

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISION CBS

126941

" EFECTOS DEL PEPTIDO NATRIURETICO AURICULAR (PNA)
SOBRE EL TRANSPORTE DE SODIO (^{22}Na)
EN UN EPITELIO RENAL EN CULTIVO
(CELULAS MDCK) "

Q.F.B. MARTHA IRMA RANGEL VAZQUEZ

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

MEXICO, D.F., ENERO DE 1992.

I

U. A. M.

126941

ESTA TESIS FUE REALIZADA BAJO LA DIRECCION DEL DR. JESUS FLAVIO MARTINEZ MORALES, INVESTIGADOR DEL CENTRO INTERDISCIPLINARIO Y DE CIENCIAS DE LA SALUD DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL, EN EL LABORATORIO DEL DEPARTAMENTO DE NEFROLOGIA DEL INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA "IGNACIO CHAVEZ".

AGRADECIMIENTOS

A mi Tutor el Dr. Flavio Martínez Morales agradezco su continua dedicación y apoyo en esta etapa de mi formación, su orientación fué decisiva para avanzar y resolver las preguntas surgidas en el desarrollo de esta Tesis.

Agradezco la participación de mis asesores en la realización de ésta Tesis, Dr. Ramón Paniagua Sierra, Dra. Concepción Gutierrez Ruiz, Dr. Jaime Herrera Acosta.

Expreso mi agradecimiento a las personas quienes de alguna manera colaboraron en la realización de ésta Tesis, Dr. José Luis Reyes Sánchez, Dra. Ma. Estela González de Crail, a mis compañeros y amigos.

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana está dentro del Programa de Fortalecimiento al Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número de convenio PFPN/66/91.

Agradezco el apoyo e infraestructura proporcionados por el Dr. Jaime Herrera Acosta para la realización de esta Tesis.

Agradezco a la Universidad Autónoma de Puebla la beca otorgada por la Comisión Bipartita y de Superación Académica (No. 248/CBSA/988.SG/758) durante mis estudios de Maestría.

A MIS PADRES:

Sr. Don Edmundo Rangel Barzola (finado).

Sra. Doña Oliva Vázquez Bello.

Les dedico esta Tesis con mucho cariño. Tu ejemplo forjó la senda de hombres rectos con nobles ideales, ávidos del saber, prestos a dar lo mejor de sí mismos en todo momento. Con el apoyo más grande de todo ser humano, el de una madre, con tu dulzura, sacrificios y oraciones, nos orientas y nos das paz, eres lo más sublime y auténtico.

Mami, tu cariño y apoyo hicieron realidad la realización de este proyecto.

¡ GRACIAS !

A MIS HERMANOS:

Yolanda

Edmundo

Josefina

A MIS TIAS:

Celia Vázquez Bello y Ofelia Vázquez Bello.

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS.

INDICE.	PAG.
1. INTRODUCCION.....	1
1.1. EL PEPTIDO NATRIURETICO AURICULAR.	
ANTECEDENTES HISTORICOS	1
1.2. CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES	4
1.3. ACCIONES FISIOLOGICAS	6
1.4. CARACTERIZACION DE RECEPTORES PARA EL PNA.....	12
1.5. MECANISMOS DE ACCION	16
1.6. RELACIONES ESTRUCTURA ACTIVIDAD	20
1.7. LAS CELULAS MDCK COMO UN MODELO PARA EL ESTUDIO DE FENOMENOS DE TRANSPORTE	23
1.8. CARACTERISTICAS DE LAS CELULAS QUE LAS ASEMELJAN AL EPITELIO DEL TUBULO COLECTOR	26
2. HIPOTESIS GENERAL DE TRABAJO	29
3. OBJETIVO GENERAL	29
4. OBJETIVOS ESPECIFICOS	29
5. MATERIAL Y METODOLOGIA	35
5.1. MODELO EXPERIMENTAL	35
5.1.1. CULTIVO DE CELULAS MDCK	35
5.1.1.1. MONOCAPAS DE CELULAS MDCK SOBRE SOPORTES IMPERMEABLES (CAJAS PETRI) ...	37
5.1.1.2. MONOCAPAS DE CELULAS MDCK SOBRE SOPORTES PERMEABLES	39
5.2. RESISTENCIA TRANSEPITELIAL	43
5.3. MICROFOTOGRAFIAS	47

5.4. DETERMINACION DE PROTEINAS49

5.5. DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE RECEPTORES
PARA EL PNA EN CELULAS MDCK52

5.6. DETERMINACION DE LA INCORPORACION DE SODIO
EN CELULAS MDCK EN PRESENCIA Y EN AUSENCIA
DE OUABAINA54

5.7. INCORPORACION APICAL DE SODIO (²²Na) EN
PRESENCIA DEL PNA57

5.8. CURVAS DOSIS - RESPUESTA DEL PNA SOBRE LA
INCORPORACION DE ²²Na58

5.9. EFECTO DEL PNA, LA AMILORIDA Y LA FUROSEMIDA
SOBRE LA INCORPORACION DE SODIO60

5.10 TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS61

6. RESULTADOS62

6.1. CURSO TEMPORAL DE CAPTACION PARA EL
¹²⁵I-PNA62

6.2. INCORPORACION DE SODIO A TRAVES DE LAS MDCK
SOBRE SOPORTES PERMEABLES EN PRESENCIA Y EN
AUSENCIA DE OUABAINA66

6.3. INCORPORACION APICAL DE SODIO EN PRESENCIA
DEL PNA69

6.4. CURVA DOSIS - RESPUESTA DEL PNA SOBRE LA
INCORPORACION APICAL DE SODIO EN CELULAS
MDCK72

	PAG.
6.5. INTERACCIONES DE AMILORIDA Y FUROSEMIDA CON EL PNA EN LA INCORPORACION DE SODIO	79
6.6. CURVA DOSIS-RESPUESTA DEL SUERO DE RATAS UREMICAS SOBRE LA INCORPORACION APICAL DE SODIO	82
7. DISCUSION	86
8. CONCLUSIONES	92
9. BIBLIOGRAFIA	94

LISTA DE CUADROS.	PAG.
1. Efectos del PNA sobre la acumulación de GMPc intracelular.	18
2. Péptidos estructuralmente semejantes al PNA, con afinidad por el mismo receptor	22
3. Composición del DMEM	33
4. Composición del PBS	34
5. Desarrollo de la resistencia transepitelial.....	46
6. Ringer alto en potasio	55
7. Ringer alto en sodio	56
8. Curso temporal de Captación ^{125}I -PNA.....	65
9. Influjo de ^{22}Na (J_{AB}) en presencia de ouabaína.....	68
10. Efectos del PNA sobre la Incorporación de ^{22}Na	71
11. Curva dosis-respuesta del J_{AB} ^{22}Na	74
12. Curva dosis-respuesta de la amilorida sobre el J_{AB} ^{22}Na ...	77
13. Curva dosis-respuesta de la furosemida sobre el J_{AB} ^{22}Na ..	78
14. Inhibición de la incorporación de ^{22}Na (J_{AB}) en presencia de amilorida.....	81
15. Curva dosis-respuesta del J_{AB} ^{22}Na en células MDCK en presencia de suero de ratas urémicas.....	85

LISTA DE FIGURAS.

PAG.

1. Péptido natriurético auricular.....	3
2. Estructura	5
3. Efectos fisiológicos	7
4. Efectos renales	9
5. Receptores específicos	17
6. Mecanismo de acción del PNA	19
7. Monocapas de células MDCK sobre soportes impermeables	25
8. Monocapas de células MDCK sobre soportes permeables	41
9. Desarrollo de la resistencia transepitelial	45
10. Curva tipo para proteínas	51
11. Curso temporal de captación apical del ^{125}I -PNA	63
12. Curso temporal de captación basolateral del ^{125}I -PNA.....	64
13. Incorporación de ^{22}Na (J_{AB}) en presencia de ouabaína	67
14. Efectos del PNA sobre la incorporación de ^{22}Na	70
15. Curva dosis-respuesta del PNA sobre la incorporación de ^{22}Na	73
16. Curva dosis-respuesta del PNA (Probits)	75
17. Inhibición de la incorporación de ^{22}Na (J_{AB}) en presencia de amilorida	80
18. Curva dosis-respuesta del J_{AB} ^{22}Na en células MDCK en presencia de suero de ratas urémicas	84

ABREVIATURAS.

ADH	Hormona antidiurética.
Ala ⁸	Alanina en posición 8.
Ala ²⁶	Alanina en posición 26.
alfa-hPNA	Alfa péptido natriurético auricular humano.
alfa-rPNA	Alfa péptido natriurético auricular de rata.
AMILO	Amilorida.
ATCC	American Type Culture Collection.
CI ₅₀	Concentración inhibitoria del 50%.
-COOH	Grupo carboxilo.
DMEM	Medio Mínimo Eagle Dulbecco.
DNAc	Adenosin nucleótido cíclico.
FURO	Furosemida.
GMPC	3',5', guanosina monofosfato cíclico.
GTP	Guanosin trifosfato.
H ₂ O	Agua.
H ⁺	Protón.
ILE	Isoleucina.
¹²⁵ I-PNA	Péptido natriurético auricular marcado con iodo (125).
J _{in}	Incorporación apical hacia la célula o flujo neto.
J _{Na}	Incorporación apical de sodio.
K _D	Constante de disociación.
KDa	Kilodaltons.
LLC-PK ₁	Línea celular de riñón de cerdo.

MDCK	Línea celular de riñón de can, de Madin y Darby.
MET	Metionina.
mOsm	Miliosmoles.
Na ⁺	Ion sodio.
²² Na	Sodio marcado.
-NH ₂	Grupo amino.
nM	Nanomoles.
OUAB	Ouabaina.
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos.
PNA	Péptido natriurético auricular
(R)	Radical.
R	Resistencia transepitelial en ohms x cm ² .
R _B	Receptor acoplado a guanilato ciclasa membranal.
R _{Blanco}	Resistencia transepitelial de los filtros.
R _C	Receptor no acoplado a guanilato ciclasa membranal.
RIA	Radioinmunoanálisis.
R _M	Resistencia transepitelial de la monocapa.
R _n	Resistencia transepitelial en ohms.
uM	Micromoles.
VFG	Velocidad de filtración glomerular.
Vmax	Velocidad máxima.

1. INTRODUCCION

1.1. EL PEPTIDO NATRIURETICO AURICULAR (PNA).

ANTECEDENTES HISTORICOS.- Las primeras evidencias que demostraron la presencia de un péptido con propiedades diurética y natriurética sobre la nefrona fueron presentadas por Reinhard y Col. en 1980, como una consecuencia del aumento en el volúmen sanguíneo en perros conscientes con un riñón denervado y perfundido a presión constante, produciéndose una respuesta diurética y natriurética. En 1980 Knock, C.A. y de Wardener (22) demostraron al cruzar la sangre de dos ratas (donador y receptor), cuando el donador fué expandido con sangre homóloga, y la orina de la rata donadora fué infundida dentro de su vena femoral, la rata receptora sufrió un brusco aumento en la excreción urinaria de sodio.

El PNA fué aislado por otros grupos de investigadores a partir de los gránulos densos de la aurícula cardiaca (15, 25, 66, 67) y obtuvieron fracciones de diferentes pesos moleculares, con actividad cada una de ellas. El extracto auricular produjo natriuresis inmediata, muy corta y está asociada con hipertensión transitoria, y fué mayor en animales con el volúmen expandido, ejerciendo un pequeño aumento en el volúmen urinario (10, 71). El músculo cardiaco es el principal órgano que almacena al péptido natriurético auricular, por esta razón se le considera como un órgano endócrino y al péptido como una hormona circulante (14, 59, 61).

Para determinar la estructura del PNA se realizaron estudios bioquímicos del extracto auricular y fué posible obtener fragmentos de diferentes pesos moleculares (25). Entre ellos está la cardionatrina II de 46 aminoácidos y peso molecular de 5499 Da, y la atriopeptina I, un péptido muy similar al PNA. Péptidos natriuréticos auriculares I, II, III, de 21, 23 y 33 aminoácidos respectivamente y otras fracciones de peso molecular entre 3600 y 44,000 Da. Algunos de ellos con actividades diurética y/o natriurética.

Las formas más pesadas no son activas, se consideran precursores del PNA, la fracción de mayor peso molecular, fué un péptido de 126 aminoácidos inactivo. Un aumento en la presión auricular, libera este precursor al actuar la enzima conversora liberando a la circulación la forma activa, que es el péptido natriurético auricular (PNA) (16, 66), (Figura No. 1).

Con el propósito de determinar polipéptidos circulantes Miyata (1985), demostró en el suero humano la presencia de 3 fracciones alfa-hPNA, beta-hPNA y gama-hPNA, de 28, 56 y 126 aminoácidos respectivamente y determinó al péptido alfa-hPNA como el más abundante. En el extracto auricular de rata, el péptido más abundante fué el gama-rPNA (de 126 aminoácidos) y en el plasma el péptido más abundante fué el alfa-rPNA (48).

PEPTIDO NATRIURETICO AURICULAR (PNA)

(126 aminoácidos)

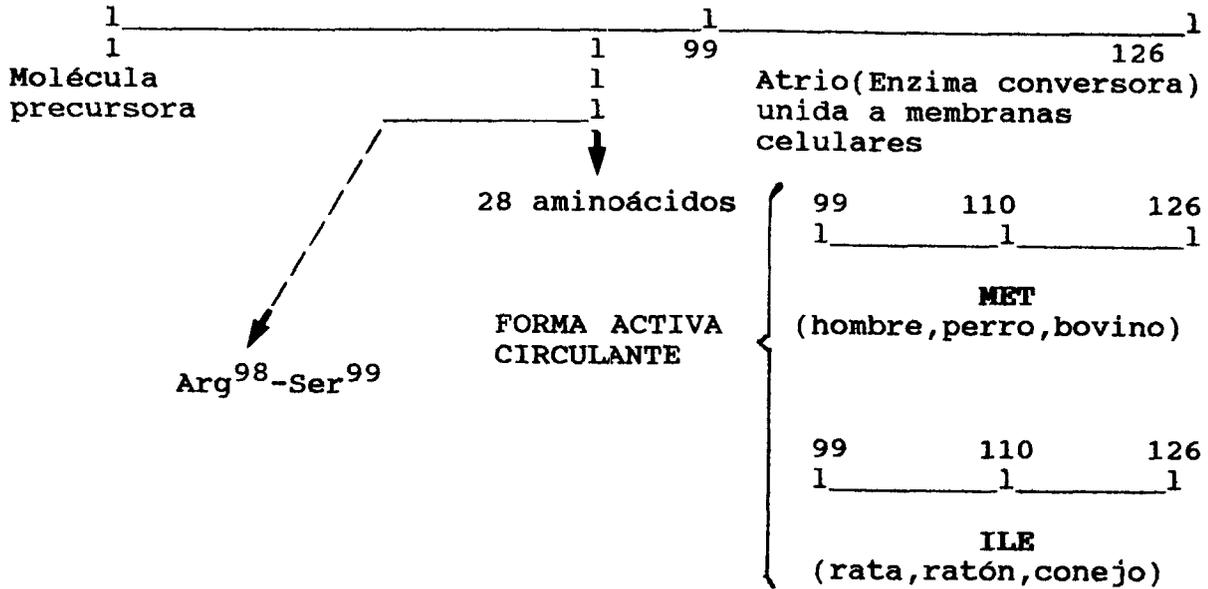


FIGURA No. 1

PNA en su forma activa liberada del atrio cardiaco, los aminoácidos en posición 12, metionina e isoleucina le dan diferenciación de especie.

1.2. CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES.

El PNA, es un péptido almacenado en los gránulos densos de la aurícula cardiaca en forma de un prefactor (péptido de 126 aminoácidos), liberado a la circulación en respuesta a un aumento en la presión auricular o distensión de la aurícula. La presencia de una enzima conversora en la aurícula, con acción sobre el enlace Arg⁹⁸ - Ser⁹⁹ permite la liberación de una fracción de bajo peso molecular, un péptido de 28 aminoácidos, que es la forma activa circulante del péptido natriurético auricular (21) (Figura 1).

Este péptido es muy similar en todas las especies. El péptido aislado del extracto auricular del hombre, perro y bovino, es una fracción de 28 aminoácidos, conteniendo en su molécula el aminoácido metionina en posición 12. Kangawa y Matsuo (1984) (25) nombraron a éste péptido alfa-hPNA. A diferencia del péptido previamente aislado por Flynn y deBold (1983)(16), quienes aislaron a partir del extracto auricular de rata, ratón y conejo, una fracción de 28 aminoácidos con isoleucina en posición 12. Esta característica le da diferenciación de especie, por encontrarla en rata le nombraron alfa-rPNA. De ambos péptidos se ha demostrado sus actividades diurética y natriurética (25, 71). Actualmente la estructura química, el DNAC y los genes que determinan al PNA están totalmente caracterizados, lo cual permite determinar sus sitios activos y estudiar el comportamiento de análogos del PNA por sustituciones con

diferentes radicales (23).

El PNA está formado por una cadena de aminoácidos unidos por un puente disulfuro, dándole a su estructura la forma de anillo.

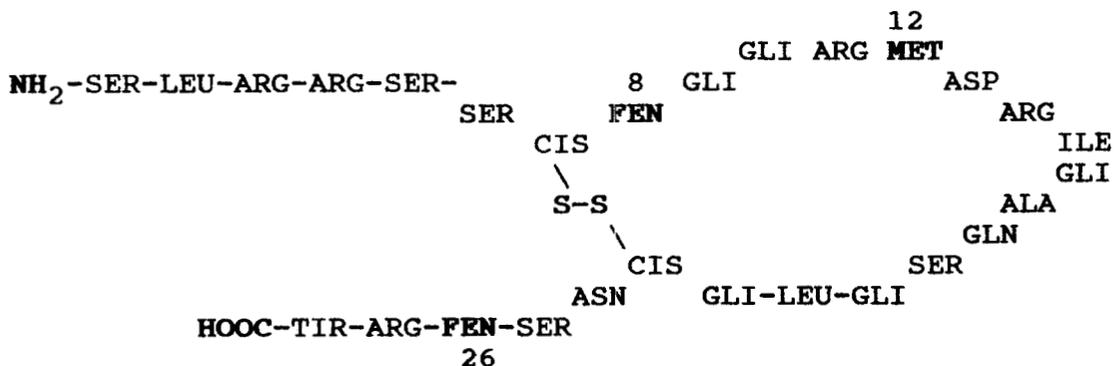


Figura No. 2.- Características estructurales del PNA.

Presenta grupos amino (-NH₂) y carboxilo (-COOH) terminales, así como grupos fenil hidrófobos en posiciones Ala⁸, Ala²⁶. Si alguna de estas características se suprime, pierde su actividad total o parcialmente. Una característica muy importante para su actividad es la estructura en anillo que le da el puente disulfuro. Cuando se abre el anillo por proteolisis o por reducción del puente disulfuro se ve claramente como pierde casi por completo su actividad fisiológica. La pérdida de su carboxilo terminal, disminuye su actividad de manera importante. Sin embargo la pérdida de su grupo amino terminal disminuye parcialmente su actividad, su actividad se ve reducida en menor proporción por la pérdida de sus grupos fenil hidrófobos (Figura 2).

1.3. ACCIONES FISIOLÓGICAS.

El PNA liberado a la circulación se encuentra en su forma activa circulante y ejerce su acción a nivel de células blanco dando por resultado efectos biológicos.

Efectos sobre el sistema circulatorio.- El principal efecto del PNA sobre el sistema circulatorio es una disminución transitoria al parecer indirecta sobre la presión arterial (23, 53) (Figura 3).

El péptido produce la relajación de las venas precontraídas por vasopresores (como angiotensina II, norepinefrina o histamina) después de 30 minutos de inyección intravenosa del PNA (24). El PNA disminuye el tono del músculo liso vascular (76). Johnston (1989), informa el efecto del PNA sobre la disminución en la liberación de renina y aldosterona, sin embargo es muy probable que se deba a un mecanismo reflejo por aumento en la excreción de sodio y un aumento en la presión arterial renal. Otros investigadores determinan que la inhibición de renina y aldosterona se produce por altas concentraciones de PNA cuando existe daño renal congestivo (24).

En cultivos de células yuxtaglomerulares de conejo, la reducción de la liberación de renina por el PNA parece ser mediada por la acumulación de GMPc (79).

