Biblioteca Digital F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral





Monzón, Casandra Margarita

2017

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Monzón, Casandra Margarita. (2017). Regulación del transporte paracelular de sodio en la rama gruesa ascendente del Asa de Henle por óxido nítrico. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6214_Monzon Citatipo Chicago:

Monzón, Casandra Margarita. "Regulación del transporte paracelular de sodio en la rama gruesa ascendente del Asa de Henle por óxido nítrico". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6214_Monzon

EXACTAS Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293 Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar



Universidad de Buenos Aires Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Departamento de Química Biológica

"Regulación del transporte paracelular de sodio en la rama gruesa ascendente del Asa de Henle por óxido nítrico"

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

Lic. Casandra Margarita Monzón

Directores de tesis:	Dr. Jeffrey L. Garvin	
	Dr. Omar P. Pignataro	

Consejero de estudios: Dr. Juan Carlos Calvo

Lugares de trabajo: Department of Physiology and Biophysics. School of Medicine. Case Western Reserve University. Cleveland, Ohio, EEUU.

> Laboratorio de Endocrinología Molecular y Transducción de Señales. Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET). Buenos Aires, Argentina.

Buenos Aires, 2017. Fecha de Defensa: 11 de abril de 2017

Resumen

La rama gruesa ascendente del asa de Henle reabsorbe el 30% del cloruro de sodio (NaCl) filtrado por el glomérulo. Aproximadamente 60% del ión sodio (Na⁺) es reabsorbido a través del transporte activo transcelular. Como resultado del transporte activo de solutos, existe un voltaje luminal positivo en esta segmento, que favorece la reabsorción del Na⁺ restante a través de la vía paracelular. El óxido nítrico (NO) promueve natriuresis y diuresis, en parte debido a la inhibición del transporte de solutos en la rama gruesa ascendente del asa de Henle. Se sabe que el NO inhibe la reabsorción transcelular de sal, pero se desconocen sus efectos sobre la vía paracelular. Para evaluar el efecto del NO en la selectividad de esta última, comenzamos por medir los potenciales de dilución causados por la reducción de la concentración de NaCl en la solución del baño basolateral a 64/56, 32/24 ó 16/8 mM Na⁺/Cl⁻ en túbulos de la rama gruesa ascendente del asa de Henle aislados y perfundidos. A partir de los diferentes potenciales de dilución calculamos el radio de permeabilidad Na⁺/Cl⁻ (P_{Na}⁺/P_{Cl}⁻). Dicho radio es una medida de permeselectividad paracelular, y encontramos que era ~2 en todos los casos. Estos datos indican que la vía paracelular en este segmento del nefrón es más selectiva para Na⁺ que para el ión cloro (Cl⁻) por un factor de 2, e indican que el transporte transcelular no se alteró de manera significativa por la dilución de NaCl en el baño basolateral. En los experimentos siguientes empleamos la solución conteniendo 32/24 mM de Na⁺/Cl⁻. Al utilizar dos dadores de NO químicamente distintos o el sustrato para la producción endógena de NO, L-arginina, se observó una disminución de P_{Na}⁺/P_{Cl}⁻. Estos resultados demuestran que NO tiene un efecto sobre la selectividad de la vía paracelular, pero no indican específicamente cómo las permeabilidades absolutas de cada ión se ven afectadas. Para investigar el efecto del NO sobre P_{Na⁺} y P_{Cl} individualmente, es necesario medir tanto P_{Na}^+/P_{Cl}^- como la resistencia transepitelial (Rt).

La Rt refleja solamente las vías de transporte conductivas y, en la rama gruesa ascendente del asa de Henle, representa mayormente la resistencia de la ruta paracelular. Bajo condiciones control, el valor de Rt hallado fue 7700 ohm-cm. Cuando se agregó L-arginina, la Rt disminuyó, y dicho efecto fue bloqueado por el inhibidor de NOS, L-NAME. Estos resultados demuestran que el NO disminuye la función de "barrera" de la ruta paracelular.

A continuación medimos una vez más el efecto del NO producido de manera endógena sobre los potenciales de dilución y P_{Na}^+/P_{Cl}^- . Con estos datos y los valores de Rt obtenidos, calculamos P_{Na}^+ y P_{Cl}^- individualmente, hallando que el NO incrementó P_{Na}^+ un 40% y P_{Cl}^- un ~100%.

La mayoría de las acciones del NO en el túbulo proximal y la rama gruesa ascendente del asa de Henle están mediadas por guanosín monofosfato cíclico (GMPc). Es por esto que investigamos si este segundo mensajero está mediando los efectos del NO sobre la vía paracelular observados en nuestro modelo. El GMPc disminuyó P_{Na}^+/P_{Cl}^- y Rt, provocando el aumento de P_{Na}^+ y P_{Cl}^- de manera similar al NO. Estos datos sugieren que GMPc está mediando el efecto final del NO sobre las permeabilidades absolutas.

El GMPc puede activar dos mediadores posteriores en la vía de señalización, la proteína quinasa dependiente de GMPc (PKG) y la fosfodiesterasa 2 (PDE2). Por lo tanto, evaluamos cuál

de ellos está mediando las acciones del NO. En presencia del inhibidor de PKG, KT5823, el dador de NO no tuvo efecto significativo sobre el potencial de dilución. En contraste, cuando repetimos este experimento utilizando un inhibidor de PDE2, el dador de NO disminuyó el potencial de dilución, de manera similar a lo descripto anteriormente para aquellos experimentos donde solamente utilizamos un dador de NO. Estos datos indican que PKG, y no PDE2, es el mediador del efecto del NO sobre la ruta de transporte paracelular.

La Rt y la selectividad iónica de la vía paracelular están reguladas por una familia de proteínas llamadas claudinas. La rama gruesa ascendente del asa de Henle expresa claudina-19, que ha sido anteriormente relacionada con la regulación de la permeabilidad de Na⁺. Además, la claudina-19 puede formar combinaciones heteroméricas y heterotípicas con las claudinas-3 y -16 en este segmento. Para evaluar si los efectos de NO sobre la vía paracelular están mediados por un poro del cual al menos la claudina-19 forma parte, medimos los potenciales de dilución en presencia o ausencia de un anticuerpo contra un dominio extracellular de la claudina-19 o contra la proteína Tamm-Horsfall (control). Cuando el anticuerpo anti-claudina-19 estaba presente, ni el dador de NO, ni el sustrato para la producción endógena de NO -L-arginina- tuvieron efecto sobre los potenciales de dilución. En presencia del anticuerpo anti-Tamm-Horsfall, el dador de NO disminuyó el potencial de dilución. Estos datos sugieren que los efectos del NO sobre la vía paracelular son mediados por un poro formado al menos por una unidad de la claudina-19.

Finalmente, modelamos matemáticamente el efecto del NO sobre la concentración luminal de Na⁺ a lo largo de la rama gruesa ascendente del asa de Henle basándonos en nuestros resultados. Bajo condiciones control, en ausencia de NO, la concentración luminal de Na⁺ decae exponencialmente a 22.4 mM al final de dicho segmento. Cuando consideramos el efecto del NO sobre la vía paracelular únicamente, la concentración luminal de Na⁺ al final del túbulo es 33.9 mM, más alta que en control, indicando que se absorbe menos Na⁺. Al tener en cuenta el efecto del NO sobre la vía transcelular solamente, la concentración luminal de Na⁺ al final del túbulo es 46.2 mM, y al considerar su efecto sobre ambas vías combinadas, 52.5 mM. Por lo tanto, el efecto del NO sobre la ruta paracelular provoca una reducción en la reabsorción neta de Na⁺. La magnitud de dicha reducción es similar a aquella resultante de NO actuando sobre la ruta transcelular, pero el efecto del NO sobre ambas vías combinadas tiene una dinámica de antagonismo.

Palabras clave: rama gruesa ascendente del asa de Henle, óxido nítrico, vía paracelular, reabsorción de Na⁺, claudina-19

Abstract

Regulation of the paracellular transport of sodium in the thick ascending limb of Henle's Loop by nitric oxide.

Thick ascending limbs reabsorb 30% of the NaCl filtered by the glomerulus. About 60% of the Na⁺ is reabsorbed through active, transcellular transport while the remainder is reabsorbed via the paracellular pathway, or shunt, due to the luminal-positive voltage created as a consequence of active transport. Nitric oxide (NO) causes natriuresis and diuresis in part due to inhibition of thick ascending limb transport. NO inhibits active transcellular salt reabsorption, but the effects of NO on the paracellular pathway are unknown.

We first evaluated the effect of NO on the selectivity of the shunt by measuring dilution potentials caused by reducing bath NaCl to 64/56, 32/24 or 16/8 mM Na⁺/Cl⁻ and then calculating P_{Na^+}/P_{Cl^-} (a measure of paracellular permeability) in isolated, perfused thick ascending limbs. We found that the P_{Na^+}/P_{Cl^-} was about 2 when calculated from the three different dilution potentials. These data indicate that the paracellular pathway is selective for Na⁺ over Cl⁻ by a factor of 2, and indicate that transcellular transport was not significantly affected by diluting the NaCl concentration of the bath. We used a bath Na⁺/Cl⁻ concentration of 32/24 mM in all subsequent experiments. Two chemically distinct NO donors reduced P_{Na^+}/P_{Cl^-} . The substrate for endogenous NO production, L-arginine, reduced P_{Na^+}/P_{Cl^-} These data show that NO can affect the selectivity of the shunt.

The afore-mentioned data indicate that NO alters the shunt but do not indicate specifically how the absolute permeabilities are affected. To investigate the effect of NO on absolute P_{Na}^+ and P_{CI}^- individually, it is necessary to measure both P_{Na}^+/P_{CI}^- and transepithelial resistance (Rt). Rt only reflects conductive transport pathways and is primarily reflective of the resistance of the shunt in thick ascending limbs. We found that Rt was about 7700 ohm-cm under control conditions. When L-arginine was added Rt decreased, and this effect was blocked by the NOS inhibitor L-NAME. These results show that NO is reducing the barrier function of the shunt. We again measured the effect of endogenously-produced NO on dilution potentials and consequently P_{Na}^+/P_{CI}^- . Using these values and the values for Rt we calculated absolute P_{Na}^+ and P_{CI}^- . We found that NO increases P_{Na}^+ by 40% and P_{CI}^- by nearly 100%.

NO exerts most of its effects via cGMP. Thus we tested whether cGMP mediates the effects of NO on the paracellular pathway in our model. cGMP decreased P_{Na}^+/P_{Cl}^- and Rt. Thus, it increased both P_{Na}^+ and P_{Cl}^- in a manner similar to NO. These data suggest that the second messenger mediating the final effect of NO on absolute permeabilities is cGMP.

cGMP can activate two downstream mediators, cGMP-dependent protein kinase (PKG) and phosphodiesterase 2 (PDE2). Thus, we next tested which of these mediates the actions of NO. We found that in the presence of the PKG inhibitor KT5823, the NO donor had no significant effect on dilution potentials. In contrast, when we repeated this experiment using a PDE2 inhibitor, the donor decreased the dilution potentials similar to the donor alone. These data indicate that PKG, but not PDE2, mediates the effect of NO on the shunt.

Rt and the ionic selectivity of the shunt are regulated by a family of proteins called claudins. Thick ascending limbs express claudin-19 which has been reported to regulate Na⁺ permeability. Claudin-19 can interact to form homomeric and homotypic combinations with claudin-3 and 16. To test whether the effects of NO on the shunt are mediated by a pore formed by at least one claudin-19, we measured the effect of NO on dilution potentials in the presence or absence of an antibody against an extracellular domain of claudin-19 or Tamm-Horsfall protein as a control. We found that with the claudin-19 antibody, neither a NO donor nor the substrate for endogenous NO production L-arginine decreased dilution potentials. In the presence of the Tamm-Horsfall protein antibody, the NO donor still reduced the dilution potential. These data suggest that the effects of NO on the shunt are mediated by at least one claudin-19.

Finally, we modeled the effect of NO on luminal Na⁺ concentration along the length of the thick ascending limb based on our results. Under control conditions in the absence of NO luminal Na⁺ falls exponentially to 22.4 mM by the end of the thick ascending limb. When the effect of NO on only the shunt was considered, the Na⁺ concentration by the end of the tubule was 33.9 mM, higher than in the control, indicating that less Na⁺ was reabsorbed. When the effects of NO on the transcellular pathway only was considered, the luminal Na⁺ was 46.2 mM, and 52.5 mM when both transcellular and paracellular pathways were taken into account. Thus the effects of NO on the paracellular pathway reduce net Na⁺ reabsorption and the magnitude of the reduction in net Na⁺ reabsorption caused by the effect of NO solely on the shunt is similar to that of NO acting on the transcellular route. The effect of NO on both routes combined follows an antagonistic dynamic.

Key words: thick ascending limb of Henle's loop, nitric oxide, paracellular pathway, Na⁺ reabsorption, claudin-19

Agradecimientos

El primer agradecimiento es para mi familia, por haberme apoyado en mi decisión de irme a otro país a perseguir mis objetivos profesionales y haber sacrificado tantos cumpleaños, domingos en el campo, Navidades y Años nuevos juntos. Por su buena predisposición para estar conectados por videoconferencia casi todas las noches de los últimos cinco años e intentar mantener la cotidianeidad pese a la distancia.

Al Dr. Jeffrey L. Garvin. Porque me enseñó que no hay excusas, que ningún experimento es imposible, que el tiempo es nuestra "commodity" más valiosa y que pensar muchas veces puede ahorrarnos muchos experimentos innecesarios, que las convenciones muchas veces no tienen sentido y que está bien oponerse a la corriente. Por haberme presionado tanto para mejorar mis presentaciones, especialmente durante los lab meetings 7.30 am cada viernes (con sol, lluvia, o tormenta de nieve) y las infinitas prácticas de posters y charlas.

Al Dr. Omar P. Pignataro. Porque confió en mí. Porque me dio la oportunidad de ser parte de su laboratorio y adquirir el ingenio y las mañas de quien hace ciencia en Argentina (y que no se aprenden afuera). Por explicarme tantas veces cómo funciona el sistema científico en nuestro país y lo necesario que es relacionarse. Por su inmensa ayuda, guía, y discusiones científicas a la distancia. Por ser una muy buena persona.

Al Dr. Juan Carlos Calvo. Por su apoyo incondicional, sus consejos profesionales y buena predisposición para todo, con todos.

A Pablo, mi ex compañero de laboratorio en Case Western Reserve University. Gracias por todos los trucos que me enseñaste sobre perfusión, por las discusiones científicas y por tu buen humor.

A Fara, por haber leído mi tesis y aportado comentarios y sugerencias. Por haber escuchado mis desahogos y frustraciones.

A Nancy, por siempre tener la respuesta correcta a la pregunta correcta.

A Romina, mi gran amiga y ex compañera de laboratorio del 214 del IBYME. Gracias por tu compañerismo en la mesada, tus consejos profesionales, tu paciencia, tu confianza en mí cuando recién empezaba. Gracias por las meriendas compartidas, y por sobre todo, gracias por tu amistad.

A Andrew, por estar a mi lado durante los días más difíciles de mi proyecto. Los buenos momentos que compartimos serán por siempre de los más memorables de mis días en Cleveland.

A María Eugenia, por su amistad incondicional desde jardín de infantes en el Stella Maris de Mar del Plata.

A mi profe de Biología en el Instituto Peralta Ramos de Mar del Plata, Francisco Rinaudo, por su dedicación, su exigencia y su contagioso amor por la ciencia.

Esta tesis está dedicada a mi mamá Margarita, quien –a la distancia- hizo cada uno de estos experimentos conmigo.

<u>Abreviaturas</u>

α	Factor de corrección alfa			
ΔV	Cambio o diferencia ("delta") de voltaje			
μΜ	Micromolar			
[Cl ⁻ extt]	Concentración de Cl ⁻ en el baño basolateral			
[Cl ⁻ in]	Concentración de Cl ⁻ en el lumen.			
[Na ⁺ ext]:	Concentración de Na ⁺ en el baño basolateral			
[Na⁺ _{in}]	Concentración de Na⁺ en el lumen			
8-br-GMPc Ab AEBSF AMPc	8-bromo-guanosín monofosfato cíclico Anticuerpo Clorhidrato de 4-(2-Aminoetil)-benzolsulfonil fluoruro Adenosín monofosfato cíclico			
AQP1	Acuaporina-1			
BAY-60-7550	2-[(3,4-dimetoxi fenil) metil]-7-[(1R)-1-hidroxi etil]-4-fenil butil]-5-metil-			
	imidazo[5,1-f][1,2,4]triazina-4(1H)-ona (Inhibidor de PDE2)			
BSA	Seroalbumina bovina			
Ca ²⁺	lón calcio			
Cl-	lón cloro			
CO ₂	Dióxido de carbono			
db-GMPc	Dibutiril- guanosín monofosfato cíclico			
E64	Trans-Epoxi succinil-L-leucil amido(4-guanidino) butano			
ECL	Reforzador de quimioluminiscencia			
ECL1	Primer rulo extracelular de una claudina			
ECL2	Segundo rulo extracelular de una claudina			
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial (también llamada NOS-3)			
F	Constante de Faraday			
FHHNC	Hipomagnesemia hipercalciúrica familiar			
G	Conductancia (1/Resistencia)			
GHK	Goldman-Hodgkin-Katz			
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico			
HEK293T	Línea celular de riñón embrionario humano			
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etanosulfónico			
lgG-HRP	Inmunoglobulina G unida a peroxidasa de rabanito			
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible (también llamada NOS-2)			
	-			

i.p.	Intraperitoneal				
J	Tasa de reabsorción (o transporte) de Na⁺				
J _A	Transporte activo transcelular				
J _P	Transporte pasivo paracelular				
K+	lón potasio				
KCI	Cloruro de potasio				
kDa	Kilodaltons				
K _m	Constante de Michaelis-Menten				
KT5823	2,3,9,10,11,12-hexahidro-10R-metoxi-2,9-dimetil-1-oxo-9S,12R-epoxi-1H-				
	diindol[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pirrol[3,4-i][1,6]benzodiazocina-10-ácido carboxílico,				
	ester metílico (inhibidor de PKG)				
L	Longitud del túbulo				
L-arg	L-arginina				
L-NAME	N-Nitroarginina metil ester				
LPS	Lipopolisacárido				
Μ	Molar				
MDCKII	Linea celular de riñón canino Madin Darby				
Mg ²⁺	lón magnesio				
mM	Milimolar				
mOsm	Miliosmoles				
mV	Milivoltios				
Na⁺	lón sodio				
nA	Nanoamperes				
NaCl	Cloruro de sodio				
NHE	Familia de intercambiadores de Na ⁺ /H ⁺				
NaH_2PO_4	Fosfato sódico monobásico				
NKCC2	Cotransportador Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻				
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal (también llamada NOS-1)				
nm	Nanometros				
NMDG	N-metil-D-glucamina				
NO	Óxido nítrico				
NOS	Óxido nítrico sintasa				
NTG	Nitroglicerina				
O ₂	Oxígeno				

O ₂ -	Superóxido			
OK	Línea celular de riñón de zarigüeya			
OONO ⁻	Peroxinitrito			
PDE2	Fosfodiesterasa 2			
PKG	Proteína quinasa dependiente de GMPc			
P _{CI} -	Permeabilidad de Cl ⁻			
P _{Na+}	Permeabilidad de Na ⁺			
P _{Na+} / P _{Cl-}	Radio de permeabilidad Na ⁺ /Cl ⁻			
pS	Picosiemens			
Q	Flujo a lo largo del túbulo			
R	Constante ideal de gases			
Rt	Resistencia transepitelial específica			
rpm	Revoluciones por minuto			
ROMK	Canales de K⁺			
SDS	Dodecilsulfato de sodio			
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida con SDS			
SEM	Error estándar de la media			
sec	Segundo			
SPM	EsperminaNONOato			
т	Temperatura en grados Kelvin			
T _{max}	Velocidad máxima			
TrisCl	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol			
TTBS	Búffer Tris salino con agregado de Tween.			
V	Voltios			
V _o	Voltaje registrado en el extremo proximal del túbulo			
V ₁	Voltaje registrado en el extremo distal del túbulo			
VA	Componente activo del voltaje			
Vm	Voltaje transepitelial			
V _{max}	Velocidad máxima en la cinética de Michaelis-Menten			
VP	Componente pasivo del voltaje			
Z	Valencia iónica			

