JR, Garg LC.** Autocrine inhibition of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase by nitric oxide in mouse proximal tubule epithelial cells. *J. Clin. Invest.* 95(5): 2083-2088, 1995.

**Habener JF, Potts JT Jr, Rich A.** Pre-proparathyroid hormone. Evidence for an early biosynthetic precursor of parathyroid hormone. *J. Biol. Chem.* 251(13): 3893-3899, 1976.

**Haberle DA, Ruhland G, Lausser A, Moore L, Neiss A.** Influence of glomerular filtration rate on renal PAH secretion rate in the rat kidney. Dependency of PAH extraction on renal filtration fraction. *Pflugers Arch.* 375(2): 131-139, 1978.

**Halloran BP, Portale AA, Lonergan ET, Morris RC Jr.** Production and metabolic clearance of 1,25-dihydroxyvitamin D in men: effect of advancing age. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 70(2): 318-323, 1990.

**Hamm LL, Alpern RJ.** Cellular mechanisms of renal tubular acidification. *The Kidney: Physiology and Pathophysiology* (3<sup>rd</sup> edition). Seldin DW and Giebisch G. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, págs. 1935-1979, 2000.

**Hanai H, Liang CT, Cheng L, Sacktor B.** Desensitization to parathyroid hormone in renal cells from aged rats is associated with alterations in G-protein activity. *J. Clin. Invest.* 83(1): 268-277, 1989.

**Hanai H, Brennan DP, Cheng L, Goldman ME, Chorev M, Levine MA, Sacktor B, Liang CT.** Downregulation of parathyroid hormone receptors in renal membranes from aged rats. *Am. J. Physiol.* 259(3 Pt 2): F444-F450, 1990.

**Harris PJ, Navar LG.** Tubular transport responses to angiotensin. *Am. J. Physiol.* 248(5 Pt 2): F621-F630, 1985.

**Harris PJ.** Regulation of proximal tubule function by angiotensin. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 19(4): 213-222, 1992.

**Harris PJ, Hiranyachattada S, Antoine AM, Walker L, Reilly AM, Eitle E.** Regulation of renal tubular sodium transport by angiotensin II and atrial natriuretic factor. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. Suppl.* 3: S112-S118, 1996.

**Harrison SC.** Peptide-surface association: the case of PDZ and PTB domains. *Cell.* 86(3): 341-343, 1996.

**Hayashi H, Szaszi K, Coady-Osberg N, Orłowski J, Kinsella JL, Grinstein S.** A slow pH-dependent conformational transition underlies a novel mode of activation of the epithelial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-3 isoform. *J. Biol. Chem.* 277(13): 11090-11096, 2002.

**Hellman D, Baird HR, Bartter FC.** Relationship of maximal tubular phosphate reabsorption to filtration rate in the dog. *Am. J. Physiol.* 207: 89-96, 1964.

**Helmle-Kolb C, Montrose MH, Stange G, Murer H.** Regulation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in opossum kidney cells by parathyroid hormone, cyclic AMP and phorbol esters. *Pflugers Arch.* 415(4): 461-470, 1990.

**Henderson RM, Bell PB, Cohen RD, Browning C, Iles RA.** Measurement of intracellular pH with microelectrodes in rat kidney in vivo. *Am. J. Physiol.* 250: F203-F209, 1986

**Hernando N, Deliot N, Gisler SM, Lederer E, Weinman EJ, Biber J, Murer H.** PDZ-domain interactions and apical expression of type IIa Na/P(i) cotransporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99(18): 11957-11962, 2002.

**Heudes D, Michel O, Chevalier J, Scalbert E, Ezan E, Bariety J, Zimmerman A, Corman B.** Effect of chronic ANG I-converting enzyme inhibition on aging processes. I. Kidney structure and function. *Am. J. Physiol.* 266: R1038-R1051, 1994.

**Higashi Y, Oshima T, Ozono R, Matsuura H, Kajiyama G.** Aging and severity of hypertension attenuate endothelium-dependent renal vascular relaxation in humans. *Hypertension.* 30(2 Pt 1): 252-258, 1997.

**Hill KJ, Stevens TH.** Vma21p is a yeast membrane protein retained in the endoplasmic reticulum by a di-lysine motif and is required for the assembly of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase complex. *Mol. Biol. Cell.* 5(9): 1039-1050, 1994.

**Hill KJ, Stevens TH.** Vma22p is a novel endoplasmic reticulum-associated protein required for assembly of the yeast vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase complex. *J. Biol. Chem.* 270(38): 22329-22336, 1995.



**Hill C, Lateef AM, Engels K, Samsell L, Baylis C.** Basal and stimulated nitric oxide in control of kidney function in the aging rat. *Am. J. Physiol.* 272(6 Pt 2): R1747-R1753, 1997.

**Hillege HL, Janssen WM, Bak AA, Diercks GF, Grobbee DE, Crijns HJ, Van Gilst WH, De Zeeuw D, De Jong PE; Prevend Study Group.** Microalbuminuria is common, also in a nondiabetic, nonhypertensive population, and an independent indicator of cardiovascular risk factors and cardiovascular morbidity. *J. Intern. Med.* 249(6): 519-526, 2001.

**Hirata R, Umemoto N, Ho MN, Ohya Y, Stevens TH, Anraku Y.** VMA12 is essential for assembly of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase subunits onto the vacuolar membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 268(2): 961-967, 1993.

**Hoffmann EK.** Intracellular signalling involved in volume regulatory decrease. *Cell Physiol Biochem.* 10: 273-288, 2000.

**Holliday LS, Lu M, Lee BS, Nelson RD, Solivan S, Zhang L, Gluck SL.** The amino-terminal domain of the B subunit of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase contains a filamentous actin binding site. *J. Biol. Chem.* 275(41): 32331-32337, 2000.

**Hoogerwerf WA, Tsao SC, Devuyst O, Levine SA, Yun CH, Yip JW, Cohen ME, Wilson PD, Lazenby AJ, Tse CM, Donowitz M.** NHE2 and NHE3 are human and rabbit intestinal brush-border proteins. *Am. J. Physiol.* 270(1 Pt 1): G29-G41, 1996.

**Huss M, Ingenhorst G, König S, Gassel M, Drose S, Zeeck A, Altendorf K, Wiczorek H.** Concanamycin A, the specific inhibitor of V-ATPases, binds to the Vo subunit c. *J. Biol. Chem.* 277(43): 40544-40548, 2002.

**Igarashi P, Reilly RF, Hildebrandt F, Biemesderfer D, Reboucas NA, Slayman CW, Aronson PS.** Molecular biology of renal Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchangers. *Kidney Int. Suppl.* 33: S84-S89, 1991.

**Igarashi P, Freed MI, Ganz MB, Reilly RF.** Effects of chronic metabolic acidosis on Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchangers in LLC-PK1 renal epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 263(1 Pt 2): F38-F83, 1992.

**Igarreta P, Calvo JC, Paladini A, and Damasco C.** Acute effects of two natural corticosteroids on the kinetics of the Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger in rat renal brush border membranes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75: 1226-1231, 1996.

**Ignarro LJ, Lipton H, Edwards JC, Baricos WH, Hyman AL, Kadowitz PJ, Gruetter CA.** Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 218(3): 739-749, 1981.

**Ignarro LJ, Kadowitz PJ.** The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 25: 171-191, 1985.

**Ignarro LJ, Harbison RG, Wood KS, Kadowitz PJ.** Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 237(3): 893-900, 1986.

**Imai-Senga Y, Sun-Wada GH, Wada Y, Futai M.** A human gene, ATP6E1, encoding a testis-specific isoform of H<sup>+</sup>-ATPase subunit E. *Gene.* 289(1-2): 7-12, 2002.

**Inoue T, Forgac M.** Cysteine-mediated cross-linking indicates that subunit C of the V-ATPase is in close proximity to subunits E and G of the V<sub>1</sub> domain and subunit a of the V<sub>0</sub> domain. *J. Biol. Chem.* 280(30): 27896-27903, 2005.

**Ives HE, Yee VJ, Warnock DG.** Asymmetric distribution of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in the renal proximal tubule epithelial cell. *J. Biol. Chem.* 258: 13513-13516, 1983.