Efectos sobre el riñón.- Los principales efectos sobre la función renal son una natriurésis y una diuresis pronunciadas, que pueden explicarse por los efectos que el PNA produce sobre las diferentes estructuras renales. Algunos de estos efectos

EFFECTOS FISIOLÓGICOS DEL PNA

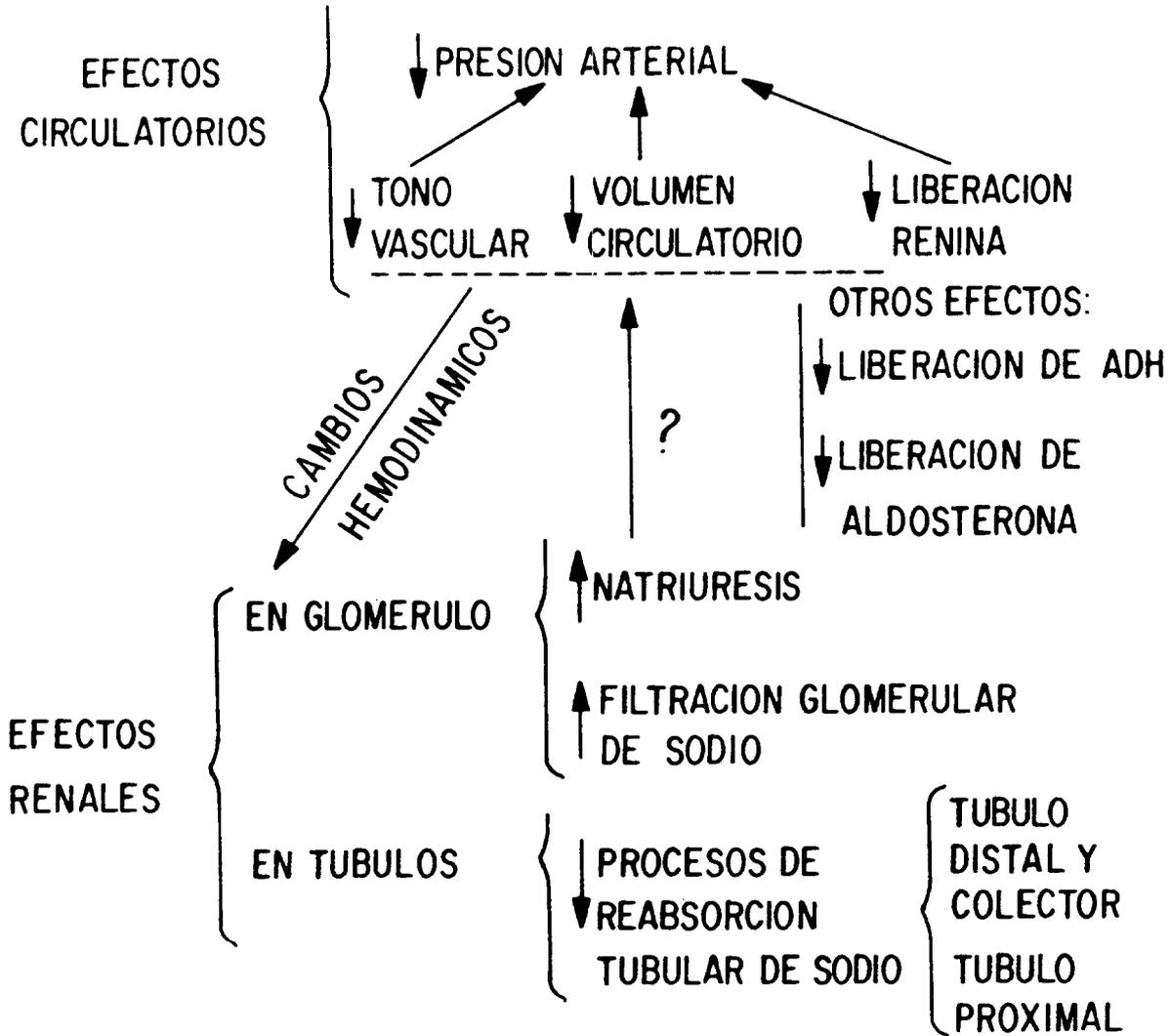


FIGURA No. 3

El PNA actúa directamente sobre el glomérulo con una marcada natriuresis y en el túbulo distal y el colector inhibe la reabsorción de sodio en la porción distal de la nefrona.

sobre todo a nivel glomerular se pueden explicar por cambios hemodinámicos evocados directa y/o indirectamente por el PNA.

En el glomérulo.- produce un aumento en el flujo sanguíneo renal aunque no es sostenido, dilata la arteriola aferente y contrae la arteriola eferente permitiéndolo una presión hidráulica aumentada en los capilares glomerulares, una acción directa en la reducción del tono de las células mesangiales glomerulares, y un aumento en la superficie de filtración (77). Como la velocidad de filtración glomerular (VFG) varía directamente en función de la superficie glomerular y de la permeabilidad del glomérulo, resulta un incremento en la VFG y en la fracción de sodio filtrado (F_{Na}). Este último contribuye en parte al efecto natriurético pero no totalmente. Hay evidencias que el efecto que ejerce el PNA sobre la VFG puede ser mediada por aumento en la acumulación de GMPc (76). Se observa que el PNA aumenta la producción de GMPc en el glomérulo aislado y en las células mesangiales cultivadas, por ello es considerado el GMPc como segundo mensajero en los efectos producidos por el PNA (76).

En los túbulos.- La natriuresis puede explicarse por un efecto directo del PNA sobre los túbulos renales, es decir, por bloqueo de alguno(s) de los mecanismos de transporte para la reabsorción de sodio (Figura 4).

En el túbulo proximal (TP).- El PNA provoca un aumento importante en la excreción de sodio debido a un aumento en la fracción de filtración de sodio a través de los glomérulos. La infusión del PNA permite la liberación de solutos del túbulo proximal en un

EFFECTOS RENALES DEL PEPTIDO NATRIURETICO AURICULAR

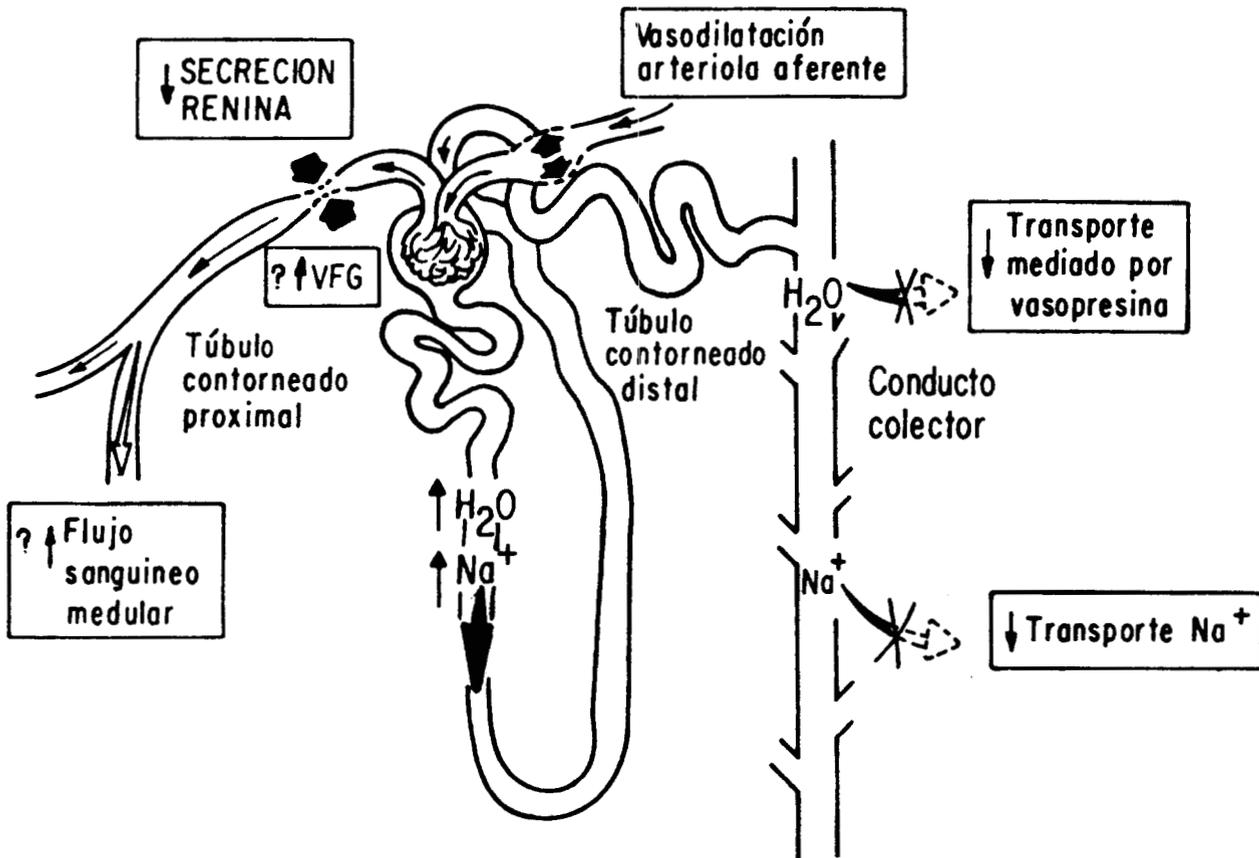


FIGURA No. 4

El PNA ejerce sus efectos en diferentes zonas localizadas de la nefrona. Los efectos encuadrados al parecer son - mediados por la acumulación de GMPc intracelular.

30% con su correspondiente aumento en la VFG. Al contraerse la aorta para regresar la VFG a niveles basales, durante la infusión del PNA, este porcentaje disminuye. Aún cuando está demostrada la ausencia de receptores al PNA en el túbulo proximal, en algunas circunstancias el PNA regula el transporte del túbulo proximal (13, 21, 75).

En el asa de Henle.- Por algunos estudios de microperfusión se observa que el PNA no tiene efecto en el transporte de sodio en ninguna de las porciones del asa de Henle (75): vuelta de horquilla, asa ascendente medular y cortical (29). Por otra parte no se encuentran receptores para el PNA en este segmento (7). Además ante la presencia del PNA no hay respuesta en la acumulación de GMPc intracelular tal como se observa en el glomérulo y en el conducto colector medular interno (34).

En la nefrona distal:

El PNA inhibe la reabsorción neta de sodio medida en función del consumo de oxígeno en el túbulo colector, sobre diferentes preparaciones membranales (células de intestino, células LLC-PK₁, células del conducto colector medular interno de conejo) (78), en animales de experimentación perfundidos (76, 77) y en el hombre medido en función de la reabsorción de sodio del filtrado glomerular (45, 49, 74). Resultados similares se obtienen al administrar análogos de GMPc (36). Así mismo el PNA ejerce un efecto inhibitorio en la liberación de vasopresina (44). Esta inhibición en la reabsorción de sodio y agua en la nefrona distal

produce una respuesta marcada diurética y natriurética (3, 27). Al administrar angiotensina II (activador de aldosterona) se producen efectos fisiológicos antagónicos a los del PNA. La angiotensina II es un vasoconstrictor, disminuye la velocidad de filtración glomerular, aumenta indirectamente la reabsorción de sodio en el túbulo distal y regula la homeostasis del sodio, por estimulación de la secreción de aldosterona. El péptido produce efectos opuestos, induce relajación de las venas precontraídas por angiotensina II, disminuye la presión sanguínea; aumenta la velocidad de filtración glomerular, inhibe la reabsorción de sodio estimulada por angiotensina II y la liberación de vasopresina (23, 38, 73).

Posiblemente estos mecanismos mencionados antes respecto a angiotensina II sean una respuesta compensatoria a los cambios desencadenados por el PNA.

El PNA es importante en diversas enfermedades como la hipertensión, cirrosis, síndrome nefrótico. Estas enfermedades se caracterizan por una importante retención de sodio en el organismo, en ellas se encuentran alterados los mecanismos de regulación de la reabsorción y la excreción de sodio, y se presenta un aumento en la presión arterial. Es importante la presencia del PNA en los casos hereditarios donde hay fallas en su excreción; puede ser administrado en dosis farmacológicas restableciendo a su normalidad los niveles circulantes de sodio, además de poseer un potente efecto hipotensor (45, 71).

1.4. CARACTERIZACION DE RECEPTORES PARA EL PNA.

En diferentes preparaciones membranales de mamíferos adultos se han encontrado evidencias de receptores para el PNA en gran número y de alta afinidad en diferentes sitios: cerebro, pulmón, aorta, arterias, arteriolas, capilares glomerulares, vasa recta de la médula externa e interna, túbulo distal, túbulo colector y en menor densidad o con menor afinidad en túbulo proximal, células endoteliales vasculares, células del músculo liso, y células epiteliales renales en cultivo (6, 20, 34, 35).

Para la identificación y caracterización de estos receptores se informa en la literatura, se recurre a diferentes metodologías, entre ellas mencionamos las siguientes:

- 1) Afinidad por cromatografía sobre afigel-10.- Consiste en fraccionar las membranas plasmáticas, después marcarlas pasándolas a través de una columna afigel-10, y lavarla con amortiguadores. Las proteínas unidas se extraen con una mezcla de acetato, NaCl y lubrol, se purifican y al final se caracterizan los receptores determinando su unión al PNA (59, 68).
- 2) Afinidad en columna por un gel de GTP-agarosa.- Consiste en fraccionar las membranas celulares, después marcarlas a través de una columna de GTP-agarosa equilibrada con amortiguador. Las proteínas unidas se extraen con otro amortiguador conteniendo GTP (5mM) y finalmente se analiza en las muestras la afinidad para guanilato

ciclasa y su unión al PNA (34, 70).

- 3) Autorradiografía.- En cortes finísimos de algunas zonas renales congeladas y fijadas sobre cubreobjetos, se marcan con radioisótopos, y en seguida se realiza la autorradiografía con una película en frío para finalmente revelar la presencia de receptores por medio de colorantes, encontrándose zonas de afinidad al ligando identificadas por zonas con puntos negros donde se encuentran los precipitados de los gránulos de plata (14, 61).
- 4) Captación específica del ligando ^{125}I -PNA.- consiste en incubar las preparaciones membranales en presencia de ^{125}I -PNA, durante 20 a 30 minutos en presencia y en ausencia del PNA frío en altas concentraciones, para desplazar al componente unido de manera inespecífica, se lavan las preparaciones con ringer y se cuenta radiactividad. Por cálculo se determina la unión específica por diferencia del componente inespecífico del componente total (4, 6, 17, 20, 27, 28, 34, 36, 59).
- 5) Electroforesis sobre gel con poliacrilamida SDS (34).- Las monocapas celulares en estudio se marcan con el ^{125}I -PNA(8-23), se aumenta la concentración con péptido frío y se exponen las monocapas a SDS con amortiguador. Las proteínas se solubilizan en agua hirviendo y el solubilizado se lleva a electroforesis con gel de

separación. Se seca el gel y se expone a una película de rayos X en frío para preparar autorradiogramas, los cuales se barren con un densitómetro. Algunos geles se fraccionan para contar radiactividad.

La forma más difundida para determinar receptores al PNA es la captación específica del ^{125}I -PNA, en preparaciones membranales de diferentes tejidos o cultivos celulares. Las moléculas marcadas del péptido se unen al receptor pero también pueden unirse en forma inespecífica a otros sitios, es pues necesario determinar la cantidad del radioligando que se une inespecíficamente.

Con el uso de ésta técnica se pueden calcular además las constantes bioquímicas de disociación al equilibrio (K_D), y la velocidad máxima ($V_{\text{max.}}$) (6, 27, 34, 36,).

Entre los receptores purificados se encuentra un tipo de receptor con peso molecular de 140KDa en su estado no reducido, es decir, se trata de un dímero unido por un puente disulfuro, al ser reducido se obtienen dos subunidades de 70KDa, las cuales no están acopladas a guanilato ciclase membranal, indicando se trata de receptores no funcionales o que no tienen relación con el efecto mediado por GMPc (30, 68).

Con el uso de las técnicas de afinidad en columna por GTP-agarosa y el uso del ligando cruzado seguido por la separación con: electroforesis, autorradiografía o cromatografía, se identifican dos tipos de receptores: uno de 66KDa no acoplado a la guanilato ciclase o no funcional (R_C) y representa el 90% de la población de receptores y otro con peso molecular de 130 KDa acoplado a

guanilato ciclasa particulada (R_B) y representa el mínimo porcentaje de la población del 6 al 10% (1, 34, 35, 70) (Figura 5).

1.5. MECANISMOS DE ACCION.

Se propone que el péptido natriurético auricular actúa sobre células blanco a través de los receptores localizados en la superficie membranal, acoplados a guanilato ciclase membranal, no citosólica, produciéndose un incremento en la acumulación de GMPc (33), que actuaría como segundo mensajero (Figuras 5 y 6).

En preparaciones in vivo e in vitro las evidencias demuestran que los efectos del péptido son mediados por GMPc, al interaccionar el péptido con los receptores, se produce un aumento en la acumulación de los niveles de la guanilato ciclase y del GMPc en tejidos y células, así mismo se inhibe la actividad de la adenilato ciclase membranal (13,22,26). El PNA ejerce un incremento en los niveles de GMPc en diversos tejidos como la aorta, el riñón, la glándula adrenal, el pulmón, el hígado, los testículos y el cerebro, es evidente que la afinidad por los diferentes tejidos varía de acuerdo a la preparación y al tiempo de incubación, posiblemente debido a la existencia de receptores específicos para el PNA con diferente afinidad (6, 27, 28, 34, 35, 38, 79), (Cuadro 1).

Respecto al mecanismo intracelular se propone que el GMPc intracelular actúa como un segundo mensajero, lo cual conduce paralelamente a un incremento en la actividad de la proteínasina y por consiguiente de la fosforilación proteica (Figura 6). En las células tubulares renales en los segmentos distales, el mecanismo de bloqueo o inhibición sobre el transporte de sodio

RECEPTORES ESPECIFICOS PARA EL PNA EN LA MEMBRANA CELULAR

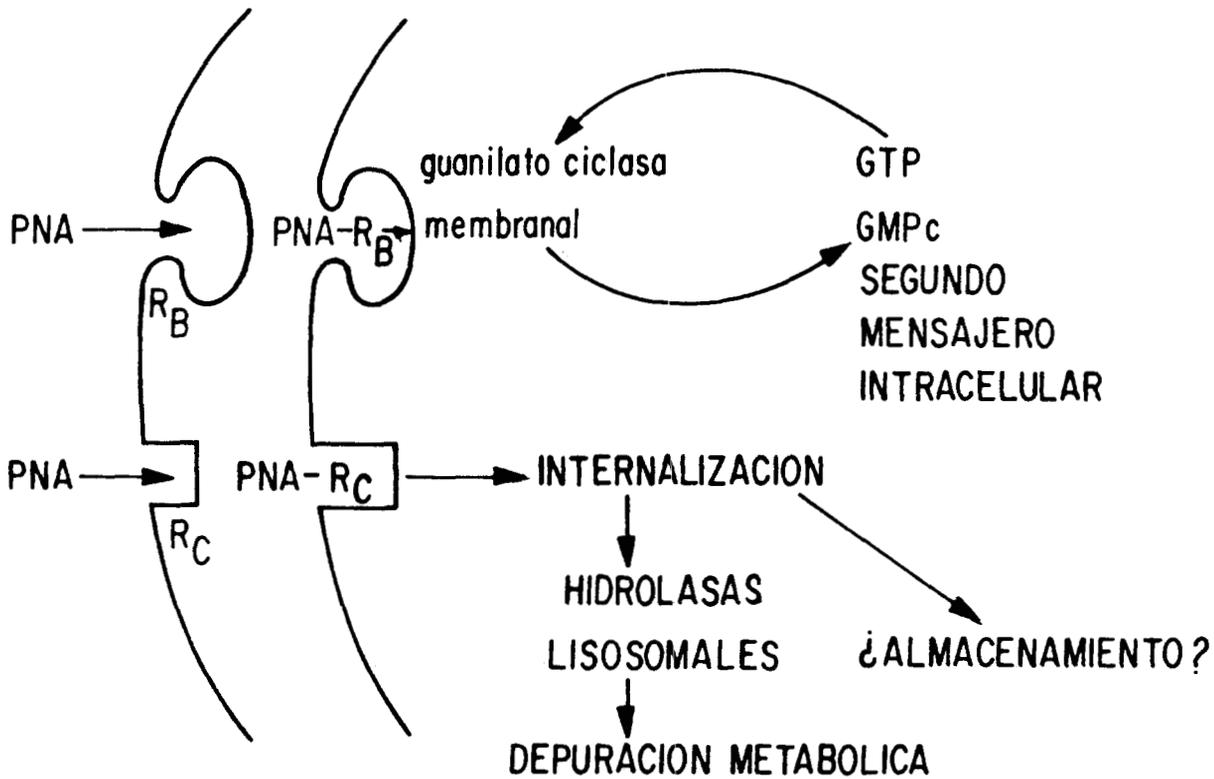


FIGURA No. 5

En la membrana celular de las células blanco, se encuentran localizados dos clases de receptores específicos para el PNA.

1.- Receptores (R_B), acoplados a una guanilato ciclasa membranar, se activan los mecanismos intracelulares con la participación del GMPc como segundo mensajero.