Índice de contenidos

Resumen	2
Abstract	4
Agradecimientos	6
Abreviaturas	8
Introducción	13
Hipótesis	25
Objetivos	25
Materiales y Métodos	26
1. Materiales y reactivos	27
1.1. Reactivos generales	27
1.2. Material de plástico y vidrio	27
1.3. Animales de laboratorio	27
1.4. Soluciones	28
1.5. Instrumentos para las mediciones de electrofisiología	28
1.6. Reactivos de electroforesis	28
1.7. Muestras control y anticuerpos	28
2. Métodos	29
2.1. Diseño, fabricación y montaje del sistema de pipetas de perfusión	29
2.2. Obtención de túbulos aislados de la rama gruesa ascendente del asa de Henle re	enal30
2.3. Medición de potenciales de dilución en túbulos aislados de la rama gruesa ascer del asa de Henle renal y cálculo de P _{Na} ⁺ /P _{Cl} ⁻	ndente 31
2.4. Medición y cálculo de la resistencia transepitelial específica (Rt) en túbulos aislad la rama gruesa ascendente del asa de Henle renal	dos de 33
2.5. Cálculo de las permeabilidades absolutas de Na ⁺ (P_{Na}^+) y Cl ⁻ (P_{Cl}^-)	34
2.6. Obtención de una suspensión enriquecida de túbulos de la rama gruesa ascende del asa de Henle	ente 35
2.7. Cuantificación de proteínas	36
2.8. Electroforesis de proteínas en matriz de poliacrilamida	36
2.9. Detección de proteína de interés y revelado	36
2.10. Modelado matemático de la concentración luminal de Na⁺ a lo largo de la rama gruesa ascendente del asa de Henle	37
2.11. Estadística	40
Resultados	41

Objetivo A4	2
1. Efecto de NO sobre permeselectividad paracelular en la rama gruesa ascendente del asa de Henle4	2
1.1. Determinación de las condiciones a utilizar durante los experimentos de potencial de dilución4	2
1.2. Efecto de dos dadores de NO sobre la permeselectividad de la vía paracelular en túbulos de la rama gruesa ascendente del asa de Henle4	2
1.3. Efecto del NO producido de manera endógena en la permeselectividad de la vía paracelular en túbulos de la rama gruesa ascendente del asa de Henle4	5
2. Cascada de señalización mediando los efectos observados del NO sobre la vía paracelula de la rama gruesa ascendente del asa de Henle4	ar 7
Objetivo B5	1
1. Efecto de NO de producción endógena sobre la resistencia transepitelial en túbulos de la rama gruesa ascendente del asa de Henle5	1
2. Efecto del GMPc sobre Rt5	4
Objetivo C5	5
 Efecto del NO sobre las permeabilidades absolutas de Na⁺ y Cl⁻ en túbulos de la rama gruesa ascendente del asa de Henle5 	5
1.1. Medición de potenciales bi-iónicos utilizando un dador de NO	5
1.2. Efecto del NO producido de manera endógena sobre P_{Na}^+ y P_{Cl}^- 5	6
2. Efecto del GMPc sobre P _{Na} ⁺ y P _{Cl} ⁻ 5	8
Objetivo D6	1
Participación de claudina-19 en las acciones de NO sobre la vía paracelular en la rama gruesa ascendente de asa de Henle6	1
Objetivo E6	5
Modelado matemático de la hipótesis6	5
Discusión	8
Conclusiones	8
Objetivo A7	9
Objetivo B8	0
Objetivo C8	1
Objetivo D8	1
Objetivo E8	1
Bibliografía	3

Introducción

La hipertensión es una condición médica en la cual la presión arterial, es decir, la tensión ejercida por la sangre sobre las paredes de las arterias, está consistentemente elevada. Esta afección conlleva a un deterioro de las arterias y predispone a un número de condiciones como la arterioesclerosis, trombosis, hipertrofia ventricular izquierda, aneurismas y muerte. La incidencia de la hipertensión en Argentina es del 32,3% (17) y su prevalencia está en aumento. Estos valores coinciden con aquellos reportados para América Latina en su conjunto (35%) (73) y Estados Unidos (33%) (118).

Los riñones juegan un rol clave en la regulación de la presión arterial, ya que mantienen el volumen del fluido extracelular constante en el cuerpo, ajustando la excreción de sal y agua en la orina de acuerdo a la ingesta (33, 79).

Una sección longitudinal del riñón nos permite identificar dos capas principales: la corteza y la médula (que a su vez tiene una parte interna y otra externa). Ocupando parte de ambas estructuras podemos encontrar el nefrón, la unidad funcional del riñón (Figura 1).



Figura 1. Esquema del riñón y de las estructuras que conforman el nefrón. Adaptado de: http://igbiologyy.blogspot.com/2014/03/human-excretion-structure-of-kidney.html y http://www.paxala.com/los-rinones. (Febrero, 2017).

Cada riñón en el ser humano contiene aproximadamente un millón de nefrones (~32000 en la rata adulta). El nefrón se compone de un glomérulo (estructura compuesta por una compleja red de capilares), responsable de la producción del ultrafiltrado plasmático, y un túbulo (estructura de origen epitelial) que convierte el ultrafiltrado en orina mediante diferentes procesos de reabsorción y secreción. El componente vascular y epitelial se unen en la denominada cápsula de Bowman, y en ese espacio el filtrado comienza a transitar por los diferentes segmentos del túbulo. Dichos segmentos son: el túbulo proximal (segmento contorneado y segmento recto), el asa de Henle (que comprende una rama delgada –descendente y ascendente- y una rama gruesa ascendente), túbulo distal, túbulo conector y túbulo colector inicial. Este último conecta con el túbulo colector (cortical y luego medular), que recibe la orina en formación proveniente de varios nefrones. Cada una de estas estructuras se caracteriza por su función altamente especializada en función de su capacidad para reabsorber moléculas específicas y secretar otras que pueden tener funciones regulatorias sobre otros segmentos posteriores o ser desechadas a través de la orina.

Podemos determinar dos poblaciones de nefrones: los corticales, cuyos glomérulos se ubican en la región más externa de la corteza, con asas de Henle relativamente corta que se extienden a lo largo de la parte externa de la médula; y los juxtaglomerulares, cuyo glomérulo nace en la región corticomedular y cuyas asas de Henle se extienden hasta la profundidad de la porción interna de la médula (Figura 2).





La rama gruesa ascendente del asa de Henle reabsorbe un 25-30% del cloruro de sodio (NaCl) filtrado por el glomérulo y es impermeable al agua, por lo tanto en este segmento lleva a cabo la dilución de la orina en formación. Adicionalmente mantiene la osmolaridad instersticial en los niveles necesarios (hipertónica) para el mecanismo de multiplicación contracorriente y reabsorción de agua en el túbulo colector. Alrededor del 60% del ión sodio (Na⁺) es absorbido por la vía transcelular (atravesando secuencialmente las membranas apical y basolateral de las células epiteliales que conforman las paredes del túbulo, y eventualmente de vuelta al torrente sanguíneo), y el 40% restante lo hace de manera paracelular (a través del espacio entre células adyacentes). La vía paracelular está favorecida por el potencial positivo en el lumen generado por el transporte activo y es más selectiva para Na⁺ que para Cl⁻, con un radio de permeabilidad Na⁺/Cl⁻ de aproximadamente 2 (9, 28, 40).

Las paredes de este túbulo están conformadas por células epiteliales polarizadas. Su superficie apical está orientada hacia el lumen del túbulo, y la superficie basolateral está en contacto con el fluido intersticial. A continuación se detalla una lista de los transportadores y canales presentes en cada membrana y la dinámica entre ambos tipos de transporte, transcelular y paracelular.

Transporte Transcelular

El transporte transcelular en este segmento ocurre a través de transportadores y canales distribuidos a lo largo de las membranas apical y basolateral de las células que lo conforman. Los mismos se listan a continuación:

Transportadores y canales apicales

 Na⁺-K⁺-2Cl⁻ (NKCC2): Es un cotransportador electroneutro que ingresa simultáneamente Na⁺, K⁺ y 2Cl⁻ desde el lumen hacia el interior de la célula. El 50% del Na⁺ reabsorbido en la rama gruesa ascendente del asa de Henle ingresa a través este cotransportador.

Hay tres isoformas de NKCC2 en la rama gruesa ascendente del asa de Henle, con valores de Km para Cl⁻ y distribución variables: A (30 mM, afinidad variable; médula y corteza), B (10-15 mM, alta afinidad; corteza) y F (110-130 mM, baja afinidad; médula) (3). La entrada apical de Na⁺ tiene lugar gracias al gradiente generado por la extrusión de este catión a través de la bomba Na⁺-K⁺-ATPasa en la membrana basolateral, por lo tanto la actividad de NKCC2 es dependiente de la función de la bomba (37). Esta última está descripta más abajo.

• La familia de transportadores electroneutros NHE median el intercambio de Na⁺/H⁺. Na⁺ ingresa a la célula y un protón H⁺ citosólico egresa. Al menos uno de los nueve miembros de esta familia (NHE1-9) se expresa en casi todas las células del cuerpo. Entre otras funciones, la familia NHE participa en la regulación del pH intracelular, la reabsorción de Na⁺, el volumen celular, etc (25). En la membrana apical de las células que conforman la pared de la rama gruesa ascendente del asa de Henle (medular) podemos encontrar al **intercambiador de Na⁺/H⁺ de tipo 3 (NHE3)**, que transporta alrededor del 10% del Na⁺ reabsorbido en este segmento. Su actividad de este intercambiador depende del amplio gradiente de Na⁺ existente entre el lumen y el interior de la célula, y por lo tanto, de la actividad de la bomba Na⁺-K⁺-ATPasa.

• El K⁺ se recicla constantemente, saliendo de la célula a través del canal luminal **ROMK**. Estudios inhibiendo este canal o utilizando ratones *knockout* para el mismo (ROMK-/-) han demostrado que el 80-90% de la reabsorción de NaCl a través de NKCC2 depende de la actividad de ROMK (38, 114).

Transportadores y canales basolaterales

La bomba Na⁺-K⁺-ATPasa en la membrana basolateral expulsa 3 Na⁺ del interior de la célula hacia el intersticio y permite el ingreso de 2 K⁺ en dirección contraria. Es un tipo de transporte activo que utiliza ATP. Su inhibición elimina la reabsorción transcelular de NaCl y el voltaje luminal positivo que favorece el transporte paracelular de Na⁺ y otros cationes divalentes (37, 75).

Canales de K⁺ y canales de K⁺-Cl⁻ (KCC4; electroneutros) en la membrana basolateral.
 Además de transportar K⁺, ayudan a mantener el potencial de membrana necesario para la salida pasiva de Cl⁻ (41).

 El Cl⁻ sale de la célula hacia el intersticio a través de canales de Cl⁻ (ClC-Kb en roedores, ClC-K2 en humanos) que requieren coexpresión de la proteína Bartina para ser funcionales (112). La salida de Cl⁻ es mayor en proporción que la entrada por el intercambiador Cl⁻/HCO₃⁻ presente en la misma membrana.

• Intercambiador de Na⁺/H⁺ de tipo 1 (NHE1) en la membrana basolateral. Es un transportador electroneutro que permite el ingreso de Na⁺ a la célula desde el intersticio, y el egreso de H⁺.

Intercambiador de CI/HCO3⁻ en la membrana basolateral. El Cl⁻ ingresa del intersticio a la célula y el HCO3⁻ egresa.

• Acuaporina-1 (AQP1) es un poro formado a partir de proteínas de membrana que funciona como un canal de agua (94), y transporte de gases como CO₂ (78) y NO (43). Nuestro laboratorio comprobó la expresión de AQP-1 en la membrana basolateral de células de la rama gruesa ascendente del asa de Henle y que este canal media gran parte de la permeabilidad al agua en dicha membrana (10). Su función y regulación no han sido estudiadas en profundidad, pero la evidencia sugiere que AQP-1 tendría un rol en la regulación del volumen celular frente al estrés osmótico y podría actuar como canal de salida para que el NO localmente producido ejerza funciones paracrinas, quizás con propósitos anti-hipertensivos.

Nuestro laboratorio reportó previamente que en ratones *knockout* para acuaporina-1 el flujo basolateral de agua se reduce solamente un 50%, lo cual indica que hay al menos una acuaporina adicional que aún no ha sido identificada (10).



En la figura 3 se puede observar la función y disposición de los distintos transportadores.

Figura 3. Esquema de los transportadores transcelulares en la rama gruesa ascendente del asa de Henle. Como resultado del transporte activo se genera un potencial luminal positivo que favorece el pasaje pasivo a través del espacio paracelular.

Transporte Paracelular

Los tejidos epiteliales pueden ser más o menos permeables dependiendo de la resistencia (o al inverso, la conductancia) que las uniones estrechas entre las células que lo conforman ofrecen al pasaje de solutos. En términos generales, la permeabilidad del epitelio tubular va en disminución, siendo mayor en el túbulo proximal, y menor en el túbulo colector.

La figura 4 muestra el esquema eléctrico de una célula epitelial de la pared de la rama gruesa ascendente del asa de Henle. Los canales apicales y basolaterales de K⁺ y Cl⁻ se representan como resistencias en serie, la bomba Na⁺-K⁺-ATPasa como una batería (se sabe

que genera alrededor de +10mV) y la ruta paracelular se representa como otra resistencia. La ruta transcelular ofrece alta resistencia (y por ende, baja conductancia) y la ruta paracelular, baja resistencia/alta conductancia. Baja resistencia eléctrica (alta conductancia) es sinónimo de alta permeabilidad y viceversa.



Figura 4. Esquema eléctrico de una célula de la rama gruesa ascendente del asa de Henle.

Los valores de resistencia transepitelial reportados en la bibliografía para la rama gruesa ascendente del asa de Henle varían entre 11-50 ohm cm² en ratón (39) y ~24-35 ohm cm² en conejo (9, 28). Hasta el momento no se han reportado mediciones de esta variable en rata.

Como se mencionó anteriormente, 40% del Na⁺ reabsorbido en la rama gruesa ascendente del asa de Henle transita por la ruta paracelular. Este segmento tiene un voltaje transepitelial positivo que varía entre +3 y +10 mV (29). Dicho voltaje genera la fuerza necesaria para reabsorber Na⁺, Ca²⁺ y Mg ²⁺ del lumen a través del espacio entre las células. En todos los demás segmentos del nefrón (con excepción de la última porción del túbulo proximal), esta fuerza es negativa, y por lo tanto se favorece una difusión de este ión del intersticio al lumen.

Dos células epiteliales contiguas están unidas a través de una serie de uniones intercelulares especializadas en sus paredes laterales. La porción más apical de este complejo de anclaje está organizada en fibras que proveen una unión estrecha y conforman una barrera con propiedades de selectividad iónica y de tamaño que impiden la difusión libre de agua y solutos por el espacio (20, 93).

Si bien hay una variedad de proteínas integrales de membrana presentes en las uniones estrechas, las claudinas son las principales determinantes de su permeabilidad y selectividad. Estas proteínas fueron descubiertas en 1998 por Furuse et al (22), en la Universidad de Kioto. Hasta la fecha se han identificado 27 claudinas diferentes en mamíferos y las diferencias en el patrón de expresión de las mismas podrían explicar las diferencias de permeselectividad paracelular de los distintos tejidos y estructuras donde se expresan.

Las claudinas tiene un peso que varía entre 21 y 28 kDa y su estructura cuenta con cuatro

dominios transmembrana, dos rulos extracelulares (ECL1 y ECL2), y extremos N- y C- terminales citosólicos (Figura 5). Estudios estructurales/funcionales han demostrado que la selectividad de las claudinas se debe a la disposición de cargas positivas y negativas presentes en el primer rulo extracelular, ECL1, ya que el reemplazo de aminoácidos acídicos por básicos o neutros puede revertir la preferencia por cationes a aniones o eliminarla completamente (12, 13). Una claudina puede interactuar con otra en cis (claudinas en la membrana de la misma célula) o trans (claudinas en las membranas de células adyacentes entre ellas). Las interacciones en cis pueden formar combinaciones homotípicas o heterotípicas, y las trans pueden formar homómeros o heterómeros (58), pero no todas las combinaciones entre claudinas distintas es posible y es altamente dependiente del modelo en el que se estudia. Al menos dos claudinas en células opuestas son necesarias para formar un poro funcional independiente, y el ECL2 es el punto de unión entre ellas (89).



Figura 5. Esquema de la estructura de una proteína claudina.

La primera evidencia de que las claudinas podían jugar un rol importante en la permeabilidad iónica paracelular del riñón, fue la descripción que la claudina-16 estaba mutada en la hipomagnesemia hipercalciúrica familiar (FHHNC) y que esto se debía a un defecto en la reabsorción paracelular de calcio y magnesio en la rama gruesa ascendente de Henle (101).

El patrón de expresión de las claudinas varía a lo largo del nefrón. La rama gruesa ascendente del asa de Henle de ratón, rata y humano expresa claudina-3, -10 (más específicamente la variante de splicing alternativo, claudina-10b), -11, -16 y -19 (31, 32, 56, 77, 110). Todas ellas, a excepción de claudina-11, han sido señaladas como reguladoras de la absorción de Na⁺ en este segmento. La claudina-3 forma una barrera que reduce la

permeabilidad tanto a Cl⁻ como a Na⁺, pero su sobreexpresión en células de riñón canino Madin Darby (MDCKII) evidenció que esa reducción es preferencial para Na⁺ (71). Braiderhoff et al demostraron que la deleción de claudina-10 en la rama gruesa ascendente conlleva a una reducción de la permeabilidad de Na⁺ y a un incremento anormal de la permeabilidad relativa de Ca²⁺ y Mg²⁺ (8). Las claudinas -16 y -19 son claramente requeridas para la reabsorción paracelular de cationes divalentes (45, 57, 101), pero existe evidencia de que ambas participan en la formación de poros selectivos a sodio en la rama gruesa del asa de Henle (47-49).

Un estudio reciente de Milatz et al. reportó que la expresión de las claudinas en la porción externa de la médula y corteza de la rama gruesa ascendente del asa de Henle en túbulos aislados de rata y ratón tiene características de mosaico (70). Utilizando la técnica de inmunotinción y microscopia láser confocal, observaron que mientras que las claudinas -3,-16 y -19 colocalizan completamente en las uniones estrechas, la claudina-10b está exclusivamente localizada en aquellas uniones donde las demás claudinas no se expresan. El rol de la claudina-3 en la dinámica entre las claudinas -16 y -19 aún no ha podido ser determinado, pero podría interactuar con ellas formando un complejo funcional claudina-3/claudina-16/claudina-19, por asociación en cis con la claudina-19. Estos autores no vieron tinción positiva para claudina-11

La importancia de esta separación espacial de la expresión de ciertas claudinas aún no está clara, pero podría deberse a que formando las paredes de este túbulo renal podemos encontrar dos tipos de células epiteliales, las células R (del inglés "rough" o rugososas, por sus interdigitaciones y microvellosidades) y las S (del inglés "smooth" o lisas).

Angelow et al. habían reportado anteriormente una completa colocalización de las claudinas -16 y -19 (2). Mientras que la claudina-19 puede formar homómeros y asociaciones homotípicas, la claudina-16 no puede ni formar homómeros, ni asociaciones homo/heterotípicas (48, 70), pero sí heterómeros con la claudina-19. Un reporte de Hou et al. sugiere que la correcta función de estas dos proteínas depende de dicha asociación, ya que el *knockdown* de claudina-19 conlleva a la pérdida de claudina-16 en las uniones estrechas, sin afectar su expresión, y viceversa (48). Milatz et al., sin embargo, observaron que en ratones *knockout* para la claudina-16, la claudina-19 permanece expresada en las uniones estrechas. Ambos estudios fueron realizados en riñón de ratón, y si bien la razón de la discrepancia entre ambos resultados no queda clara, se sabe que la claudina-19 tiene la capacidad de interactuar en cis y trans con otras unidades de la claudina-19. Por lo tanto, si bien la claudina-16 necesita indefectiblemente de la claudina-19 para funcionar (de hecho todo indica que necesita un poro formado por al menos dos proteínas en la membrana de la misma célula), la claudina-19 tendría una función independiente. Más estudios funcionales son necesarios para ver las implicancias sobre las propiedades de

selectividad de dichas uniones estrechas.