**Janecki AJ, Montrose MH, Zimniak P, Zweibaum A, Tse CM, Khurana S, Donowitz M.** Subcellular redistribution is involved in acute regulation of the brush border Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 3 in human colon adenocarcinoma cell line Caco-2. Protein kinase C-mediated inhibition of the exchanger. *J. Biol. Chem.* 273(15): 8790-8798, 1998.

**Jehlich K, Sablotni J, Simon BJ, Burckhardt G.** Biochemical aspects of H<sup>+</sup>-ATPase in renal proximal tubules: inhibition by N,N'-dicyclohexylcarbodiimide, N-ethylmaleimide, and bafilomycin. *Kidney Int.* 40: S64-S70, 1991.

**Johnson DW, Brew BK, Poronnik P, Cook DI, Field MJ, Gyory AZ, Pollock CA.** Insulin-like growth factor I stimulates apical sodium/hydrogen exchange in human proximal tubule cells. *Am. J. Physiol.* 272(4 Pt 2): F484-F490, 1997.

**Jones CA, Francis ME, Eberhardt MS, Chavers B, Coresh J, Engelgau M, Kusek JW, Byrd-Holt D, Narayan KM, Herman WH, Jones CP, Salive M, Agodoa LY.** Microalbuminuria in the US population: third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am. J. Kidney Dis.* 39(3): 445-459, 2002.

**Jourdain M, Amiel C, Friedlander G.** Modulation of Na-H exchange activity by angiotensin II in opossum kidney cells. *Am. J. Physiol.* 263(6 pt 1): C1141-C1146, 1992.

**Kahn AM, Dolson GM, Hise MK, Bennett SC, Weinman EJ.** Parathyroid hormone and dibutyryl cAMP inhibit Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in renal brush border. *Am. J. Physiol.* 248 (*Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 17): F212-F218, 1985.

**Kalu DN, Hardin RR.** Age, strain and species differences in circulating parathyroid hormone. *Horm. Metabol. Res.* 16: 654-657, 1984.

**Kalu DN, Masoro EJ, Yu BP, Hardin RR, Hollis BW.** Modulation of age-related hyperparathyroidism and senile bone loss in Fischer rats by soy protein and food restriction. *Endocrinology*. 122(5): 1847-1854, 1988.

**Kalu DN, Masoro EJ.** The biology of aging, with particular reference to the musculoskeletal system. *Clin. Geriatr. Med.* 4(2): 257-267, 1988.

**Kandasamy RA, Yu FH, Harris R, Boucher A, Hanrahan JW, Orłowski J.** Plasma membrane  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger isoforms (NHE-1, -2, and -3) are differentially responsive to second messenger agonists of the protein kinase A and C pathways. *J. Biol. Chem.* 270(49): 29209-29216, 1995.

**Kandasamy RA, Orłowski J.** Genomic organization and glucocorticoid transcriptional activation of the rat  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger Nhe3 gene. *J. Biol. Chem.* 271(18): 10551-10559, 1996.

**Kane PM.** Disassembly and reassembly of the yeast vacuolar  $\text{H}^+$ -ATPase in vivo. *J. Biol. Chem.* 270(28): 17025-17032, 1995.

**Kane PM.** Regulation of V-ATPases by reversible disassembly. *FEBS Lett.* 469(2-3): 137-141, 2000.

**Kang DH, Anderson S, Kim YG, Mazzalli M, Suga S, Jefferson JA, Gordon KL, Oyama TT, Hughes J, Hugo C, Kerjaschki D, Schreiner GF, Johnson RJ.** Impaired angiogenesis in the aging kidney: vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 in renal disease. *Am. J. Kidney Dis.* 37(3): 601-611, 2001.

**Karet FE, Finberg KE, Nelson RD, Nayir A, Mocan H, Sanjad SA, Rodriguez-Soriano J, Santos F, Cremers CW, Di Pietro A, Hoffbrand BI, Winiarski J, Bakkaloglu A, Ozen S, Dusunsel R, Goodyer P, Hulton SA, Wu DK, Skvorak AB, Morton CC, Cunningham MJ, Jha V, Lifton RP.** Mutations in the gene encoding B1 subunit of  $\text{H}^+$ -ATPase cause renal tubular acidosis with sensorineural deafness. *Nat. Genet.* 21(1): 84-90, 1999.

**Kasiske BL.** Relationship between vascular disease and age-associated changes in the human kidney. *Kidney Int.* 31(5): 1153-1159, 1987.

**Kawasaki-Nishi S, Nishi T, Forgac M.** Proton translocation driven by ATP hydrolysis in V-ATPases. *FEBS Lett.* 545(1): 76-85, 2003.

**Kedem O, Katchalsky A.** A physical interpretation of the phenomenological coefficients of membrane permeability. *J. Gen. Physiol.* 45: 143-179, 1961.

**Kemper B, Habener JF, Rich A, Potts JT Jr.** Microtubules and the intracellular conversion of proparathyroid hormone to parathyroid hormone. *Endocrinology*. 96(4): 903-912, 1975.

- Kerr JB.** Atlas of Functional Histology. Mosby Int., Londres, págs.282-298, 1999.
- Khalifa S, Mills S, Hruska KA.** Stimulation of calcium uptake by parathyroid hormone in renal brush-border membrane vesicles. Relationship to membrane phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 258(23): 14400-14406, 1983.
- Khan I.** Topology of the C-terminus of sodium hydrogen exchanger isoform-1: presence of an extracellular epitope. *Arch. Biochem. Biophys.* 391(1): 25-29, 2001.
- Khan I, Cheng B.** Selective suppression of renal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform-3 by prolonged stimulation of rats with adrenocorticotrophic hormone. *Endocrine* 16(3): 189-194, 2001.
- Khaw KT.** Healthy aging. *BMJ.* 315(7115): 1090-1096, 1997.
- Kielstein JT, Bode-Boger SM, Frolich JC, Ritz E, Haller H, Fliser D.** Asymmetric dimethylarginine, blood pressure, and renal perfusion in elderly subjects. *Circulation.* 107(14): 1891-1895, 2003.
- Kinne-Saffran E, Kinne R.** Presence of bicarbonate stimulated ATPase in the brush border microvillus membranes of the proximal tubule. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 146(3): 751-753, 1974.
- Kinne-Saffran E; Beauwens R, Kinne R.** An ATP-Driven proton pump in brush border membranes from rat renal cortex. *J. Membrane Biol.* 64: 67-76, 1982.
- Kinne-Saffran E.** Renal H<sup>+</sup>ATPases. Bicarbonate, chloride and proton transport systems. *Annals of the New York Academy of Sciences.* Vol 574. Parte 3, págs 189-200, 1989.
- Kinsella JL, Aronson PS.** Properties of the Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger in renal microvillus membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* 238: F461-F469, 1980.
- Kinsella JL, Aronson PS.** Amiloride inhibition of the Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger in renal microvillus membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* 241(4): F374-F379, 1981.
- Kinsella JL, Sacktor B.** Renal brush-border Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange activity in the aging rat. *Am. J. Physiol.* 252: R681-R686, 1987.
- Kirkwood TBL, Wolff SP.** The biological basis of ageing. *Age Ageing* 24: 167-171, 1995.
- Klahr S, Hammerman MR, Martin K, Slatopolsky E.** Renal effects of parathyroid hormone and calcitonin. *Renal Endocrinology.* M. J. Dunn, Baltimore/London: Williams and Wilkins, págs. 269-322, 1983.

**Klanke CA, Su YR, Callen DF, Wang Z, Meneton P, Baird N, Kandasamy RA, Orłowski J, Otterud BE, Leppert M, et al.** Molecular cloning and physical and genetic mapping of a novel human Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (NHE5/SLC9A5) to chromosome 16q22.1. *Genomics*. 25(3): 615-622, 1995.

**Kliscic J, Hu MC, Nief V, Reyes L, Fuster D, Moe OW, Ambuhl PM.** Insulin activates Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 3: biphasic response and glucocorticoid dependence. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 283(3): F532-F539, 2002.

**Kone BC, Baylis C.** Biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide in the normal kidney. *Am. J. Physiol.* 272(5 Pt 2): F561-F578, 1997.

**Kone BC, Higham S.** Nitric oxide inhibits transcription of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase alpha1-subunit gene in an MTAL cell line. *Am. J. Physiol.* 276(4 Pt 2): F614-F621, 1999.