2.- Receptores (R_C), no acoplados a guanilato ciclasa membranar, actúan depurando al PNA inmediatamente después de internalizarlo.

CUADRO No. 1.

EFFECTOS DEL PNA SOBRE LA ACUMULACION DEL GMPc INTRACELULAR Y EL AUMENTO EN LA ACTIVIDAD DE LA GUANILATO CICLASA PARTICULADA EN DIFERENTES PREPARACIONES MEMBRANALES.

PREPARACION	PNA (nM)	AUMENTO GMPc VECES	GUANILATO CICLASA PARTICULADA No. VECES
CORTEZA ADRENAL BOVINA	100	13	1.5
FIBROBLASTO DE PULMON HUMANO	100	35	3.1
CELULAS MDCK	100	58	3.2
MUSCULO LISO AORTICO BOVINO	100	60	2.5
EPITELIO MAMARIO DE RATA	100	120	5.0
TESTICULO DE RATA	100	260	7.0
CELULAS EPITELIALES DE RIÑON BOVINO	100	300	7.8
CELULAS ENDOTE - LIALES AORTICAS BOVINAS	100	475	8.0

Tomado de Leitman, D.C. (34).

Relación de la acumulación de GMPc y guanilato ciclasa particulada por la presencia del PNA en preparaciones membranales.

MECANISMO DE ACCION DEL PNA

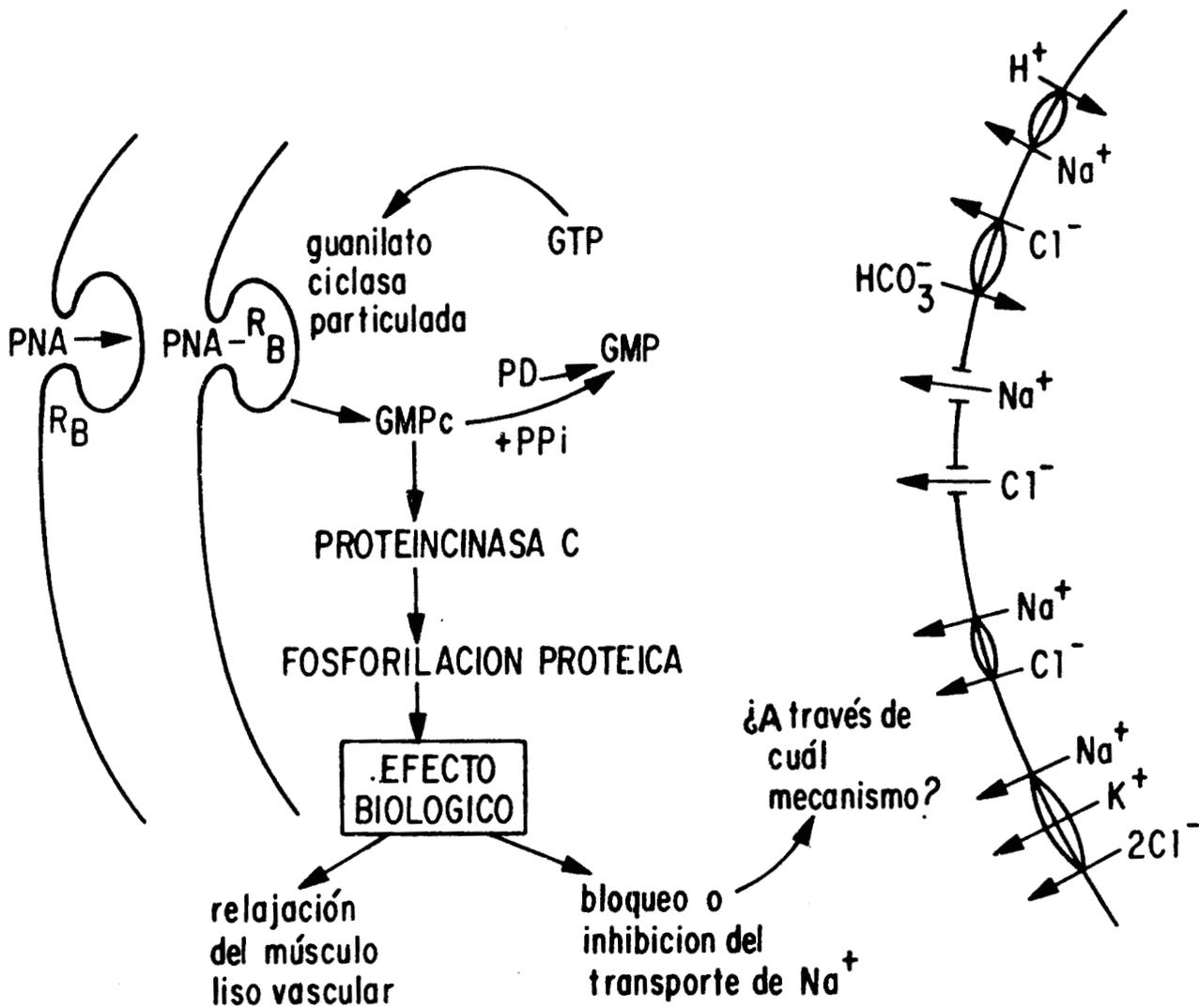


FIGURA No. 6

El PNA después de formar el complejo PNA-R_B, activa mecanismos intracelulares en cadena por medio de la guanilato ciclasa membranal aumentando los niveles de GMPC, que actuaría como 2o. mensajero en los efectos biológicos del PNA, sobre la de mecanismos específicos del transporte de sodio localizados en la membrana apical.

aún no está dilucidado.

El PNA inhibe el transporte iónico dependiente del consumo de oxígeno en células del conducto colector. El PNA y el GMPC reducen marcadamente la apertura de canales a cationes no selectivos en células del conducto colector medular interno (19, 71).

Este efecto inhibitorio es mediado a través de receptores específicos al PNA localizados en la superficie membranal y donde el GMPC y la guanilato ciclasa particulada actúan como mediadores en el mecanismo intracelular.

1.6. RELACIONES ESTRUCTURA-ACTIVIDAD.

El PNA presenta actividad dependiendo de su estructura, por lo tanto es necesario, que el PNA conserve íntegro su puente disulfuro, sus grupos fenil hidrófobos así como sus grupos carboxilo y amino terminales, para interactuar eficientemente con los receptores (21).

La especificidad de las relaciones estructura actividad quedan claramente demostradas con los experimentos llevados a cabo por Bovy y col. y Kitajima y col. (6, 28). Ellos determinan que el GMPC media la acción del PNA a través de la guanilato ciclasa particulada, utilizando análogos del PNA por ejemplo el [Cis (R) ^{7,23}]alfa - hPNA; al sustituir el radical (R) por $-\text{CH}_2\text{NHCOCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$, $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{COOH}$ o $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, obtienen actividades de enlace similares a las del PNA. Sin embargo al sustituir el radical por grupos fenólicos o sulfhidrilos las

potencias de enlace se reducen a la mitad. Más aún, al suprimir el aminoácido cisteína sus actividades de enlace se reducen al 5%. Empleando el decapeptido (Ala-106)-PNA (105-114) NH₂, un compuesto estructuralmente similar al PNA(103-126) encuentran que la actividad relativa con respecto a éste último es de 0.013 para el receptor (R_B) acoplado a la guanilato ciclasa particulada, y de 0.36 para el receptor (R_C) no acoplado a la guanilato ciclasa particulada, comparado con 1 para el PNA(103-126) tanto para el receptor R_B como para el receptor R_C (Cuadro 2).

Aunque están identificados gran cantidad de receptores para el PNA ampliamente distribuidos en muchos órganos, aún no se aclara si todas las acciones inducidas por el PNA pueden ser explicadas mediante un solo mecanismo mediado por GMPc, o bien existen otros mecanismos involucrados acoplados al receptor.

El interés particular de éste proyecto es tratar de definir la participación del PNA en la natriuresis a nivel del túbulo colector. Para ello elegimos un epitelio renal en cultivo que conservara las características epiteliales del túbulo colector de los mamíferos, en el cual se hubiese caracterizado con anterioridad un transporte de sodio similar en sus mecanismos a los del túbulo distal.

En la actualidad existen modelos de líneas celulares que conservan ciertas características in vitro, semejantes a las encontradas en los epitelios celulares renales in vivo, como por ejemplo, la línea celular LLC-PK1 que conserva características

CUADRO No. 2

PEPTIDOS SEMEJANTES AL PNA CON AFINIDAD POR LOS MISMOS RECEPTORES.

PEPTIDOS	AFINIDAD POR RECEPTORES	
	R _B (%)	R _C (%)
PNA	100	100
[CIS(R) ^{7,23}]ALFA-HPNA	-	-
-CH ₂ NHCOCH ₃	100	100
-CH ₂ CONH ₂	100	100
-CH ₃	100	100
-CH ₂ COOH	100	100
-CH ₂ CH ₂ NH ₂	100	100
[CIS(FENOL) ^{7,23}]ALFA-hPNA	50	50
[CIS(SH) ^{7,23}]ALFA-hPNA	50	50
[(R) ^{7,23}]ALFA-hPNA	5	5
(ALA-106)-PNA(105-114)NH ₂ (muy similar al PNA)	1.3	3.6

Los péptidos semejantes al PNA, que conservan sus radicales funcionales, presentan similar afinidad por los receptores para el PNA. Cuando el radical (R), es sustituido por el grupo fenólico o por el grupo sulfhidrilo, su afinidad se reduce a la mitad, más aún cuando se suprime el aminoácido cisteína, su afinidad se reduce al 5%. El último péptido de este cuadro, es una molécula muy parecida al PNA, sin embargo la falta de algunos grupos activos, reduce su afinidad al 1.3%.

epiteliales del túbulo proximal de la nefrona; la línea celular MDCK que conserva características del epitelio de la porción distal de la nefrona (túbulo contorneado distal, tubulo colector, cortical y medular). En este trabajo elegimos la línea celular MDCK como un modelo *in vitro* sobre el que determinamos la participación del PNA sobre la incorporación de sodio ($J_{AB}^{22}\text{Na}$), en las monocapas de células MDCK.

1.7. LAS CELULAS MDCK COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DE FENOMENOS DE TRANSPORTE.

La línea celular MDCK establecida por S.H. Madin y N.B. Darby en 1958 (40), derivada a partir de células epiteliales del túbulo colector del riñón de una perra Cocker Spaniel aparentemente sana, según consta en los registros de la ATCC (41) (MDCK NBL-2). Es caracterizada y determinado su cariotipo en el pasaje 50avo por Gauth y Col. en 1966 (18). Ellos determinan en estas células la presencia de 79 cromosomas incluyendo un gran cromosoma metacéntrico y cromosomas subteloecéntricos en gran cantidad (18). Por investigaciones de las características funcionales y diferenciales de las células MDCK, demuestran el desarrollo de tumores con actividad oncogénica al inyectarse en embriones de pollo (31, 32).

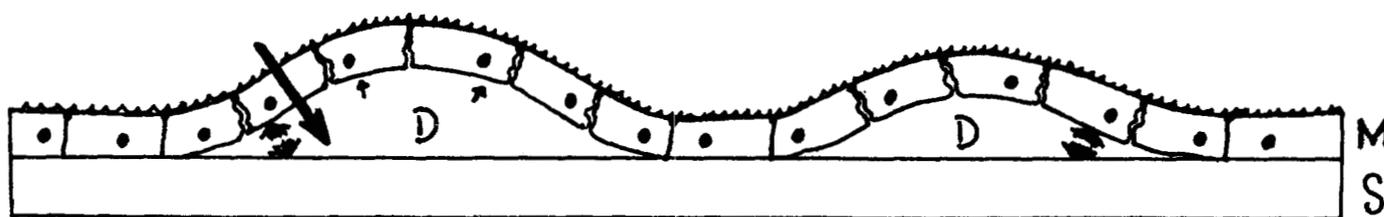
Las células MDCK como sucede con otras líneas celulares tienden a organizarse cuando se encuentran sobre una superficie plana, forman monocapas confluentes pocos días después de la resiembra. Si la monocapa es resembrada a baja densidad ($<1 \times 10^6$ cel/ml),

entonces su desarrollo y organización es más lento, alcanzan confluencia después de una semana de resembradas.

Su forma de organización es similar a la de los epitelios naturales y otros epitelios en cultivo, presentando asimetrías morfológicas y funcionales lo cual conduce a la formación de un epitelio polarizado (12, 45, 57, 58), es decir, cuando las células crecen sobre un soporte tienden a orientarse. La cara apical en contacto con el medio que las baña, sobre esta cara presentan microvellocidades (55, 11), mientras en la cara basolateral orientada hacia el soporte presenta una superficie interdigitada (69).

Cuando la monocapa de células MDCK se encuentra sobre un soporte impermeable por ejemplo vidrio o plástico, las células expresan una formación muy característica; si las observamos a través de un microscópio invertido podremos apreciar la presencia de algunas zonas refringentes fuera de foco, estas formaciones son partes de la monocapa que tienden a separarse del soporte sin romper la monocapa y se denominan ampollas. domos o "blisters" (11, 50, 60) (Figura No. 7). Estas formaciones aparecen y desaparecen sobre la monocapa, se les ha comparado con las burbujas formadas en la superficie de un caldero de avena hirviendo. Evidentemente la presencia de estos domos nos demuestra la funcionalidad del epitelio en cuanto a sus mecanismos de transporte de agua y solutos, es decir, en ellas se está realizando un transporte unidireccional de líquido y de solutos de la cara apical, bañada por el medio hacia la cara

MONOCAPAS DE CELULAS MDCK SOBRE SOPORTES IMPERMEABLES



M = monocapa de células MDCK.

S = soporte del cultivo.

D = domos.

FIGURA No. 7

Formación de domos en las células MDCK. El efecto del flujo unidireccional de solutos y agua ejerce una presión hidrostática entre el soporte y la monocapa. Al separarse la monocapa del soporte forma los domos.

basolateral adherida al soporte y al generarse un incremento en la presión hidrostática entre monocapa y soporte, se desprende la monocapa del soporte generándose un domo (52). Aún cuando unas células se desprenden del soporte para formar domos y otras no, todas son funcionales (51).

Las monocapas de células MDCK sembradas sobre soportes permeables no forman domos porque la presión hidrostática entre el soporte y la monocapa es inexistente, aún cuando existan fuertes uniones estrechas intercelulares caracterizadas por la formación de bandas la monocapa permanece adherida al soporte (47, 51). La formación de domos es inhibida por la presencia de ouabaína. La ouabaína, es un fármaco que inhibe las bombas de $\text{Na}^+ - \text{K}^+/\text{ATPasa}$, como consecuencia se inhibe el flujo unidireccional de sodio y potasio, al mismo tiempo que inhibe el transporte pasivo del agua acoplado al primero (50).

Las células MDCK presentan mecanismos de transporte de agua y solutos sensibles a hormona antidiurética, prostaglandinas y corticosteroides (43).

1.8. CARACTERISTICAS DE LAS CELULAS MDCK QUE LAS ASEMEJAN AL EPITELIO DEL TUBULO COLECTOR.

Las monocapas de células MDCK presentan algunas características similares a las del epitelio de la porción distal (túbulo colector) de la nefrona in vivo. Entre ellas podemos mencionar las siguientes:

Las células MDCK para formar monocapas es necesario que se organicen.

1) Tienden a organizarse por su capacidad de formar uniones estrechas, por ejemplo sensibles a Ca^{++} lo cual les transfiere una resistencia transepitelial alta (11, 51).

2) Las células MDCK son funcionalmente asimétricas, tienen localizadas las bombas $\text{Na}^+-\text{K}^+/\text{ATPasa}$ preferencialmente en la cara basolateral (2, 5, 50, 57).

3) Estas células también tienen localizado el cotransportador $\text{Na}^+-\text{K}^+ 2\text{Cl}$ en la cara apical inhibible por furosemida (46).

4) En esta línea celular se encuentra caracterizado el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ (64).

5) Presentan mecanismos de transpote de agua y solutos sensibles a la hormona antidiurética, a las prostaglandinas y a los corticosteroides (42, 43, 57, 62).

6) La presencia de antígenos de superficie basolaterales son característicos del túbulo colector, asociados a fenómenos de transporte (19,47).

7) Las MDCK exhiben un flujo unidireccional neto de agua y solutos de la membrana apical hacia la basolateral (60), este fenómeno no ocurre en filtros sin células o en filtros con fibroblastos (46).

8) Las células MDCK expresan un aumento en la formación de domos por la presencia de factores de diferenciación celular aplicados en la cara apical (37).

9) Son selectivas al paso de cationes (56). Se localizan en estas células canales de sodio (63), y un sistema intercambiador Na^+/H^+ sensible a amilorida (9, 55, 60).

10) Expresan una respuesta diferencial ante la presencia de hormonas (63, 72).

11) Las monocapas de células MDCK responden a HAD y PE_2 respecto al flujo neto de agua al aplicarlas en la cara basolateral (43).

12) Los estudios por microscopía determinan la presencia de microvellocidades en la cara apical (11).

13) Las células MDCK proveen un sistema modelo para estudiar reabsorción de sales y agua, y su regulación en el riñón (69).

14) La polaridad funcional y morfológica de estos epitelios les permite expresar sus propiedades diferenciadas que las asemejan a los epitelios in vivo (11, 47).

Las células MDCK conservan características similares a las células del epitelio del túbulo distal, sin embargo no son del todo iguales al epitelio del túbulo distal de la nefrona, presentan algunas características diferentes a los epitelios renales in vivo:

1) Con este tipo de epitelios se desarrollan mutantes que al crecer en monocapas desarrollan una nueva característica y la capacidad de transmitirla hereditariamente (63).

2) Estas células desarrollan características oncogénicas cuando se inyectan en embrión de pollo (32).

2. HIPOTESIS GENERAL DE TRABAJO.

El PNA ejerce efectos fisiológicos al unirse a un receptor específico y bloquea alguno de los mecanismos de transporte de sodio a nivel del túbulo distal de la nefrona, este efecto puede ser cuantificado en un epitelio modelo en el cual los receptores al PNA para el transporte de sodio han sido caracterizados.

3. OBJETIVO GENERAL.

Determinar los efectos del péptido natriurético auricular (PNA) sobre los flujos de sodio (^{22}Na) en una monocapa de células epiteliales renales en cultivo (células MDCK), lo cual permitirá dilucidar el mecanismo y la participación del PNA en la natriuresis que se observa por acción del péptido a nivel renal. Para cumplir con este objetivo general, será necesario cubrir los objetivos específicos siguientes:

4. OBJETIVOS ESPECIFICOS.

OBJETIVO No. 1.

Montaje de técnicas de cultivo de células MDCK.- con el objeto de obtener una monocapa de células, como un epitelio modelo in vitro similar en características y funciones al túbulo distal del epitelio renal. El modelo con éstas características es la línea celular MDCK.

En el laboratorio del Departamento de Nefrología del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chavez", se mostró gran interés

en montar e implementar técnicas de cultivo de células renales como modelos experimentales. El montaje de la técnica de células MDCK representó una colaboración importante como parte del Trabajo Experimental realizado durante el desarrollo de esta Tesis.

Es de gran interés estudiar los efectos producidos por el PNA en la nefrona distal:

A) El PNA ejerce un efecto natriurético, al actuar directamente inhibiendo probablemente la incorporación de Na^+ apical través de un mecanismo de transporte de sodio específico, localizado en la membrana apical de la porción distal de la nefrona. Los beneficios de este efecto podrían ser empleados directamente en pacientes expandidos por causas patológicas debidas a mecanismos de retención de sodio.

B) En diversas enfermedades como la hipertensión y enfermedades urémicas, caracterizadas por un exceso en la reabsorción de Na^+ a través de la nefrona, lo cual trae como consecuencia un aumento en los niveles de Na^+ circulante, con un aumento en la presión arterial. Es importante eliminar el exceso de sodio, para restablecer los niveles de sodio sérico. Tal propósito es posible mediante la administración de algún fármaco natriurético. Dadas las características del PNA, podría llegar a emplearse como un diurético-natriurético administrado a dosis farmacológicas.

OBJETIVO No. 2

Determinar la presencia de receptores para el PNA en las monocapas de las células MDCK.

La presencia de captación específica para el ^{125}I -PNA indica la presencia de una molécula específica sobre la superficie celular con actividad para interactuar uniéndose al ^{125}I -PNA; para cuantificarlo es necesario determinar las cinéticas de unión de este ligando radiactivo.

OBJETIVO No. 3

Determinar la incorporación apical de ^{22}Na en las monocapas de células MDCK y determinar su cinética en ausencia y en presencia de ouabaína.

Esta determinación nos permitirá determinar la participación de las bombas de $\text{Na}^+ - \text{K}^+ / \text{ATPasa}$ y el tiempo en la incorporación de sodio a las monocapas.

OBJETIVO No. 4

Determinar la incorporación apical de sodio en las monocapas de células MDCK en presencia del PNA.