La selectividad de las claudinas puede ser regulada de manera aguda por modificaciones postrasduccionales como fosforilación o palmitolación (16, 62, 106, 107, 121), pero muy pocos estudios se han focalizado en su relevancia fisiológica. Dada la importancia de la vía paracelular en la reabsorción de Na⁺ en la rama gruesa ascendente del asa de Henle, una mejor comprensión de los factores que pueden regular dicho proceso es necesaria.

El Óxido Nítrico (NO)

El NO es una molécula gaseosa de vida corta, con una vida media de 30 segundos en soluciones acuosas. El mismo contiene un electrón libre, por lo tanto es considerado un radical libre perteneciente a las especies reactivas de nitrógeno. Los estudios iniciales sobre el NO se focalizaron en sus efectos tóxicos, pero hoy en día sabemos que este gas de producción endógena desempeña un rol de gran importancia como una molécula de señalización, participando tanto en procesos fisiológicos como patológicos.

El NO es producido por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) a partir de L-arginina. Hay tres isoformas de NOS: NOS-1, NOS-2 Y NOS-3, anteriormente denominadas NOS neuronal (nNOS), NOS inducible (iNOS) y NOS endotelial (eNOS), respectivamente, debido a las condiciones y tejidos en las que fueron caracterizadas inicialmente. Todas ellas se expresan en el riñón, sin embargo su patrón de expresión varía a lo largo del nefrón:

- La isoforma NOS-1 se expresa en mácula densa (5), rama gruesa ascendente del asa de Henle (50), tubo colector y pelvis renal.
- Si bien la expresión de NOS-2 aumenta en presencia de factores pro-inflamatorios (LPS, citoquinas, isquemia-reperfusión, etc), y de allí su nombre original de isoforma "inducible", se ha detectado expresión basal de esta isoforma en túbulo proximal, rama gruesa ascendente del asa de Henle medular y túbulo colector de la franja interna de la médula (74, 76).
- NOS-3 se ha descripto en glomérulo, túbulo proximal, rama gruesa ascendente del asa de Henle, tubo colector y células endoteliales de la vasa recta (red de capilares rectos situados en paralelo al asa de Henle) y arterias aferentes/eferentes (109).

Las acciones del NO en el riñón incluyen una variedad de efectos anti-hipertensivos (14, 92, 95, 96) entre los cuales podemos destacar la inducción de natriuresis y diuresis (68, 69, 83). Un

incremento anormal en la reabsorción de NaCl en la rama gruesa ascendente de asa de Henle causa hipertensión, mientras que la disminución en el transporte de este soluto induce hipotensión (15, 33, 79), por lo tanto muchos estudios se han enfocado en el rol de NO en la regulación de este proceso en dicho segmento.

Nuestro laboratorio demostró previamente que NO inhibe la reabsorción <u>neta</u> de NaCl (23, 88) y bicarbonato de sodio (80) en túbulos de rama gruesa ascendente del asa de Henle aislados y perfundidos., al menos en parte, por sus efectos inhibitorios sobre el cotransportador Na⁺/K⁺/2Cl⁻ (85) y el intercambiador Na⁺/H⁺ (24), respectivamente. La inhibición de Na⁺/K⁺/2Cl⁻ está mediada por un incremento de guanosín monofosfato cíclico (GMPc), activación de fosfodiesterasa 2 (PDE2) y una disminución subsecuente de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) (82). Por otra parte, en la inhibición del intercambiador Na⁺/H⁺ se observa un incremento de GMPc y una activación subsecuente de una proteína quinasa G (PKG) dependiente de GMPc (80). En esos experimentos no se investigó si el NO tenía algún efecto sobre la vía paracelular.

Se sabe que el NO puede aumentar o disminuir la permeabilidad paracelular en numerosos sistemas, dependiendo del contexto (patológico o fisiológico) en el cual fue producido (11, 35, 36, 53, 54, 59, 99, 104, 105). Esto es discutido con mayor profundidad en la sección de Discusión de este trabajo. Reportes adicionales relacionan un incremento de la actividad de distintas isoformas de NOS y producción de NO con la regulación de la expresión de diferentes claudinas, y cambios en las propiedades de la barrera paracelular (65, 122). En el contexto de nuestro proyecto, NO podría regular la reabsorción de Na⁺ a través de la vía paracelular ejerciendo algún efecto sobre las proteínas claudinas presentes en las uniones estrechas entre las células que forman la pared del túbulo. Basándonos en evidencia publicada de la participación de la claudina-19 en la formación de poros selectivos a Na⁺ en este segmento (2, 46, 49), sumado al hecho de que esta claudina puede formar una variedad de poros (claudina-19/claudina-19, claudina-19/claudina-3, y complejos claudina-16/claudina-19 y/o claudina-3/claudina-16/claudina-19) en las uniones estrechas, decidimos explorar si dicha proteína está involucrada en el efecto regulación de NO sobre la vía paracelular.

<u>Hipótesis</u>

El NO reduce la selectividad de la vía paracelular de absorción a Na⁺, disminuyendo el transporte de dicho soluto, y estos efectos están mediados por claudina-19

<u>Objetivos</u>

- A. Estudiar los efectos del NO sobre el radio de permeabilidad Na⁺/Cl⁻ (P_{Na+}/P_{Cl-}), medida de permeselectividad paracelular, en túbulos aislados provenientes de rama gruesa ascendente del asa de Henle de rata y la cascada de señalización involucrada.
- B. Evaluar los efectos del NO sobre la resistencia transepitelial de dichos túbulos.
- C. Evaluar los efectos del NO sobre la permeabilidad absoluta de Na⁺ y Cl⁻.
- D. Determinar si la proteína claudina-19 está involucrada en el efecto del NO sobre la permeselectividad de la vía de transporte paracelular en la rama gruesa ascendente del asa de Henle.
- E. Analizar el efecto del NO sobre la reabsorción paracelular de Na⁺ a través de un modelo matemático utilizando los resultados hallados en nuestros experimentos.

Materiales y Métodos

1. Materiales y reactivos

1.1. Reactivos generales

El dador de óxido nítrico, esperminaNONOato y el inhibidor de fosfodiesterasa-2, BAY-60-7550, fueron adquiridos en Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, EEUU). La esperminaNONOato fue preparada inmediatamente antes de ser utilizada. El dibutiril-GMPc y el inhibidor de PKG, KT5823, fueron adquiridos en Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, EEUU). La nitroglicerina, la L-arginina, el inhibidor de NOS L-NAME, el manitol y sales/ácidos de uso cotidiano fueron comprados en Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, EEUU). El agar fue obtenido en BD (Franklin Lakes, NJ, EEUU). El elastómero de silicona Sylgard 184 fue adquirido de Dow Corning (Midland, MI, EEUU). La ketamina y la xilacina fueron provistas por el Centro de Recursos Animales de Case Western Reserve University (Cleveland, OH, EEUU). El reactivo Coomasie Plus para cuantificación de proteínas fue adquirido en Thermo Scientific (Hercules, CA, EEUU).

1.2. Material de plástico y vidrio

El material de plástico descartable de uso cotidiano y las placas de 96 pocillos fueron adquiridos en Corning Incorporated (Corning, NY, EEUU). Las tuberías de polietileno (PE10-190), TYGON y tuberías plásticas para bombas de precisión Masterflex fueron obtenidas en BD (Franklin Lakes, NJ, EEUU), Fisher Scientific (Hampton, NH, EEUU) y Cole Palmer (Vernon Hills, IL, EEUU), respectivamente, Las unidades filtrantes descartables ZAPCAP-CR de nylon (poros de 0.2 µm) fueron obtenidas en Maine Manufacturing (Sanford, ME, EEUU). Las varillas uniformes de vidrio para la fabricación de pipetas de microperfusión fueron obtenidas en Drummond Scientific (Broomall, PA, EEUU).

1.3. Animales de laboratorio

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho de 120-150 gr de peso en todos los casos, excepto en el protocolo de obtención de una suspensión enriquecida de túbulos de la rama gruesa ascendente del asa de Henle, donde las ratas tenían 250-350 gr de peso (simplemente para obtener mayor cantidad de proteína). Las mismas fueron alimentadas con una dieta conteniendo Na⁺ 0.22% y K⁺ 1.1%, adquirida en Purina (Richmond, IN, EEUU) por al menos cuatro días. Todos los protocolos de trabajo fueron aprobados por el Comité Institucional de Uso y Cuidado Animal (IACUC) de Case Western Reserve University, de acuerdo con las Guías del National Institute of Health (NIH) para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.

1.4. Soluciones

La solución salina fisiológica utilizada para perfundir y bañar los túbulos estuvo compuesta por: NaCl 130 mM, KCl 4 mM, NaH₂PO₄ 2.5 mM, MgSO₄ 1.2 mM, L-alanina 6 mM, citrato trisódico 1 mM, glucosa 5.5 mM, lactato de calcio 2 mM, y HEPES 10 mM, con pH 7.4, a 37°C. Las concentraciones finales de Na⁺ y Cl⁻ en dicha solución fueron de 142 y 134 mM, respectivamente. En los experimentos de potencial de dilución, la concentración de Na⁺/Cl⁻ en la solución del baño basolateral (solución en la cual los túbulos aislados estarán sumergidos) se redujo a 16/8, 32/24, ó 64/56 mM según se indique, mientras que los compuestos restantes se mantuvieron idénticos a la solución de perfusión. La osmolaridad de todas las soluciones fue ajustada a 290 ± 3 mOsm/kg H₂O, medidas por osmometría de presión de vapor, utilizando manitol.

1.5. Instrumentos para las mediciones de electrofisiología

Los electrodos de calomelanos marca Accumel empleados fueron adquiridos en Fisher Scientific (Hampton, NH, EEUU). Se utilizaron dos voltímetros: uno modelo Axoprobe-1A de Molecular Devices (Sunnyvale, CA, EEUU), y otro modelo Neuroprobe Amplifier 1600 de A-M Systems Inc (Sequim, WA, EEUU). El sistema de integración de señal y software utilizado fue Power Lab 4/30 de AD Instruments (Colorado Springs, CO, EEUU).

1.6. Reactivos de electroforesis

Los geles de poliacrilamida Mini-protean TGX (12%), la membrana de PVDF, los marcadores de peso molecular Precision Plus Protein dual color, los soportes y la cuba para la corrida electroforética y transferencia fueron adquiridos en BioRad Laboratories (Hércules, CA, EEUU). El 2-mercapto etanol, el Tween 20, el azul de bromofenol, la glicina, TrisCl, el búffer de lisis Cellytic M y el cocktail de inhibidores de proteasas fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, EEUU). El ditiotreitol (DTT), el dodecil sulfato de sodio (SDS) y el metanol fueron obtenidos en Fisher Scientific (Hampton, NH, EEUU). Las placas de autoradiografía Hyblot CL fueron obtenidas en Denville Scientific Inc (Holliston, MA, EEUU). El cassette de autoradiografía fue comprado en Amersham Biosciences.

1.7. Muestras control y anticuerpos

Los controles positivo y negativo de expresión de claudina-19 utilizados en el ensayo de Western blot fueron obtenidos en Novus Biologicals (Littleton, CO, EEUU). Los anticuerpos anticlaudina-19 (sc-162688) y anti-IgG-HRP de cabra (sc-2020) fueron obtenidos en Santa Cruz Biotechnology Inc (Santa Cruz, CA, EEUU).

2. Métodos

2.1. Diseño, fabricación y montaje del sistema de pipetas de perfusión

Todas las pipetas de vidrio empleadas fueron moldeadas de manera artesanal a partir de varillas uniformes de vidrio comerciales, empleando dos máquinas que permiten dilatar el vidrio con filamentos (platino 90%, iridio 10%) calentados eléctricamente con distinta intensidad de calor. Utilizando pesas de diferentes tamaños es posible manipular la manera en que el vidrio se elonga y la forma que tendrá el producto final. Las dimensiones y formas varían de acuerdo a la función de cada tipo de pipeta. Se diseñaron cuatro tipos de pipetas:

<u>a) Pipeta de sostén de perfusión:</u> Por un sistema de presión negativa, esta pipeta succiona el extremo proximal del túbulo, y gracias a su constricción interna, el túbulo se queda atascado en la constricción interna de esta pipeta. Para fabricarla, se parte de una varilla base con un diámetro externo de 0.084" y un diámetro interno de 0.071". La misma se moldea hasta alcanzar las siguientes dimensiones finales: diámetro en la punta y en la sección paralela, 44 µm; diámetro en la constricción, 22 µm; longitud de la sección paralela, variable entre 1 mm aproximadamente. La longitud total de la pipeta completa es 8 cm.

<u>b) Pipeta de perfusión:</u> Es la que avanza a través de la pipeta de perfusión, penetra el extremo proximal del túbulo y permite el ingreso de la solución de perfusión al mismo. Para fabricarla, se parte de una varilla base con un diámetro externo de 0.047" y un diámetro interno de 0.040". La misma se moldea hasta alcanzar las siguientes dimensiones finales: sección paralela, 11 µm de diámetro, 1 mm de longitud (considerando desde el cuello a la punta). La longitud total de la pipeta completa es 11 cm.

<u>c) Pipeta de intercambio:</u> La misma se apoya en el interior de la pipeta de perfusión (sobre el cuello, antes del angostamiento), y está conectada en su extremo superior al reservorio que contiene la solución de perfusión que se desea utilizar. Para fabricarla, se parte de una varilla base con un diámetro externo de 0.018" y un diámetro interno de 0.012". Sus dimensiones finales son: diámetro en la punta, 1/3 del diámetro de la pipeta de perfusión a la altura del cuello. La longitud total de la pipeta completa es 13.5 cm.

<u>d) Pipeta colectora:</u> Esta pipeta cumple la función de recolección de fluido perfundido, succiona el extremo distal del túbulo y lo contiene durante todo el experimento. Se fabrica de manera

similar a la pipeta de perfusión, pero carece de constricción. El diámetro en su punta es de ~33 µm, para asegurar que no hayan pérdidas de voltaje durante las mediciones eléctricas; y la longitud de la sección paralela (considerando desde el cuello a la punta) es de ~0.7 mm. A continuación, la punta y primer tercio de la sección paralela son sometidas a un proceso químico con un elastómero de silicona denominado Sylgard 184 que tras un golpe de calor endurece y provee un sellado eléctrico adicional.



Figura 6. Esquema del sistema de pipetas concéntricas de microperfusión. (a) Pipeta de sostén de perfusión, (b) pipeta de perfusión, (c) pipeta de intercambio y (d) pipeta colectora.

2.2. Obtención de túbulos aislados de la rama gruesa ascendente del asa de Henle renal

Las ratas fueron anestesiadas con ketamina y xilacina (100 y 20 mg/kg peso i.p., respectivamente). A través de una incisión se expuso la cavidad abdominal y se extrajo el riñón izquierdo. El mismo fue colocado sobre una plancha acrílica previamente refrigerada. A continuación se removió la capsula y se realizaron cortes coronales a manera de láminas finas. El tejido cortical fue descartado y se procedió a la disección de los túbulos de la rama ascendente del asa de Henle ubicados en la médula externa, trabajando en un estereomicroscopio a 4–10°C. Los túbulos aislados (0.5-1.0 mm) fueron transferidos a una cámara acrílica en un microscopio modificado. Allí, los túbulos permanecieron sumergidos en una solución (a partir de aquí denominada "baño basolateral") con reposición constante (es decir, con entrada y salida continua de solución) a un flujo de 1 ml/min y temperatura controlada (37 \pm 1°C). Los túbulos fueron

contenidos y perfundidos a través del sistema de pipetas concéntricas descriptas en el Protocolo 2.1 de esta sección.

2.3. Medición de potenciales de dilución en túbulos aislados de la rama gruesa ascendente del asa de Henle renal y cálculo de P_{Na}^{+}/P_{Cl}^{-}

En estos experimentos, nuestra plataforma de trabajo montada sobre el microscopio contó con dos electrodos de calomelanos sumergidos en KCI 3M. El primero fue conectado a través de un puente de agar 4% en NaCl 150 mM al sistema de pipetas de perfusión por un extremo, y a un voltímetro (y sistema de integración de señal) por el otro. El segundo fue conectado a través de un puente de iguales características al baño basolateral por un extremo, y con conexión a tierra por el otro. El sistema de integración de señal conectado al software permitió registrar el trazo continuo de voltaje durante la totalidad del experimento.

Previo al aislamiento del túbulo de la rama gruesa ascendente del asa de Henle, se estabilizó la línea de base con solución salina fisiológica de idéntica composición en el lumen y baño basolateral (conteniendo entre otros, 142/134 mM Na⁺/Cl⁻, como se describió en 1.4). El flujo del baño se fijó en 1 ml/min y la temperatura se mantuvo a 37 +/- 1 °C.

Rápidamente se procedió a la disección, aislamiento, transferencia y perfusión de un túbulo, de la manera descripta en el Protocolo 2.2 de esta sección. Después de una preincubación de 15 minutos para llegar al equilibrio, se procedió a medir el voltaje transepitelial por 6 a 12 minutos, dependiendo del protocolo específico (en los experimentos del Objetivo A los períodos fueron de 12 minutos, mientras que en los experimentos de los Objetivos C y D, el tiempo de cada período se redujo a 6 minutos porque se vio que era suficiente para completar la transición de voltaje). A continuación se reemplazó la solución del baño basolateral por una con una concentración reducida de NaCI (16/8, 32/24, o 64/56 mM Na⁺/Cl⁻ y se mantuvo el contenido de los demás compuestos idénticos.) durante 6 a 12 minutos de acuerdo a lo descripto en 1.4. La diferencia de voltaje generada, medida tres minutos después de introducir este gradiente, fue considerada como el "potencial de dilución" control. La Figura 7 grafica la técnica de medición del voltaje. Cumplido el tiempo, se permitió un período de recuperación, en el cual se volvió a las condiciones iniciales (soluciones simétricas dentro y fuera del túbulo) durante 12 minutos. Este proceso se repitió en presencia del compuesto a evaluar. La Figura 8 esquematiza el trazo representativo del protocolo de medición de potenciales de dilución. A los valores de potencial de dilución obtenidos se les restó el potencial de unión líquida, que es el potencial que nace de la interfase entre dos soluciones de diferente concentración (localizada en la punta del puente de agar).



Figura 7. Esquema de un túbulo perfundido y técnica de medición de voltaje

Na/Cl en el lumen (mM)	142	142	142	142
Na/Cl en baño (mM)	142	32	142	32



Figura 8. Esquema y trazo representativo del protocolo de medición de potenciales de dilución.

A partir del potencial de dilución de cada período, se calculó P_{Na+}/P_{CI-} según la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz.

$$\Delta V = \left(\frac{RT}{zF}\log\left(\frac{P_{Na^{+}}\left[Na^{+}_{\text{int}}\right]}{P_{Na^{+}}\left[Na^{+}_{ext}\right]} - \frac{P_{Cl^{-}}\left[Cl^{-}_{ext}\right]}{P_{Cl^{-}}\left[Cl^{-}_{\text{int}}\right]}\right)\right)_{1} - \left(\frac{RT}{zF}\log\left(\frac{P_{Na^{+}}\left[Na^{+}_{\text{int}}\right]}{P_{Na^{+}}\left[Na^{+}_{ext}\right]} - \frac{P_{Cl^{-}}\left[Cl^{-}_{ext}\right]}{P_{Cl^{-}}\left[Cl^{-}_{\text{int}}\right]}\right)\right)_{2}$$

Donde, ΔV: diferencia de voltaje (entre la condición de potencial de dilución –donde la concentración de NaCl en la solución del baño está reducida-, y la condición inicial – donde tanto el lumen como el baño tienen solución salina de 142 mM Na⁺/ 134 mM Cl⁻); R: constante ideal de los gases;T: temperatura en Kelvin; F: constante de Faraday; z: valencia iónica; P_{Na+} y P_{Cl-}: permeabilidad de Na⁺ y Cl⁻ respectivamente; [Na⁺_{ext}]: concentración de Na⁺ en el baño; [Na⁺_{in}]: concentración de Na⁺ en el lumen; [Cl⁻_{extt}]: concentración de Cl⁻ en el baño ; [Cl⁻_{in}]: concentración de Cl⁻ en el lumen.