**Kone BC.** Localization and regulation of nitric oxide synthase isoforms in the kidney. *Semin. Nephrol.* 19(3): 230-241, 1999.

**Kositzke JA.** A question of balance--dehydration in the elderly. *J. Gerontol. Nurs.* 16(5): 4-11, 1990.

**Krapf R, Solioz M.** Na/H antiporter mRNA expression in single nephron segments of rat kidney cortex. *J. Clin. Invest.* 88(3): 783-788, 1991.

**Krug AW, Papavassiliou F, Hopfer U, Ullrich KJ, Gekle M.** Aldosterone stimulates surface expression of NHE3 in renal proximal brush borders. *Pflugers Arch.* 446(4): 492-496, 2003.

**Kurashima K, Yu FH, Cabado AG, Szabo EZ, Grinstein S, Orłowski J.** Identification of sites required for down-regulation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE3 activity by cAMP-dependent protein kinase. phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *J. Biol. Chem.* 272(45): 28672-28679, 1997.

**Kurashima K, Szabo EZ, Lukacs G, Orłowski J, Grinstein S.** Endosomal recycling of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE3 isoform is regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 273(33): 20828-20836, 1998.

**Kurashima K, D'Souza S, Szaszi K, Ramjeesingh R, Orłowski J, Grinstein S.** The apical Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform NHE3 is regulated by the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 274(42): 29843-29849, 1999.

**Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.

- Laghmani K, Borensztein P, Ambül P, Froissart M, Bichara M, Moe OW, Alpern RJ, Paillard M.** Chronic metabolic acidosis enhances NHE-3 protein abundance and transport activity in the rat thick ascending limb by increasing NHE-3 mRNA. *J. Clin. Invest.* 99(1): 24-30, 1997.
- Laghmani K, Preisig PA, Alpern RJ.** The role of endothelin in proximal tubule proton secretion and the adaptation to a chronic metabolic acidosis. *J. Nephrol.* 15(5): S75-S87, 2002.
- Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T.** Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 89(14): 6348-6352, 1992.
- Lamb EJ, O’Riordan SE, Delaney MP.** Kidney function in older people: pathology, assessment and management. *Clin. Chim. Acta* 334: 25-40, 2003.
- Lamprecht G, Weinman EJ, Yun CH.** The role of NHERF and E3KARP in the cAMP-mediated inhibition of NHE3. *J. Biol. Chem.* 273(45): 29972-29978, 1998.
- Lang KS, Wagner CA, Haddad G, Burnekova O, Geibel JP.** Intracellular pH activates membrane-bound Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger and vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in human embryonic kidney (HEK) cells. *Cell Physiol. Biochem.* 13: 257-262, 2003.
- Ledoussal C, Lorenz JN, Nieman ML, Soleimani M, Schultheis PJ, Shull GE.** Renal salt wasting in mice lacking NHE3 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger but not in mice lacking NHE2. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 281(4): F718-F727, 2001.
- Leng XH, Nishi T, Forgac M.** Transmembrane topography of the 100-kDa a subunit (Vph1p) of the yeast vacuolar proton-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* 274(21): 14655-14661, 1999.
- Levi M, Rowe JW.** Renal function and dysfunction in aging. *The kidney: Physiology and Pathophysiology.* Seldin DW, Giebisch G. Raven Press, Ltd., New York, Págs 3433-3456, 1992.
- Levine DZ, Iacovitti M, Burns KD, Zhang X.** Real-time profiling of kidney fluid nitric oxide concentrations in vivo. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 281: F189-F194, 2001.
- Levine SA, Nath SK, Yun CH, Yip JW, Montrose M, Donowitz M, Tse CM.** Separate C-terminal domains of the epithelial specific brush border Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform NHE3 are involved in stimulation and inhibition by protein kinases/growth factors. *J. Biol. Chem.* 270(23): 13716-13725, 1995.
- Liang M, Knox FG.** Production and functional roles of nitric oxide in the proximal tubule. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278(5): R1117-R1124, 2000.

- Linas SL, Repine JE.** Endothelial cells regulate proximal tubule epithelial cell sodium transport. *Kidney Int.* 55(4): 1251-1258, 1999.
- Lindeman RD, Tobin JD, Shock NW.** Association between blood pressure and the rate of decline in renal function with age. *Kidney Int.* 26(6): 861-868, 1984.
- Lindeman RD, Tobin J, Shock NW.** Longitudinal studies on the rate of decline in renal function with age. *J. Am. Geriatr. Soc.* 33(4): 278-285, 1985.
- Lindeman RD, Goldman R.** Anatomic and physiologic age changes in the kidney. *Exp. Gerontol.* 21(4-5): 379-406, 1986.
- Lindeman RD.** Renal and urinary tract function. *Handbook of Physiology, Section 11: Aging.* Masoro EJ, New York: Oxford University Press, págs 485-503, 1995.
- Liu FY, Cogan MG.** Angiotensin II stimulation of hydrogen ion secretion in the rat early proximal tubule. Modes of action, mechanism, and kinetics. *J. Clin. Invest.* 82(2): 601-607, 1988.
- Liu Y, Edwards RH.** The role of vesicular transport proteins in synaptic transmission and neural degeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* 20: 125-156, 1997.
- Long DA, Mu W, Price KL, Johnson RJ.** Blood vessels and the aging kidney. *Nephron Exp. Nephrol.* 101(3): e95-e99, 2005a.
- Long DA, Newaz MA, Prabhakar SS, Price KL, Truong LD, Feng L, Mu W, Oyekan AO, Johnson RJ.** Loss of nitric oxide and endothelial-derived hyperpolarizing factor-mediated responses in aging. *Kidney Int.* 68(5): 2154-2163, 2005b.
- Lorenz JN, Schultheis PJ, Traynor T, Shull GE, Schnermann J.** Micropuncture analysis of single-nephron function in NHE3-deficient mice. *Am. J. Physiol.* 277(3 Pt 2): F447-F453, 1999.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurements with the Folin phenol reagents. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.
- Lu M, Giebisch G, Wang W.** Nitric oxide-induced hyperpolarization stimulates low-conductance Na<sup>+</sup> channel of rat CCD. *Am. J. Physiol.* 272(4 Pt 2): F498-F504, 1997.
- Lu M, Holliday S, Zhang L, Dunn WA, Gluck SL.** Interaction between aldolase and Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *J. Biol. Chem.* 276: 30407-30413, 2001.
- Lu M, Vergara S, Zhang L, Holliday LS, Aris J, Gluck SL.** The amino-terminal domain of the E subunit of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase (V-ATPase) interacts with the H subunit and is required for V-ATPase function. *J. Biol. Chem.* 277(41): 38409-38415, 2002.

**Mac Laughlin M, Damasco MC, Igarreta P, Amorena C.** In vitro and in vivo evaluation of proximal tubular acidification in aging rats. *Am. J. Physiol.* 280: R1627-R1631, 2001.

**Mackovic-Basic M, Kurtz I.** H<sup>+</sup>/Base transport in the proximal straight tubule and thin descending limb of Henle. *Seminars in Nephrology* 10: 122-131, 1990.

**Maddox DA, Atherton LJ, Deen WM, Gennari FJ.** Proximal HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> reabsorption and the determinants of tubular and capillary P<sub>CO2</sub> in the rat. *Am. J. Physiol.* 247(1 Pt 2): F73-F81, 1984.

**Maddox DA, Gennari FJ.** Load dependence of HCO<sub>3</sub> and H<sub>2</sub>O reabsorption in the early proximal tubule of the Munich-Wistar rat. *Am. J. Physiol.* 248(1 Pt 2): F113-F121, 1985.

**Mahnensmith RL, Aronson PS.** The plasma membrane sodium-hydrogen exchanger and its role in physiological and pathophysiological processes. *Circ. Res.* 56(6): 773-788, 1985.

**Mahon MJ, Donowitz M, Yun CC, Segre GV.** Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor 2 directs parathyroid hormone 1 receptor signalling. *Nature* 417(6891): 858-861, 2002.

**Malnic G, Geibel JP.** Cell pH and H<sup>+</sup> secretion by S3 segment of mammalian kidney: role of H<sup>+</sup>-ATPase and Cl<sup>-</sup>. *J. Membrane Biol.* 178: 115-125, 2000.