La determinación de la incorporación de sodio en las monocapas indica el flujo neto (J_{in}) y brindará una idea clara de la compartimentalización del mecanismo de transporte de sodio en este epitelio.

OBJETIVO No. 5

Determinar si la inhibición del PNA sobre la incorporación apical de ^{22}Na es un fenómeno dependiente de la dosis.

De esta manera será evaluada la interacción PNA-receptor y si el transporte de sodio es modificado por la concentración del PNA. La interacción fármaco receptor será evaluada a partir de curvas dosis-efecto.

OBJETIVO No. 6

Caracterizar las interacciones farmacológicas entre el PNA, la amilorida y la furosemida sobre la inhibición de la incorporación apical de sodio, en las células MDCK en cultivo.

Mediante manipulación farmacológica se determinará el mecanismo de transporte de sodio modificado por el PNA.

CUADRO No.3

COMPOSICION DEL DMEM.

(MEDIO ESENCIAL MINIMO MODIFICADO POR DULBECCO)

		mg/lt.
	1. CaCl ₂ .2H ₂ O	265.00
	2. Fe(NO ₃) ₃ . 9H ₂ O	0.10
	3. KCl	400.00
SALES INORGANICAS:	4. MgSO ₄ (anhidro)	97.67
	5. NaCl	6400.00
	6. NaHCO ₃	3700.00
OTROS COMPONENTES:	7. D-glucosa	4500.00
	8. Rojo de fenol	15.90
	9. L-arginina . HCl	84.00
	10. L-cistina . 2HCl	62.60
	11. L-glutamina	584.00
	12. glicina	30.00
	13. L-histidina HCl . H ₂ O	42.00
	14. L-isoleucina	105.00
	15. L-leucina	105.00
AMINOACIDOS:	16. L-lisina .HCl	146.00
	17. L-metionina	30.00
	18. L-fenilalanina	66.00
	19. L-serina	42.00
	20. L-treonina	95.00
	21. L-triptófano	16.00
	22. L-tirosina (sal disódica)	103.79
	23. L-valina	94.00
	24. D-ácido pantoténico (calcio)	4.00
	25. cloruro de colina	4.00
	26. ácido fólico	4.00
	27. mio-inositol	7.20
VITAMINAS:	28. nicotinamida	4.00
	29. piridoxal . HCl	4.00
	30. Tiamina . HCl	4.00
	31. riboflavina	0.40

pH = 7.4

osmolaridad = 300 mosm.

CUADRO No. 4

COMPOSICION DEL PBS

(SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS)

Sales inorgánicas	gramos/litro
CaCl	0.10
KCl	0.20
KH_2PO_4	0.20
MgCl_2 (anhidro)	0.047
NaCl	8.00
Na_2HPO_4	1.15

pH = 7.4

NOTA.- en algunos experimentos se puede usar
PBS sin CaCl.

5. MATERIAL Y METODOLOGIA.

5.1. MODELO EXPERIMENTAL.

Con el propósito de obtener una monocapa de células que sirva como un epitelio modelo para el estudio de fenómenos de transporte de iones (por ejemplo: Na^+ , Cl^- , Ca^{++} , etc.) y acciones hormonales. Se implementa la técnica de cultivos celulares.

Además, es necesario desarrollar ciertas habilidades técnicas en el manejo de cultivos celulares.

El montaje de ésta técnica comprende algunas etapas del proceso de cultivos celulares en términos generales como por ejemplo:

- 1) Manejo rutinario de los cultivos.
- 2) El proceso de almacenamiento de células a bajas temperaturas.
- 3) El ensayar diferentes superficies o sustratos de cultivos para el crecimiento celular en monocapa.

5.1.1. CULTIVO DE CELULAS MIXC.

Se seleccionan células de pasaje bajo (entre 60avo y 70avo) almacenadas con anterioridad en tubos NUNC (Nunc Inter Med 1.8ml) a -190°C , temperatura del nitrógeno líquido a una concentración de 5×10^6 cel/ml de medio de cultivo.

A) TECNICA DE DESCONGELACION.

Se extraen las células congeladas del nitrógeno líquido de acuerdo con las características deseadas (No. de pasaje, fecha de congelación, densidad celular) especificadas en la etiqueta de

congelación. Se coloca el tubo de congelación (Nunc Inter Med 1.8ml) en posición vertical en el baño de agitación a una temperatura de 37°C hasta que el contenido alcance esa temperatura. Se centrifuga de 5 a 8 minutos a 1000 rpm. En condiciones de esterilidad, decantar por vaciamiento rápido el líquido sobrenadante, cuidando conservar la pastilla de células en el fondo del tubo; se resuspenden las células con pipeta estéril con 5 a 10 ml de medio mínimo esencial modificado por Dulbecco, adicionado de suero fetal bovino al 10% (DMEMc)(42). Resuspendidas las células se pasan a un frasco de cultivo (Falcon 3024, 250 ml de capacidad y 75 cm² de superficie cultivable) y se les agrega de 10 a 15 ml de medio DMEMc, el cual se cambia 24 horas después. Cuando no se dispone de células congeladas se puede adquirir comercialmente, directamente de la American Type Culture Collection o bien de algún comercio nacional, ya sea congeladas o en cultivo.

B) PRODUCCION DE CELULAS.

Las células MDCK se hacen crecer en una incubadora (Shel-Lab VWR Scientific) con temperatura de 36.5°C atmósfera de aire más 5% de CO₂, humedad constante, en frascos de cultivo de 250 ml. de capacidad y 76 cm² de superficie cultivable (Falcon 3024, Div. Becton Dickerson and C, Orland), conteniendo entre 10 y 15 ml de DMEM (Medio Eagle Dulbecco, IN VITRO) cuya composición se señala en el cuadro 3; complementando con 10% de suero de ternera

neonato (IN VITRO S-02), penicilina (100U/ml) y estreptomicina (100µgr/ml) Lakeside; hepes (25mM). Este medio se denomina DMEM completo a un pH de 7.4 (DMEMc).

Una vez que las células alcanzan un 60 a 70% de confluencia, en una campana de flujo laminar vertical (Bio-Quest Biological Cabinet) se les retira el medio por aspiración; se lavan dos veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) cuya composición se señala en el cuadro 4 equilibrada a 37°C; se les añade 10 ml de tripsina-verseno (0.05%-0.05% en solución salina de fosfatos sin Ca⁺², sin Mg⁺² (EN-005, IN VITRO) y se incuban durante 10 minutos a 37°C, golpeándose a intervalos regulares para promover el desprendimiento celular. Una vez desprendidas las células se añaden 10 ml de DMEMc y el total de la solución se vierte en un tubo cónico (CorningTM 50ml, tubo para centrifuga con tapón de rosca) para centrifugar durante 5 minutos a 1500 rpm; se retira el sobrenadante cuidando conservar la pastilla en el fondo del tubo y se utiliza según se requiera.

5.1.1.1. MONOCAPAS DE CELULAS MDCK SOBRE SOPORTES IMPERMEABLES (CAJAS PETRI).

Cuando las células crecen en una confluencia cercana al 80% aproximadamente, se colocan en presencia de tripsina durante 10 minutos, centrifugar, retirar el sobrenadante y resuspender en 10 ml de DMEM completo con una pipeta estéril de 10 ml. De la suspensión obtenida tomar una gota y llevarla a una cámara de

Neubauer cuenta glóbulos y calcular y ajustar la densidad a 2×10^6 cel/ml; esta suspensión se distribuye en cajas Petri de 35X10 mm (Nunclon/Delta), aproximadamente 1 ml/caja. El volumen se lleva a 2 ml añadiendo 1 ml de DMEM fresco sin células. Esta preparación de la monocapa nos permite obtener una monocapa confluyente, con la adhesión de la población celular añadida a la caja Petri al tiempo cero, con ello se evita el crecimiento celular subsecuente. A las dos horas de sembradas se cambia el medio por DMEMc fresco para mantener los cultivos el menor tiempo posible en contacto con la tripsina. Cada tercer día se cambia DMEMc por DMEMc fresco para proporcionar a los cultivos las condiciones nutritivas óptimas para su desarrollo, mantener un pH constante. Así se emplean para los experimentos de captación. Para los experimentos de captación se emplean monocapas a partir de los 7 días hasta 14 días después de sembradas, por lo que se denominan monocapas de 7 días, 8, 10, ... ó 14 días de edad.

Los métodos aquí descritos facilitan el control microscópico del crecimiento de la monocapa; se considera que en promedio a los 90 minutos de sembradas, la mayor parte de las células se adhieren a la superficie del soporte, y que sembradas a alta densidad (2×10^6 células/ml) se forma la monocapa casi sin necesidad de crecimiento y reproducción celular.

5.1.1.2. MONOCAPAS DE CELULAS MDCK SOBRE SOPORTES PERMEABLES.

Las monocapas se siembran sobre filtros de membrana biopore (PICM-01250) insertados en soportes de poliestireno Millicell-CM Millipore. Estos soportes nos proporcionan una superficie cultivable de 0.6 cm^2 , permeable translúcida, permitiendo llevar a cabo el control microscópico de las monocapas.

Este tipo de soporte es muy útil para determinaciones finas del flujo unidireccional de solutos y agua (J_{AB}) a través de las células, su disposición permite probar diferentes fármacos aplicados de manera selectiva ya sea en el compartimento apical o en el basolateral, lo cual no sucede con un soporte impermeable. Se pueden probar los efectos de dos fármacos de acción localizada o bien aplicarlos simultáneamente, para cubrir los objetivos planteados. Algunos autores emplean un modelo similar de soporte (47), con una membrana permeable no translúcida, este tipo de soporte no permite el control microscópico del epitelio, siendo un inconveniente, prefiriéndose las membranas de nylon montadas en cámaras de Ussing. Las membranas Millicell-CM PICM 012 50, proveen grandes ventajas sobre el anterior: 1o. Las membranas son translúcidas. 2o. Permiten el control microscópico del desarrollo de las monocapas. 3o. El desarrollo de las monocapas de células MDCK es uniforme, con los bordes periféricos íntegros a diferencia del montaje en la cámara de Ussing en que puede alterarse la integridad de la monocapa en la periferia. El empleo

de estos soportes se difunde con gran rapidez ultimamente.

Preparación de los soportes:

Los filtros se cubren con una solución de colágeno-etanol (60%) en proporción 1:4 (una parte de colágeno y tres partes de etanol) colocados cuidadosamente dentro de una caja Petri. La superficie del filtro queda completamente cubierta con una capa homogénea de colágeno. Se dejan secar bajo campana de flujo laminar durante 3 horas, el secado es lento pero recomendable (Figura 8).

Posteriormente se cubren los filtros con etanol al (60%) estéril dejando secar durante la noche y bajo luz ultravioleta.

Al día siguiente se cubren los anillos con DMEMc, se mide resistencia transepitelial (se fotografian en algunas ocasiones como control).

Pasaje celular sobre los soportes permeables:

Para hacer el pasaje celular se emplean células MDCK de pasaje 60avo al 90avo. Los filtros Millicell-CM Millipore nos permiten tener dos compartimentos completamente independientes como se presenta en la figura 8, sobre ellos se resiembran las células a una densidad de 1×10^6 células /ml/cm². Sembradas a esta densidad las monocapas se encuentran confluentes a las 24 o 48 horas de sembradas.

En el momento que la monocapa esta totalmente confluyente, quedan dispuestos tres compartimentos perfectamente delimitados e independientes:

a) compartimento apical (dentro del soporte),

126941

MONOCAPAS DE CELULAS MDCK SOBRE SOPORTES PERMEABLES
Y TRANSLUCIDOS (MILLICELL-CM, PICM 012 50).

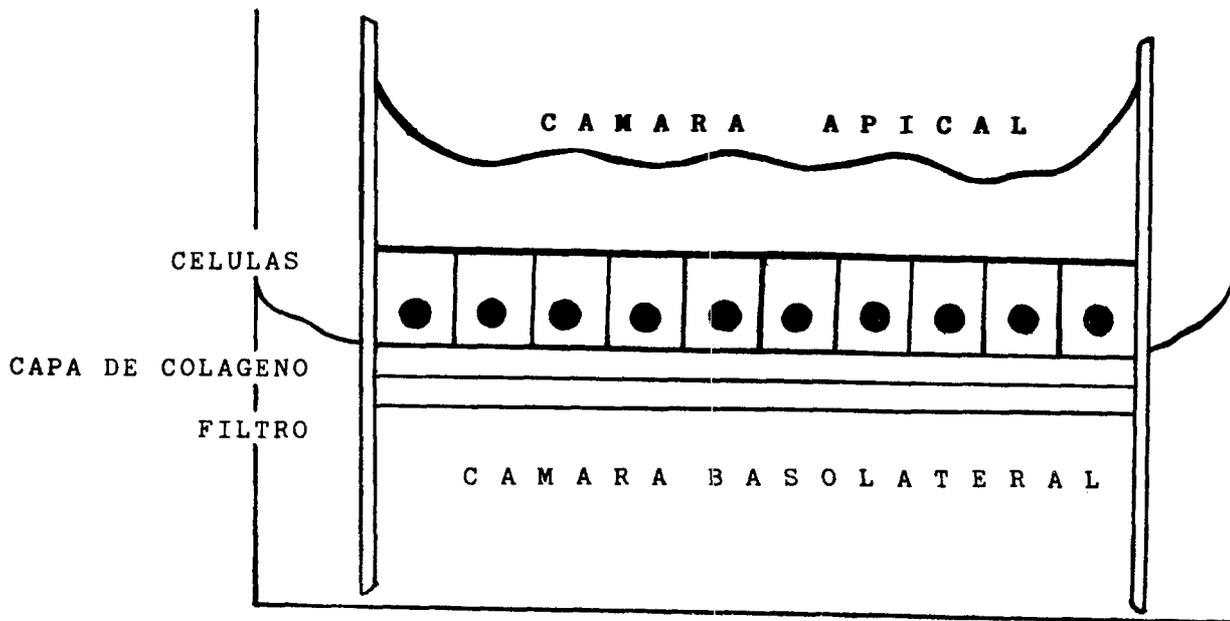


FIGURA No. 8

Las monocapas de células MDCK sobre este tipo de soportes, proveen tres compartimentos perfectamente delimitados: A) Apical, B) Basolateral y C) Intracelular. Permitiendo la cuantificación del flujo unidireccional (J_{AB}) de solutos y agua, así como su modificación en presencia de hormonas o fármacos aplicados selectivamente en el compartimento apical o en el basolateral.

- b) compartimento basolateral (fuera del soporte) y
- c) compartimento intracelular.

En estas preparaciones cuantificamos el flujo de sustancias de un compartimento a otro.

Los soportes se disponen en multiplacas de 24 pozos (Costar, 16mm de diámetro. Mark II 3424, o Nunclon Delta 24 pozos, 143982 1/75 Intermed). Previamente se humedecen con 300 microlitros de DMEMc por su cara basolateral y 50 microlitros en su cara apical. Los filtros se resiembran a confluencia, con una densidad celular de 1×10^6 células/ml/cm². Posteriormente se determina la resistencia transepitelial y se incuban a 37°C, en una atmósfera de CO₂ al 5%, flujo de aire continuo y humedad constante. Para mantener los cultivos en condiciones óptimas, se cambia el DMEMc cada tercer día bajo campana de flujo laminar, retirando el medio cuidadosamente con pipetas pasteur a manera de no levantar la monocapa, así se permite un desarrollo uniforme a la monocapa.

Es necesario, llevar el control del desarrollo de la monocapa:

a) Por control microscópico.- Los soportes elegidos para las monocapa de células MDCK, nos proporcionan un soporte permeable y translúcido por lo que podemos observar la monocapa a través del microscópio invertido, de esta forma aseguramos el control de calidad de los cultivos.

b) Por determinación de la resistencia transepitelial.- Es muy útil para determinar en que momento la monocapa alcanza

confluencia, al obtener una resistencia transepitelial alta se emplean para los experimentos. Para seguir este control es necesario estar capacitado, y desarrollar ciertas habilidades técnicas en el manejo de cultivos celulares.

5.2. RESISTENCIA TRANSEPITELIAL.

Con el objeto de estimar la integridad de las monocapas de células epiteliales MDCK se cuantifica la resistencia transepitelial. Estas células al encontrarse en monocapas se reorganizan formando uniones estrechas sensibles a calcio que les confiere resistencia transepitelial alta. En este trabajo se procede a determinar la resistencia transepitelial con un resistómetro Millipore Millicell-ERS (intervalo de 2000 ohms). Este sistema permite realizar mediciones puntuales de resistencia eléctrica y abrir un circuito de voltaje de una monocapa de células epiteliales cultivadas en soportes permeables. Esto se consigue con un par de electrodos de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl), con el alambre de plata se pasa una corriente a través de la monocapa y se mide el cambio en el voltaje a través de la monocapa, procediendo de la siguiente manera:

A) Bajo condiciones de esterilidad, esterilizar los electrodos sumergiéndolos en etanol al 70% estéril, durante 15 minutos.

B) Pasar los electrodos a PBS durante 15 minutos.

C) Sumergirlos en DMEMc durante 30 minutos, para estabilizar

los electrodos.

D) Ajustar a cero antes de iniciar las lecturas.

E) Al inicio y al final, medir resistencia transepitelial en dos blancos (filtros sin células). El promedio de estas lecturas (R_{blanco}) se sustrae a la resistencia de cada monocapa (R_m), para obtener la resistencia en ohms (R_n), en las preparaciones con células.

F) Medir resistencia transepitelial en todas las monocapas.

G) Calcular la diferencia entre la lectura promedio de los blancos y cada una de las lecturas de las monocapas.

$$R_n = R_m - R_{\text{blanco}}$$

La resistencia transepitelial depende del área cubierta por la monocapa. Para corregir con el área cubierta se calcula:

H) El producto de la resistencia por el área de las monocapas, que proveen una superficie de membrana efectiva igual a (0.6cm^2). El producto es igual a la resistencia transepitelial en ohms . cm^2 . Se calcula como:

$$R = R_n \text{ ohms} \cdot 0.6\text{cm}^2 = \text{ohms} \cdot \text{cm}^2$$

Los anillos sin células presentan una resistencia transepitelial promedio de $190 \text{ ohms} \cdot \text{cm}^2$. Las monocapas de células presentan una resistencia transepitelial al tiempo cero entre 2 y 14 $\text{ohms} \cdot \text{cm}^2$ y va aumentando en relación directa a la edad del cultivo (Figura 9, cuadro 5).

La resistencia transepitelial de las monocapas de células MDCK resultó ser de tal manera que aumenta en relación directa con la

DESARROLLO DE LA RESISTENCIA TRANSEPITELIAL EN MONOCAPAS DE CELULAS MDCK PASAJE 88.

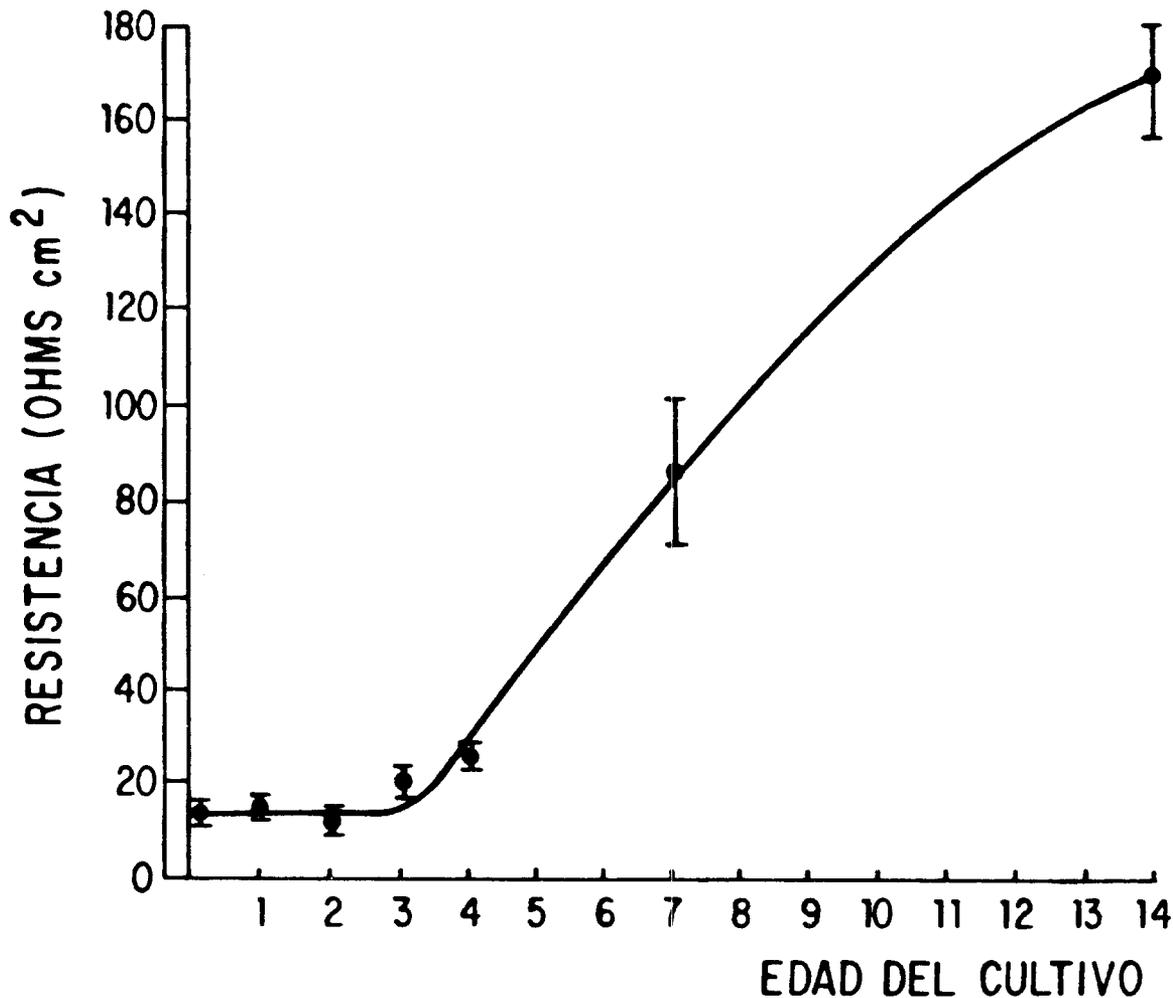


FIGURA No. 9

La resistencia transepitelial de las monocapas MDCK refleja la formación de uniones estrechas fuertes intercelulares, lo cual permite la formación de una monocapa íntegra.