2.4. Medición y cálculo de la resistencia transepitelial específica (Rt) en túbulos aislados de la rama gruesa ascendente del asa de Henle renal

El voltaje se midió de manera constante tal como se describe en el Protocolo 2.3 de esta sección, excepto que se agregó un tercer electrodo, conectado por un puente de agar a la pipeta colectora por un extremo, y a un segundo voltímetro por el otro.

Previo al comienzo del experimento se inyectaron cuatro pulsos de +100/-100 nA y 1 s de duración, en ausencia de túbulo, para medir el artefacto del sistema. Este procedimiento se repitió al finalizar el experimento, tras liberar el túbulo.

Rápidamente se procedió a la disección, aislamiento, transferencia y perfusión de un túbulo de la manera descripta en el Protocolo 2.2 de esta sección. Luego de un período de preincubación de 14 minutos para llegar al equilibrio, se inyectaron tres pulsos de +100/-100 nA de 1 s de duración, dentro de un período de 1 min. Al cambio de voltaje promedio generado por las inyecciones de corriente se le sustrajo la línea de base de ese período y el artefacto de la inyección para obtener el valor corregido del cambio de voltaje del período control. Este procedimiento se repitió en presencia del compuesto a evaluar.

Los valores de cambio de voltaje corregidos se utilizaron para calcular Rt para cada período, implementando la teoría de cable:

$$\frac{L}{\lambda} = \cosh^{-1}(\frac{V_0}{V_1}),$$

$$R_t = \frac{V_0 \lambda}{I_0} \tanh\left(\frac{L}{\lambda}\right)$$

Donde, L: longitud del túbulo; λ : *constante espacial*; V_o: voltaje registrado en el extremo proximal; V₁: voltaje registrado en el extremo distal; R_t: resistencia transepitelial específica; I₀: corriente inyectada en el extremo proximal.

Cabe aclarar que el término "resistencia transepitelial específica" hace referencia al valor de resistencia transepitelial normalizado a unidad de longitud.

2.5. Cálculo de las permeabilidades absolutas de Na⁺ (P_{Na}⁺) y Cl⁻ (P_{Cl}⁻)

A partir de los valores de Rt y P_{Na^+}/P_{Cl^-} se calculó la permeabilidad absoluta de Na⁺ y Cl⁻. Para esto se implementó la ecuación de Kimizuka-Koketsu (52, 55):

$$P_{Na^+} = rac{G\left(rac{RT}{F^2}
ight)}{lpha \left(1+eta
ight)}$$
 ,

$$P_{Cl^-} = P_{Na^+}\beta$$

Donde, $P_{Na^{+}}$ y P_{Cl} : permeabilidad de Na⁺ y Cl; G: conductancia (1/resistencia); R: constante ideal de gases; T: temperatura en grados Kelvin; F: constante de Faraday; α : concentración de NaCl; β : P_{Cl} ·/ $P_{Na^{+}}$.

2.6. Obtención de una suspensión enriquecida de túbulos de la rama gruesa ascendente del asa de Henle

Previamente al comienzo del procedimiento quirúrgico se preparó una solución de colagenasa 1 mg/ml diluída en solución fisiológica oxigenada (O₂ 100% por al menos 15 min) a la cual se le agregó 0.1 ml de heparina y se mantuvo en hielo. Las ratas fueron anestesiadas con ketamina y xilacina (100 y 20 mg/kg peso i.p., respectivamente). Adicionalmente fueron inyectadas con 0.1 ml de heparina. A continuación se realizó una incisión en forma de "U" para exponer la cavidad torácica-abdominal. Utilizando hisopos se desplazaron las vísceras hacia la derecha para exponer la arteria aorta/vena cava (en su tramo inferior, con respecto a los riñones) y se disgregó el tejido conectivo rodeando a las mismas. Utilizando una pinza angulada se separaron la arteria aorta y la vena cava del músculo posterior y se introdujo un hilo de sutura alrededor de ambas. Se ajustó el hilo con un nudo y de esta manera el flujo de sangre quedó bloqueado en este punto. Luego, se colocó un clamp en la aorta (más o menos 3 cm más arriba que el hilo de sutura) y se hizo un pequeño corte en la pared arterial con una tijera Westcott para introducir una cánula. Al remover el clamp, pudo verse flujo de sangre subiendo por la cánula. Seguidamente, se localizó la arteria submesentérica y se la anudó con un hilo de sutura, y se colocó una pinza hemostática obstruyendo la arteria y vena cava proximales para circunscribir la zona a perfundir. Se prendió la bomba de perfusión y la solución de colagenasa comenzó a circular y los riñones comenzaron a tornarse de color amarillo claro. Se hizo una incisión en la vena cava como ruta de salida.

Una vez finalizada la perfusión, los riñones fueron removidos y decapsulados. Con una hoja de afeitar se realizaron cortes coronales a manera de láminas gruesas, de las cuáles solo se conservó la porción externa de la médula. La misma fue picada y colocada en un tubo plástico de 2 ml conteniendo solución de colagenasa 1 mg/ml preparada en solución fisiológica, en un baño térmico a 37°C. Cada 5 min el contenido del tubo fue agitado con una pipeta con un tip ancho (con un orificio de 1.8 mm de diámetro interno para evitar dañar los túbulos) y oxigenado con 100% O₂. A continuación, el tubo fue centrifugado a 800 rpm en una microcentrífuga refrigerada a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 1 ml de solución hielo sobre un agitador magnético por 30 min. Cumplido este paso, la suspensión fue filtrada a través de una malla de nylon de 250 µm. El contenido recuperado fue centrifugado a 800 rpm por 2 min, y el pellet resuspendido en 1 ml de solución fisiológica para ser centrifugado una vez más en iguales condiciones. El nuevo pellet fue resuspendido en 0.5 ml de búffer de lisis con agregado de un cocktail comercial de inhibidores de proteasa (conteniendo AEBSF, aprotinina,
bestatina, E64, leupeptina y pepstatina). El lisado fue agitado primero con una pipeta con tip ancho (llevando el contenido hacia arriba y hacia abajo 4 veces) y luego con el vórtex (1 s de duración, 10 veces). A continuación la suspensión fue centrifugada 5 min a 13200 rpm y el sobrenadante, enriquecido en túbulos de rasa gruesa ascendente del asa de Henle fue transferido a un nuevo tubo. Se separó una alícuota para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford y el remanente se utilizó para el ensayo de Western blot.

Este protocolo permite obtener suspensiones de rama gruesa ascendente del asa de Henle de ~95% de pureza.

2.7. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (7), utilizando BSA como estándar. Las mediciones se realizaron en placas de 96 pocillos, registrándose las lecturas de absorbancia a 595 nm en un lector de ELISA (Spectra Max 340, Molecular Devices).

2.8. Electroforesis de proteínas en matriz de poliacrilamida

Las proteínas en la suspensión enriquecida de túbulos de rama gruesa ascendente del asa de Henle fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).

Cada muestra se preparó combinando el volumen de suspensión de túbulos correspondiente a la cantidad deseada de proteína más búffer de siembra 6x (0.375M Tris pH 6.8, 12% SDS, 60% glicerol, 0.85 M 2-mercapto etanol, 0.06% azul de bromofenol) y calentando a 100°C por 5 min. Las mismas fueron sembradas en un gel de poliacrilamida 12%. El búffer de corrida utilizado fue Tris 0.025 M, glicina 0.192 M, SDS 0.5%, pH 8.3. La corrida electroforética se realizó a 80 V por los primeros 25 min, y 100 V durante el tiempo restante.

A continuación, el gel fue equilibrado en búffer de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol, pH 8.3). Las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF previamente activada en metanol. Se empleó un sistema de electrotransferencia húmeda, a 30 V durante 16 hs.

2.9. Detección de proteína de interés y revelado

La membrana fue incubada en un búffer de bloqueo conteniendo BSA 5% en TTBS (NaCl 140 mM, KCl 3 mM, Tris 25 mM, Tween 20 0.1%) por 1 h, para evitar que los anticuerpos se unan a sitios inespecíficos.

En seguida se procedió a la incubación de la membrana con el anticuerpo primario, anticlaudina19, durante 1 h. Se utilizó una dilución 1/2000 preparada en BSA 5% en TTBS. Finalizado este paso, la membrana fue sometida a enjuagues sucesivos con TTBS durante 30 m. Luego se procedió a la incubación de la misma con el anticuerpo secundario, anti-IgG de cabra unido a la enzima peroxidasa, durante 1 h. La dilución utilizada de este anticuerpo fue 1/2000 preparado en BSA 5% en TTBS.

El resultado de la reacción se evidenció con el reactivo de detección de quimioluminiscencia ECL. La señal se obtuvo exponiendo la reacción en placas de autoradiografía por tiempo variable. Paso siguiente, las placas se sometieron a una fijación química.

2.10. Modelado matemático de la concentración luminal de Na⁺ a lo largo de la rama gruesa ascendente del asa de Henle.

Este protocolo se realizó en colaboración con la Dra Rosanna Occhipinti, PhD en Matemática e Investigadora del Departamento de Fisiología y Biofísica de la Facultad de Medicina en CWRU.

Se desarrolló un modelo matemático sencillo de la concentración de Na⁺ presente en el lumen [Na⁺]_i a lo largo de la rama gruesa ascendente del asa de Henle siguiendo el enfoque de Layton et al (61) y Layton y Edwards (60). El modelo se basó en las siguientes supuestos: a) el segmento en cuestión es rígido, extendiéndose desde la base de la porción más externa de la médula (*x* = 0) hasta el final de la región cortical del túbulo rama gruesa ascendente del asa de Henle (*x* = L) y que la unión cortico-medular está situada en x = x^{*} (x^{*} = 0.18cm, equivalente al 30% de la longitud total (L) del túbulo, que en nuestros experimentos es 0.6 cm); b) x es positiva en la dirección del flujo constante (Q) a lo largo del túbulo; c) la concentración de Na⁺ en el lumen (Q·[Na⁺]_i) varía a lo largo del túbulo dada la tasa de reabsorción de Na⁺ (*J*). Por lo tanto, la ecuación de conservación de soluto para [Na⁺]_i (luminal) a lo largo de la rama gruesa ascendente del asa de Henle en estado de equilibrio está dada por la ecuación diferencial de primer orden:

$$Q\frac{d}{dx}([\mathrm{Na}^+]_{\mathrm{i}}) = -2\pi r \cdot J, \qquad (1)$$

Donde, r: radio del túbulo.

Ya que *J* depende de: 1) transporte activo transcelular (J_A) mediado por el cotransportador apical Na⁺-K⁺-2Cl⁻ y la bomba Na⁺-K⁺-ATPasa basolateral; y 2) el transporte a través de la vía pasiva paracelular (J_P) mediada por el voltaje luminal positivo (V_m), se puede definir:

$$J = J_{\rm A} + J_{\rm P},\tag{2}$$

Donde J_A sigue una cinética de Michaelis-Menten

$$J_{\rm A} = T_{\rm max} \frac{[{\rm Na}^+]_{\rm i}}{K_m + [{\rm Na}^+]_{\rm i}},$$
(3)

Se asumió una velocidad máxima T_{max} de 400 pmol/mm/min de manera similar a un reporte previo (61). De esta manera se alcanza un valor de $[Na^+]_i$ de ~25 mmol/L al final del túbulo, semejante al valor fisiológico (6). El valor de K_m es 30 mmol/L, un promedio de los distintos K_m para Cl⁻ de las isoformas de NKCC2 presentes en la capa externa de la médula y en la corteza, dado que Cl⁻ es cotransportado obligatoriamente con Na⁺ y es el ión limitante para la reabsorción de este último.

J_P sigue la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz (GHK)

$$J_{\rm P} = P_{\rm Na^+} \frac{FV_m}{RT} \left(\frac{[\rm Na^+]_i - [\rm Na^+]_o \exp(-FV_m / RT)}{1 - \exp(-FV_m / RT)} \right).$$
(4)

Donde: $P_{Na^+} F$, R, T tienen el mismo significado previamente descripto. $[Na^+]_o$ es la concentración de sodio intersticial. Como $[Na^+]_o$ depende del transporte y J_A decae exponencialmente, asumimos que $[Na^+]_o$ decae exponencialmente a partir de la concentración basolateral inicial de Na⁺ ($[Na^+]_{o,inicial}$) (en x=0) a su concentración intersticial final ($[Na^+]_{o,final}$), alcanzada en (x = L), de acuerdo a la ecuación

$$[Na^{+}]_{o} = ([Na^{+}]_{o,\text{initial}} - [Na^{+}]_{o,\text{final}}) \exp(-x/0.05) + [Na^{+}]_{o,\text{final}}.$$
 (5)

Considerando que la osmolalidad en la capa externa de la médula es aproximadamente 350-400 mOsm/kg H₂O (42), se tomó 175 mmol/L como valor de [Na⁺]_{o,initial}. En la corteza, basándonos en los experimentos realizados en esta tesis, la osmolalidad es de 290 mOsm/kg de H₂O y por ende, se tomó 140 mmol/L como valor de [Na⁺]_{o,final}. Dada la alta tasa de perfusión en la corteza, [Na⁺]_o alcanza su valor mínimo de 140 mmol/L ([Na⁺]_{o,final}) en la unión corticomedular (en $x = x^{*}$). El valor de la tasa constante *r*, considerada 0.03, garantiza que [Na⁺]_o alcance su valor mínimo de 140 mmol/L en x^{*} = 0.18cm (30% de la longitud total del túbulo).

Finalmente, se asumió el voltaje luminal positivo, V_m , está influenciado tanto por el transporte activo como pasivo. Por lo tanto, se determinó:

$$V_m = V_A + \alpha V_P, \tag{6}$$

Dado que el componente activo del voltaje V_A , se debe al transporte activo J_A , y que este sigue una cinética de Michaelis-Menten, se asumió que V_A también sigue una cinética de este tipo, de acuerdo a la ecuación:

$$V_{\rm A} = V_{initial} \frac{[{\rm Na}^+]_{\rm i}}{K_m + [{\rm Na}^+]_{\rm i}},$$
(7)

Con un K_m igual al de J_A , y un voltaje luminal positivo máximo (V_{max}) de 10 mV medido al comienzo del túbulo donde J_A esta estimulado al máximo.

El componente pasivo del voltaje, V_P, está dado por la ecuación de Nernst

$$V_{\rm p} = 2.303 \frac{RT}{F} \log_{10} \left(\frac{[{\rm Na}^+]_{\rm o}}{[{\rm Na}^+]_{\rm i}} \right).$$
(8)

Dado que en el modelo no se incluyó Cl⁻, su efecto sobre V_m , y en particular sobre el componente pasivo del voltaje, V_P, fue compensado introduciendo un factor de corrección α . La elección del factor de corrección se hizo con la siguiente lógica: en nuestros experimentos de potencial de dilución, si Na⁺ fuera el único ion permeable, e hiciéramos un análisis utilizando la ecuación de Nernst considerando las concentraciones 142 mmol/L para [Na⁺]_i y 32 mmol/L para [Na⁺]_o (que son las que se utilizaron en los protocolos de potencial de dilución), calcularíamos un voltaje de ~-40 mV. Sin embargo, experimentalmente, el voltaje que medimos y calculamos con la ecuación de GHK (considerando además los valores de 134 mmol/L para [Cl⁻]_o y 24 mmol/L para [Cl⁻]_o utilizados), fue ~ -11 mV ya que Cl⁻ también es permeable con una selectividad Na⁺/Cl⁻ de ~2. Entonces el α es calculado como el radio entre el voltaje calculado por GHK para Na⁺ and Cl⁻, V_{P,GHK}, y el predicho para Na⁺ solamente con la ecuación de Nernst, V_{P,Nernst}. El valor de α calculado es 0.28, y la ecuación es la siguiente:

$$\alpha = \frac{V_{P,GHK}}{V_{P,Nernst}} = \frac{2.303 \frac{RT}{F} \log_{10} \left(\frac{P_{Na^{+}} [Na^{+}]_{o,*} + P_{CI^{-}} [CI^{-}]_{i,*}}{P_{Na^{+}} [Na^{+}]_{i,*} + P_{CI^{-}} [CI^{-}]_{o,*}} \right)}{2.303 \frac{RT}{F} \log_{10} \left(\frac{[Na^{+}]_{o,*}}{[Na^{+}]_{i,*}} \right)}$$
(11)

Donde $[Na^+]_{i,*} = 142 \text{ mmol/L}, [Na^+]_{o,*} = 32 \text{ mmol/L}, [Cl^-]_{i,*} = 134 \text{ mmol/L}, and [Cl^-]_{o,*} = 24 \text{ mmol/L}.$

Asumiendo que $[Na^+]_i = 175 \text{ mmol/L}$ al principio del túbulo (x = 0), $r = 10 \mu \text{m} \text{ y Q} = 10 \text{ nL/min}$, la ecuación diferencial inicial (1) se resolvió utilizando el software Matlab usando la herramienta para resolución de ecuaciones diferenciales "stiff", ode15s.

Se realizaron cuatro simulaciones para predecir la concentración luminal de Na⁺ al final del túbulo bajo las siguientes condiciones: 1) control; 2) considerando los efectos del NO sobre la vía paracelular únicamente; 3) considerando el efecto del NO sobre las vía transcelular únicamente, y 4) considerando el efecto de NO sobre las vías paracelular y transcellular combinadas.

Para la simulación de la condición control se utilizaron los valores del P_{Na^+} y P_{Cl^-} obtenidos experimentalmente en este trabajo y un $\alpha = 0.28$. A continuación, el efecto de NO sobre la vía paracelular únicamente fue simulado asignando los valores de P_{Na^+} y P_{Cl^-} calculados en presencia de L-arginina y un $\alpha = 0.22$. El efecto de NO sobre la vía transcelular únicamente fue simulado reduciendo el valor de T_{max} un 30%, es decir $T_{\text{max}} = 280$ pmol/mm/min, asignando los valores de P_{Na^+} y P_{Cl^-} utilizados para el caso control y un $\alpha = 0.28$. Finalmente, el efecto de NO sobre ambas vías combinadas se simulo reduciendo el valor de T_{max} un 30%, asignando valores de P_{Na^+} , P_{Cl^-} y α iguales a aquellos utilizados en la simulación en la que testeamos el efecto de NO sobre la vía paracelular únicamente.

2.11. Estadística

Para los experimentos de resistencia, potenciales de dilución y P_{Na}^+/P_{Cl}^- utilizamos el programa de análisis estadístico GraphPad Prism 6 y aplicamos el test de Student para experimentos apareados. Para el análisis estadístico de las permeabilidades absolutas P_{Na}^+ y P_{Cl}^- se utilizó el método de bootstrapping para muestras no apareadas a partir de los P_{Na}^+/P_{Cl}^- y Rt obtenidos. En todos los casos, los resultados se presentan como los promedios ± SEM. Se consideró como significativo un valor de p<0.05.

Resultados

Objetivo A

Estudiar los efectos del NO sobre el radio de permeabilidad Na⁺/Cl⁻ (P_{Na+}/P_{Cl-}), medida de permeselectividad paracelular, en túbulos aislados provenientes de rama gruesa ascendente del asa de Henle de rata y la cascada de señalización involucrada.

1. Efecto del NO sobre permeselectividad paracelular en la rama gruesa ascendente del asa de Henle

1.1. Determinación de las condiciones a utilizar durante los experimentos de potencial de dilución

Con el objetivo de determinar las condiciones óptimas para los experimentos siguientes, evaluamos los potenciales de dilución generados a partir de la sustitución de la solución fisiológica del baño lateral por otra conteniendo 16/8, 32/24, o 64/56 mM Na⁺/Cl⁻. Los potenciales de dilución fueron -13.6 \pm 2.2 mV (n=5), -10.8 \pm 3.0 mV (n=6), y -6.1 \pm 0.9 mV (n=4), respectivamente. Los valores de P_{Na}⁺/P_{Cl}⁻ calculados fueron 2.0 \pm 0.2, 2.2 \pm 0.5, y 1.9 \pm 0.2. Decidimos proceder utilizando la solución conteniendo 32/24 mM Na⁺/Cl⁻, ya que esta fue la concentración más alta de NaCl a la que pudimos observar valores con menos variabilidad y que nos permitiría apreciar luego un efecto claro de los compuestos a evaluar.