**Manning RD Jr, Hu L, Reckelhoff JF.** Role of nitric oxide in the arterial pressure and renal adaptations to long-term changes in sodium intake. *Am. J. Physiol.* 272(4 Pt 2): R1162-R1169, 1997.

**Marcus R, Madvig P, Young G.** Age-related changes in parathyroid hormone and parathyroid hormone action in normal humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 58(2): 223-230, 1984.

**Masoro EJ.** Biology of Aging: Facts, Thoughts and Experimental Approaches. *Lab. Invest.* 65: 500-510, 1991.

**McKee M, Scavone C, Nathanson JA.** Nitric oxide, cGMP, and hormone regulation of active sodium transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 12056-12060, 1994.

**McKinney TD, Myers P.** PTH inhibition of bicarbonate transport by proximal convoluted tubules. *Am. J. Physiol.* 239 (*Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 8): F127-F134, 1980a.

**McKinney TD, Myers P.** Bicarbonate transport by proximal tubules: effect of parathyroid hormone and dibutyryl cyclic AMP. *Am. J. Physiol.* 238 (*Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 7): F166-F174, 1980b.

**McKinney TD, Myers P.** Effect of calcium and phosphate on bicarbonate and fluid transport by proximal tubules in vitro. *Kidney Int.* 21(3): 433-438, 1982.



**Mellman I.** The importance of being acid: the role of acidification in intracellular membrane traffic. *J. Exp. Biol.* 172: 39-45, 1992.

**Merzendorfer H, Reineke S, Zhao XF, Jacobmeier B, Harvey WR, Wieczorek H.** The multigene family of the tobacco hornworm V-ATPase: novel subunits a, C, D, H, and putative isoforms. *Biochim. Biophys. Acta.* 1467(2): 369-379, 2000.

**Miao D, Tong XK, Chan GK, Panda D, McPherson PS, Goltzman D.** Parathyroid hormone-related peptide stimulates osteogenic cell proliferation through protein kinase C activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 276(34): 32204-32213, 2001.

**Miyazaki E, Sakaguchi M, Wakabayashi S, Shigekawa M, Mihara K.** NHE6 protein possesses a signal peptide destined for endoplasmic reticulum membrane and localizes in secretory organelles of the cell. *J. Biol. Chem.* 276(52): 49221-49227, 2001.

**Moe OW, Amemiya M, Yamaji Y.** Activation of protein kinase A acutely inhibits and phosphorylates Na/H exchanger NHE-3. *J. Clin. Invest.* 96(5): 2187-94, 1995.

**Moe OW.** Acute regulation of proximal tubule apical membrane Na/H exchanger NHE-3: role of phosphorylation, protein trafficking, and regulatory factors. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10(11): 2412-2425, 1999.

**Moriyama Y, Nelson N.** The purified ATPase from chromaffin granule membranes is an anion-dependent proton pump. *J. Biol. Chem.* 262(19): 9175-9180, 1987.

**Muff R, Fischer JA, Biber J, Murer H.** Parathyroid hormone receptors in control of proximal tubule function. *Annu. Rev. Physiol.* 54: 67-79, 1992.

**Mujais SK, Kauffman S, Katz AI.** Angiotensin II binding sites in individual segments of the rat nephron. *J. Clin. Invest.* 77(1): 315-318, 1986.

**Murer H, Hopfer U, Kinne R.** Sodium/proton antiport in brush-border-membrane vesicles isolated from rat small intestine and kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9(1): 143-150, 1998.

**Myers M, Forgac M.** Assembly of the peripheral domain of the bovine vacuolar H<sup>+</sup>-adenosine triphosphatase. *J. Cell. Physiol.* 156(1): 35-42, 1993.

**Nakamura S, Amlal H, Schultheis PJ, Galla JH, Shull GE, Soleimani M.** HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> reabsorption in renal collecting duct of NHE-3-deficient mouse: a compensatory response. *Am. J. Physiol.* 276(6 Pt 2):F914-F921, 1999.

**Nakamura N, Tanaka S, Teko Y, Mitsui K, Kanazawa H.** Four Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoforms are distributed to Golgi and post-Golgi compartments and are involved in organelle pH regulation. *J. Biol. Chem.* 280(2): 1561-72, 2005.

- Nakhoul NL, Hamm LL.** Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in the kidney. *J. Nephrol.* 15: S22-S31, 2002.
- Nava E, Llinas MT, Gonzalez JD, Salazar FJ.** Nitric oxide synthase activity in renal cortex and medulla of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Hypertens.* 9(12 Pt 1): 1236-1239, 1996.
- Nelson N.** Structure, molecular genetics, and evolution of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases. *J. Bioenerg. Biomembr.* 21(5): 553-571, 1989.
- Nelson N.** Structural conservation and functional diversity of V-ATPases. *J. Bioenerg. Biomembr.* 24(4): 407-414, 1992.
- Nelson N, Harvey WR.** Vacuolar and plasma membrane Proton-Adenosinetriphosphatases. *Physiological Reviews* 79: 361-385, 1999.
- Nelson N, Perzov N, Cohen A, Hagai K, Padler V, Nelson H.** The cellular biology of proton-motive force generation by V-ATPases. *J. Exp. Biol.* 203(Pt 1): 89-95, 2000.
- Nelson RD, Guo XL, Masood K, Brown D, Kalkbrenner M, Gluck S.** Selectively amplified expression of an isoform of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase 56-kilodalton subunit in renal intercalated cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 89(8): 3541-3545, 1992.
- Nishi T, Forgac M.** The vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases--nature's most versatile proton pumps. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3(2): 94-103, 2002.
- Numata M, Petrecca K, Lake N, Orłowski J.** Identification of a mitochondrial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *J. Biol. Chem.* 273(12): 6951-6959, 1998.
- Numata M, Orłowski J.** Molecular cloning and characterization of a novel (Na<sup>+</sup>·K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> exchanger localized to the trans-Golgi network. *J. Biol. Chem.* 276(20): 17387-17394, 2001.
- Offermanns S, Iida-Klein A, Segre GV, Simon MI.** G alpha q family members couple parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide and calcitonin receptors to phospholipase C in COS-7 cells. *Mol. Endocrinol.* 10(5): 566-574, 1996.
- Orłowski J, Kandasamy RA, Shull GE.** Molecular cloning of putative members of the Na/H exchanger gene family. cDNA cloning, deduced amino acid sequence, and mRNA tissue expression of the rat Na/H exchanger NHE-1 and two structurally related proteins. *J. Biol. Chem.* 267(13): 9331-9339, 1992.
- Orłowski J.** Heterologous expression and functional properties of amiloride high affinity (NHE-1) and low affinity (NHE-3) isoforms of the rat Na/H exchanger. *J. Biol. Chem.* 268(22): 16369-16377, 1993.

- Orlowski J, Grinstein S.** Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers of mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 272(36): 22373-22376, 1997.
- Orlowsky M, Meister A.** Isolation of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase from hog kidney. *J. Biol. Chem.* 240: 338-347, 1965.
- Ortiz PA, Garvin JL.** Role of nitric oxide in the regulation of nephron transport. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 282(5): F777-F784, 2002.
- Orwoll ES, Meier DE.** Alterations in calcium, vitamin D, and parathyroid hormone physiology in normal men with aging: relationship to the development of senile osteopenia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 63(6): 1262-1269, 1986.
- Pang T, Su X, Wakabayashi S, Shigekawa M.** Calcineurin homologous protein as an essential cofactor for Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers. *J. Biol. Chem.* 276(20): 17367-17372, 2001.
- Pang T, Wakabayashi S, Shigekawa M.** Expression of calcineurin B homologous protein 2 protects serum deprivation-induced cell death by serum-independent activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *J. Biol. Chem.* 277(46): 43771-43777, 2002.
- Papadaki M, Tilton RG, Eskin SG, McIntire LV.** Nitric oxide production by cultured human aortic smooth muscle cells: stimulation by fluid flow. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 274: H616-H626, 1998.
- Papper S.** The effects of age in reducing renal function. *Geriatrics.* 28(5): 83-87, 1973.
- Pastoriza-Muñoz E, Harrington RM, Graber ML.** Parathyroid hormone decrease HCO<sub>3</sub> reabsorption in the rat proximal tubule by stimulating phosphatidylinositol metabolism and inhibiting base exit. *J. Clin. Invest.* 89: 1485-1495, 1992.
- Pathak BG, Shull GE, Jenkins NA, Copeland NG.** Mouse chromosomal location of four Na/H exchanger isoform genes. *Genomics* 31(2): 261-263, 1996.
- Pedersen PA, Carafoli E.** Ion motive ATPases. I. Ubiquity properties and significance to cell function. *Trends Biochem. Sci.* 12: 146-150, 1987.
- Peng TC, Garner SC, Hirsch PF, Posillico JT.** Cytochemical bioassay of circulating concentrations of rat parathyroid hormone: application to a study of age and sex. *J. Bone Miner. Res.* 1(4): 351-357, 1986.
- Peng Y, Moe OW, Chu T, Preisig PA, Yanagisawa M, Alpern RJ.** ETB receptor activation leads to activation and phosphorylation of NHE3. *Am. J. Physiol.* 276(4 Pt 1): C938-45, 1999.