Una resistencia transepitelial mayor a $80 \Omega \cdot \text{cm}^2$ se presenta en una monocapa íntegra, totalmente confluyente.

CUADRO No. 5
DESARROLLO DE LA RESISTENCIA TRANSEPITELIAL
EN MONOCAPAS DE CELULAS MDCK.

EDAD		RESISTENCIA TRANSEPITELIAL (OHMS . cm ²)
DIAS	HORAS	
0	2	13 ⁺ 1
1	24	14 ⁺ 1
2	48	12 ⁺ 1
3	72	22 ⁺ 2
4	96	24 ⁺ 3
7	168	90 ⁺ 13
14	336	175 ⁺ 13

n = 25

$\bar{X} \pm \sigma_n$

Respecto a 175 ohmsxcm², todos los valores son significativamente diferentes con una $p < 0.0005$.

edad de los cultivos, permanece en una fase estacionaria de las cero a las 48 horas con una resistencia transepitelial de 13 ohms . cm². De las 72 a las 96 horas aumenta ligeramente hasta 24 ohms . cm², sigue aumentando gradualmente, a las 168 horas las monocapas exhiben una resistencia transepitelial óptima de 90 ohms . cm². Finalmente las monocapas de 336 horas exhiben una resistencia máxima de 175 ohms . cm² tendiendo a estabilizarse. Las monocapas de células MDCK en estas condiciones, están en condiciones óptimas para los experimentos, entre 168 y 336 horas de edad. Durante este periodo se realizan los experimentos.

5.3. MICROFOTOGRAFIAS.

Con el objeto de seguir un control del desarrollo de las monocapas con respecto a la edad del cultivo y tener evidencias de la integridad de la monocapa decidimos microfotografiarlas a diferentes edades.

Las monocapas de células MDCK se microfotografiaron a diferentes edades, a t = 0, 2, 24, 48, 72, 96, 168, 336 horas. Utilizando una cámara adaptada al microscópio invertido de contraste de fases (Zeiss West Germany) con un objetivo de 16/0.35 y oculares de 10 X / 18 (CPL-W).

Cada toma se realiza con un tiempo de exposición de 6 segundos y una intensidad de luz de 5 volts y 15 watts.

A t = 0 las células se observan esféricas y suspendidas en el medio de cultivo.

A las dos horas de edad las células están adheridas al sustrato,

presentando forma ahusada, estrelladas emitiendo pseudópodos o prolongaciones que les permiten comunicarse con las demás y organizarse para formar una monocapa mediante la formación de uniones ocluseras, sensibles a calcio que les confiere resistencia transepitelial alta.

A las 24 horas desarrollan una confluencia del 70% al 80% observándose sus uniones bien delimitadas.

A las 48 horas desarrollan una confluencia del 90% y su resistencia transepitelial aún es baja.

A las 72 horas desarrollan una confluencia del 95%. las monocapas presentan la forma de mosaicos, sus uniones ocluseras se observan bien definidas.

A las 96 horas de edad desarrollan el 100% de confluencia y las células se observan más pequeñas con uniones ocluseras poco definidas por lo desarrollado que se encuentra la monocapa.

Finalmente las monocapas de células MDCK están en condiciones óptimas para los experimentos, entre los 7 y 14 días de edad de los cultivos, bajo control microscópico y determinación de una resistencia transepitelial alta.

5.4. DETERMINACION DE PROTEINAS.

Uno de los controles que se lleva a cabo es la determinación de proteínas por monocapa, con el objeto de realizar los cálculos correspondientes para los experimentos realizados y expresarlos en Moles/tiempo/mg de proteína.

Esta determinación se realiza por el micrométodo de Bradford (8), este procedimiento es altamente sensible y su manejo altamente reproducible. Consiste en el enlace del azul brillante de Coomassie G-250 a proteínas, el complejo que se forma colorante-proteína causa una transferencia de la absorción máxima del colorante en una longitud de onda de 465 a 595 nm, y el incremento en la absorción a 595 nm es la absorción monitoreada. La formación del complejo colorante-proteína es muy rápido, aproximadamente 2 min, con estabilidad del color por una hora. La interferencia de este método es baja o nula en presencia de iones sodio o potasio y carbohidratos. Así como la presencia de amortiguadores alcalis fuertes. Lo cual se elimina empleando un amortiguador apropiado (PBS cuadro 4).

Este método puede ser altamente interferido por la presencia de detergentes como SDS, triton X-100 y detergentes comerciales. Esto se puede evitar lavando el material por el método para material de cultivo celular (libre de detergentes).

Procedimiento:

Se prepara una solución proteica con albumina bovina sérica (0.05mg/ml) disuelta en PBS.

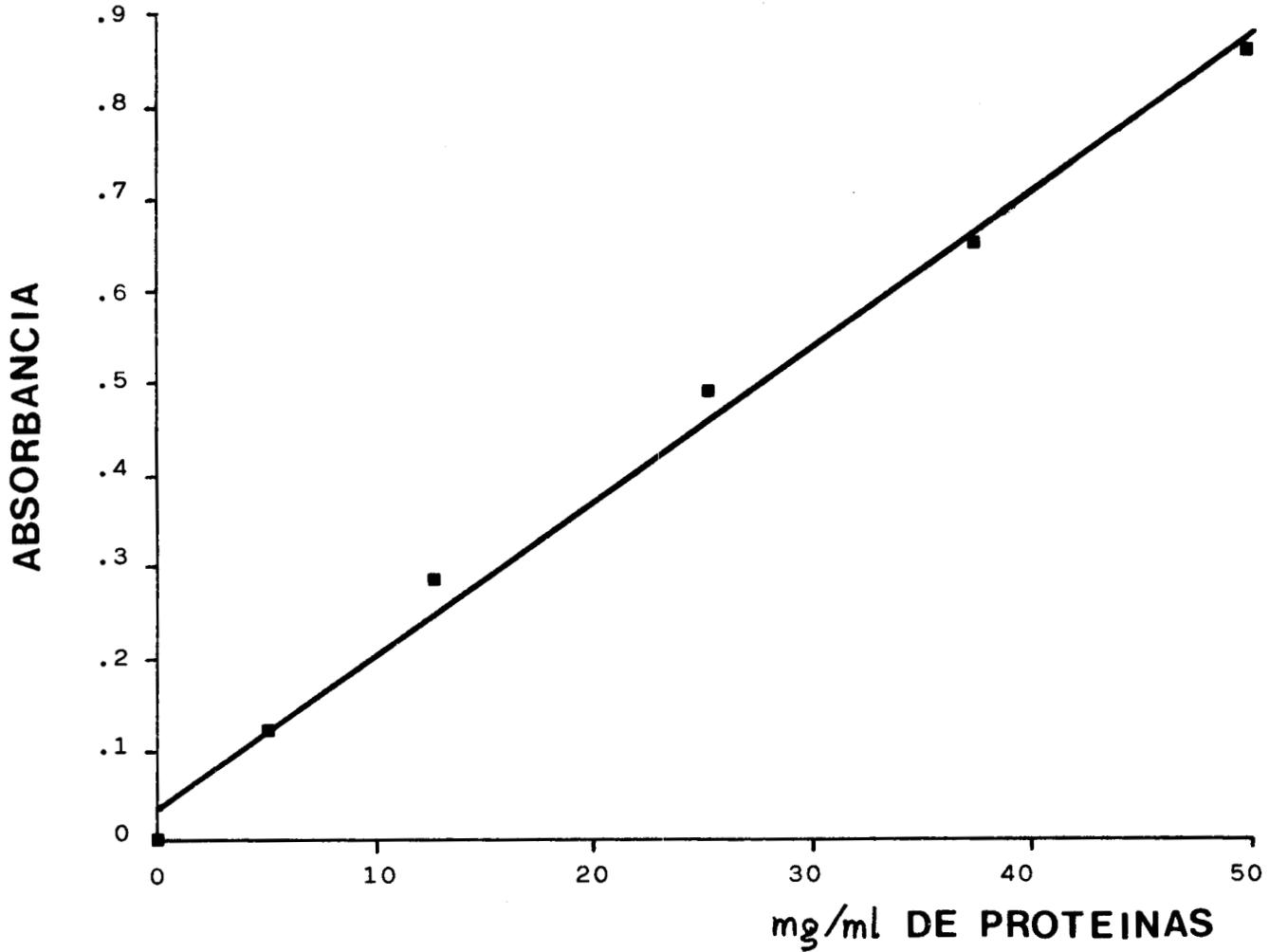
Preparación del Reactivo de Coomassie.- 100 mg de azul brillante de Coomassie G-250 en 50 ml de etanol al 95%, a esta solución se adicionan 100 ml de ácido fosfórico al 85% (peso/vol).

Análisis de microproteína para una solución que contenga de 1 a 10 microgramos de proteína en un volumen hasta de 0.1 ml se pipetea dentro de tubos de ensayo 12X100mm. El volumen de los tubos de ensayo (20, microlitros) se ajustada a 0.1 ml con PBS. Se adicionan 900 microlitros de reactivo de Coomassie al tubo de ensayo y el contenido se agita vigorosamente. La absorvancia se determina a 595nm en un espectrofotómetro Bekman digital a los 20 minutos. El blanco se prepara con 0.1ml de PBS y 900 microlitros de reactivo de Coomassie, se incuba como los demás durante 20 minutos.

La curva estándar se prepara tomando para cada punto una concentración de proteína que va de 0 a 100mg/ml de proteína. Los resultados de las muestras problema se interpolan en la curva tipo y por extrapolación obtenemos la concentración en mg de proteína/ml para cada muestra. Esto se determina por cálculos de regresión lineal. Finalmente se corrige según el volumen de dilución de la monocapa.

126941

CURVA TIPO PARA PROTEINAS



DATOS		RESULTADOS	
X	Y	r = 0.996	
0	.005	m = 165.851	
0	.121	intercepto = -0.000	
10	.283	Valor de X	Valor de Y
30	.487	30	0.494
40	.646	31	0.501
50	.858		

5.5. DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE RECEPTORES PARA EL PNA EN CELULAS MDCK.

Con el objeto de caracterizar la presencia de una molécula receptora al PNA, se determina la presencia de receptores en las monocapas de células MDCK, por medio de un curso temporal de captación del ^{125}I -PNA. Todos los experimentos se realizan en monocapas, con un estricto control de calidad, manteniendo las siguientes características.

- 1) Monocapas de 7 a 14 días de edad en las condiciones de los cultivos celulares (ver punto 4,5,y 6 de metodología).
- 2) Utilizar unicamente monocapas íntegras por: (a) Control microscópico y (b) alta resistencia transepitelial (mayor de 80 ohmsxcm^2).
- 3) Retirar el suero del medio 24 horas antes del experimento.
- 4) Cambiar medio por medio fresco sin suero dos horas antes del experimento.

El control de las monocapas se realiza en general para todos los experimentos.

METODOLOGIA:

I.- Las monocapas se incuban a 37°C , en una atmósfera de CO_2 al 5%, flujo de aire continuo y humedad constante, durante el experimento.

(a) A una serie se aplica ^{125}I -PNA (10^{-12}M) con una actividad específica de 2200 $\mu\text{Ci/nmol}$, en el compartimento apical o basolateral al tiempo cero.

(b) A otra serie se aplica ^{125}I -PNA (10^{-12}M) + PNA (10^{-9}M) (Peninsula No. 8798) en la cara apical o en la basolateral, al tiempo cero para determinar:

A) Captación total (Ct)

B) Captación específica (Ce)

II.- A $t = 1, 3, 15, 30,$ y 60 minutos los filtros se lavan tres veces en solución de MgCl_2 (100mM) a 4° .

III.- La radiactividad de las monocapas se determina en un contador Gamma Cord II durante dos minutos.

IV.- Los blancos se procesan al igual que los demás sin radioisótopo.

V.- En todos los cálculos se considera la radiactividad de fondo y se resta a todos los valores y los estándares de las soluciones para calcular la actividad específica, la de los blancos son restadas.

VI.- En todos los experimentos se corre una serie de monocapas igual que los blancos y son digeridas con NaOH (0.5N) (Beckman) para determinación de proteínas totales por el micrométodo de Bradford por medio de una curva tipo para albúmina sérica bovina. Los resultados se expresan en nM/mg de proteína/min.

La captación total es la unión del ligando radiactivo (^{125}I -PNA) por el receptor formándose un complejo ^{125}I -PNA-receptor y además la unión de este radioligando a cualquier otra molécula de manera inespecífica.

La captación específica es la unión del radioligando a la

molécula receptora de manera muy selectiva, formando un complejo ^{125}I -PNA-receptor.

Para obtener este resultado se resta el componente unido de manera inespecífica. Mediante la aplicación sobre la monocapa de ambos, el PNA marcado y el PNA frío, este último 1000 veces más concentrado de manera que desplace al componente inespecífico.

5.6. DETERMINACION DE LA INCORPORACION DE SODIO EN PRESENCIA Y EN AUSENCIA DE OUABAINA.

Con el objeto de determinar la participación de la ouabaína en la incorporación apical de sodio (^{22}Na) a través de las células MDCK y determinar su cinética. Se realiza el curso temporal de captación de sodio ($J_{\text{AB}}^{22}\text{Na}$) apical en presencia y en ausencia de ouabaína.

I.- Las monocapas de células MDCK se preincuban con ringer alto en potasio conteniendo ouabaína (10^{-4}M) (Cuadro 6) durante una hora, aplicado en el compartimento basolateral con el fin de inhibir las bombas de $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}/\text{ATPasa}$, localizadas en la membrana basolateral.

II.- Después de una hora se retira el medio del compartimento apical. Al tiempo cero ($t=0$) se aplican 400 microlitros de ringer alto en sodio conteniendo el radioisótopo ^{22}Na ($1\ \mu\text{Ci/ml}$) (Cuadro 7), se incuban las monocapas a 37°C , en atmósfera de CO_2 al 5%, flujo de aire continuo y humedad constante.

CUADRO No. 6

RINGER ALTO EN POTASIO.

Sales inorgánicas	mM
KCl	106.0
NaCl	14.0
MgSO ₄	1.7
CaCl ₂	1.8
HEPES	25.0
+ OUABAINA	0.1

pH = 7.4

CUADRO No. 7

RINGER ALTA EN SODIO.

Sales inorgánicas	mM
KCl	4.4
NaCl	118.0 + 1 μ Ci/ml ^{22}Na
MgSO ₄	1.7
CaCl ₂	1.8
HEPES	25.0

pH = 7.4

III.- A $t = 15, 30, 60, 120, 300$ minutos, se lavan las monocapas 3 veces con $MgCl_2(100mM)$ a $4^{\circ}C$.

IV.- Se determina radiactividad y proteínas totales como se describe para receptores.

5.7. INCORPORACION APICAL DE SODIO (^{22}Na) EN PRESENCIA DE PNA.

Con el objeto de determinar los efectos que produce el PNA sobre la incorporación de sodio apical ($J_{AB}^{22}Na$) en las monocapas de células MDCK, se cuantifica la incorporación de ión sodio en base a la captación de ^{22}Na en presencia de PNA.

Las monocapas seleccionadas como en los experimentos anteriores se incuban a $37^{\circ}C$, en atmósfera de CO_2 al 5%, flujo de aire continuo y humedad constante. Aplicando sodio (^{22}Na) en el compartimento apical con una actividad específica de $21.6 \mu Ci/nM$ (Amersham) a una concentración de $1 \mu Ci/ml$ durante 30 segundos.

La captación de sodio apical se cuantifica bajo las siguientes condiciones experimentales:

- (1) Captación total de ^{22}Na , como control.
- (2) Captación de ^{22}Na , preincubando durante dos horas con ouabaína ($10^{-4}M$), aplicada en el compartimento basolateral (CB), con el objeto de inhibir las bombas de $Na^+-K^+/ATPasa$.
- (3) Captación de ^{22}Na , preincubando durante 20 minutos en presencia de PNA ($10^{-8}M$), aplicado en el (CB).
- (4) Captación de ^{22}Na , preincubando durante dos horas en presencia de ouabaína ($10^{-4}M$), aplicada en el (CB), más el PNA

(10^{-8}M) aplicado en el (CB) y preincubando durante 20 minutos.

La preincubación del PNA permite la unión del PNA a sus receptores localizados en la superficie basolateral.

Cada una de las series, después de incubarse con la solución radiactiva de ^{22}Na durante 30 segundos, se lavan tres veces en una solución de MgCl_2 (100mM) a 4°C .

Finalmente se determina la radiactividad en las monocapas y proteínas totales como se describe para receptores. Los resultados se expresan en pmolas/mg prot/min.

5.8. CURVAS DOSIS-RESPUESTA DEL PNA SOBRE LA INCORPORACION DE ^{22}Na .

Con el objeto de evaluar si el efecto inhibitorio del PNA sobre la incorporación de ^{22}Na apical (J_{AB}) a través de las células MDCK, es un efecto dependiente de la dosis, se realizan las curvas dosis-respuesta.

Las monocapas seleccionadas como en los experimentos anteriores son preincubadas en presencia de ouabaína (10^{-4}M) aplicada en el compartimento basolateral durante dos horas a 37°C , en una atmósfera de CO_2 al 5%, humedad constante y flujo de aire continuo. Transcurrido el tiempo de preincubación se determina la curva dosis-respuesta bajo las siguientes condiciones experimentales:

(1) Se preincuban las monocapas en presencia de PNA (10^{-8}M) durante 20 minutos, aplicado en el compartimento basolateral a las siguientes dosis:

10^{-12}M , $5 \times 10^{-12}\text{M}$, 10^{-10}M , $5 \times 10^{-9}\text{M}$, 10^{-8}M , $5 \times 10^{-6}\text{M}$ y 10^{-5}M .

(2) A $t = 0$ se aplica la solución radiactiva de ^{22}Na en el compartimento apical, incubando las monocapas.

(3) A $t = 30$ segundos, se lavan las monocapas 3 veces con una solución de MgCl_2 (100mM) a 4°C .

La radiactividad y proteínas totales se cuantifican como se describe en la sección de receptores.

Aunado al efecto dosis-respuesta del PNA, se realizan las curvas dosis-respuesta para fármacos de acción conocida sobre algunos de los mecanismos de transporte iónico como el intercambiador Na^+/H^+ , y canales de sodio inhibibles por amilorida y el co-transportador $\text{Na}^+-\text{K}^+/2\text{Cl}$ inhibible por furosemida.

Con el objeto de evaluar el efecto inhibitorio de amilorida y furosemida sobre el transporte de ^{22}Na apical en este modelo de células epiteliales renales MDCK y determinar si dicho efecto es dosis-dependiente, se realizan las curvas dosis-respuesta.

Las monocapas en presencia de ouabaína (10^{-4}M) aplicada en el compartimento basolateral, más la adición de amilorida a dosis de 10^{-10}M , 10^{-9}M , 10^{-7}M , 10^{-6}M , 10^{-5}M , 10^{-4}M , 10^{-3}M , 10^{-2}M , aplicada en el compartimento apical, se incuban a 37°C , en atmósfera de CO_2 al 5%, humedad constante y flujo de aire continuo, durante dos horas.

Otras series de monocapas se incuban en condiciones similares a las anteriores sustituyendo amilorida por furosemida a las siguientes dosis: 10^{-9}M , 10^{-8}M , 10^{-7}M , 10^{-6}M , 10^{-5}M , 10^{-4}M , 10^{-3}M .