1.2. Efecto de dos dadores de NO sobre la permeselectividad de la vía paracelular en túbulos de la rama gruesa ascendente del asa de Henle

Comenzamos evaluando el efecto del dador de NO esperminaNONOato a una concentración de 200 μ M sobre el potencial de dilución generado por el remplazo de la solución basolateral inicial por otra conteniendo 32/24 mM Na⁺/Cl⁻. Durante el período control, el potencial de dilución fue -11.1 ± 2.1 mV. Luego de agregar esperminaNONOato en el baño basolateral, el potencial de dilución registrado fue -6.5 ± 1.6 mV, indicando una reducción de la magnitud del mismo de un 41.4% (Figura 9A; p<0.004; n=9). El P_{Na}⁺/P_{Cl}⁻ calculado en el período control fue 2.2 ± 0.4, mientras que en presencia de esperminaNONOato fue 1.5 ± 0.2 (p< 0.04).



Figura 9. Efecto del dador de NO esperminaNONOato (SPM) sobre (A) los potenciales de dilución provocados por $32/24 \text{ mM Na}^+/Cl \text{ y}$ (B) P_{Na}^+/P_{Cl}^- calculado. Se muestran experimentos individuales y medias con error estándar de la media (n=9).

Se realizaron experimentos control donde se evaluó que el tiempo no fuera una variable que afectara a los potenciales de dilución. Durante el período control 1 el potencial de dilución fue -10.8 \pm 3.0 mV, y durante el período control 2 fue -8.8 \pm 2.6 mV (Figura 10; n=6). No se encontraron diferencias significativas. Estos resultados sugieren que el NO regula la permeselectividad paracelular.



Figura 10. Efecto de la variable tiempo sobre los potenciales de dilución provocados por 32/24 mM Na⁺/Cl⁻. Se muestran experimentos individuales y medias con error estándar de la media (n=6).

Para asegurar que estos resultados se debieran a las acciones del NO y no a subproductos de la descomposición química de esperminaNONOato, utilizamos un dador de NO alternativo y químicamente distinto, nitroglicerina (200 μ M). El potencial de dilución en el período control fue -11.6 ± 1.7 mV. Tras agregar nitroglicerina, el potencial de dilución fue -9.5 ± 1.5 mV, indicando una reducción de la magnitud de esta variable del 18.1% (Figura 11; p<0.02; n=5). El P_{Na}⁺/P_{Cl}⁻ calculado durante el período control fue 2.1 ± 0.2, mientras que en presencia de nitroglicerina fue 1.8 ± 0.2 (p< 0.025). De manera conjunta, estos resultados indican que el NO reduce la permeselectividad de la vía paracelular en la rama gruesa ascendente del asa de Henle.



Figura 11. Efecto del dador de NO nitroglicerina (NTG) sobre (A) los potenciales de dilución provocados por $32/24 \text{ mM Na}^+/Cl \text{ y}$ (B) P_{Na}^+/P_{Cl}^- calculado. Se muestran experimentos individuales y medias con error estándar de la media (n=5).

1.3. Efecto del NO producido de manera endógena en la permeselectividad de la vía paracelular en túbulos de la rama gruesa ascendente del asa de Henle

La rama gruesa ascendente del asa de Henle produce NO a partir de L-arginina. Por esto, decidimos evaluar si los efectos inhibitorios observados con los dadores de NO ocurren con el NO producido de manera endógena. Durante el período control, el potencial de dilución fue -11.0 \pm 1.7 mV. Cuando se agregó L-arginina (0.5 mM) para estimular la producción de NO, el potencial de dilución registrado fue -8.0 \pm 1.0 mV (Figura 12; n=6; p<0.03), evidenciando una reducción del mismo de este parámetro del 27.3%. El P_{Na}⁺/P_{Cl}⁻ calculado fue 2.0 \pm 0.2 en el período control y 1.6 \pm 0.1 tras la adición de L-arginina (p<0.05).



Figura 12. Efecto de L-arginina (L-arg) sobre (A) los sobre los potenciales de dilución provocados por $32/24 \text{ mM Na}^+/Cl \text{ y } (B) P_{Na}^+/P_{Cl}^-$ calculado. Se muestran experimentos individuales y medias con error estándar de la media (n=6).

2. Cascada de señalización mediando los efectos observados del NO sobre la vía paracelular de la rama gruesa ascendente del asa de Henle

La mayoría de las acciones del NO en túbulo proximal (34, 97, 113) y rama gruesa ascendente del asa de Henle (23, 27) están mediadas por GMPc, por lo tanto decidimos evaluar si este segundo mensajero está participando en sus efectos sobre P_{Na}^+/P_{Cl}^- . Encontramos que durante el período control, el potencial de dilución fue -13.4 ± 2.9 mV, y en presencia del análogo permeable de GMPc, dibutiril-GMPc (500 µM), el potencial de dilución fue -7.5 ± 1.8 mV, evidenciando una reducción de dicho parámetro del 44% (Figura 13; p< 0.02; n=6).



Figura 13. Efecto del segundo mensajero GMPc sobre los potenciales de dilución provocados por 32/24 mM Na⁺/Cl⁻. Se muestran experimentos individuales y medias con error estándar de la media (n=6).

El GMPc puede activar dos mediadores posteriores en la cascada de señales, PKG (80) y fosfodiesterasa 2 (82). Por lo tanto, analizamos a continuación cuál de ellos está involucrado en las acciones del NO en nuestro modelo.

Primero estudiamos el efecto del inhibidor de PKG, KT5823 (4 μ M). Durante el período control, en presencia de KT 5823, el potencial de dilución fue -8.6 ± 0.1 mV. Cuando esperminaNONOato fue agregada, el potencial de dilución fue de -7.1 ± 0.9 mV, sin mostrar diferencias significativas (Figura 14, n=6).



Figura 14. Efecto de esperminaNONOato sobre los potenciales de dilución provocados por 32/24 mM Na⁺/Cl⁻ en presencia del inhibidor de PKG dependiente de GMPc, KT5823. Se muestran experimentos individuales y medias con error estándar de la media (n=6).

Adicionalmente, realizamos experimentos control para descartar que KT5823 afectara los potenciales de dilución por sí mismo. Durante el período control, el potencial de dilución fue -12.1 \pm 2.6 mV, y en presencia de KT5823 fue -11.9 \pm 2.6 mV (Figura 15; n=4).



Figura 15. Efecto del inhibidor de PKG dependiente de GMPc, KT5823, sobre los potenciales de dilución provocados por 32/24 mM Na⁺/Cl⁺. Se muestran experimentos individuales y medias con error estándar de la media (n=4).

No hubo diferencias significativas entre el período control y el de tratamiento, indicando que el inhibidor empleado no tiene efectos sobre la vía paracelular.

A continuación evaluamos el efecto del inhibidor específico de fosfodiesterasa 2, BAY60-7550 (10 μ M). El potencial de dilución del período control en presencia de BAY60-7550 fue -7.0 ± 0.5 mV. Tras la adición de esperminaNONOato (200 μ M), el potencial fue de -4.1 ± 0.5 mV (Figura 16; n=6; p<0.005), evidenciando una reducción del 41.4%.



Figura 16. Efecto de esperminaNONOato sobre los potenciales de dilución provocados por 32/24 mM Na⁺/Cl⁻ en presencia del inhibidor de fosfodiesterasa 2, BAY60-7550. Se muestran experimentos individuales y medias con error estándar de la media (n=6).

A manera de control, evaluamos si BAY60-7550 tenía algún efecto por sí mismo sobre los potenciales de dilución. En el período control, el potencial de dilución fue -12.1 \pm 1.6 mV. Luego de agregar el inhibidor de fosfodiesterasa 2, el potencial de dilución fue -11.5 \pm 1.1 mV. (Figura 17; N=4). No se encontraron diferencias significativas entre el control y el tratamiento, descartando que BAY60-7550 tuviera un efecto per se sobre la variable medida.



Figura 17. Efecto del inhibidor de fosfodiesterasa 2, BAY60-7550, sobre los potenciales de dilución provocados por 32/24 mM Na⁺/Cl⁺. Se muestran experimentos individuales y medias con error estándar de la media (n=4).

Estos resultados indican que PKG está mediando los efectos del NO sobre la vía paracelular, basándonos en el hecho de que el efecto del NO fue prevenido en presencia de inhibidor de PKG. En contraste, cuando utilizamos un inhibidor de fosfodiesterasa 2, el efecto del NO sobre el potencial de dilución igual tuvo lugar.

Objetivo B

Analizar los efectos del NO sobre la resistencia transepitelial de dichos túbulos.

1. Efecto del NO de producción endógena sobre la resistencia transepitelial en túbulos de la rama gruesa ascendente del asa de Henle

Es posible que las permeabilidades cambien sin generar un impacto sobre las propiedades eléctricas de la vía paracelular, por eso decidimos estudiar el efecto de NO sobre la resistencia transepitelial. Para ello, medimos este parámetro en túbulos aislados de la rama gruesa ascendente del asa de Henle y cómo se ve afectado en presencia del NO. Actualmente no hay evidencia bibliográfica de los valores basales de la Rt en este segmento.

La Rt ese determinó midiendo la diferencia de voltaje proximal y distal generadas por una inyección de corriente en presencia o ausencia de L-arginina. Durante el período control la Rt fue 7722 \pm 1554 ohm-cm, y 6318 \pm 1757 ohm-cm luego de agregar L-arginina para estimular la producción endógena de NO (Figura 18, n=10, p<0.05).



Figura 18. Efecto de L-arginina sobre la resistencia transepitelial específica en la rama gruesa ascendente del asa de Henle. Se observan experimentos individuales y medias con error estándar de la media (n=10).

Para confirmar que el efecto de la L-arginina sobre la Rt se debiera al NO, repetimos esta medición en presencia del inhibidor de NOS, L-NAME. El valor de la Rt obtenido en el período control (L-NAME solo) fue 7924 ± 1964 ohm-cm. Al agregar L-arginina en presencia de L-NAME, la Rt fue 8463 ± 1725 ohm-cm. No se encontraron diferencias significativas entre las dos condiciones (Figura 19, n=6). El L-NAME bloqueó la habilidad de la L-arginina de disminuir la resistencia transepitelial, sugiriendo que el NO es el mediador de los efectos de la L-arginina. Se realizaron experimentos control donde corroboramos que el L-NAME per se no tiene efecto sobre la Rt.



Figura 19. Efecto del inhibidor de la NOS, L-NAME, sobre la resistencia transepitelial específica. Se observan experimentos individuales y medias con error estándar de la media (*n*=6).

2. Efecto del GMPc sobre Rt

Investigamos el efecto del GMPc sobre la resistencia transepitelial utilizando db-GMPc en este segmento. Durante el período control, el valor de la Rt fue 7592 \pm 1470 ohm-cm. Tras agregar db-GMPc, la misma disminuyó a 4796 \pm 847 ohm-cm (Figura 20, n=10, p<0.04).



Figura 20. Efecto del db-GMPc sobre la resistencia transepitelial específica. Se observan experimentos individuales y medias con error estándar de la media (n=10).

Objetivo C

Evaluar los efectos del NO sobre la permeabilidad absoluta de Na⁺ y Cl⁻.

1. Efecto del NO sobre las permeabilidades absolutas de Na⁺ y Cl⁻ en túbulos de la rama gruesa ascendente del asa de Henle.

1.1. Medición de potenciales bi-iónicos utilizando un dador de NO.

Nuestro primer acercamiento al estudio de las permeabilidades absolutas de Na⁺ y Cl⁻ consistió en llevar a cabo experimentos de potenciales bi-iónicos. En estos experimentos se utilizan soluciones donde el Na⁺ ó el Cl⁻ son reemplazados por N-metil-D-glucamina⁺ (NMDG) ó gluconato⁻, respectivamente, y se miden los potenciales generados tras establecer un gradiente de concentración para dicha molécula entre el lumen y el baño basolateral.

El principio detrás de este experimento es el siguiente. Tomando como ejemplo el experimento de reemplazo de Na⁺, si bien en el lumen la concentración de NMDG era mucho mayor que en el baño basolateral (~142 vs 32 mM), lo cual favorecería su pasaje, nuestra predicción era que la permeabilidad de una molécula con el peso molecular del NMDG debería ser extremadamente baja, y su contribución al voltaje medido sería despreciable. Si esto fuera así, entonces el potencial bi-iónico obtenido sería primordialmente debido al pasaje de Cl⁻, y por lo tanto podríamos realizar un análisis utilizando la ecuación de Nernst para determinar su permeabilidad absoluta (en presencia y ausencia de NO). Sin embargo, cuando realizamos este experimento, encontramos que el potencial bi-iónico bajo condiciones control fue -5.2 ± 1.0 mV y -7.4 ± 2.3 mV en presencia de esperminaNONOato (n=6; sin diferencias significativas). No sólo no se encontraron diferencias significativas, sino que además la magnitud de los potenciales obtenidos fue mucho menor de lo pronosticado por el análisis de Nernst asumiendo que la permeabilidad de Cl⁻ sería predominante por sobre la del NMDG y el Na⁺. Lo mismo ocurrió cuando repetimos el experimento utilizando una solución donde el Cl⁻ fue reemplazado por gluconato⁻. El potencial bi-iónico fue -5.1 ± 1.6 mV durante el período control y -4.1 ± 1.4 mV en presencia de esperminaNONOato (n=3; sin diferencias significativas). Estos resultados sugieren que el NMDG y el gluconato⁻ son capaces de transitar libremente por el espacio paracelular y no son útiles para la medición de las permeabilidades absolutas. Por este motivo decidimos emplear

una estrategia alternativa: es posible calcular los valores absolutos de P_{Na}^+ y P_{Cl}^- a partir de P_{Na}^+/P_{Cl}^- y Rt.

1.2. Efecto del NO producido de manera endógena sobre $P_{Na^+} y P_{CI^-}$

El segundo acercamiento para poder dilucidar el efecto de NO sobre las permeabilidades absolutas, consistió en la aplicación de la ecuación simplificada de Kimizuka-Koketsu (52, 55), detallada en la sección 2.5 de Materiales y Métodos. Para esto se necesitan los datos experimentales de P_{Na^+}/P_{Cl^-} y Rt. Como estas dos variables se estudian en animales distintos, decidimos repetir las mediciones de potencial de dilución y cálculos de P_{Na^+}/P_{Cl^-} en presencia o ausencia de L-arginina para que fueran contemporáneas de los experimentos de Rt y eliminar así variabilidad extra.

Durante el período control, el potencial de dilución fue -11.0 ± 1.1 mV. Luego de la adición de L-arginina en el baño basolateral, el potencial de dilución fue -9.0 ± 1.3 mV (Figura 21, n=9, p< 0.05). El P_{Na}^+/P_{Cl}^- calculado fue 2.0 ± 0.2 durante el período control y 1.7 ± 0.1 en presencia de L-arginina (p< 0.04).



Figura 21. Efecto de la L-arginina (L-arg) sobre (A) los potenciales de dilución provocados por $32/24 \text{ mM Na}^+/Cl \text{ y (B) } P_{Na}^+/P_{Cl}^-$ calculado. Se observan experimentos individuales y medias con error estándar de la media (n=9).

Con los datos de P_{Na}^{+}/P_{Cl}^{-} y los de Rt, procedimos entonces a calcular las permeabilidades absolutas. Encontramos que durante el período control, los valores de P_{Na}^{+} y P_{Cl}^{-} calculados fueron $3.52 \times 10^{-5} \pm 0.2 \times 10^{-5}$ cm/s y $1.81 \times 10^{-5} \pm 0.1 \times 10^{-5}$ cm/s, respectivamente. En presencia de L-arginina, P_{Na}^{+} fue $6.65 \times 10^{-5} \pm 0.69 \times 10^{-5}$ cm/s (p<0.0001 vs P_{Na}^{+} control) y P_{Cl}^{-} 3.97×10^{-5} $\pm 0.44 \times 10^{-5}$ cm/s (Figura 22, p<0.0001 vs P_{Cl}^{-} control). Estos resultados sugieren que el NO provoca un aumento de P_{Na}^{+} y P_{Cl}^{-} , pero que el aumento de P_{Cl}^{-} sería aún mayor. Esto es consistente con los resultados obtenidos previamente que indicaban que el NO disminuye el valor de P_{Na}^{+}/P_{Cl}^{-} .



Figura 22. Efecto de L-arginina (L-arg) sobre las permeabilidades absolutas de Na⁺ (P_{Na}^+) y Cf (P_{Ci}). Se observan experimentos individuales y medias con error estándar de la media (n=50).

2. Efecto del GMPc sobre P_{Na}⁺ y P_{Cl}⁻

Como previamente demostramos que el segundo mensajero en la cascada de señalización del NO es el GMPc, decidimos calcular su efecto sobre las permeabilidades absolutas a partir de los datos de Rt y P_{Na}^{+}/P_{Cl}^{-} . Como los experimentos de resistencia y potenciales de dilución fueron realizados en distintos animales y espaciados en tiempo, decidimos repetir el protocolo de potencial de dilución y cálculo de P_{Na}^{+}/P_{Cl}^{-} . Encontramos que durante el período control, el potencial de dilución fue -9.8 ± 1.0 mV, y en presencia del análogo

permeable del GMPc, dibutiril-GMPc (500 μ M), el potencial de dilución fue -7.5 ± 1.1 mV (Figura 23A; p< 0.02; n=6). El P_{Na}⁺/P_{Cl}⁻ calculado fue 1.8 ± 0.1 en el período control y 1.6 ± 0.1 luego del tratamiento con dibutiril-GMPc (Figura 23B, n=6, p<0.03).



Figura 23. Efecto del segundo mensajero, GMPc, sobre (A) los potenciales de dilución provocados por $32/24 \text{ mM Na}^+/Cl^+ y$ (B) P_{Na}^+/P_{Cl}^- calculado. Se observan experimentos individuales y medias con error estándar de la media (n=6).

Con estos datos calculamos entonces el efecto de db-GMPc sobre P_{Na}^+ y P_{Cl}^- , de la misma manera que lo hicimos para el NO. Durante el período control, P_{Na}^+ y P_{Cl}^- fueron 4.58 x $10^{-5} \pm 0.80 \times 10^{-5}$ cm/s y 2.66 x $10^{-5} \pm 0.57 \times 10^{-5}$ cm/s, respectivamente. Luego del tratamiento con db-GMPc, dichos valores incrementaron a 9.48 x $10^{-5} \pm 1.63 \times 10^{-5}$ cm/s (p<0.007 vs P_{Na}^+ período control) y 6.01 x $10^{-5} \pm 1.05 \times 10^{-5}$ cm/s (p<0.005 vs P_{Cl}^- período control), respectivamente (Figura 24, n=50).



Figura 24. Efecto del db-GMPc sobre las permeabilidades absolutas de Na⁺ (P_{Na}^+) y Cf (P_{Cl}^-). Se observan experimentos individuales y medias con error estándar de la media (n=50).

Objetivo D

Determinar si la proteína claudina-19 está involucrada en el efecto del NO sobre la permeselectividad de la vía de transporte paracelular en la rama gruesa ascendente del asa de Henle.

Participación de claudina-19 en las acciones del NO sobre la vía paracelular en la rama gruesa ascendente de asa de Henle.

La claudina-19 se expresa en el asa de Henle. Particularmente en la rama gruesa ascendente, esta proteína formaría un poro selectivo de cationes (2, 46, 49). A diferencia de las otras claudinas que se expresan en este segmento, la claudina-19 participa en la formación de una variedad de poros (claudina-19/claudina-19, claudina-19/claudina-3, y complejos claudina-16/claudina-19 y/o claudina-3/claudina-16/claudina-19) y por lo tanto representa un buen blanco para un primer acercamiento al estudio del efector o de los efectores de las acciones de NO sobre la vía paracelular (si se bloquea claudina-19 se pueden afectar múltiples poros). Además, a la fecha, la claudina-19 es la única que tiene un anticuerpo comercial dirigido a uno de sus dominios extracelulares. Esta característica era una condición necesaria para realizar los experimentos de potencial de dilución en túbulos aislados y perfundidos.

Este protocolo siguió el mismo diseño experimental general descripto en la sección de Métodos, pero se realizó en presencia constante de un anticuerpo anti-claudina-19 (1/200) o antiproteína Tamm Horsfall (control) en la solución de perfusión. En el período de tratamiento se agregó NO (de manera exógena o facilitando su producción endógena). El anticuerpo anticlaudina-19 utilizado está dirigido específicamente contra un epítope de un dominio extracelular de claudina-19. La proteína Tamm-Horsfall está presente únicamente en el lumen de la rama gruesa ascendente del asa de Henle y es utilizada como marcador de localización de este segmento.