- Peti-Peterdi J, Chambrey R, Bebok Z, Biemesderfer D, St John PL, Abrahamson DR, Warnock DG, Bell PD.** Macula densa Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange activities mediated by apical NHE2 and basolateral NHE4 isoforms. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 278(3): F452-F463, 2000.
- Pizzonia JH, Biemesderfer D, Abu-Alfa AK, Wu MS, Exner M, Isenring P, Igarashi P, Aronson PS.** Immunochemical characterization of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform NHE4. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 275(44): F510-F517, 1998
- Pollock AS, Warnock DG, Strewler GJ.** Parathyroid hormone inhibition of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> antiporter activity in a cultured renal cell line. *Am. J. Physiol.* 250 (*Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 19): F217-F225, 1986.
- Ponting CP, Phillips C, Davies KE, Blake DJ.** PDZ domains: targeting signalling molecules to sub-membranous sites. *Bioessays.* 19(6): 469-479, 1997.
- Powell B, Graham LA, Stevens TH.** Molecular characterization of the yeast vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase proton pore. *J. Biol. Chem.* 275(31): 23654-23660, 2000.
- Prasad R, Kinsella JL, Sacktor B.** Renal adaptation to metabolic acidosis in senescent rats. *Am. J. Physiol.* 255(6 Pt 2): F1183-F1190, 1988.
- Preisig PA, Ives HE, Cragoe EJ Jr, Alpern RJ, Rector FC Jr.** Role of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in rat proximal tubule bicarbonate absorption. *J. Clin. Invest.* 80(4): 970-978, 1987.
- Preisig PA, Rector FC Jr.** Role of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> antiport in rat proximal tubule NaCl absorption. *Am. J. Physiol.* 255(3 Pt 2): F461-F465, 1988.
- Randall SK, Sze H.** Properties of the partially purified tonoplast H<sup>+</sup>-pumping ATPase from oat roots. *J. Biol. Chem.* 261(3): 1364-1371, 1986.
- Reckelhoff JF, Samsell L, Dey R, Racusen L, Baylis C.** The effect of aging on glomerular hemodynamics in the rat. *Am. J. of Kidney Diseases* 20: 70-75, 1992.
- Reckelhoff JF, Kellum JA, Blanchard EJ, Bacon EE, Wesley AJ, Kruckeberg WC.** Changes in nitric oxide precursor, L-arginine, and metabolites, nitrate and nitrite, with aging. *Life Sci* 55(24): 1895-1902, 1994.
- Rector FC.** Sodium, bicarbonate, and chloride absorption by the proximal tubule. *Am. J. Physiol.* 244: F461-F471, 1983.
- Reczek D, Berryman M, Bretscher A.** Identification of EBP50: A PDZ-containing phosphoprotein that associates with members of the ezrin-radixin-moesin family. *J. Cell Biol.* 139(1): 169-179, 1997.

- Reilly AM, Harris PJ, Williams DA.** Biphasic effect of angiotensin II on intracellular sodium concentration in rat proximal tubules. *Am. J. Physiol.* 269(3 pt 2): F374-F380, 1995.
- Reithmeier RA.** Mammalian exchangers and co-transporters. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6(4): 583-594. 1994.
- Ribstein J, Du Cailar G, Mimran A.** Glucose tolerance and age-associated decline in renal function of hypertensive patients. *J. Hypertens.* 19(12): 2257-2264, 2001.
- Roczniak A, Burns KD.** Nitric oxide stimulates guanylate cyclase and regulates sodium transport in rabbit proximal tubule. *Am. J. Physiol.* 270(1 Pt 2): F106-F115, 1996.
- Rolls BJ, Phillips PA.** Aging and disturbances of thirst and fluid balance. *Nutr. Rev.* 48(3): 137-144, 1990.
- Romero JC, Lahera V, Salom MG, Biondi ML.** Role of endothelium-derived relaxing factor nitric oxide on renal function. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2: 1371-1387, 1992.
- Ross MH, Kaye GI, Pawlina W.** Histología. Ed Panamericana, 2005.
- Rotin D, Grinstein S.** Impaired cell volume regulation in  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  exchange-deficient mutants. *Am. J. Physiol.* 257(6 Pt 1): C1158-C1165, 1989.
- Rowe JW, Shock NW, DeFronzo RA.** The influence of age on the renal response to water deprivation in man. *Nephron* 17(4): 270-278, 1976.
- Ruiz OS, Arruda JA, Talor Z.**  $\text{Na-HCO}_3$  cotransport and  $\text{Na-H}$  antiporter in chronic respiratory acidosis and alkalosis. *Am. J. Physiol.* 256(3 Pt 2): F414-F420, 1989.
- Saccomani G, Mitchell KD, Navar LG.** Angiotensin II stimulation of  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  exchange in proximal tubule cells. *Am. J. Physiol.* 258(5 Pt 2): F1188-F1195, 1990.
- Sasaki S, Shiigai T, Takeuchi J.** Intracellular pH in the isolated perfused rabbit proximal straight tubule. *Am. J. Physiol.* 249: F417-F423, 1985.
- Sacktor B, Kinsella JL.** Hormonal effects on sodium cotransport systems. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 456: 438-444, 1985.
- Sardet C, Franchi A, Pouyssegur J.** Molecular cloning, primary structure, and expression of the human growth factor-activatable  $\text{Na}^+\text{/H}^+$  antiporter. *Cell.* 56(2): 271-280, 1989.
- Schafer JA.** Fluid absorption in the kidney proximal tubule. *News Physiol. SCI.* 2: 22-26, 1987.

**Schlesinger PH, Blair HC, Teitelbaum SL, Edwards JC.** Characterization of the osteoclast ruffled border chloride channel and its role in bone resorption. *J. Biol. Chem.* 272(30): 18636-18643, 1997.

**Scholz W, Albus U, Counillon L, Gogelein H, Lang HJ, Linz W, Weichert A, Scholkens BA.** Protective effects of HOE642, a selective sodium-hydrogen exchange subtype 1 inhibitor, on cardiac ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc. Res.* 29(2): 260-268, 1995.

**Schoner W, von Ilberg C, Kramer R, Seubert W.** On the mechanism of Na<sup>+</sup>- and K<sup>+</sup> stimulated Hydrolysis of Adenosine Triphosphate. *European J. Biochem.* 1: 334-343, 1967.

**Schultheis PJ, Clarke LL, Meneton P, Miller ML, Soleimani M, Gawenis LR, Riddle TM, Duffy JJ, Doetschman T, Wang T, Giebisch G, Aronson PS, Lorenz JN, Shull GE.** Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *Nat. Genet.* 19(3): 282-285, 1998.

**Schultz SG.** Sodium-coupled solute transport of small intestine: a status report. *Am. J. Physiol.* 233(4): E249-E254, 1977.

**Schuster VL.** Bicarbonate reabsorption and secretion in the cortical and outer medullary collecting tubule. *Semin. Nephrol.* 10(2): 139-147, 1990.

**Schwark JR, Jansen HW, Lang HJ, Krick W, Burckhardt G, Hropot M.** S3226, a novel inhibitor of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger subtype 3 in various cell types. *Pflugers Arch.* 436(5): 797-800, 1998.

**Schwartz GJ.** Na<sup>+</sup>-dependent H<sup>+</sup> efflux from proximal tubule: evidence for reversible Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange. *Am. J. Physiol.* 241(4): F380-F385, 1981.