Transcurrido el tiempo de incubación. A $t=0$ se aplica la solución radiactiva de ^{22}Na en el compartimento apical.

A $t = 30$ segundos, las monocapas se lavan tres veces en solución de MgCl_2 (100mM) a 4°C .

Finalmente se cuantifica la radiactividad y las proteínas totales como se indica en receptores.

5.9. EFECTO DEL PNA, LA AMILORIDA Y LA FUROSEMIDA SOBRE LA INCORPORACION DE SODIO.

Con el objeto de esclarecer cuál mecanismo de transporte de sodio es modificado por los efectos directos que ejerce el PNA a nivel de la nefrona distal, se investiga la incorporación de ^{22}Na apical a través de las monocapas de células MDCK en presencia de fármacos de acción conocida sobre algunos de los mecanismos de transporte de sodio localizados en la porción distal del epitelio renal.

1) Las monocapas seleccionadas como en los experimentos anteriores, se preincuban en presencia de ouabaína (10^{-4}M), durante dos horas a 37°C , en atmósfera de CO_2 al 5%, flujo de aire continuo y humedad constante.

2) Después del tiempo de preincubación se determinan las interacciones farmacológicas, sobre la inhibición del ($J_{\text{AB}} \text{ } ^{22}\text{Na}$) bajo las siguientes condiciones experimentales:

(1) Con o sin amilorida (10^{-3}M) en la cámara apical, durante dos horas antes del experimento.

(2) Con o sin furosemida (10^{-4}M) en la cámara apical,

durante dos horas antes del experimento.

(3) Con o sin ouabaina (10^{-4}M) aplicada en la cámara basolateral, durante dos horas antes del experimento.

(4) Con o sin PNA (10^{-8}M) en la cámara basolateral, durante veinte minutos antes del experimento.

3) A $t = 0$ se aplica la solución radiactiva de ^{22}Na en el compartimento apical durante 30 segundos.

4) A $t = 30$, se enjuagan las monocapas en una solución de MgCl_2 (100mM) a 4°C .

Se cuantifica la radiactividad y las proteínas totales como se describe para receptores.

5.10. TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS.

Expresamos los resultados como promedio \pm el error estándar.

Los resultados obtenidos se compararon respecto al control mediante la distribución de t , para muestras independientes de una sola cola. Elegimos un nivel de significancia mínimo del 95% para una $p < 0.05$. En el caso de las curvas dosis-respuesta; procesamos los resultados mediante el método de Tallarida (65), y graficamos en unidades de probabilidad (PROBITS). Las unidades probits es el % de la probabilidad de encontrar un valor en el área bajo la curva probabilística normalizada.

6. RESULTADOS.

6.1. CURSO TEMPORAL DE CAPTACION PARA EL ^{125}I -PNA.

Denominamos curso temporal de captación a la incorporación del isótopo radiactivo en este caso ^{125}I -PNA en función del tiempo. El curso temporal de captación se investiga en la cara apical y en la cara basolateral de las monocapas (Figuras 11 y 12). Obtenemos una captación total al aplicar el ^{125}I -PNA que va desde 1.72 pmolas/mg proteína hasta niveles máximos de 8.4 pmolas/mg proteína. Esto significa que el PNA marcado se encuentra unido a moléculas con afinidad específica y a otras moléculas de manera inespecífica. En el laboratorio determinamos el componente inespecífico, aplicando juntos el PNA marcado (1X) y el PNA frío 1000X de manera que por diferencia de concentración el PNA frío desplaza al PNA marcado. Por cálculos obtenemos la captación específica restando el componente inespecífico a la captación total. La captación específica obtenida es de 0.48 a 2.74 pmolas/mg proteína (Cuadro 8).

Evidentemente estos resultados demuestran que las células MDCK presentan afinidad por el PNA, en un sitio específico de la membrana basolateral lo cual evidencia la presencia de algunas moléculas receptoras para el PNA, localizadas en las células MDCK.

CURSO TEMPORAL DE LA INCORPORACION DE ^{125}I -PNA(10^{-12}M) EN MONOCAPAS DE CELULAS MDCK P-90 DE 14 DIAS DE EDAD

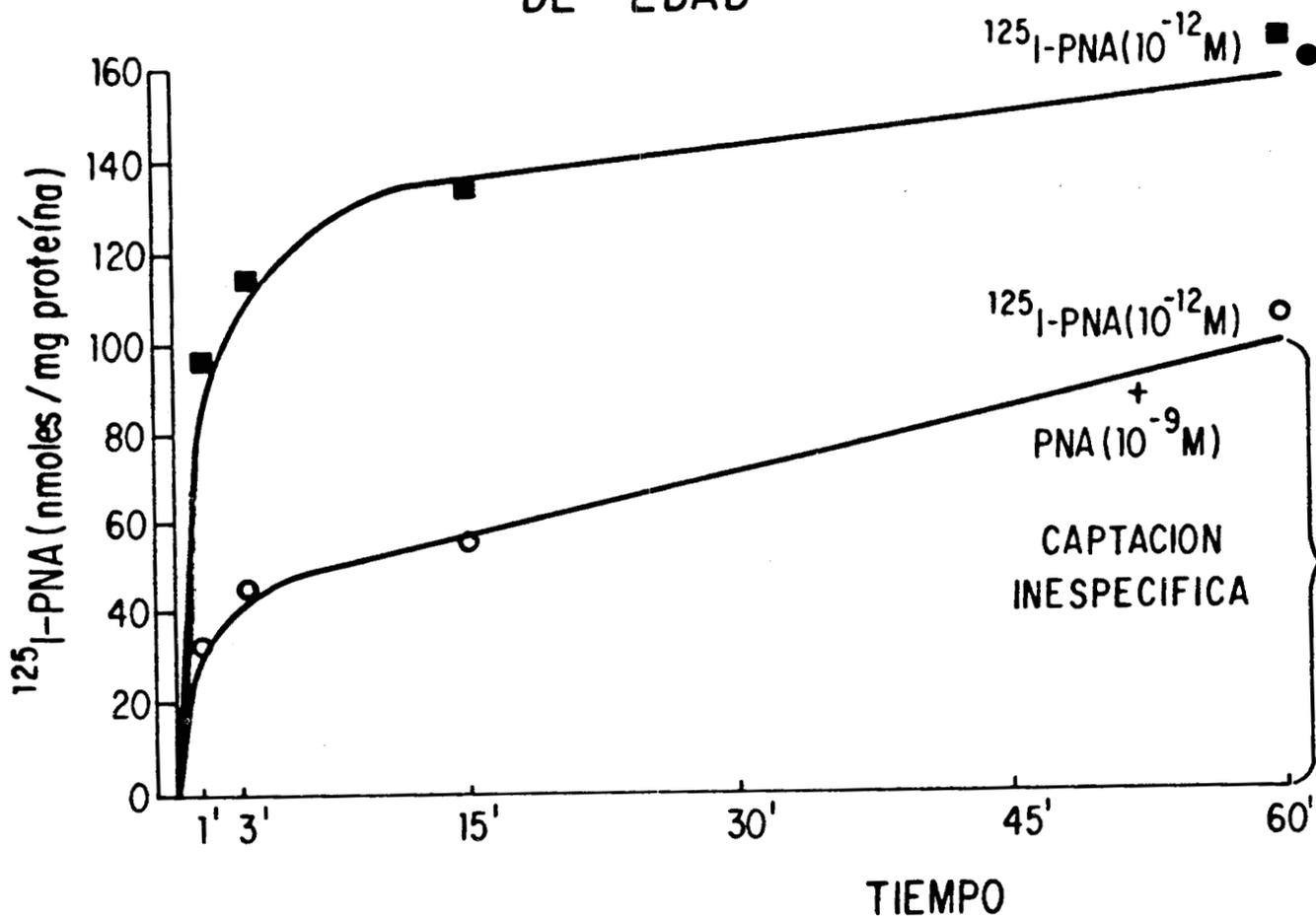


FIGURA No.11

Las células MDCK fueron incubadas con ^{125}I -PNA como se describió en material y métodos en presencia y en ausencia de PNA frío. Se midió la incorporación del ^{125}I -PNA en intervalos de tiempo en segundos. Los datos se expresan en promedio, con una $n = 3$.

CURSO TEMPORAL DE LA CAPTACION DEL ^{125}I -PNA EN LA CARA BASOLATERAL DE LAS MONOCAPAS DE CELULAS MDCK

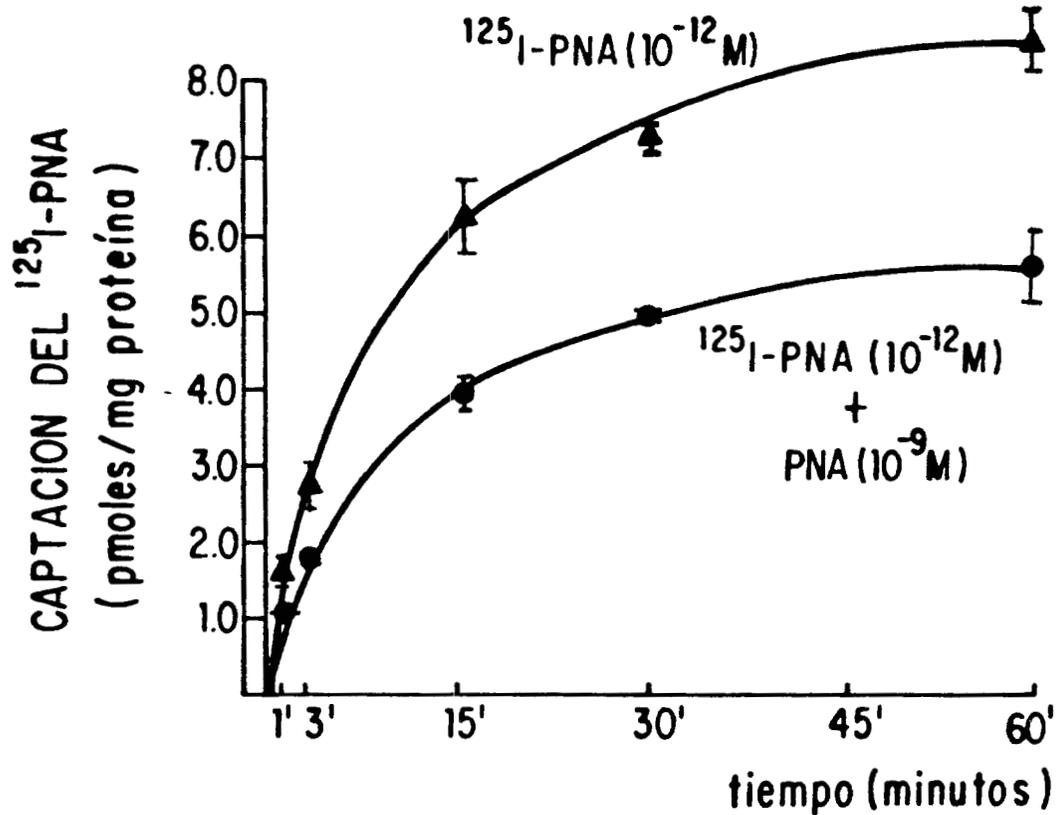


FIGURA No.12

Captación del ^{125}I -PNA en función del tiempo en minutos, medido en presencia y en ausencia del PNA frío.

n = 3

X \pm σ_n

CUADRO No. 8

CURSO TEMPORAL DE CAPTACION PARA $^{125}\text{I-PNA}$

TIEMPOS MINUTOS	CAPTACION TOTAL $^{125}\text{I-PNA}(10^{-12}\text{M})$	CAPTACION EN PRESENCIA DE PNA (10^{-9}M)	CAPTACION ESPECIFICA
1	1.7 ± 0.2	1.2 ± 0.0	0.5 ± 0.1
3	2.8 ± 0.3	1.8 ± 0.1	1.0 ± 0.2
15	6.3 ± 0.5	4.2 ± 0.2	2.2 ± 0.3
30	7.6 ± 0.2	5.1 ± 0.1	2.5 ± 0.1
60	8.4 ± 0.4	6.0 ± 0.5	3.0 ± 0.4

UNIDADES: pmolas/mg protefina

n = 4

$\bar{x} \pm \sigma_n$

6.2. INCORPORACION DE SODIO A TRAVES DE MDCK SOBRE SOPORTES PERMEABLES EN PRESENCIA Y EN AUSENCIA DE OUABAINA.

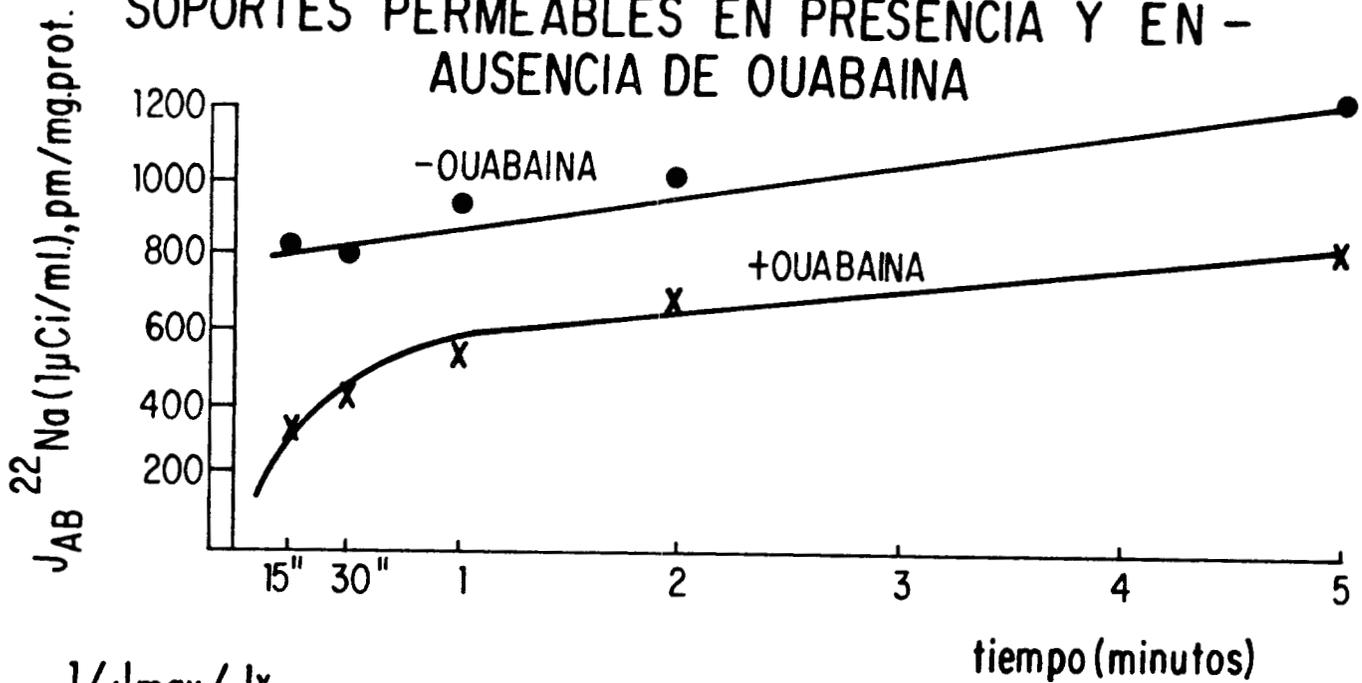
Para determinar el tiempo en que es cuantificable la incorporación de sodio apical a las monocapas de células MDCK se determina el J_{AB}^{22Na} apical, en ausencia y en presencia de ouabaina ($10^{-4}M$) con el objeto de sustraer el efecto de las bombas de $Na^{+}-K^{+}/ATPasa$ (localizadas en la membrana basolateral del epitelio renal) sobre el influjo de Na^{+} apical.

Determinamos que la ouabina participa activamente bloqueando las bombas de $Na^{+}-K^{+}/ATPasa$ (Figura 13, cuadro 9). Si las bombas se encuentran activas, el sistema se satura en corto tiempo. Obteniendo los siguientes resultados: a los 15" una incorporación de 804 nM/mg de proteína que aumenta rápidamente hasta 1007 nmolas/mg de proteína a los 120", alcanzando ya niveles de saturación con un máximo de 1225 nM/mg de proteína.

Cuando administramos ouabaina la incorporación del sodio a través de las células es más lento como puede observarse en el cuadro 9, a los 15" la incorporación de sodio es de 315nM/mg de proteína y a los 30" y 60" aún puede apreciarse esos incrementos, a los 300" alcanza niveles de saturación similares a la incorporación de sodio en ausencia de ouabaina.

Para determinar con certeza el tiempo óptimo en que es cuantificable la incorporación de sodio en presencia de ouabaina, llevamos los resultados a una forma lineal. Decidimos realizar las series experimentales sin el efecto de las bombas de $Na^{+}-$

INFLUJO DE ^{22}Na A TRAVES DE CELULAS MDCK SOBRE
SOPORTES PERMEABLES EN PRESENCIA Y EN -
AUSENCIA DE OUABAINA



$1/J_{max} / J_x$

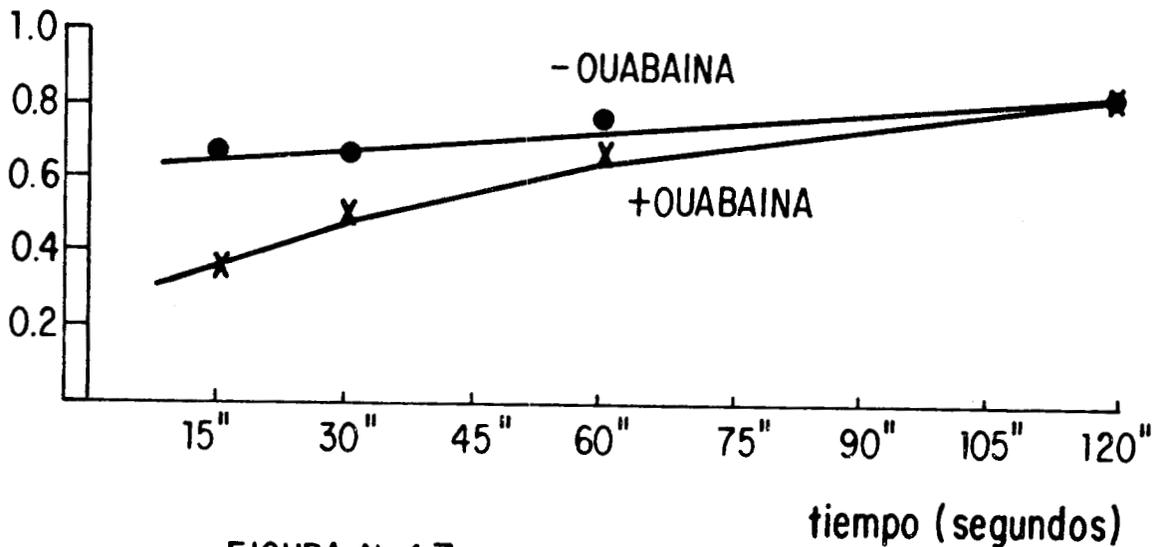


FIGURA No 13

Incorporación apical de sodio por monocapas MDCK de 7 a 14 días de edad, en función del tiempo. Se cuantificó en ausencia y en presencia de ouabaina (10^{-4}M).

CUADRO No. 9
INCORPORACION DE ^{22}Na A TRAVES DE CELULAS MDCK SOBRE
SOPORTES PERMEABLES EN PRESENCIA Y EN AUSENCIA DE OUAB.

TIEMPO SEGUNDOS	$J_{AB}^{22}\text{Na}(1\mu\text{Ci/ml})$ pmolas/mg prot.	J_{AB}^{max} $\frac{J_{AB}^{\text{max}}}{J_x}$	1 $\frac{J_{AB}^{\text{max}}}{J_x}$	
15"	823	1.4	0.71	SIN OUABAINA
30"	861	1.3	0.76	
60"	975	1.2	0.83	
120"	1037	1.1	0.91	
300"	1161	1.0	1.00	
15"	361	2.2	0.45	MAS OUABAINA (10^{-4}M)
30"	467	1.7	0.58	
60"	589	1.3	0.76	
120"	731	1.1	0.91	
300"	801	1.0	1.00	

n = 2, \bar{X}

K^+ /ATPasa, y cuantificar el flujo de sodio apical a $t = 30''$.

6.3. INCORPORACION APICAL DE SODIO EN PRESENCIA DEL PNA.

La incorporación de sodio apical, a través de las monocapas de las células MDCK cuantificada en base a la captación de ^{22}Na (Figura 14 y cuadro 10), nos da una estimación de la participación del PNA sobre la incorporación de Na^+ (J_{AB}) apical por las monocapas de células MDCK. El J_{AB} a través de las monocapas de células MDCK, resulta ser inhibido por la presencia de PNA (10^{-8}M) en un 58%, cuando éste se aplica en la cara basolateral. La incorporación de sodio apical a través de las monocapas de células MDCK, generado por las bombas Na^+-K^+ /ATPasa, se inhibe al aplicar ouabaína (10^{-4}M) en un 41%, existiendo una diferencia significativa entre el efecto del PNA (10^{-8}M) y el efecto de ouabaína (10^{-4}M) con una $p < 0.05$.