El potencial de dilución en el período control, donde solo el anticuerpo anti-claudina-19 estaba presente, fue -12.7 ± 2.1 mV. Al agregar esperminaNONOato en presencia del anticuerpo, el potencial de dilución fue -12.9 ± 2.4 mV (Figura 25A; n=6; sin diferencias significativas). Cuando el anticuerpo bloqueó el loop extracelular de claudina-19, el efecto del NO sobre la permeselectividad desapareció, sugiriendo que dicha proteína tiene un rol n las acciones de NO sobre la vía paracelular. Este fenómeno no se observó cuando realizamos este experimento en presencia continua del anticuerpo anti-Tamm Horsfall. Durante el período control (anticuerpo

solamente), el potencial de dilución fue -9.7 \pm 1.0 mV. Al agregar esperminaNONOato en presencia del anticuerpo anti-Tamm Horsfall, el potencial de dilución fue -6.3 \pm 1.1 mV (Figura 25B, p<0.006, n=6). Estos datos demuestran que claudina-19 participa de las acciones de NO sobre la vía paracelular.



Figura 25. Efecto del NO exógeno sobre (A) los potenciales de dilución en presencia de un anticuerpo anti-claudina-19 ó (B) anti-proteína Tamm Horsfall. Se observan experimentos individuales y medias con error estándar de la media (n=6 para cada caso).

Para los experimentos con NO producido de manera endógena, se agregó L-arginina (sustrato de NOS). Durante el período control (sólo el anticuerpo anti-claudina-19 estaba presente), el potencial de dilución fue -10.1 \pm 0.9 mV. Luego del tratamiento con L-arginina (500 μ M) en presencia del anticuerpo, el potencial de dilución fue -10.1 \pm 1.0 mV (Figura 26, n=9), sin diferencias significativas.



Figura 26. Efecto de la L-arginina (L-arg) sobre los potenciales de dilución en presencia de un anticuerpo anti-claudina-19. Se observan experimentos individuales y medias con error estándar de la media (n=9).

Para asegurarnos de que el anticuerpo anti-claudina-19 empleado estuviera efectivamente uniéndose a la proteína claudina-19 presente en nuestros túbulos, realizamos Western blots. Para esto obtuvimos suspensiones enriquecidas de túbulos de la rama gruesa ascendente del asa de Henle como se describió en la sección de Métodos, medimos el contenido de proteínas y sembramos un control negativo, un control positivo y concentraciones crecientes de dicha suspensión de túbulos en un gel de poliacrilamida. Los controles consistieron de un lisado de células HEK293T con (positivo) o sin (negativo) un plásmido de sobreexpresión de proteína claudina-19.

Luego de la corrida electroforética y la transferencia, procedimos a revelar el resultado en placas radiográficas. Detectamos la proteína de interés en las muestras de rama gruesa ascendente del asa de Henle, representada por una doble banda a la altura de la línea de peso

molecular de ~23 kDa. La misma doble banda fue identificada en el control positivo, y no así en el control negativo (Figura 27).



Figura 27. Detección de claudina-19 en suspensiones enriquecidas de rama gruesa ascendente del asa de Henle con el anticuerpo previamente utilizado en los experimentos de potencial de dilución.

Estos datos nos permiten concluir que las acciones de NO sobre la permeselectividad paracelular de la rama gruesa ascendente del asa de Henle están mediadas por un poro en el que la claudina-19 está presente.

Objetivo E

Analizar el efecto del NO sobre la reabsorción paracelular de Na⁺ a través de un modelo matemático utilizando los resultados hallados en nuestros experimentos.

Modelado matemático de la hipótesis

Los cambios en las permeabilidades de Na⁺ y Cl⁻ causados por el NO podrían cesar el efecto inhibitorio de este compuesto sobre el transporte transcelular incrementando el flujo de NaCl a través de la vía paracelular ó aumentar el efecto inhibitorio reduciendo la reabsorción a través de esta vía. Para poder contestar esta pregunta, diseñamos un modelo matemático para predecir el efecto de NO sobre la concentración luminal de Na⁺. Los valores considerados para cada parámetro fueron los presentados experimentalmente en este proyecto y otros previamente reportados. Las Figuras 28, 29 y 30 muestran las predicciones del modelo en función de la longitud del túbulo considerando los efectos de NO sobre la vía paracelular solamente o sobre las vías paracelular y transcelular combinadas.

En la condición control en ausencia del NO, la concentración luminal de Na⁺ cayó exponencialmente a 22.4 mM al final de la rama gruesa ascendente del asa de Henle. Cuando se consideró el efecto del NO sobre la vía paracelular solamente, la reabsorción de Na⁺ aumentó en el primer tramo del segmento, pero hacia el final del túbulo la concentración de Na⁺ fue de 33.9 mM, mucho mayor que en la condición control. Al considerar el efecto de NO sobre la vía transcelular únicamente, la concentración luminal de Na⁺ fue 46.2 mM, y al tener en cuenta su efecto sobre ambas vías de reabsorción (paracelular + transcelular) combinadas, 52.5 mM.



Figura 28. Modelo matemático del efecto del NO sobre la concentración luminal de sodio a lo largo del túbulo de rama gruesa ascendente del asa de Henle.



Figura 29. Simulación del efecto delfr NO sobre el valor de J_P (componente paracelular del transporte) a lo largo del túbulo de rama gruesa ascendente del asa de Henle.



Figura 30. Simulación del efecto del NO sobre el valor de V_m (voltaje luminal) a lo largo del túbulo de rama gruesa ascendente del asa de Henle.

Discusión

Como se mencionó en la introducción, el NO reduce la reabsorción transepitelial neta de NaCl (88, 91) y la actividad del cotransportador Na⁺/K⁺/2Cl⁻ (85) en la rama gruesa ascendente del asa de Henle. Sin embargo, sus efectos sobre la ruta paracelular, que es responsable de hasta el 50% de la reabsorción de Na⁺, se desconocen. Nuestra hipótesis inicial era que el **NO** reduce la selectividad de la vía paracelular de absorción a Na⁺, disminuyendo el transporte de dicho soluto, y estos efectos están mediados por claudina-19.

El punto de partida para abordar nuestra hipótesis, fue estudiar los efectos del NO sobre la selectividad de la ruta paracelular midiendo potenciales de dilución y calculando el radio de permeabilidad Na⁺/Cl⁻. Los potenciales de dilución son producto del movimiento de los iones a través de las uniones estrechas intercelulares a favor del gradiente de concentración. El mismo depende de la selectividad de carga y el impedimento estérico del espacio paracelular.

En nuestros experimentos encontramos que P_{Na}^+/P_{Cl}^- era ~2 bajo diferentes condiciones y que no cambió significativamente con el tiempo. Nuestro resultado es comparable con otros publicados previamente e indica que la vía paracelular en la rama gruesa ascendente del asa de Henle es más selectiva para Na⁺ que para Cl⁻ por un factor de 2 (9, 28, 40).

El hecho de que P_{Na}^+/P_{Cl}^- se mantuviera estable a lo largo del tiempo indica que la viabilidad celular se sostuvo durante la totalidad del protocolo experimental. Esto es consistente con datos previos de nuestro laboratorio que demuestran que los túbulos de la rama gruesa ascendente del asa de Henle aislados y perfundidos son viables por 85-90 minutos (80, 82, 90, 100).

Nuestros datos demuestran que el dador de NO esperminaNONOato disminuye la magnitud del potencial de dilución y el P_{Na}^+/P_{Cl}^- calculado. Un efecto similar se observó al utilizar nitroglicerina. El hecho de que dos dadores de NO químicamente diferentes redujeran P_{Na}^+/P_{Cl}^- de manera semejante, representa una fuerte evidencia de que el efecto observado fue debido al NO y no a un subproducto de metabolismo/degradación alguno de esos compuestos. El efecto inhibitorio de la esperminaNONOato fue mayor pese a haber utilizado concentraciones equimolares de ambos dadores de NO, y esto puede explicarse por el hecho de que mientras que este compuesto espontáneamente comienza a degradarse liberando NO con una vida media de 40 minutos en solución acuosa, la nitroglicerina necesita ser metabolizada para producir NO. La concentración utilizada de esperminaNONOato produce una concentración de NO de alrededor de 1.6 μ M. Este valor está comprendido dentro del rango fisiológico de NO previamente reportado para la médula renal, 0.6 to 9 μ M (51, 124).

Los resultados observados utilizando NO agregado de manera exógena, sumado al hecho de que la rama gruesa ascendente produce NO, nos llevó a evaluar si el mismo efecto

podía observarse con NO producido de manera endógena a partir de arginina agregada al medio, por acción de la NOS. En efecto, el NO endógeno disminuyó significativamente los potenciales de dilución y los P_{Na}⁺/P_{Cl}⁻.

Cabe aclarar que en todos los protocolos se utilizaron soluciones libres de L-arginina en el lumen y en el baño basolateral, y solo se agregó el precursor para la biosíntesis de NO (o los dadores de NO) durante la etapa de equilibrio en el baño basolateral. Esto se debe a que los transportadores de aminoácidos catiónicos que movilizan L-arginina hacia adentro de la célula también pueden expulsarla hacia afuera de ella si el gradiente favorece su salida. Debido a que el baño basolateral estaba siendo intercambiado constantemente, la concentración de L-arginina en el mismo era ~0, favoreciendo su expulsión de la célula. Al agregar L-arginina a la solución del baño, la producción de NO comienza ya que NOS está siendo activada por el flujo y ahora tiene el sustrato que faltaba (84).

Nuestro descubrimiento de que la adición de L-arginina en el baño reduce P_{Na}^+/P_{Cl}^- y la conclusión de que esto se debe al NO se basa en un trabajo publicado anteriormente por nuestro grupo que demuestra que: 1) L-arginina estimula la producción de NO (81); 2) L-arginina inhibe la reabsorción neta de NaCl y que este efecto desaparece al tratar con el inhibidor de NOS, L-NAME; 3) D-arginina no tiene el mismo efecto que L-arginina sobre la reabsorción neta de NaCl (92). Si fuera la L-arginina per se en vez del NO la que afecta la ruta paracelular en nuestros experimentos, su efecto también habría sido evidente en los experimentos de medición de reabsorción neta de NaCl, pero no habría sido bloqueado en presencia del L-NAME y la D-arginina posiblemente habría tenido un efecto similar al de la L-arginina.

La concentración de L-arginina en la médula externa del riñón no ha sido claramente determinada. Recientemente se publicó un reporte que sugiere que su concentración en riñón total puede llegar a ser de hasta 0.5 mM (103). Tomando dicho valor como referencia, uno esperaría que la concentración de L-arginina en la médula externa sea considerablemente más alta, y por lo tanto, la concentración utilizada en nuestro experimento (0.5 mM) se aproxima a los niveles fisiológicos (86).

En nuestro diseño experimental el flujo luminal sirve como estímulo para la producción de NO (84, 86). En el nefrón, dicho flujo no es estático, sino que oscila (19, 44, 98), y en algunos segmentos hasta puede detenerse periódicamente (19, 98). En consecuencia, es posible que la vía de señalización del NO también oscile, y aunque el efecto de NO presumiblemente está presente todo el tiempo, quizás sea variable.

Si bien nuestro laboratorio previamente demostró que el NO inhibe la reabsorción activa, transcelular de NaCl (24, 85, 92), la misma presumiblemente tendría un efecto despreciable

sobre los potenciales de dilución dada la naturaleza de nuestro diseño experimental. La dilución de NaCl se hizo en el baño basolateral en lugar de en la solución de perfusión, para que la actividad del cotransportador Na⁺/K⁺/2Cl⁻ no disminuyera y, en caso, de verse afectada, lo que observaríamos sería un aumento. Esto último llevaría a una subestimación del verdadero potencial de dilución, por lo que podríamos decir que nuestro diseño es conservador. De todos modos, los P_{Na}⁺/P_{Cl}⁻ calculados son consistentes con los descriptos en la bibliografía (9, 28, 39, 40).

Los datos obtenidos con esperminaNONOato, nitroglicerina y L-arginina indican que NO regula P_{Na^+} y P_{Cl^-} de manera diferencial, pero no proveen información acerca de cómo las permeabilidades absolutas están afectadas por este compuesto. Las mismas pueden resolverse a partir de la ecuación de Kimizuka-Koketsu, para lo cual es necesario conocer el valor de Rt.

A continuación estudiamos el efecto del NO sobre Rt, que refleja principalmente la permeabilidad paracelular a iones en este segmento. La Rt en la rama gruesa ascendente del asa de Henle de rata y el efecto del NO sobre ella se desconocían hasta el momento. Encontramos que la Rt en este segmento era de 7700 ohm-cm (~46 ohm-cm²) durante el período control y que disminuyó al agregar L-arginina. Este efecto fue bloqueado por el inhibidor de NOS, L-NAME. Estos resultados indican que el NO induce cambios en la función de barrera de las uniones estrechas intercelulares.

Los valores de Rt y de P_{Na}^{+}/P_{Cl}^{-} obtenidos, nos permitieron calcular las permeabilidades absolutas de Na⁺ y Cl⁻. Encontramos que el NO provocó un aumento en ambas permeabilidades, pero que el aumento de P_{Cl}^{-} fue mayor. Este es el primer reporte mostrando que el NO tiene un efecto sobre P_{Na}^{+} y P_{Cl}^{-} en un segmento del nefrón. Como el NO tiene un efecto mayor sobre P_{Cl}^{-} , comparado con P_{Na}^{+} , su efecto sobre la vía paracelular probablemente provoca una reducción del potencial luminal positivo generado por el transporte activo normalmente presente en la rama gruesa ascendente del asa de Henle.

En nuestros experimentos asumimos que el cambio en Rt observado en presencia del NO se debió a cambios en la permeabilidad iónica paracelular y no a resistencia transcelular. Esta asunción se basó en las siguientes líneas de evidencia:

1) En nuestros experimentos, el NO redujo el P_{Na^+}/P_{Cl^-} . Esto solo puede ocurrir debido a cambios en la vía paracelular, dado que no hay conductancia a Na⁺ o Cl⁻ en la membrana luminal de la rama gruesa ascendente del asa de Henle;

2) Nuestro laboratorio ha demostrado previamente que dentro de la ventana temporal de nuestros experimentos, el NO no altera la actividad de la bomba Na⁺/K⁺-ATPasa (111);
3) Hay un reporte de Wu et al. (120) que describe un efecto inhibitorio del NO sobre el canal de Cl⁻ de 10 pS en túbulos corticales de la rama gruesa ascendente del asa de Henle de ratón. Nuestros estudios fueron realizados en túbulos de la porción medular de dicho segmento, por lo cual dicho efecto no puede ser extrapolado directamente a nuestro modelo. Guinamard et al. (30) sugieren que el canal de CI- de 10 pS es el principal tipo de canal de CI- presente en los túbulos corticales de rama gruesa ascendente del asa de Henle basándose en el porcentaje de identificaciones positivas obtenidas mediante la técnica de patch-clamp. Sin embargo, ese parámetro no necesariamente se corresponde con abundancia de canales, dado que una identificación positiva individual mediante patch-clamp puede contener múltiples canales en sí misma. Además, dicha técnica no considera otras características inherentes al funcionamiento de dichos canales, como la probabilidad de apertura, regulación, etc. Aun considerando los porcentajes de identificación positiva reportados para los canales de Cl⁻ descriptos en los túbulos corticales (7-9 pS and 45 pS), si calculamos la conductancia total para cada uno, observamos que la de los canales de 45 pS es ligeramente superior, sugiriendo que el efecto del NO sobre los canales de 10 pS no tendría un impacto crítico sobre la medición total de la resistencia. Adicionalmente, Winters et al. (117) reportaron un canal de Cl⁻ de 80 pS en túbulos medulares de la rama gruesa ascendente del asa de Henle, por lo tanto no queda claro si el canal de 10 pS está presente en esta porción;

4) Existe escasa evidencia de que el NO puede estimular los canales de K⁺ (ROMK) en la membrana luminal en este segmento (67, 115). Si el NO tuviera un efecto estimulatorio sobre ROMK e inhibitorio sobre los canales de Cl- de 10 pS de manera similar al descripto en la bibliografía, y los incorporamos a nuestros cálculos de Rt, los mismos se cancelarían (por ser opuestos) o resultarían en un cambio muy pequeño sobre dicha variable. Tanto P_{Na}^+ como P_{Cl}^- aún aumentarían y, por lo tanto, si bien habría un sutil cambio cuantitativo, la conclusión cualitativamente sería la misma.

La Rt calculada en nuestros experimentos se encuentra entre los valores reportados en la bibliografía para ratón (11-50 ohm cm²) (39) y conejo (~24-35 ohm cm²) (9, 28), y aunque no fue discutido en la sección de resultados, lo mismo es cierto para la constante espacial λ (~100 µm). La diferencia entre los valores de Rt entre ratón y rata en este segmento podría deberse a que son distintas especies o a la variabilidad entre las técnicas empleadas para calcular este parámetro.

Este proyecto es el primero en investigar si el NO regula la permeselectividad paracelular específicamente en túbulos aislados y perfundidos de rama gruesa ascendente del asa de Henle (tejido nativo); adicionalmente, no existen muchas evidencias al respecto en otras partes del

riñón. En nuestro conocimiento, hay un solo reporte de Liang et al (64), donde se demuestra un efecto dosis-dependiente de NO sobre la permeselectividad paracelular en cultivos de células OK, comúnmente utilizadas como modelo de células de túbulo proximal in vitro. En este estudio, concentraciones elevadas del dador de NO, nitroprusiato de sodio, producen un incremento en el flujo de manitol-D-³[H], peroxidación de lípidos y una reducción en los niveles de ATP. Dada la larga duración de los tiempos de incubación que realizaron y el hecho de que los efectos fueron revertidos por la enzima superóxido-dismutasa, no está claro que los resultados sean debidos al NO per se o a ONOO⁻, que resulta de la reacción entre NO y O_2^- . Además, no midieron los efectos del nitroprusiato sobre los valores absolutos de P_{Na}^+ y/o P_{Cl}^- .

El NO puede regular la permeabilidad de la ruta paracelular en numerosos otros sistemas fuera del riñón. Se ha demostrado que el NO puede tanto aumentar como disminuir la permeabilidad en células epiteliales del tracto gastrointestinal (11, 35, 36, 53, 54, 59, 99, 104, 105). La explicación de estos resultados contradictorios no ha sido precisada, sin embargo podría estar relacionada a la fuente de NO, y por ende a su concentración. La mayoría de los estudios que involucran la activación de NOS constitutivas (NOS-1 y NOS-3), reportan que el NO disminuye la permeabilidad (72). En contraste, cuando la enzima NOS inducible (NOS-2) es activada, el NO produce un incremento en la permeabilidad (11, 35, 36, 72, 105). Se sabe que las NOS constitutivas producen niveles bajos de NO, mientras que NOS-2 es una enzima de alto rendimiento involucrada en muchos desórdenes patofisiológicos (21, 87). Por lo tanto, los niveles bajos de NO producidos por las NOS constitutivas juegan un rol crucial en el mantenimiento y regulación de la función normal intestinal, mientras que defectos en la actividad de estas enzimas o una actividad excesiva de NOS-2 conducen a un estado inflamatorio (72).

El GMPc media los efectos del NO sobre el transporte de Na⁺ tanto en túbulo proximal (34, 97, 113) como en la rama gruesa ascendente del asa de Henle (23, 27). Nuestros datos demuestran que el análogo permeable de GMPc, db-GMPc, reproduce los efectos observados con el NO en todas las variables evaluadas: disminuye el radio de permeabilidad Na⁺ y Cl⁻, disminuye la Rt y provoca un aumento en P_{Na}^+ y P_{Cl}^- . Esto indica que dicho segundo mensajero está mediando el primer paso de la cascada de señalización y es consistente con datos previos publicados por nuestro laboratorio mostrando que el NO vía GMPc actúan sobre la reabsorción neta de NaCl y sobre el transporte transcelular (82).

La magnitud de la reducción de los potenciales de dilución fue mayor en presencia de db-GMPc (comparado con el NO), posiblemente debido al hecho de que se utilizó una concentración relativamente alta de este segundo mensajero para asegurar un resultado visible en caso de que hubiera un efecto.