**Schwindinger WF, Fredericks J, Watkins L, Robinson H, Bathon JM, Pines M, Suva LJ, Levine MA.** Coupling of the PTH/PTHrP receptor to multiple G-proteins. Direct demonstration of receptor activation of Gs, Gq/11, and Gi(1) by [alpha-<sup>32</sup>P]GTP-gamma-azidoanilide photoaffinity labeling. *Endocrine.* 8(2): 201-209, 1998.

**Shah M, Gupta N, Dwarakanath V, Moe OW, Baum M.** Ontogeny of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter activity in rat proximal convoluted tubules. *Pediatr. Res.* 48(2): 206-210, 2000.

**Shock NW.** Homeostatic disturbances and adaptations in aging. *Bul. Swiss. Acad. Med. Sci.* 24: 284-298, 1986.

**Sigrist-Nelson K, Murer H, Hopfer U.** Active alanine transport in isolated brush border membranes. *J. Biol. Chem.* 250(14): 5674-5680, 1975.

**Smith AN, Skaug J, Choate KA, Nayir A, Bakkaloglu A, Ozen S, Hulton SA, Sanjad SA, Al-Sabban EA, Lifton RP, Scherer SW, Karet FE.** Mutations in ATP6N1B, encoding a new kidney vacuolar proton pump 116-kD subunit, cause recessive distal renal tubular acidosis with preserved hearing. *Nat. Genet.* 26(1): 71-75, 2000.

**Smith AN, Finberg KE, Wagner CA, Lifton RP, Devonald MA, Su Y, Karet FE.** Molecular cloning and characterization of Atp6n1b: a novel fourth murine vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ -subunit gene. *J. Biol. Chem.* 276(45): 42382-42388, 2001.

**Smith AN, Borthwick KJ, Karet FE.** Molecular cloning and characterization of novel tissue-specific isoforms of the human vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase C, G and d subunits, and their evaluation in autosomal recessive distal renal tubular acidosis. *Gene.* 297(1-2): 169-177, 2002.

**Smith HW.** *The kidney. Structure and function in health and disease.* New York, Oxford University Press, 1951.

**Soleimani M, Aronson PS.** Ionic mechanism of Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransport in rabbit renal basolateral membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 264(31): 18302-18308, 1989.

**Soleimani M, Bergman JA, Hosford MA, McKinney TD.** Potassium depletion increases luminal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange and basolateral Na<sup>+</sup>:CO<sub>3</sub>=:HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransport in rat renal cortex. *J. Clin. Invest.* 86(4): 1076-1083, 1990.

**Soleimani M, Bookstein C, McAteer JA, Hattabaugh YJ, Bizal GL, Musch MW, Villereal M, Rao MC, Howard RL, Chang EB.** Effect of high osmolality on Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in renal proximal tubule cells. *J. Biol. Chem.* 269(22): 15613-15618, 1994.

**Soleimani M, Bookstein C, Singh G, Rao MC, Chang EB, Bastani B.** Differential regulation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange and H<sup>+</sup>-ATPase by pH and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> in kidney proximal tubules. *J. Membr. Biol.* 144(3): 209-216, 1995.

**Stankovic KM, Brown D, Alper SL, Adams JC.** Localization of pH regulating proteins H<sup>+</sup>ATPase and Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger in the guinea pig inner ear. *Hear Res.* 114(1-2): 21-34, 1997.

**Stanton BA, Giebisch GH.** Renal Potassium transport. *Handbook of Physiology, Renal Physiology.* Windhager EE, American Physiological Society, , Oxford Press University, New York, USA, 1992.

**Steiner AL, Pagliara AS, Chase LR, Kipnis DM.** Radioimmunoassay for cyclic nucleotides. II Adenosine 3'-5'-monophosphate and guanosine 3'-5'-monophosphate in mammalian tissues and body fluids. *J. Biol. Chem.* 247(4): 1114-1120, 1972.

**Stevens TH, Forgac M.** Structure, function and regulation of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 13: 779-808, 1997.

**Stone DK, Xie X-S.** Proton translocating ATPases: Issues in structure and function. *Kidney Int.* 33: 767-774, 1988.

**Stone DK, Crider BP, Xie X-S.** Structural properties of vacuolar proton pumps. *Kidney Int.* 38: 649-653, 1990.

**Stoos BA, Carretero OA, Farhy RD, Scicli G, Garvin JL.** Endothelium-derived relaxing factor inhibits transport and increases cGMP content in cultured mouse cortical collecting duct cells. *J. Clin. Invest.* 89: 761-765, 1992.

**Sumner JP, Dow JA, Earley FG, Klein U, Jager D, Wieczorek H.** Regulation of plasma membrane V-ATPase activity by dissociation of peripheral subunits. *J. Biol. Chem.* 270(10): 5649-5653, 1995.

**Szabo EZ, Numata M, Shull GE, Orlowski J.** Kinetic and pharmacological properties of human brain Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 5 stably expressed in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 275(9): 6302-6307, 2000.

**Szaszi K, Grinstein S, Orlowski J, Kapus A.** Regulation of the epithelial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform by the cytoskeleton. *Cell Physiol. Biochem.* 10(5-6): 265-272, 2000.

**Thomas SE, Anderson S, Gordon KL, Oyama TT, Shankland SJ, Johnson RJ.** Tubulointerstitial disease in aging: evidence for underlying peritubular capillary damage, a potential role for renal ischemia. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9(2): 231-242, 1998.

**Tomashek JJ, Brusilow WS.** Stoichiometry of Energy Coupling by Proton-Translocating ATPases: A History of Variability. *J. Bioenerg. Biomembr.* 32(5): 493-500, 2000.

**Trombetta ES, Ebersold M, Garrett W, Pypaert M, Mellman I.** Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science.* 299(5611): 1400-1403, 2003.

**Tse CM, Ma AI, Yang VW, Watson AJ, Levine S, Montrose MH, Potter J, Sardet C, Pouyssegur J, Donowitz M.** Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the rabbit ileal villus cell basolateral membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *EMBO J.* 10(8): 1957-1967, 1991.

**Tse CM, Brant SR, Walker MS, Pouyssegur J, Donowitz M.** Cloning and sequencing of a rabbit cDNA encoding an intestinal and kidney-specific Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform (NHE-3). *J. Biol. Chem.* 267(13): 9340-9346, 1992.

**Tse CM, Levine SA, Yun CH, Montrose MH, Little PJ, Pouyssegur J, Donowitz M.** Cloning and expression of a rabbit cDNA encoding a serum-activated ethylisopropylamiloride-resistant epithelial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform (NHE-2). *J. Biol. Chem.* 268(16): 11917-11924, 1993a.



**Tse M, Levine S, Yun C, Brant S, Counillon LT, Pouyssegur J, Donowitz M.** Structure/function studies of the epithelial isoforms of the mammalian Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger gene family. *J. Membr. Biol.* 135(2): 93-108, 1993b.

**Tse CM, Levine SA, Yun CH, Khurana S, Donowitz M.** Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-2 is an O-linked but not an N-linked sialoglycoprotein. *Biochemistry.* 33(44): 12954-12961, 1994.

**Uchida E, Ohsumi Y, Anraku Y.** Purification and properties of H<sup>+</sup>-translocating, Mg<sup>2+</sup>-adenosine triphosphatase from vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 260(2): 1090-1095, 1985.

**Uden P, Halloran B, Daly R, Duh QY, Clark O.** Set-Point for Parathyroid Hormone release increases with postmaturational aging in the rat. *Endocrinology* 131(5): 2251-2256, 1992.

**Ullrich KJ, Rumrich G, Baumann K.** Renal proximal tubular buffer-(glycodiazine) transport. Inhomogeneity of local transport rate, dependence on sodium, effect of inhibitors and chronic adaptation. *Pflugers Arch.* 357(3-4): 149-163, 1975.

**Ullrich KJ, Capasso G, Rumrich G, Papavassiliou R, Kloss S.** Coupling between proximal tubular transport processes: studies with ouabain, SITS, and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> free solutions. *Pflugers Arch.* 368(3): 245-52, 1977.

**Ullrich KJ.** Sugar, amino acid, and Na<sup>+</sup> cotransport in the proximal tubule. *Annu. Rev. Physiol.* 41: 181-195, 1979.