Estos resultados demuestran el efecto inhibitorio del PNA sobre la incorporación de ^{22}Na apical a través de las células MDCK cuando se aplica el PNA en la cara basolateral. Dicho efecto inhibitorio del PNA sobre la captación de sodio, confirma la presencia de receptores basolaterales al PNA.

EFFECTOS DEL PNA SOBRE LA INCORPORACION DE ^{22}Na POR LAS MONOCAPAS MDCK

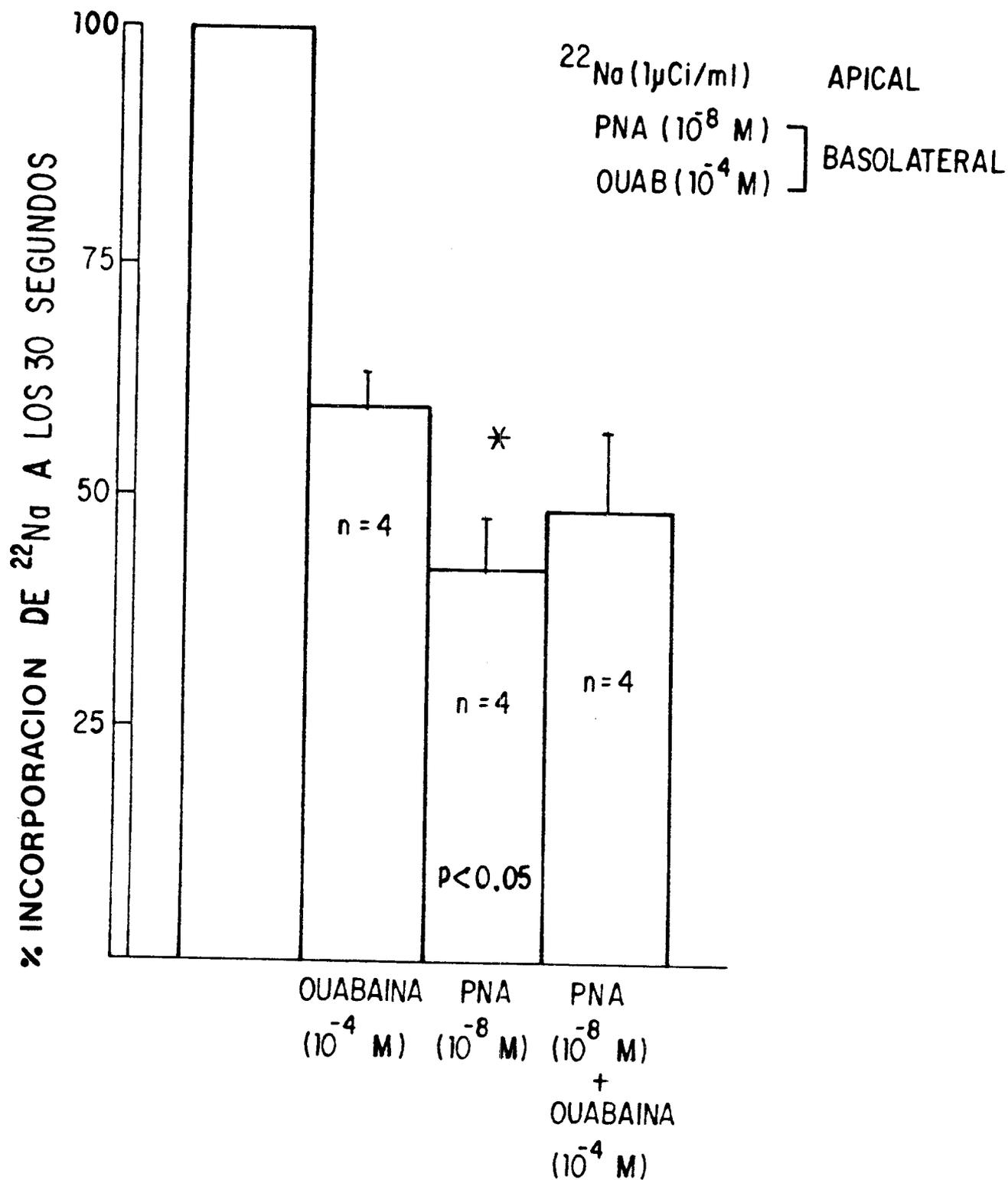


FIGURA N.º 14

CUADRO No. 10
EFFECTOS DEL PNA SOBRE LA INCORPORACION
DE ^{22}Na POR MONOCAPAS MDCK.

	$J_{AB} \text{ } ^{22}\text{Na}$	
	30" INCORPORACION	% INHIBICION
CONTROL	1473 \pm 373	0 \pm 4
OUABAINA (10^{-4}M)	843 \pm 214	41 \pm 4
P N A (10^{-8}M)	563 \pm 119	58 \pm 6
OUABAINA (10^{-4}M) +	572 \pm 128	52 \pm 9
P N A (10^{-8}M)		

UNIDADES: pmolas/mg protefina

n = 4

$\bar{X} \pm \sigma_n$

6.4 CURVA DOSIS-RESPUESTA DEL PNA SOBRE LA INCORPORACION APICAL DE SODIO EN CELULAS MDCK.

Con el objeto de determinar si los efectos producidos por el PNA son dosis-dependientes, realizamos las curvas dosis-efecto aplicando diferentes dosis de PNA, desde concentraciones picomolares hasta micromolares (Cuadro 11, y Figuras 15 y 16).

Los resultados nos demuestran que el PNA presenta un comportamiento farmacológico. El PNA inhibe la incorporación de sodio apical en un 20 % a dosis picomolares, esta inhibición aumenta en forma gradual hasta alcanzar un máximo a dosis micromolares de un 56% de inhibición en la incorporación de sodio apical cuando el péptido se aplica en la cara basolateral. La figura 15 en la parte superior, expresa la captación de sodio con respecto al logaritmo de la dosis de PNA, el PNA ejerce una disminución en la incorporación de sodio apical con respecto al control de 658 a 464 pmolas/mg proteína en promedio. La gráfica inferior expresa el efecto inhibitorio del PNA sobre la incorporación apical de sodio. Para determinar con certeza la CI_{50} se transfieren los resultados a una forma lineal, por el método de Tallarida (Figura No. 16). Se grafican Probits contra logaritmo de la dosis y se obtiene una $CI_{50} = 5 \times 10^{-9} M$ para el PNA. La concentración es similar a dosis farmacológicas, por lo que el sistema es de alta afinidad.

La participación de los fármacos amilorida y furosemida sobre la inhibición de los mecanismos específicos del transporte de sodio

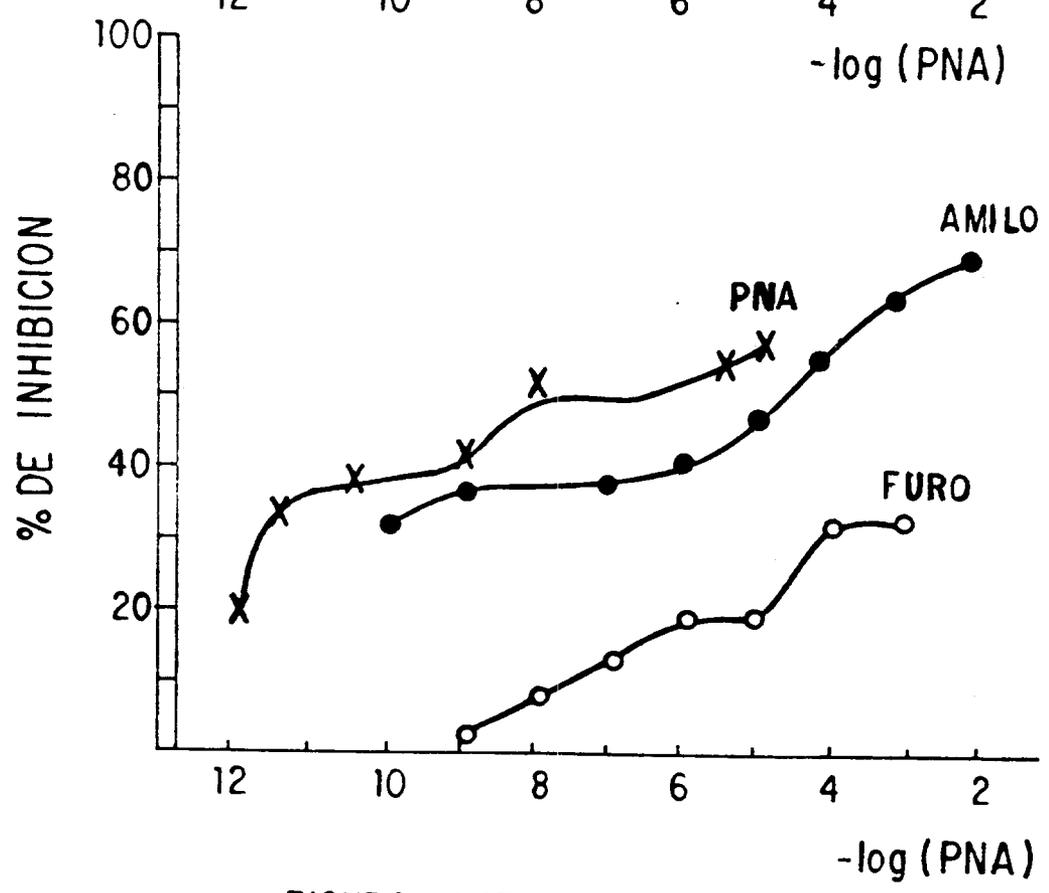
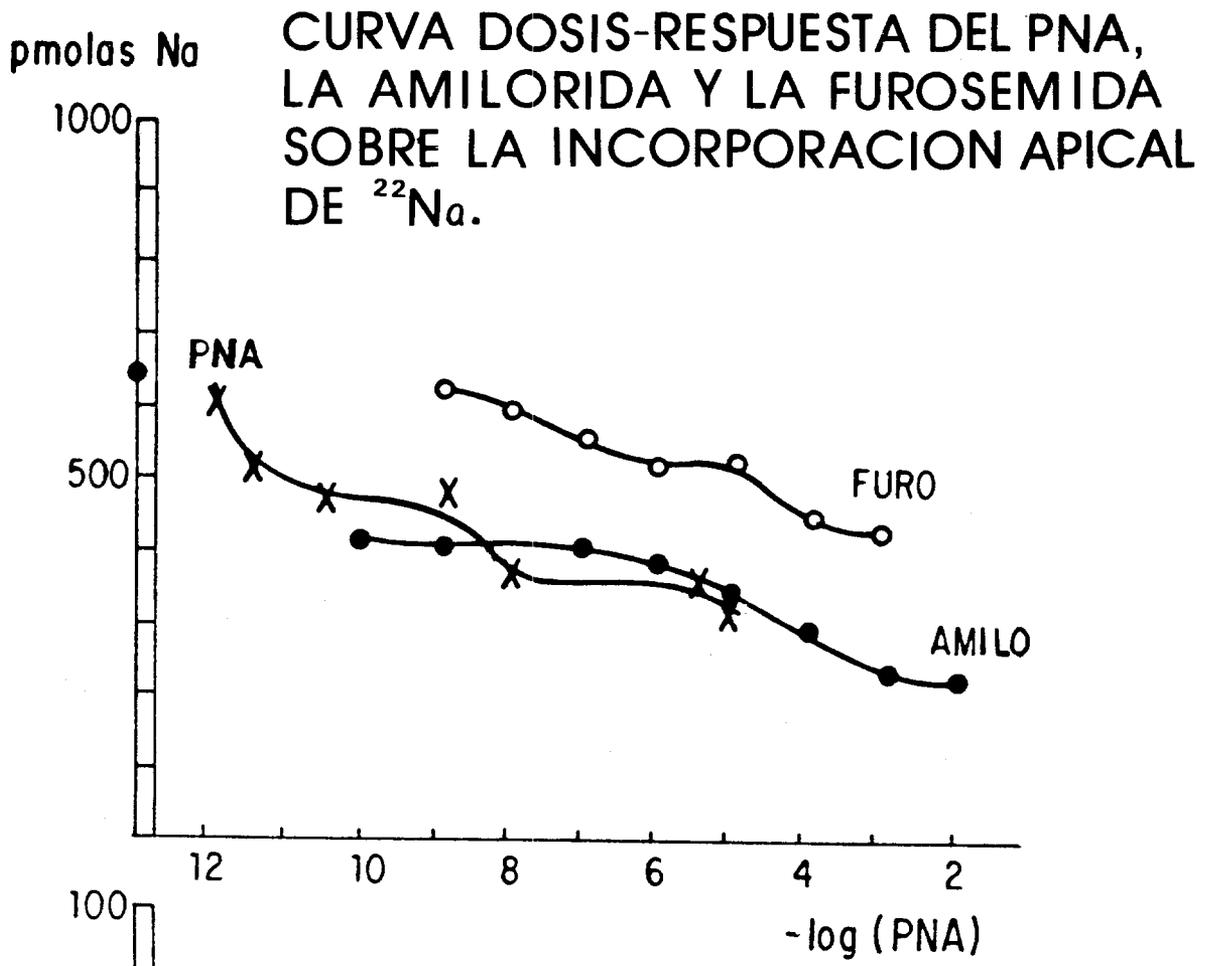


FIGURA N.º15

CUADRO No. 11

CURVA DOSIS-EFECTO DEL PNA SOBRE LA INCORPORACION
DE ^{22}Na APICAL A TRAVES DE CELULAS MDCK.

DOSIS PNA (M)	J_{AB} ^{22}Na pmolas/mgprot. $\pm \sigma_n$	% INCORPORACION	% INHIBICION
CONTROL	658 \pm 8	100	0
1×10^{-12}	621 \pm 28	80 \pm 6	20 \pm 6
5×10^{-12}	513 \pm 22	66 \pm 6	34 \pm 6
1×10^{-10}	492 \pm 26	63 \pm 4	37 \pm 4
5×10^{-9}	464 \pm 12	59 \pm 4	41 \pm 4
1×10^{-8}	396 \pm 27	50 \pm 5	50 \pm 5
5×10^{-6}	362 \pm 10	46 \pm 4	54 \pm 4
1×10^{-5}	343 \pm 13	44 \pm 2	56 \pm 2

n = 3
 $\bar{X} \pm \sigma_n$

Con excepción de la dosis 1×10^{-12} M, todos los
datos son significativamente diferentes del
control con una $p < 0.005$

CURVA DOSIS-EFECTO DEL PNA
 SOBRE LA INCORPORACION APICAL
 DE SODIO ^{22}Na EN CELULAS MDCK

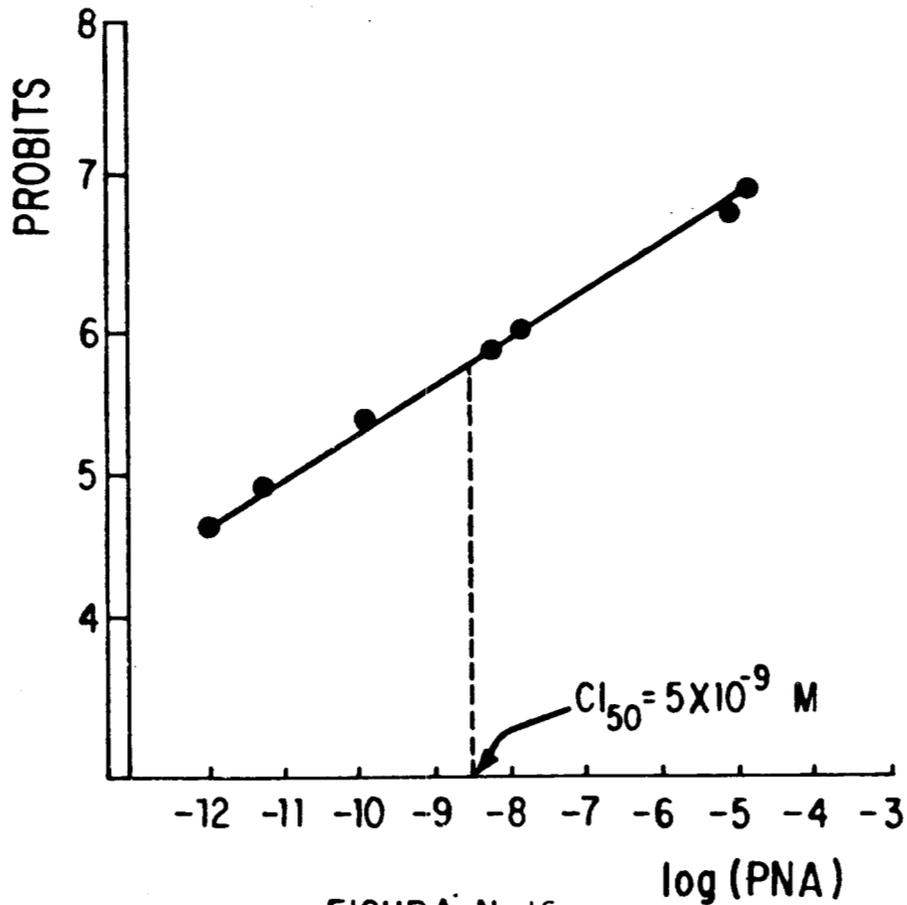


FIGURA No. 16

Por el Método de Tallarida, calculamos los valores PROBITS. Los probits representan la probabilidad en % de encontrar un punto bajo la curva probabilística normalizada.

Obtuvimos una $CI_{50} = 5 \times 10^{-9} \text{ M}$ para el PNA.

localizados en la cara apical de las células MDCK, se estima determinando las curvas dosis-respuesta para cada uno de ellos (Figura 15 y cuadros 12 Y 13).

La amilorida ejerce un efecto inhibitorio sobre la incorporación apical de sodio, cuando ésta se aplica en el compartimento apical. Conforme aumenta la dosis de manera gradual: con un 33% de inhibición para dosis de ($1 \times 10^{-10} \text{M}$) hasta un 69% con $1 \times 10^{-2} \text{M}$. Como se observa en el cuadro 12 y la figura 15, la amilorida presenta un comportamiento inhibitorio similar al PNA.

Se obtiene una CI_{50} para amilorida de $5 \times 10^{-6} \text{M}$, su efecto inhibitorio promedio es de 40% +/- 4, es dosis-dependiente. Comparado con la respuesta inhibitoria del PNA presenta un comportamiento similar.

La furosemida inhibe la incorporación de sodio apical cuando se aplica en el compartimento apical, su efecto es dosis dependiente su porcentaje de inhibición es muy bajo, inhibe el 1.0% a la menor dosis y a la mayor dosis aplicada su efecto inhibitorio es del 34%, como se expresa en el cuadro 13 y en la figura 15.

La CI_{50} para la furosemida es de $5 \times 10^{-5} \text{M}$, este sistema es de baja afinidad con un efecto inhibitorio promedio de 18% como ha sido informado en otros modelos experimentales.

CUADRO No. 12

CURVA DOSIS-EFECTO DE AMILORIDA SOBRE LA INCORPORACION
DE ^{22}Na APICAL A TRAVES DE CELULAS MDCK.

AMILORIDA DOSIS (M)	J_{AB} ^{22}Na pmolas/mgprot. $\pm \sigma_n$	% INCORPORACION	% INHIBICION
CONTROL	658 \pm 9	100	0
1×10^{-10}	439 \pm 9	67 \pm 1	33 \pm 1
1×10^{-9}	419 \pm 53	64 \pm 8	36 \pm 8
1×10^{-7}	422 \pm 48	64 \pm 7	36 \pm 7
1×10^{-6}	396 \pm 15	60 \pm 2	40 \pm 2
1×10^{-5}	355 \pm 26	54 \pm 4	46 \pm 4
1×10^{-4}	294 \pm 35	45 \pm 5	55 \pm 5
1×10^{-3}	232 \pm 23	35 \pm 3	65 \pm 3
1×10^{-2}	206 \pm 30	31 \pm 5	69 \pm 5

n = 3
 $\bar{X} \pm \sigma_n$

CUADRO No. 13

CURVA DOSIS-RESPUESTA DE FUROSEMIDA SOBRE LA INCORPORACION
DE ^{22}Na APICAL A TRAVES DE LAS CELULAS MDCK.