En la bibliografía se pueden encontrar antecedentes de cambios en la permeabilidad de diversos tipos celulares mediados por vías dependientes de GMPc, así como vías independientes del mismo. Se ha demostrado de manera consistente que los niveles elevados de AMPc ayudan a preservar la integridad de la barrera paracelular (1, 4, 123). Específicamente en el riñón, se ha demostrado que AMPc actúa como mediador de los cambios en la permeabilidad paracelular en túbulo proximal, lo cual conlleva a cambios en transporte (66). La relación entre GMPc y los cambios en la permeabilidad paracelular no están claros, ya que niveles elevados de dicho segundo mensajero han sido relacionados tanto con un incremento como con una disminución de la permeabilidad y permeselectividad en diferentes tipos celulares (18, 26, 99, 102, 108, 116) Nuestros resultados están en línea con reportes que indican que la cascada de NO/GMPc está involucrada con una disminución de la permeabilidad en células endoteliales (18, 116), así como permeabilidad y permeselectividad de la barrera intestinal (99, 108). Trischitta et al demostraron que utilizando 8-br-GMPc, otro análogo permeable de GMPc, redujo los potenciales de dilución en intestino de anguila, sugiriendo que este segundo mensajero podría estar reduciendo P_{Na}⁺, aumentando P_{Cl}, o afectando ambos parámetros en distinta proporción/dirección. Lee et al descubrieron que mientras que 8-br-cGMP 4 umol/L aumentó Rt en células de Sertoli, y por lo tanto promoviendo el ensamblaje de las uniones celulares estrechas, una concentración mayor de entre 0.1-1 mmol/L tuvo el efecto contrario. Estos resultados indican que GMPc tiene un efecto bifásico en el cual concentraciones bajas disminuyen la permeabilidad iónica y concentraciones altas la aumentan (63). En el estudio de Liang mencionado anteriormente, no queda claro si GMPc es parte del mecanismo de acción de los efectos de NO observado en las células OK (64). La incubación de estas células con un inhibidor de guanilato ciclasa no pudo prevenir el incremento en permeabilidad, pero tampoco logró abolir el incremento en los niveles de GMPc. Estos resultados pueden estar indicando que la droga no estaba cumpliendo su rol de inhibir la producción de GMPc, y por lo tanto no se puede obtener una conclusión al respecto.

Los efectos del NO sobre la vía paracelular en otros tipos celulares están mediados por PKG; sin embargo, el NO inhibe la reabsorción de NaCl en la rama gruesa ascendente del asa de Henle vía PDE2. Por lo tanto, evaluamos cuál de ambos está mediando las acciones del NO sobre la permeselectividad de la vía paracelular en este segmento. Al utilizar un inhibidor de PKG, el efecto del NO desapareció. En contraste, al utilizar un inhibidor de PDE2, el NO redujo el potencial de dilución. Estos indica que PKG, y no PDE2 está mediando el efecto de NO. Estos resultados son consistentes con nuestro reporte previo de que NO reduce la reabsorción de bicarbonato vía PKG en este segmento, pero difiere de aquel que demuestra que PDE2 media

el efecto inhibitorio del NO sobre la reabsorción de CI⁻. Otros autores han señalado a PKG como un mediador cascada debajo de los efectos del NO sobre la permeabilidad paracelular (63, 119).

Numerosos estudios en los últimos años apuntan a la familia de proteínas claudinas como determinantes de la selectividad de la ruta paracelular. Varios estudios demuestran que la claudina-19 participa en la formación de poros con selectividad de cationes y de Na⁺ (2, 46, 49). En este trabajo encontramos que las acciones del NO sobre la vía paracelular en la rama gruesa ascendente del asa de Henle involucran un efecto sobre los poros selectivos de las uniones estrechas donde la claudina-19 está presente. Dicho de otra manera, el NO actuando directa o indirectamente sobre la claudina-19 u otra de las claudinas que se asocian con ella (claudina-16 o claudina-3) estaría alterando su estructura de manera tal que la vía paracelular se vuelve menos selectiva a Na⁺, y al mismo tiempo provocando un incremento en la permeabilidad absoluta tanto de Na⁺ como de Cl⁻.

Esto podría explicarse a través de distintos escenarios. Una posibilidad es que el NO esté modificando postrasduccionalmente (por ejemplo, fosforilando) a la claudina-19 y alterando las cargas en su rulo extracelular de manera tal que el poro que conforma con la claudina en la célula adyacente cambia en estructura (por ejemplo distanciándose y generando un espacio más amplio para el pasaje iónico). Alternativamente, el NO podría estar afectando a otra claudina que esté asociada a la claudina-19. Se sabe que claudina-16 no forma homómeros ni combinaciones homotípicas, pro sí homomeros con la claudina-19. Esto sugiere que tanto la claudina-16 como la claudina-19 son blancos de la regulación del NO. La claudina-3 pude formar un poro independiente por asociación homotípica. Sería interesante ver la proporción de expresión de poros independientes claudina-3/claudina-3 y aquellos de claudina-3/claudina-19 (asociación cis, más una asociación con otra claudina-19 en la membrana adyacente). Si el NO estuviera modificando a la claudina-3, al bloquear las acciones de claudina-19 en nuestro experimento no nos estaríamos deshaciendo de todos los poros de los cuales claudina-3 forma parte. Sin embargo, esto estaría en línea con los resultados obtenidos experimentalmente en este trabajo si los poros claudina-3/claudina-3 tuvieran significativamente menos expresión que los de claudina-3/claudina-19. Más estudios funcionales son necesarios para determinar la naturaleza de la interacción NO/claudinas en este segmento del nefrón.

Alternativamente, el NO podría estar mediando cambios en el patrón de expresión de claudina-3, claudina-16 o claudina-19 y alterando las propiedades de permeselectividad de las uniones estrechas. Esto estaría en línea con evidencia en la bibliografía que describe la participación de la vía NOS/NO en la reducción de la expresión de claudina-5 por bradikininas en

75

la barrera sangre-tumor, con una disminución de la resistencia transendotelial (65) o por hemoglobina en la barrera sangre-cerebro (122).

Finalmente, desarrollamos un modelo matemático simple para investigar el efecto del NO sobre la concentración luminal de Na⁺ a lo largo de la rama gruesa ascendente del asa de Henle basándonos en nuestros resultados. En el punto más profundo de la porción externa de la médula renal (al comienzo del túbulo), cuando solo se considera el efecto del NO sobre la vía paracelular, el modelo predice una concentración luminal de Na⁺ menor (indicando que más cantidad de Na⁺ está siendo reabsorbida) comparado con la condición control. Esto se debe a la alta tasa de transporte transcelular que crea un voltaje luminal positivo elevado -pero al mismo tiempo un gradiente transepitelial de Na⁺ relativamente pequeño-, y a un incremento de la permeabilidad causada por el NO. Sin embargo, en la última porción del mismo segmento, ya en la corteza, el modelo predice una concentración luminal de Na⁺ mayor (indicando que menos Na⁺ es reabsorbido) en presencia de NO. Esto se debe a: 1) el transporte activo creando un alto gradiente transepitelial de Na⁺ que favorece su entrada al lumen desde el intersticio (reflujo); 2) el aumento de la permeabilidad paracelular causado por NO; 3) la reducción en P_{Na}^{+}/P_{Cl}^{-} que disminuye el potencial luminal positivo (28% menor que el control al considerar el efecto del NO sobre las vías para- y transcelular combinadas). Mientras que todas las condiciones exhiben reflujo, al analizar Jp (componente paracelular del transporte), podemos observar que al tener en cuenta el efecto de NO sobre la vía paracelular únicamente el reflujo más temprano y más pronunciado durante la longitud restante del túbulo, consistente con la reducción en P_{Na⁺}/P_{Cl}.

Cuando el efecto del NO en ambas vías de transporte, trans- y paracelular- son considerados, los resultados son diferentes. Ahora, la concentración luminal de Na⁺ en presencia de NO es siempre mayor a lo largo del túbulo, comparado con la condición control. Esto se debe a: 1) una directa inhibición del transporte activo; 2) una reducción del voltaje luminal positivo que ocasiona una disminución de parte de la fuerza que impulsa la reabsorción paracelular de Na⁺; 3) el aumento en la permeabilidad paracelular que permite un mayor reflujo de Na⁺ del intersticio al lumen. Mientras que el efecto del NO sobre cada vía analizada individualmente muestra una inhibición de la reabsorción de Na⁺ que conlleva a una mayor concentración luminal de dicho ion al final del túbulo (49% más al considerar el efecto del NO sobre la vía paracelular únicamente y 99.6% al considerar su efecto sobre la vía transcelular), no se observa un efecto sinergístico o aditivo al considerar ambos componentes (para- y transcelular), sino más bien un efecto antagonista (el efecto del NO sobre ambas vías resulta en una concentración luminal final de Na⁺ 127% mayor que en los controles).

Una de las limitaciones de este modelo es que asumimos que el NO tiene el mismo efecto sobre el transporte trans- y paracelular en túbulos de la rama ascendente del asa de Henle corticales y medulares. Esto puede o no ser una suposición válida, porque si bien túbulos corticales y medulares responden diferencialmente en presencia de ciertos factores reguladores, en nuestro conocimiento, los efectos del NO sobre la reabsorción de NaCl no han sido estudiados en túbulos corticales.

En conjunto los resultados obtenidos en este trabajo de investigación nos permiten generar el siguiente mecanismo de acción (esquematizado en la Figura 30):

El NO producido de manera local en las células epiteliales que conforman las paredes del túbulo induce la producción de GMPc por la enzima guanilato ciclasa soluble. El segundo mensajero activa a la proteína quinasa dependiente de GMPc (PKG). El NO o alguno de los componentes de su cascada de señalización, de manera directa o indirecta, regulan la estructura y selectividad de los poros presentes en las uniones estrechas entre células adyacentes, de los cuales al menos la proteína claudina-19 forma parte. A partir de estos eventos, se observa una reducción en la permeselectividad y resistencia transepitelial, por un aumento en las permeabilidades absolutas de Na⁺ y Cl⁻ (el efecto es mayor para Cl⁻). Nuestro modelo matemático predice que los efectos del NO sobre la vía paracelular provocan un reflujo de Na⁺ del espacio basolateral al lumen más temprano y prolongado que deriva en una menor reabsorción paracelular de este catión.

Los hallazgos que nacen de esta investigación son pioneros en el estudio de la regulación del NO sobre la reabsorción de Na⁺ a través de la vía paracelular en túbulos renales nativos. Además proveen evidencia de un mecanismo novedoso que contribuye a la mejor comprensión de los efectos anti-hipertensivos del NO.



Figura 30. Esquema del mecanismo de acción de los efectos de NO sobre la vía paracelular en la rama gruesa ascendente del asa de Henle.

Conclusiones

Objetivo A

Estudiar los efectos del NO sobre el radio de permeabilidad Na⁺/Cl⁻(P_{Na+}/P_{Cl-}), medida de permeselectividad paracelular, en túbulos aislados provenientes de rama gruesa ascendente del asa de Henle de rata y la cascada de señalización involucrada.

Conclusiones

• En nuestros experimentos observamos que el radio de permeabilidad Na⁺/Cl⁻ en túbulos aislados y perfundidos de rama gruesa ascendente del asa de Henle medido bajo distintas condiciones tiene un valor de alrededor de 2.

 Observamos que tanto los dadores de NO utilizados, como el NO de producción endógena (producido a partir de L-arginina, por acción de la enzima NOS) reducen el radio de permeabilidad Na⁺/Cl⁻.

• Las acciones del NO sobre la permeselectividad paracelular en este segmento están mediadas por una cascada de señalización que involucra a GMPc/PKG y no a PDE2.

Estos resultados han sido parcialmente publicados en Marzo de 2015:

"Nitric oxide decreases the permselectivity of the paracellular pathway in thick ascending limbs". Monzon CM, Garvin JL. Hypertension. 2015 Jun;65(6):1245-50.

Objetivo B

Analizar los efectos del NO sobre la resistencia transepitelial de dichos túbulos.

Conclusiones

• Utilizando L-arginina como sustrato, observamos que el NO disminuye la resistencia transepitelial en la rama gruesa ascendente del asa de Henle. Dicho efecto es inhibido en presencia de L-NAME.

• GMPc media las acciones del NO sobre la resistencia transepitelial en este segmento.

Objetivo C

Evaluar los efectos del NO sobre la permeabilidad absoluta de Na⁺ y Cl⁻.

Conclusiones

• El NO aumenta la permeabilidad absoluta de Na⁺ y Cl⁻, pero el aumento es mayor para Cl⁻.

• Dichos efectos están mediados por GMPc.

Objetivo D

Determinar si la proteína claudina-19 está involucrada en el efecto del NO sobre la permeselectividad de la vía de transporte paracelular en la rama gruesa ascendente del asa de Henle.

Conclusión

• La proteína claudina-19 es al menos una de las efectoras de las acciones del NO sobre la permeselectividad paracelular de la rama gruesa ascendente del asa de Henle.

Objetivo E

Analizar el efecto del NO sobre la reabsorción paracelular de Na⁺ a través de un modelo matemático utilizando los resultados hallados en nuestros experimentos.

Conclusiones

- El modelo matemático diseñado predice que el NO inhibe la reabsorción paracelular de Na⁺ en la rama gruesa ascendente el asa de Henle.
- Este efecto inhibitorio de la vía paracelular es similar a la que el NO ejerce sobre la vía transcelular. El efecto de NO sobre ambas vías combinadas es menor a la de la suma de ambas inhibiciones individuales.

Al momento de impresión de esta tesis, los resultados obtenidos en los Objetivos B, C y E fueron aceptados para su publicación en la revista científica American Journal of Physiology – Renal Physiology, con fecha exacta a determinar en Marzo de 2017.

El título de dicho manuscrito es:

"Nitric Oxide Reduces Paracellular Resistance in Rat Thick Ascending Limbs by Increasing Na⁺ and Cl⁻ Permeabilities". Casandra M. Monzon, Rossana Occhipinti, Omar P Pignataro, Jeffrey L. Garvin. Lic. Casandra M. Monzón

Jeffrey L. Garvin, PhD

Omar P. Pignataro, PhD

Bibliografía

1. Adamson RH, Liu B, Fry GN, Rubin LL, and Curry FE. Microvascular permeability and number of tight junctions are modulated by cAMP. *The American Journal of Physiology* 274: H1885-1894, 1998.

2. **Angelow S, El-Husseini R, Kanzawa SA, and Yu AS**. Renal localization and function of the tight junction protein, claudin-19. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 293: F166-177, 2007.

3. Ares GR, Caceres PS, and Ortiz PA. Molecular regulation of NKCC2 in the thick ascending limb. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 301: F1143-1159, 2011.

4. **Aslam M, Tanislav C, Troidl C, Schulz R, Hamm C, and Gunduz D**. cAMP controls the restoration of endothelial barrier function after thrombin-induced hyperpermeability via Rac1 activation. *Physiological Reports* 2: e12175, 2014.

5. **Bachmann S, Bosse HM, and Mundel P**. Topography of nitric oxide synthesis by localizing constitutive NO synthases in mammalian kidney. *The American Journal of Physiology* 268: F885-898, 1995.

6. **Bennett CM, Brenner BM, and Berliner RW**. Micropuncture study of nephron function in the rhesus monkey. *The Journal of Clinical Investigation* 47: 203-216, 1968.

7. **Bradford MM**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254, 1976.

8. Breiderhoff T, Himmerkus N, Stuiver M, Mutig K, Will C, Meij IC, Bachmann S, Bleich M, Willnow TE, and Muller D. Deletion of claudin-10 (Cldn10) in the thick ascending limb impairs paracellular sodium permeability and leads to hypermagnesemia and nephrocalcinosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 14241-14246, 2012.

9. **Burg MB, and Green N**. Function of the thick ascending limb of Henle's loop. *The American Journal of Physiology* 224: 659-668, 1973.

10. **Cabral PD, and Herrera M**. Membrane-associated aquaporin-1 facilitates osmotically driven water flux across the basolateral membrane of the thick ascending limb. *AmericanJjournal of Physiology Renal Physiology* 303: F621-629, 2012.

11. Cenac N, Garcia-Villar R, Ferrier L, Larauche M, Vergnolle N, Bunnett NW, Coelho AM, Fioramonti J, and Bueno L. Proteinase-activated receptor-2-induced colonic inflammation in mice: possible involvement of afferent neurons, nitric oxide, and paracellular permeability. *Journal of Immunology* 170: 4296-4300, 2003.

12. **Colegio OR, Van Itallie C, Rahner C, and Anderson JM**. Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 284: C1346-1354, 2003.

13. Colegio OR, Van Itallie CM, McCrea HJ, Rahner C, and Anderson JM. Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 283: C142-147, 2002.

14. **Costa MA, Marchetti M, Balaszczuk AM, and Arranz CT**. Effects of L-arginine and furosemide on blood pressure and renal function in volume-expanded rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28: 528-532, 2001.

15. Cruz DN, Simon DB, Nelson-Williams C, Farhi A, Finberg K, Burleson L, Gill JR, and Lifton RP. Mutations in the Na-Cl cotransporter reduce blood pressure in humans. *Hypertension* 37: 1458-1464, 2001.

16. **D'Souza T, Agarwal R, and Morin PJ**. Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by cAMP-dependent protein kinase regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 26233-26240, 2005.

17. **Diaz A, and Ferrante D**. Trends in prevalence of hypertension in Argentina in the last 25 years: a systematic review of observational studies. *Revista panamericana de salud publica = Pan American Journal of Public Health* 38: 496-503, 2015.

18. **Draijer R, Atsma DE, van der Laarse A, and van Hinsbergh VW**. cGMP and nitric oxide modulate thrombin-induced endothelial permeability. Regulation via different pathways in human aortic and umbilical vein endothelial cells. *Circulation Research* 76: 199-208, 1995.

19. **Dwyer TM, and Schmidt-Nielsen B**. The renal pelvis: machinery that concentrates urine in the papilla. *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society* 18: 1-6, 2003.

20. **Farquhar MG, and Palade GE**. Junctional complexes in various epithelia. *The Journal of Cell Biology* 17: 375-412, 1963.

21. **Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, and Kleinert H**. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 23: 1121-1131, 1994.

22. **Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, and Tsukita S**. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *The Journal of Cell Biology* 141: 1539-1550, 1998.

23. Garcia NH, Plato CF, Stoos BA, and Garvin JL. Nitric oxide-induced inhibition of transport by thick ascending limbs from Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension* 34: 508-513, 1999.

24. **Garvin JL, and Hong NJ**. Nitric oxide inhibits sodium/hydrogen exchange activity in the thick ascending limb. *The American Journal of Physiology* 277: F377-382, 1999.

25. **Girardi AC, and Di Sole F**. Deciphering the mechanisms of the Na+/H+ exchanger-3 regulation in organ dysfunction. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 302: C1569-1587, 2012.

26. **Gorodeski GI**. NO increases permeability of cultured human cervical epithelia by cGMPmediated increase in G-actin. *Am J Physiol-Cell Ph* 278: C942-C952, 2000.

27. Grandes S, Gallego MJ, Riesco A, Lopez Farre A, Millas I, Casado S, Hernando L, and Caramelo C. Mechanisms of renal effects of different agents stimulating production of cGMP. *The American Journal of Physiology* 261: H1109-1114, 1991.

28. **Greger R**. Cation selectivity of the isolated perfused cortical thick ascending limb of Henle's loop of rabbit kidney. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology* 390: 30-37, 1981.

29. **Greger R**. Ion transport mechanisms in thick ascending limb of Henle's loop of mammalian nephron. *Physiological Reviews* 65: 760-797, 1985.

30. **Guinamard R, Chraibi A, and Teulon J**. A small-conductance Cl- channel in the mouse thick ascending limb that is activated by ATP and protein kinase A. *The Journal of Physiology* 485 (Pt 1): 97-112, 1995.

31. Gunzel D, Stuiver M, Kausalya PJ, Haisch L, Krug SM, Rosenthal R, Meij IC, Hunziker W, Fromm M, and Muller D. Claudin-10 exists in six alternatively spliced isoforms that exhibit distinct localization and function. *Journal of Cell Science* 122: 1507-1517, 2009.

32. **Gunzel D, and Yu AS**. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiological Reviews* 93: 525-569, 2013.