**Valles PG, Manucha WA.** H<sup>+</sup>-ATPase activity on unilateral ureteral obstruction: interaction of endogenous nitric oxide and angiotensin II. *Kidney Int.* 58(4):1641-1651, 2000.

**Vallon V, Schwark JR, Richter K, Hropot M.** Role of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE3 in nephron function: micropuncture studies with S3226, an inhibitor of NHE3. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 278(3): F375-F379, 2000.

**Van Liew JB, Davis FB, Davis PJ, Noble B, Bernardis LL.** Calorie restriction decreases microalbuminuria associated with aging in barrier-raised Fischer 344 rats. *Am. J. Physiol.* 263(3 Pt 2): F554-F561, 1992.

**Vitavska O, Wieczorek H, Merzendorfer H.** A novel role for subunit C in mediating binding of the H<sup>+</sup>-V-ATPase to the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 278(20):18499-18505, 2003.

**von Bayer H, Haberle DA, van Liew JB, Hare D.** Glomerular tubular balance of renal D-glucose transport during hyperglycemia: clearance and micropuncture studies on its characterisation at saturated transport conditions. *Pflugers Arch.* 384(1): 39-47, 1980.

**Wada L, Daly R, Kern D, Halloran B.** Kinetics of 1,25-dihydroxyvitamin D metabolism in the aging rat. *Am. J. Physiol.* 262(6 Pt 1): E906-E910, 1992.

**Wade JB, Welling PA, Donowitz M, Shenolikar S, Weinman EJ.** Differential renal distribution of NHERF isoforms and their colocalization with NHE3, ezrin, and ROMK. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 280(1):C192-198, 2001.

**Wade JB, Liu J, Coleman RA, Cunningham R, Steplock DA, Lee-Kwon W, Pallone TL, Shenolikar S, Weinman EJ.** Localization and interaction of NHERF isoforms in the renal proximal tubule of the mouse. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 285(6): C1494-C1503, 2003.

**Wagner CA, Finberg KE, Breton S, Marshansky V, Brown D, Geibel JP.** Renal vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Physiol. Rev.* 84(4): 1263-1314, 2004.

**Walker JE, Fearnley IM, Gay NJ, Gibson BW, Northrop FD, Powell SJ, Runswick MJ, Saraste M, Tybulewicz VL.** Primary structure and subunit stoichiometry of F1-ATPase from bovine mitochondria. *J. Mol. Biol.* 184(4): 677-701, 1985.

**Wang SY, Moriyama Y, Mandel M, Hulmes JD, Pan YC, Danho W, Nelson H, Nelson N.** Cloning of cDNA encoding a 32-kDa protein. An accessory polypeptide of the H<sup>+</sup>-ATPase from chromaffin granules. *J. Biol. Chem.* 263(33): 17638-17642, 1988.

**Wang T, Chan YL.** Time- and dose-dependent effects of protein kinase C on proximal bicarbonate transport. *J. Membr. Biol.* 117(2): 131-139, 1990.

**Wang Z, Orlowski J, Shull GE.** Primary structure and functional expression of a novel gastrointestinal isoform of the rat Na/H exchanger. *J. Biol. Chem.* 268(16): 11925-11928, 1993.

**Wang T.** Nitric oxide regulates HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> and Na<sup>+</sup> transport by a cGMP-mediated mechanism in the kidney proximal tubule. *Am. J. Physiol.* 272(2 Pt 2): F242-8, 1997.

**Wang T, Yang CL, Abbiati T, Schultheis PJ, Shull GE, Giebisch G, Aronson PS.** Mechanism of proximal tubule bicarbonate absorption in NHE3 null mice. *Am. J. Physiol.* 277(2 Pt 2): F298-F302, 1999.

**Wang T, Hropot M, Aronson PS, Giebisch G.** Role of NHE isoforms in mediating bicarbonate reabsorption along the nephron. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 281(6): F1117-F1122, 2001.

**Wang ZQ, Gluck S.** Isolation and properties of bovine kidney brush border vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. A proton pump with enzymatic and structural differences from kidney microsomal H<sup>+</sup>-ATPase. *J. Biol. Chem.* 265(35): 21957-21965, 1990.

- Warnock DG, Reenstra WW, Yee VJ.** Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter of brush border vesicles: studies with acridine orange uptake. *Am. J. Physiol.* 242(6): F733-F739, 1982.
- Warnock DG, Yang WC, Huang ZQ, Cragoe EJ Jr.** Interactions of chloride and amiloride with the renal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *J. Biol. Chem.* 263(15): 7216-7221, 1988.
- Weinman EJ, Shenolikar S.** Protein kinase C activates the renal apical membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *J. Membr. Biol.* 93(2): 133-139, 1986.
- Weinman EJ, Dubinsky WP, Shenoliak S.** Reconstitution of cAMP-dependent protein kinase regulated renal Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger. *J. Membr. Biol.* 101: 11-18, 1988.
- Weinman EJ, Steplock D, Shenolikar S.** cAMP-mediated inhibition of the renal brush border membrane Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger requires a dissociable phosphoprotein cofactor. *J. Clin. Invest.* 92(4): 1781-1786, 1993.
- Weinman EJ, Steplock D, Wang Y, Shenolikar S.** Characterization of a protein cofactor that mediates protein kinase A regulation of the renal brush border membrane Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger. *J. Clin. Invest.* 95(5): 2143-9, 1995.
- Weinman EJ, Steplock D, Wade JB, Shenoliak S.** Ezrin binding domain-deficient NHERF attenuates cAMP-mediated inhibition of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange in OK cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 281: F374-F380, 2001.
- Whittembury G, Paz-Aliaga A, Biondi A, Carpi-Medina P, Gonzalez E, Linares H.** Pathways for volume flow and volume regulation in leaky epithelia. *Pflugers Arch.* 405 Suppl 1: S17-S22, 1985.
- Wiederkehr MR, Zhao H, Moe OW.** Acute regulation of Na/H exchanger NHE3 activity by protein kinase C: role of NHE3 phosphorylation. *Am. J. Physiol.* 276(5 Pt 1): C1205-17, 1999.
- Wiederkehr MR, Di Sole F, Collazo R, Quinones H, Fan L, Murer H, Helmle-Kolb C, Moe OW.** Characterization of acute inhibition of Na/H exchanger NHE-3 by dopamine in opossum kidney cells. *Kidney Int.* 59(1): 197-209, 2001.
- Wilkens S, Vasilyeva E, Forgac M.** Structure of the vacuolar ATPase by electron microscopy. *J. Biol. Chem.* 274(45): 31804-31810, 1999.
- Wilkens S, Forgac M.** Three-dimensional structure of the vacuolar ATPase proton channel by electron microscopy. *J. Biol. Chem.* 276(47): 44064-44068, 2001.
- Wiske PS, Epstein S, Bell NH, Queener SF, Edmondson J, Johnston CC Jr.** Increases in immunoreactive parathyroid hormone with age. *N. Engl. J. Med.* 300(25): 1419-1421, 1979.

- Woodhall PB, Tisher CC, Simonton CA, Robinson RR.** Relationship between para-aminohippurate secretion and cellular morphology in rabbit proximal tubules. *J. Clin. Invest.* 61: 1320-1329, 1978.
- Wu F, Park F, Cowley AW Jr, Mattson DL.** Quantification of nitric oxide synthase activity in microdissected segments of the rat kidney. *Am. J. Physiol.* 276(6 Pt 2): F874-F881, 1999.
- Wu MS, Biemesderfer D, Giebisch G, Aronson PS.** Role of NHE3 in mediating renal brush border  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$  exchange. Adaptation to metabolic acidosis. *J. Biol. Chem.* 271(51): 32749-32752, 1996.
- Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, Nathan C.** Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 256(5054): 225-228, 1992.
- Xie XS, Stone DK.** Isolation and reconstitution of the clathrin-coated vesicle proton translocating complex. *J. Biol. Chem.* 261(6): 2492-2495, 1986.
- Xie XS, Crider BP, Stone DK.** Isolation of a protein activator of the clathrin-coated vesicle proton pump. *J. Biol. Chem.* 268(33): 25063-25067, 1993.
- Xiong Y, Yuan LW, Deng HW, Li YJ, Chen BM.** Elevated serum endogenous inhibitor of nitric oxide synthase and endothelial dysfunction in aged rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 28(10): 842-847, 2001.
- Xu T, Forgac M.** Microtubules are involved in glucose-dependent dissociation of the yeast vacuolar  $[\text{H}^+]$ -ATPase in vivo. *J. Biol. Chem.* 276(27): 24855-24861, 2001.
- Yasuda R, Noji H, Yoshida M, Kinosita K Jr, Itoh H.** Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F1-ATPase. *Nature.* 410(6831): 898-904, 2001.
- Yip JW, Ko WH, Viberti G, Haganir RL, Donowitz M, Tse CM.** Regulation of the epithelial brush border  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger isoform 3 stably expressed in fibroblasts by fibroblast growth factor and phorbol esters is not through changes in phosphorylation of the exchanger. *J. Biol. Chem.* 272(29): 18473-18480, 1997.
- Yoshitomi K, Fromter E.** Cell pH of rat renal proximal tubule in vivo and the conductive nature of peritubular  $\text{HCO}_3^-$  ( $\text{OH}^-$ ) exit. *Pflugers Arch.* 402(3): 300-305, 1984.
- Yoshitomi K, Burckhardt BC, Fromter E.** Rheogenic sodium-bicarbonate cotransport in the peritubular cell membrane of rat renal proximal tubule. *Pflugers Arch.* 405(4): 360-366, 1985.

**Young G, Marcus R, Minkoff JR, Kim LY, Segre GV.** Age-related rise in parathyroid hormone in man: the use of intact and midmolecule antisera to distinguish hormone secretion from retention. *J. Bone Miner. Res.* 2(5): 367-374, 1987.

**Yu FH, Shull GE, Orlowski J.** Functional properties of the rat Na/H exchanger NHE-2 isoform expressed in Na/H exchanger-deficient Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 268(34): 25536-25541, 1993.

**Yun CH, Tse CM, Nath S, Levine SL, Donowitz M.** Structure/function of mammalian Na-H exchangers— an update. *J. Physiol.* 482(P): 1S-6S, 1995.

**Yun CH, Oh S, Zizak M, Steplock D, Tsao S, Tse CM, Weinman EJ, Donowitz M.** cAMP-mediated inhibition of the epithelial brush border Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger, NHE3, requires an associated regulatory protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94(7): 3010-3015, 1997.

**Yun CH, Lamprecht G, Forster DV, Sidor A.** NHE3 kinase A regulatory protein E3KARP binds the epithelial brush border Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE3 and the cytoskeletal protein ezrin. *J. Biol. Chem.* 273(40): 25856-25863, 1998.

**Zalocchi M, Igarreta P, Calvo JC, Reboucas NA, Damasco MC.** The mechanisms of brush border Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger activation by corticosteroids. *Med. Sci. Monit.* 9(2): BR85-BR90, 2003.

**Zeiske W, Meyer H, Wiczorek H.** Insect midgut K<sup>+</sup> secretion: concerted run-down of apical/basolateral transporters with extra-/intracellular acidity. *J. Exp. Biol.* 205(Pt 4): 463-474, 2002.

**Zhang J, Myers M, Forgac M.** Characterization of the V<sub>0</sub> domain of the coated vesicle (H<sup>+</sup>)-ATPase. *J. Biol. Chem.* 267(14): 9773-9778, 1992a.

**Zhang K, Wang ZQ, Gluck S.** Identification and partial purification of a cytosolic activator of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases from mammalian kidney. *J. Biol. Chem.* 267(14): 9701-9705, 1992b.

**Zhang K, Wang ZQ, Gluck S.** A cytosolic inhibitor of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases from mammalian kidney. *J. Biol. Chem.* 267(21): 14539-14542, 1992c.

**Zhang J, Vasilyeva E, Feng Y, Forgac M.** Inhibition and labeling of the coated vesicle V-ATPase by 2-azido-[<sup>32</sup>P]ATP. *J. Biol. Chem.* 270(26): 15494-15500, 1995.

**Zhang J, Bobulescu IA, Goyal S, Aronson PS, Baum MG, Moe OW.** Characterization of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE8 in cultured renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 293(3): F761-F766, 2007.

**Zhang Y, Mircheff AK, Hensley CB, Magyar CE, Warnock DG, Chambrey R, Yip KP, Marsh DJ, Holstein-Rathlou NH, McDonough AA.** Rapid redistribution and inhibition of renal sodium transporters during acute pressure natriuresis. *Am. J. Physiol.* 270(6 Pt 2): F1004-F1014, 1996.

**Zhao H, Wiederkehr MR, Fan L, Collazo RL, Crowder LA, Moe OW.** Acute inhibition of Na/H exchanger NHE-3 by cAMP. Role of protein kinase a and NHE-3 phosphoserines 552 and 605. *J. Biol. Chem.* 274(7): 3978-3987, 1999.

**Zimolo Z, Montrose MH, Murer H.** H<sup>+</sup> extrusion by an apical vacuolar-type H<sup>+</sup>ATPase in rat renal proximal tubules. *J. Membr. Biol.* 126: 19-26, 1992.

**Zizak M, Lamprecht G, Steplock D, Tariq N, Shenolikar S, Donowitz M, Yun CH, Weinman EJ.** cAMP-induced phosphorylation and inhibition of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 3 (NHE3) are dependent on the presence but not the phosphorylation of NHE regulatory factor. *J. Biol. Chem.* 274(35): 24753-24758, 1999.

**Zizak M, Cavet ME, Bayle D, Tse CM, Hallen S, Sachs G, Donowitz M.** Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE3 has 11 membrane spanning domains and a cleaved signal peptide: topology analysis using in vitro transcription/translation. *Biochemistry.* 39(27): 8102-8112, 2000.

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AMPc	Adenosina-monofosfato-3', 5' cíclico
Ang II	Angiotensina II
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosina 5' trifosfato
BBMV	Vesículas de membrana luminal de túbulo proximal
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato
BSA	Seroalbúmina bovina
BUN	Nitrógeno ureico sanguíneo
CaMK	Proteína quinasa dependiente de Calcio-Calmodulina
Cr <sub>p</sub>	Creatinina plasmática
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
DTT	Ditiotreitol
EDHF	Factor hiperpolarizante del endotelio
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	<i>"Epidermal growth factor"</i>
EIPA	5-N-etil-N-isopropil amiloride
ERM	ezrina/raidixina/moesina
FGF	<i>"Fibroblast growth factor"</i>
GADPH	Gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa
GMPc	Guanosina-monofosfato-3', 5' cíclico
HEPES	Ácido 4-(2-Hidroxietil)-1-piperazineetanosulfónico
HSE	Solución con HEPES, Sacarosa y EDTA
IBMX	Isobutilmetil xantina
IGF	<i>"Insulin-like growth factor"</i>
K <sub>u</sub> <sup>+</sup>	Concentración urinaria de K <sup>+</sup>
kDa	Kilodaltons

MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
Na <sup>+</sup> <sub>u</sub>	Concentración urinaria de Na <sup>+</sup>
NBD-Cl	7-cloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazilcloro
NBT	<i>"Nitro blue tetrazolium"</i>
NEM	N-etilmaleimida
NHE	Intercambiador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>
NHERF	Factor regulador del intercambiador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetasa
eNOS	Óxido nítrico sintetasa endotelial
nNOS	Óxido nítrico sintetasa neuronal
Osm <sub>p</sub>	Osmolaridad plasmática
Osm <sub>u</sub>	Osmolaridad urinaria
PAS	Presión arterial sistólica
pb	Pares de bases
PBS	Solución salina con buffer fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDZ	PSD-95/Dlg/ZO-1
PKA	Proteína quinasa dependiente de AMPc
PKC	Proteína quinasa dependiente de Ca <sup>2+</sup> , diacilglicerol y fosfolípidos
PLE	Polioxietilén lauril éster
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoruro
P <sub>CO2</sub>	Presión parcial de dióxido de carbono
PTH	Hormona paratiroidea
RT-PCR	Transcripción Reversa- Reacción en cadena de la polimerasa
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SDS-PAGE	Dodecil Sulfato de Sodio- Electroforesis en gel de poliacrilamida
TCA	Ácido tricloroacético
TCP	Túbulo contorneado proximal
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilediamina
U <sub>Na+</sub> V	Excreción urinaria de sodio
U <sub>K+</sub> V	Excreción urinaria de potasio
U <sub>p</sub>	Urea plasmática