33. **Guyton AC**. Dominant role of the kidneys and accessory role of whole-body autoregulation in the pathogenesis of hypertension. *American Journal of Hypertension* 2: 575-585, 1989.

34. **Guzman NJ, Fang MZ, Tang SS, Ingelfinger JR, and Garg LC**. Autocrine inhibition of Na+/K(+)-ATPase by nitric oxide in mouse proximal tubule epithelial cells. *The Journal of Clinical Investigation* 95: 2083-2088, 1995.

35. **Han X, Fink MP, and Delude RL**. Proinflammatory cytokines cause NO*-dependent and -independent changes in expression and localization of tight junction proteins in intestinal epithelial cells. *Shock* 19: 229-237, 2003.

36. **Han X, Uchiyama T, Sappington PL, Yaguchi A, Yang R, Fink MP, and Delude RL**. NAD+ ameliorates inflammation-induced epithelial barrier dysfunction in cultured enterocytes and mouse ileal mucosa. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 307: 443-449, 2003.

37. **Hebert SC, and Andreoli TE**. Control of NaCl transport in the thick ascending limb. *The American Journal of Physiology* 246: F745-756, 1984.

38. **Hebert SC, and Andreoli TE**. Effects of antidiuretic hormone on cellular conductive pathways in mouse medullary thick ascending limbs of Henle: II. determinants of the ADH-mediated increases in transepithelial voltage and in net Cl-absorption. *The Journal of Membrane Biology* 80: 221-233, 1984.

39. **Hebert SC, Culpepper RM, and Andreoli TE**. NaCl Transport in Mouse Medullary Thick Ascending Limbs . 1. Functional Nephron Heterogeneity and Adh-Stimulated NaCl Cotransport. *The American Journal of Physiology* 241: F412-F431, 1981.

40. **Hebert SC, Culpepper RM, and Andreoli TE**. NaCl transport in mouse medullary thick ascending limbs. II. ADH enhancement of transcellular NaCl cotransport; origin of transepithelial voltage. *The American Journal of Physiology* 241: F432-442, 1981.

41. **Hebert SC, Desir G, Giebisch G, and Wang W**. Molecular diversity and regulation of renal potassium channels. *Physiological Reviews* 85: 319-371, 2005.

42. Herrera M, and Garvin JL. A high-salt diet stimulates thick ascending limb eNOS expression by raising medullary osmolality and increasing release of endothelin-1. *American journal of physiology Renal physiology* 288: F58-64, 2005.

43. Herrera M, Hong NJ, and Garvin JL. Aquaporin-1 transports NO across cell membranes. *Hypertension* 48: 157-164, 2006.

44. **Holstein-Rathlou NH, and Marsh DJ**. A dynamic model of the tubuloglomerular feedback mechanism. *The American Journal of Physiology* 258: F1448-1459, 1990.

45. **Hou J**. Lecture: New light on the role of claudins in the kidney. *Organogenesis* 8: 1-9, 2012.

46. **Hou J, and Goodenough DA**. Claudin-16 and claudin-19 function in the thick ascending limb. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 19: 483-488, 2010.

47. **Hou J, Paul DL, and Goodenough DA**. Paracellin-1 and the modulation of ion selectivity of tight junctions. *Journal of Cell Science* 118: 5109-5118, 2005.

48. Hou J, Renigunta A, Gomes AS, Hou M, Paul DL, Waldegger S, and Goodenough DA. Claudin-16 and claudin-19 interaction is required for their assembly into tight junctions and for renal reabsorption of magnesium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 15350-15355, 2009.

49. Hou J, Renigunta A, Konrad M, Gomes AS, Schneeberger EE, Paul DL, Waldegger S, and Goodenough DA. Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex. *The Journal of Clinical Investigation* 118: 619-628, 2008.

50. Jarry A, Renaudin K, Denis MG, Robard M, Buffin-Meyer B, Karam G, Buzelin F, Paris H, Laboisse CL, and Vallette G. Expression of NOS1 and soluble guanylyl cyclase by human kidney epithelial cells: morphological evidence for an autocrine/paracrine action of nitric oxide. *Kidney International* 64: 170-180, 2003.

51. **Jin C, Hu C, Polichnowski A, Mori T, Skelton M, Ito S, and Cowley AW, Jr.** Effects of renal perfusion pressure on renal medullary hydrogen peroxide and nitric oxide production. *Hypertension* 53: 1048-1053, 2009.

52. Kahle KT, Macgregor GG, Wilson FH, Van Hoek AN, Brown D, Ardito T, Kashgarian M, Giebisch G, Hebert SC, Boulpaep EL, and Lifton RP. Paracellular Clpermeability is regulated by WNK4 kinase: insight into normal physiology and hypertension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 14877-14882, 2004.

53. Kanwar S, Tepperman BL, Payne D, Sutherland LR, and Kubes P. Time course of nitric oxide production and epithelial dysfunction during ischemia/reperfusion of the feline small intestine. *Circulatory Shock* 42: 135-140, 1994.

54. **Katsube T, Tsuji H, and Onoda M**. Nitric oxide attenuates hydrogen peroxide-induced barrier disruption and protein tyrosine phosphorylation in monolayers of intestinal epithelial cell. *Biochimica et Biophysica Acta* 1773: 794-803, 2007.

55. **Kimizuka H, and Koketsu K**. Ion transport through cell membrane. *J Theor Biol* 6: 290-305, 1964.

56. **Kiuchi-Saishin Y, Gotoh S, Furuse M, Takasuga A, Tano Y, and Tsukita S**. Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 13: 875-886, 2002.

57. Konrad M, Schaller A, Seelow D, Pandey AV, Waldegger S, Lesslauer A, Vitzthum H, Suzuki Y, Luk JM, Becker C, Schlingmann KP, Schmid M, Rodriguez-Soriano J, Ariceta G, Cano F, Enriquez R, Juppner H, Bakkaloglu SA, Hediger MA, Gallati S, Neuhauss SC, Nurnberg P, and Weber S. Mutations in the tight-junction gene claudin 19 (CLDN19) are associated with renal magnesium wasting, renal failure, and severe ocular involvement. *American Journal of Human Genetics* 79: 949-957, 2006.

58. **Krause G, Winkler L, Piehl C, Blasig I, Piontek J, and Muller SL**. Structure and function of extracellular claudin domains. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1165: 34-43, 2009.

59. **Kubes P**. Nitric oxide modulates epithelial permeability in the feline small intestine. *The American Journal of Physiology* 262: G1138-1142, 1992.

60. Layton AT EA. Mathematical Modeling in Renal Physiology. . 2014.

61. Layton HE, Pitman EB, and Moore LC. Bifurcation analysis of TGF-mediated oscillations in SNGFR. *The American Journal of Physiology* 261: F904-919, 1991.

62. Le Moellic C, Boulkroun S, Gonzalez-Nunez D, Dublineau I, Cluzeaud F, Fay M, Blot-Chabaud M, and Farman N. Aldosterone and tight junctions: modulation of claudin-4 phosphorylation in renal collecting duct cells. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 289: C1513-1521, 2005.

63. Lee NP, and Cheng CY. Regulation of Sertoli cell tight junction dynamics in the rat testis via the nitric oxide synthase/soluble guanylate cyclase/3',5'-cyclic guanosine monophosphate/protein kinase G signaling pathway: an in vitro study. *Endocrinology* 144: 3114-3129, 2003.

64. Liang M, and Knox FG. Nitric oxide enhances paracellular permeability of opossum kidney cells. *Kidney International* 55: 2215-2223, 1999.

65. Liu LB, Liu XB, Ma J, Liu YH, Li ZQ, Ma T, Zhao XH, Xi Z, and Xue YX. Bradykinin increased the permeability of BTB via NOS/NO/ZONAB-mediating down-regulation of claudin-5 and occludin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 464: 118-125, 2015.

66. **Lorentz WB, Jr.** The effect of cyclic AMP and dibutyryl cyclic AMP on the permeability characteristics of the renal tubule. *The Journal of Clinical Investigation* 53: 1250-1257, 1974.

67. Lu M, Wang X, and Wang W. Nitric oxide increases the activity of the apical 70-pS K+ channel in TAL of rat kidney. *The American Journal of Physiology* 274: F946-950, 1998.

68. **Majid DS, and Navar LG**. Nitric oxide in the control of renal hemodynamics and excretory function. *American Journal of Hypertension* 14: 74S-82S, 2001.

69. **Manning RD, Jr., and Hu L**. Nitric oxide regulates renal hemodynamics and urinary sodium excretion in dogs. *Hypertension* 23: 619-625, 1994.

70. **Milatz S, Himmerkus N, Wulfmeyer VC, Drewell H, Mutig K, Hou J, Breiderhoff T, Muller D, Fromm M, Bleich M, and Gunzel D**. Mosaic expression of claudins in thick ascending limbs of Henle results in spatial separation of paracellular Na+ and Mg2+ transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114: E219-E227, 2017.

71. Milatz S, Krug SM, Rosenthal R, Gunzel D, Muller D, Schulzke JD, Amasheh S, and Fromm M. Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1798: 2048-2057, 2010.

72. Miller MJ, Chotinaruemol S, Sadowska-Krowicka H, Kakkis JL, Munshi UK, Zhang XJ, and Clark DA. Nitric oxide: the Jekyll and Hyde of gut inflammation. *Agents and Actions* 39 Spec No: C180-182, 1993.

73. **Mittal BV, and Singh AK**. Hypertension in the developing world: challenges and opportunities. *American Journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 55: 590-598, 2010.

74. **Mohaupt MG, Elzie JL, Ahn KY, Clapp WL, Wilcox CS, and Kone BC**. Differential expression and induction of mRNAs encoding two inducible nitric oxide synthases in rat kidney. *Kidney International* 46: 653-665, 1994.

75. **Mount DB**. Thick ascending limb of the loop of Henle. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 9: 1974-1986, 2014.

76. **Mount PF, and Power DA**. Nitric oxide in the kidney: functions and regulation of synthesis. *Acta Physiol* 187: 433-446, 2006.

77. **Muto S, Furuse M, and Kusano E**. Claudins and renal salt transport. *Clin Exp Nephrol* 16: 61-67, 2012.

78. Nakhoul NL, Davis BA, Romero MF, and Boron WF. Effect of expressing the water channel aquaporin-1 on the CO2 permeability of Xenopus oocytes. *The American Journal of Physiology* 274: C543-548, 1998.

79. **Navar LG**. The role of the kidneys in hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 7: 542-549, 2005.

80. **Ortiz PA, and Garvin JL**. Autocrine effects of nitric oxide on HCO(3)(-) transport by rat thick ascending limb. *Kidney International* 58: 2069-2074, 2000.

81. **Ortiz PA, and Garvin JL**. Interaction of O(2)(-) and NO in the thick ascending limb. *Hypertension* 39: 591-596, 2002.

82. **Ortiz PA, and Garvin JL**. NO Inhibits NaCl absorption by rat thick ascending limb through activation of cGMP-stimulated phosphodiesterase. *Hypertension* 37: 467-471, 2001.

83. **Ortiz PA, and Garvin JL**. Role of nitric oxide in the regulation of nephron transport. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 282: F777-784, 2002.

84. Ortiz PA, Hong NJ, and Garvin JL. Luminal flow induces eNOS activation and translocation in the rat thick ascending limb. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 287: F274-280, 2004.

85. **Ortiz PA, Hong NJ, and Garvin JL**. NO decreases thick ascending limb chloride absorption by reducing Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter activity. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 281: F819-825, 2001.

86. **Ortiz PA, Hong NJ, Wang D, and Garvin JL**. Gene transfer of eNOS to the thick ascending limb of eNOS-KO mice restores the effects of L-arginine on NaCl absorption. *Hypertension* 42: 674-679, 2003.

87. **Pautz A, Art J, Hahn S, Nowag S, Voss C, and Kleinert H**. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric oxide : biology and chemistry / official Journal of the Nitric Oxide Society* 23: 75-93, 2010.

88. **Perez-Rojas JM, Kassem KM, Beierwaltes WH, Garvin JL, and Herrera M**. Nitric oxide produced by endothelial nitric oxide synthase promotes diuresis. *American journal of physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 298: R1050-1055, 2010.

89. **Piontek J, Winkler L, Wolburg H, Muller SL, Zuleger N, Piehl C, Wiesner B, Krause G, and Blasig IE**. Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22: 146-158, 2008.

90. **Plato CF, Pollock DM, and Garvin JL**. Endothelin inhibits thick ascending limb chloride flux via ET(B) receptor-mediated NO release. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 279: F326-333, 2000.

91. **Plato CF, Shesely EG, and Garvin JL**. eNOS mediates L-arginine-induced inhibition of thick ascending limb chloride flux. *Hypertension* 35: 319-323, 2000.

92. Plato CF, Stoos BA, Wang D, and Garvin JL. Endogenous nitric oxide inhibits chloride transport in the thick ascending limb. *The American Journal of Physiology* 276: F159-163, 1999.
93. Powell DW. Barrier function of epithelia. *The American Journal of Physiology* 241: G275-288, 1981.

94. **Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, and Agre P**. Appearance of Water Channels in Xenopus Oocytes Expressing Red-Cell Chip28 Protein. *Science* 256: 385-387, 1992.

95. **Qiu C, Muchant D, Beierwaltes WH, Racusen L, and Baylis C**. Evolution of chronic nitric oxide inhibition hypertension: relationship to renal function. *Hypertension* 31: 21-26, 1998.

96. **Rees DD, Palmer RM, and Moncada S**. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 3375-3378, 1989.

97. **Roczniak A, and Burns KD**. Nitric oxide stimulates guanylate cyclase and regulates sodium transport in rabbit proximal tubule. *The American Journal of Physiology* 270: F106-115, 1996.

98. Sakai T, Craig DA, Wexler AS, and Marsh DJ. Fluid waves in renal tubules. *Biophysical Journal* 50: 805-813, 1986.

99. Schleiffer R, and Raul F. Prophylactic administration of L-arginine improves the intestinal barrier function after mesenteric ischaemia. *Gut* 39: 194-198, 1996.

100. **Silva GB, Ortiz PA, Hong NJ, and Garvin JL**. Superoxide stimulates NaCl absorption in the thick ascending limb via activation of protein kinase C. *Hypertension* 48: 467-472, 2006.

101. Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al-Sabban E, Praga M, Casari G, Bettinelli A, Colussi G, Rodriguez-Soriano J, McCredie D, Milford D, Sanjad S, and Lifton RP. Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg2+ resorption. *Science* 285: 103-106, 1999.

102. **Surapisitchat J, Jeon KI, Yan C, and Beavo JA**. Differential regulation of endothelial cell permeability by cGMP via phosphodiesterases 2 and 3. *Circulation Research* 101: 811-818, 2007.

103. **Tain YL, Leu S, Wu KL, Lee WC, and Chan JY**. Melatonin prevents maternal fructose intake-induced programmed hypertension in the offspring: roles of nitric oxide and arachidonic acid metabolites. *Journal of pineal research* 57: 80-89, 2014.

104. **Takizawa Y, Kishimoto H, Kitazato T, Tomita M, and Hayashi M**. Effects of nitric oxide on mucosal barrier dysfunction during early phase of intestinal ischemia/reperfusion. *European Journal of Pharmaceutical Sciences : Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 42: 246-252, 2011.

105. **Takizawa Y, Kitazato T, Ishizaka H, Kamiya N, Tomita M, and Hayashi M**. Effect of aminoguanidine on ischemia/reperfusion injury in rat small intestine. *Biological & Pharmaceutical bulletin* 34: 1737-1743, 2011.

106. **Tanaka M, Kamata R, and Sakai R**. EphA2 phosphorylates the cytoplasmic tail of Claudin-4 and mediates paracellular permeability. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 42375-42382, 2005.

107. Tatum R, Zhang Y, Lu Q, Kim K, Jeansonne BG, and Chen YH. WNK4 phosphorylates ser(206) of claudin-7 and promotes paracellular Cl(-) permeability. *FEBS Lett* 581: 3887-3891, 2007.

108. **Trischitta F, Pidala P, and Faggio C**. Nitric oxide modulates ionic transport in the isolated intestine of the eel, Anguilla anguilla. *Comp Biochem Phys A* 148: 368-373, 2007.

109. Ujiie K, Yuen J, Hogarth L, Danziger R, and Star RA. Localization and Regulation of Endothelial No Synthase Messenger-Rna Expression in Rat-Kidney. *American Journal of Physiology* 267: F296-F302, 1994.

110. Van Itallie CM, Rogan S, Yu A, Vidal LS, Holmes J, and Anderson JM. Two splice variants of claudin-10 in the kidney create paracellular pores with different ion selectivities. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 291: F1288-1299, 2006.

111. **Varela M, Herrera M, and Garvin JL**. Inhibition of Na-K-ATPase in thick ascending limbs by NO depends on O2- and is diminished by a high-salt diet. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 287: F224-230, 2004.

112. Waldegger S, Jeck N, Barth P, Peters M, Vitzthum H, Wolf K, Kurtz A, Konrad M, and Seyberth HW. Barttin increases surface expression and changes current properties of ClC-K channels. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology* 444: 411-418, 2002.

113. **Wang T**. Nitric oxide regulates HCO3- and Na+ transport by a cGMP-mediated mechanism in the kidney proximal tubule. *The American Journal of Physiology* 272: F242-248, 1997.

114. **Wang T**. Renal outer medullary potassium channel knockout models reveal thick ascending limb function and dysfunction. *Clin Exp Nephrol* 16: 49-54, 2012.

115. Wei Y, Babilonia E, Pedraza PL, Ferreri NR, and Wang WH. Acute application of TNF stimulates apical 70-pS K+ channels in the thick ascending limb of rat kidney. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 285: F491-497, 2003.

116. Westendorp RG, Draijer R, Meinders AE, and van Hinsbergh VW. Cyclic-GMPmediated decrease in permeability of human umbilical and pulmonary artery endothelial cell monolayers. *Journal of Vascular Research* 31: 42-51, 1994. 117. **Winters CJ, Reeves WB, and Andreoli TE**. Cl- channels in basolateral renal medullary vesicles: V. Comparison of basolateral mTALH Cl- channels with apical Cl- channels from jejunum and trachea. *The Journal of Membrane Biology* 128: 27-39, 1992.

118. Writing Group M, Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, Das SR, de Ferranti S, Despres JP, Fullerton HJ, Howard VJ, Huffman MD, Isasi CR, Jimenez MC, Judd SE, Kissela BM, Lichtman JH, Lisabeth LD, Liu S, Mackey RH, Magid DJ, McGuire DK, Mohler ER, 3rd, Moy CS, Muntner P, Mussolino ME, Nasir K, Neumar RW, Nichol G, Palaniappan L, Pandey DK, Reeves MJ, Rodriguez CJ, Rosamond W, Sorlie PD, Stein J, Towfighi A, Turan TN, Virani SS, Woo D, Yeh RW, Turner MB, American Heart Association Statistics C, and Stroke Statistics S. Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 133: e38-360, 2016.

119. Wu HM, Huang Q, Yuan Y, and Granger HJ. VEGF induces NO-dependent hyperpermeability in coronary venules. *The American Journal of Physiology* 271: H2735-2739, 1996.

120. **Wu P, Gao Z, Ye S, and Qi Z**. Nitric oxide inhibits the basolateral 10-pS Cl- channels through cGMP/PKG signaling pathway in the thick ascending limb of C57BL/6 mice. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 00270 02015, 2016.

121. Yamauchi K, Rai T, Kobayashi K, Sohara E, Suzuki T, Itoh T, Suda S, Hayama A, Sasaki S, and Uchida S. Disease-causing mutant WNK4 increases paracellular chloride permeability and phosphorylates claudins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 4690-4694, 2004.

122. Yang S, Chen Y, Deng X, Jiang W, Li B, Fu Z, Du M, and Ding R. Hemoglobin-induced nitric oxide synthase overexpression and nitric oxide production contribute to blood-brain barrier disruption in the rat. *Journal of Molecular Neuroscience : MN* 51: 352-363, 2013.

123. **Yuan SY**. Protein kinase signaling in the modulation of microvascular permeability. *Vascular Pharmacology* 39: 213-223, 2002.

124. **Zou AP, and Cowley AW, Jr.** Nitric oxide in renal cortex and medulla. An in vivo microdialysis study. *Hypertension* 29: 194-198, 1997.