FUROSEMIDA	J_{AB} ^{22}Na	%	%
DOSIS (M)	pmolas/mg protefina	INCORPORACION	INHIBICION
CONTROL	658	100	0
1×10^{-9}	649	99	1
1×10^{-8}	604	92	8
1×10^{-7}	574	87	13
1×10^{-6}	541	82	18
1×10^{-5}	536	81	19
1×10^{-4}	457	69	31
1×10^{-3}	436	66	34

n = 2, \bar{x}

6.5. INTERACCIONES DE AMILORIDA Y FUROSEMIDA CON EL PNA EN LA INCORPORACION DE SODIO.

Con el objeto de determinar el mecanismo específico sobre el cual actúa el PNA o bien si su acción es a otro nivel. Investigamos las interacciones farmacológicas de amilorida y furosemida con el PNA sobre la incorporación apical de sodio en las monocapas de células MDCK (Figura 17, cuadro 14). Cada fármaco bloquea un mecanismo específico del transporte de sodio localizados en la membrana apical de la porción del túbulo distal, con los resultados obtenidos planteamos un mecanismo específico por medio del cual el PNA ejerce un efecto natriurético directo sobre la membrana apical en la porción distal de la nefrona. El PNA y la amilorida inhiben de manera similar la incorporación del sodio apical a través de las células MDCK. El PNA ejerce una inhibición de la incorporación apical de ^{22}Na del 58%, cuando se aplica en la cara basolateral. La amilorida ejerce un efecto inhibitorio de la incorporación apical de sodio del 53%, cuando se aplica en la cara apical.

Al administrarse juntos sus efectos no se potencian. Lo cual hace evidente que el mecanismo por el que actúa el PNA es inhibiendo la incorporación de sodio apical por alguno de los mecanismos inhibibles por amilorida, el intercambiador Na^+/H^+ o los canales de sodio. En principio los efectos que ejerce el péptido son mediados por un receptor, al formar el complejo PNA-receptor se activa algún mecanismo intracelular y se traduce con la

INHIBICION DE LA INCORPORACION DE ^{22}Na EN PRESENCIA DE AMILORIDA

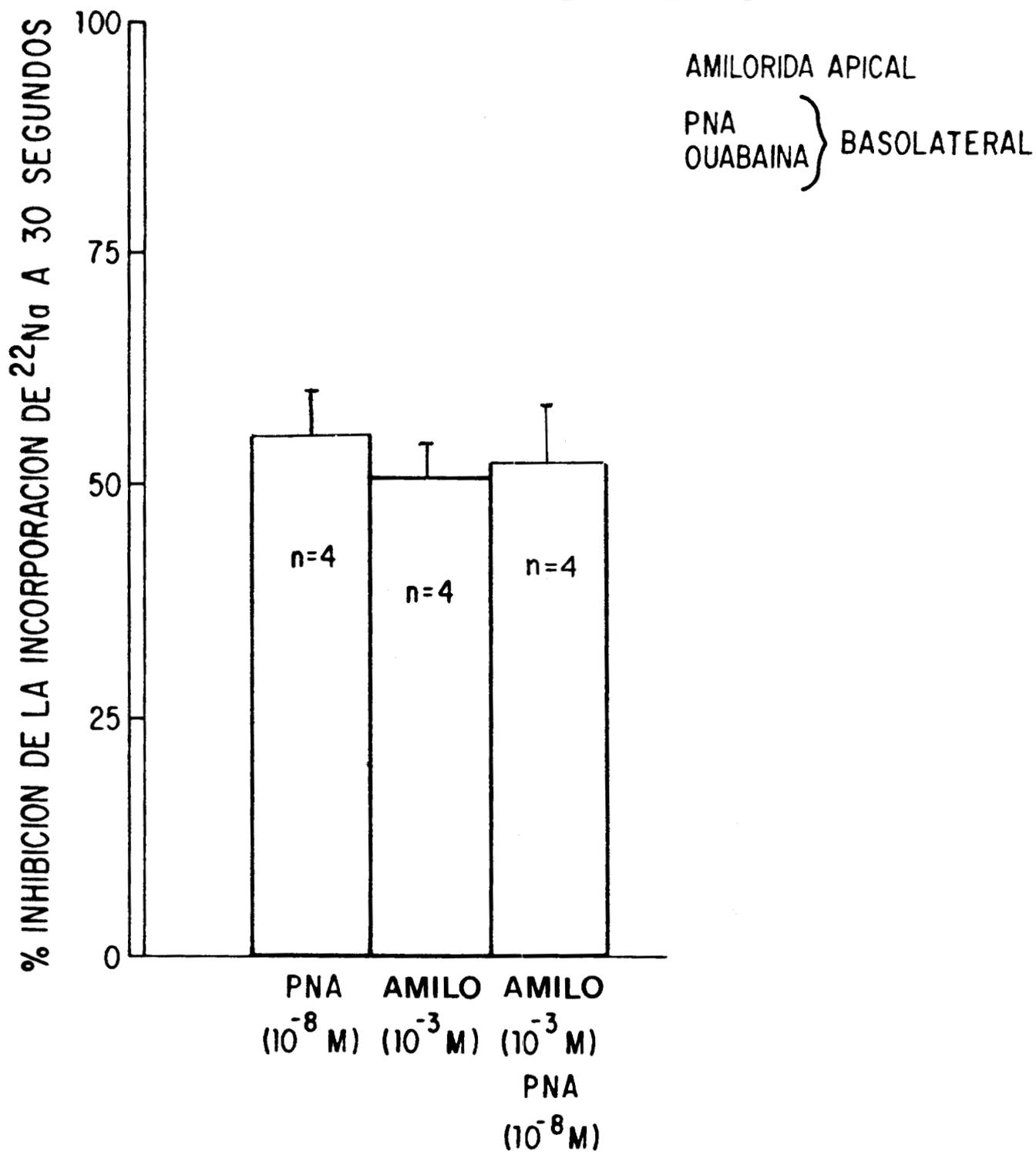


FIGURA No. 17

CUADRO No. 14
INHIBICION DE LA INCORPORACION DE
²²**Na EN PRESENCIA DE AMILORIDA**

/	$J_{AB} \text{ } ^{22}\text{Na}$	
	30 SEG. INCORPORACION	% INHIBICION
CONTROL	1473 \pm 323	0
P N A (10 ⁻⁸ M)	563 \pm 119	58 \pm 7
AMILORIDA (10 ⁻³ M)	567 \pm 181	53 \pm 4
AMILORIDA (10 ⁻³ M) + P N A (10 ⁻⁸ M)	505 \pm 10	55 \pm 10

n = 4

$\bar{x} \pm \sigma_n$

Mediante el análisis estadístico no encontramos diferencias significativas entre los resultados de esta serie experimental. La $p > 0.05$.

inhibición de alguno de los mecanismos intercambiadores localizados en la cara apical e inhibibles por amilorida. Amilorida es selectiva para inhibir el intercambiador Na^+-H^+ y los canales de sodio.

6.6. CURVA DOSIS-RESPUESTA DEL SUERO DE RATAS UREMICAS SOBRE LA INCORPORACION DE SODIO APICAL.

Con el objeto de estimar los efectos del péptido sobre la incorporación apical de sodio, probamos el efecto del suero de ratas urémicas, sobre monocapas de células MDCK como fueron seleccionadas para todos los experimentos. Aplicamos el suero a las dosis 10^{-4}M , 10^{-3}M , 10^{-2}M , 10^{-1}M .

2.- Preincubamos durante 20 minutos como se incubó el PNA, a 37°C , en atmósfera de CO_2 al 5%, humedad constante y flujo de aire continuo.

2.- A $t = 0$, aplicamos $1 \mu\text{Ci/ml}$ de ^{22}Na en la cara apical durante 30 segundos.

3.- Lavamos tres veces con solución de MgCl_2 100mM a 4°C .

4.- Los blancos se procesaron de igual manera al igual que las series para proteínas totales.

5.- La radiactividad se contó en un contador gamma-Cord II, y la determinación de proteínas totales se realizó como se indicó en receptores. Los resultados se expresan en pmolas/mg de proteína.

RESULTADOS.

Obtuvimos una inhibición en la incorporación de sodio apical

cuando aplicamos el suero de ratas urémicas en la cara basolateral. Encontramos un efecto dosis-dependiente con un promedio de inhibición de 41% +/- 12 (Figura 18 y cuadro 15). Esta inhibición es cercana al efecto inhibitorio del PNA sobre las MDCK. Podemos considerar que el efecto inhibitorio que ejerce el suero sobre la incorporación apical de sodio se debe a la presencia del PNA en el suero.

CURVA DOSIS RESPUESTA DEL J_{AB}^{22Na} EN CELULAS MDCK SOBRE SOPORTES PERMEABLES (ANILLOS) EN PRESENCIA DE SUERO DE RATAS UREMICAS

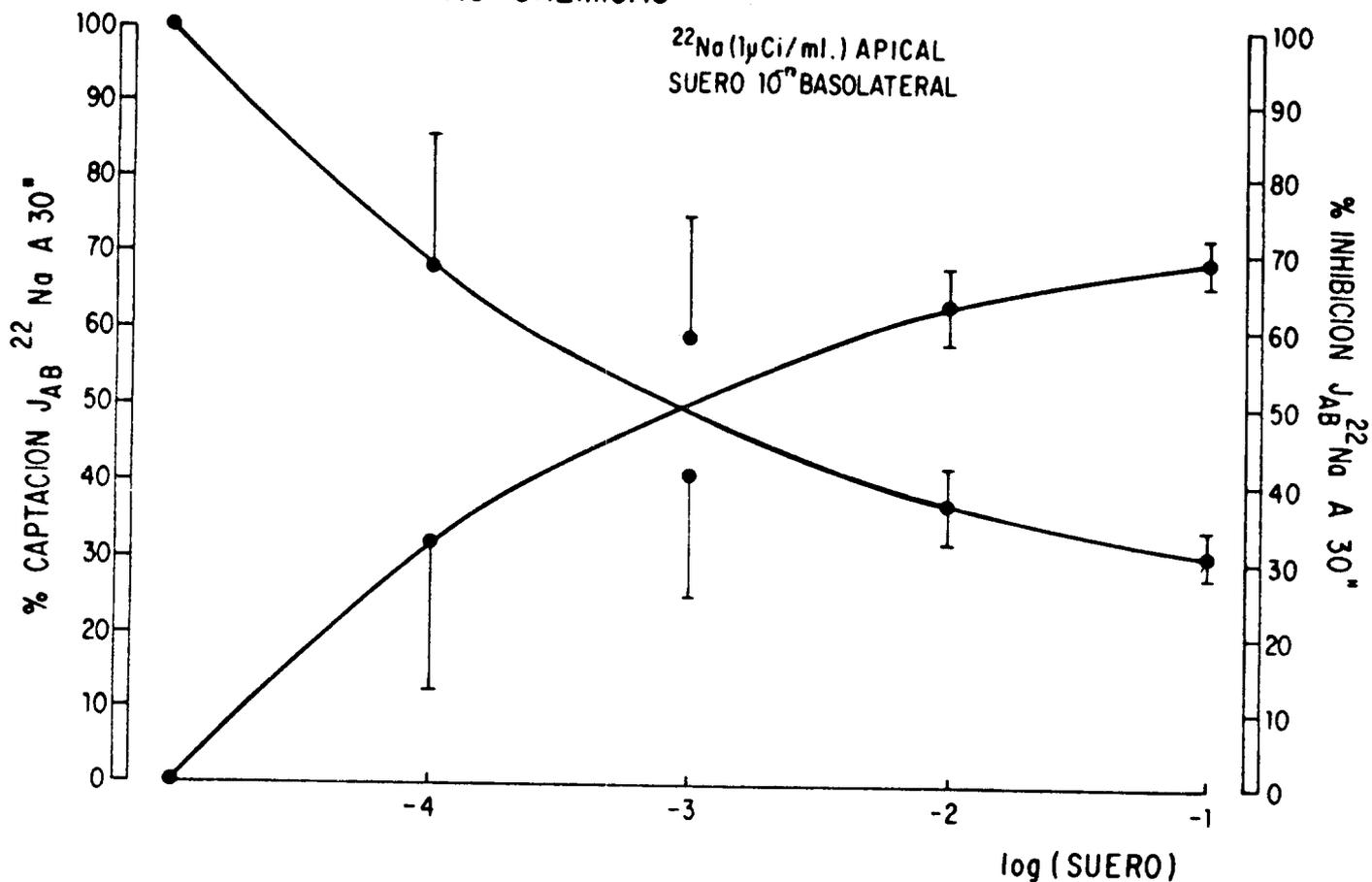


FIGURA No.18

Graficamos % de captación (J_{AB}^{22Na}) en función del log(suero). Obtuvimos una inhibición en la incorporación - de sodio similar a la obtenida con el PNA.

CUADRO No. 15

CURVA DOSIS-RESPUESTA DEL J_{AB}²²Na EN MDCK
EN PRESENCIA DE SUERO DE RATAS UREMICAS.

LOG DOSIS SUERO	30" INCORPORACION pmolas/mg prot	% INCORPORACION	% INHIBICION
CONTROL	778 ± 72	100	0
-4	526 ± 100	68 ± 13	32 ± 13
-3	489 ± 86	59 ± 12	41 ± 12
-2	338 ± 33	37 ± 3	63 ± 3
-1	286 ± 40	31 ± 3	69 ± 3

n = 3

$\bar{X} \pm \sigma_n$

DISCUSION.

En éste trabajo estudiamos uno de los efectos fisiológicos del PNA que ha sido considerado como regulador de la excreción de sodio y agua en diferentes preparaciones membranales del túbulo distal de la nefrona *in vitro* y sobre los efectos fisiológicos natriurético y diurético *in vivo* sobre el túbulo distal de la nefrona, en animales de experimentación y en el hombre.

Caracterizamos los receptores para el PNA (localizados en las células blanco del túbulo distal de la nefrona de los mamíferos y el hombre), en las monocapas de células MDCK. Determinamos la incorporación apical de sodio con las bombas de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ /ATPasa activas e inactivas, para cuantificar su participación. La incorporación apical de ^{22}Na fué cuantificada en presencia del PNA. Esta metodología nos permitió determinar la participación de la amilorida y la furosemida de acción diurética y natriurética específica sobre los canales de sodio y/o el intercambiador Na^+/H^+ , y el co-transportador $2\text{Cl}/\text{Na}^+\text{-K}^+$ respectivamente, localizados en la membrana apical del túbulo distal. Determinamos el posible mecanismo de acción del péptido mediante las cinéticas de incorporación de sodio empleando curvas dosis-respuesta.

Los resultados obtenidos durante estos experimentos nos han permitido plantear un mecanismo de acción del PNA en la regulación de la excreción de sodio involucrando todos los factores propuestos. En este mecanismo tenemos que considerar las respuestas intracelulares involucradas, como la participación de la guanilato ciclasa membranal y el GMPc que actuaría como

segundo mensajero intracelular, dicha participación aún está por esclarecer.

En la sección 6.1 determinamos la presencia de receptores para el PNA en base al curso temporal de captación para el ^{125}I -PNA bajo dos condiciones experimentales. En una de ellas se caracterizó la presencia de receptores en la cara apical en presencia del ^{125}I -PNA, mientras en la otra el ^{125}I -PNA se aplicó en la cara basolateral. Los dos grupos presentaron diferencias en la captación del ligando radiactivo. El curso temporal de captación fué de 1' a 60'. Nuestros resultados evidencian la presencia de receptores para el PNA en las células MDCK, localizados preferencialmente en la cara basolateral. Este método para determinar receptores es muy usual, ha sido empleado por varios investigadores. Bianchi (1986), determina sitios de enlace en el glomérulo, Bovy (1989), demuestra sitios de enlace para el PNA con actividad sobre guanilato ciclasa y actividad vasorrelajante. Fontura (1990), determina la presencia de receptores en células renomedulares. Hirata (1985), localizó sitios del enlace para el PNA, internalización y degradación en células del músculo liso vascular de ratas. Otros autores han determinado la relación de los sitios de enlace al PNA y el aumento en la acumulación de GMPc para algunos receptores, y para otros han determinado ser afuncionales.

Nuestros resultados muestran evidencias de la presencia de moléculas receptoras para el PNA, localizados en la cara basolateral, por captación del ^{125}I -PNA.

Una característica de éste modelo experimental, la línea celular MDCK es la presencia de las bombas $\text{Na}^+-\text{K}^+/\text{ATPasa}$, localizadas preferencialmente en la cara basolateral, según nos informa Rostgaard y Col. (1980) (57), quienes determinaron la localización de las bombas de $\text{Na}^+-\text{K}^+/\text{ATPasa}$, en el túbulo distal y proximal de conejo, por microscopía electrónica. Rabito y Col. (1980)(50), determinan la presencia de las bombas, localizadas en la cara basolateral mediante cinéticas de enlace a [^3H]-ouabaína en las células MDCK. Estas bombas son inhibibles por ouabaína, sin embargo, también se ha reportado la presencia de las $\text{Na}^+-\text{K}^+/\text{ATPasa}$ resistente al efecto de ouabaína, según lo reportan Anner y Col. (1989) (2), las identificaron en la medula externa de riñón de rata y expresan su resistencia a ouabaína debido a un defecto, expresan la unión entre el glucósido cardiaco y el transporte activo de sodio.

Una determinación importante de éste trabajo fué estimar la participación de las bombas de $\text{Na}^+-\text{K}^+/\text{ATPasa}$ en la incorporación apical de sodio. Se realizó en dos series: uno en ausencia de ouabaína y otro en presencia de ouabaína, esto nos permitió determinar los tiempos en que fué cuantificable la incorporación apical de sodio. Nuestros resultados demuestran (Figura 13, cuadro 9) una participación importante de las bombas, a tiempos cortos de 15" a 30" se obtienen niveles de saturación con las bombas activas.

Los resultados expresados en forma lineal, determinan con

presición en que tiempo es cuantificable la incorporación de ^{22}Na en las monocapas de células MDCK. Los resultados indican la incorporación de sodio en células MDCK, es cuantificable en tiempos cortos, $< 60''$, tiempo en el que se aprecian incrementos en la incorporación apical de sodio.

La incorporación apical de sodio en presencia del PNA sufre una inhibición del 58%, cuando el PNA se aplica en la cara basolateral (Figura 14, cuadro 10). En presencia de ouabaína la inhibición en el $J_{AB} \text{ } ^{22}\text{Na}$ es del 41%, existe una diferencia estadísticamente significativa entre ambos, con una $p < 0.05$.

Los resultados son consistentes con los reportados por Zeidel y Col. (78), ellos determinaron inhibición de la incorporación de sodio en células del conducto colector medular interno de conejo, con una significancia estadística de $p < 0.01$.

Nuestros resultados demuestran el efecto inhibitorio del PNA sobre la incorporación apical de ^{22}Na en las células MDCK en un 58% cuando se aplica el PNA en la cara basolateral. Estos resultados sobre la inhibición del $J_{AB} \text{ } ^{22}\text{Na}$ confirman la presencia de una molécula receptora con afinidad para el PNA, localizada en la cara basolateral de las células MDCK.

Las curvas dosis-respuesta de la incorporación apical de sodio en las células MDCK en presencia de PNA, amilorida y furosemida, permitieron determinar que dicha inhibición es dosis dependiente y encontramos un sistema de alta afinidad para el PNA con una $CI_{50} = 5 \times 10^{-9} \text{M}$ similar a la reportada por Zeidel (78) en células del conducto colector medular interno de conejo con $CI_{50} = 5 \times$

10^{-11} M. Cantiello y Col. (9), investigaron el efecto inhibitorio del PNA en otro tipo celular las células LLC-PK1 (proximales), y reportan el efecto inhibitorio del PNA en la incorporación apical de Na^+ en un 33% aplicando 10^{-7} M.

En este trabajo se determinó el efecto inhibitorio de la amilorida sobre la incorporación apical de sodio, en un 53% siendo su efecto dosis dependiente con una $\text{CI}_{50} = 5 \times 10^{-6}$ M, concentración mayor a la reportada por Zeidel (78) de 3×10^{-7} M y una inhibición del 83%. Estos resultados se alejan de los encontrados en este trabajo, obtuvimos una inhibición máxima del 69% a la mayor dosis aplicada en la curva dosis-efecto para amilorida. Sin embargo consideramos estos resultados de amilorida con respecto al PNA sobre la inhibición de la incorporación apical de sodio (Figura 17, cuadro 14), corresponden a un mecanismo de acción similar, por medio del análisis estadístico no encontramos diferencias significativas, la $p > 0.05$. Sus efectos al aplicarlos individualmente no son diferentes y al aplicarlos simultáneamente sus efectos no se potencian.

Estos resultados permiten plantear el mecanismo de acción del PNA sobre la inhibición de la incorporación de sodio apical se realiza uniéndose el PNA a una molécula receptora localizada en la cara basolateral de las células MDCK, el PNA posiblemente actúe a través de un mecanismo intracelular o un segundo mensajero inhibiendo algún mecanismo de transporte de sodio, localizados en la cara apical de éste epitelio. Las interacciones

del péptido con amilorida sugieren que el posible mecanismo involucrado sea el intercambiador Na^+/H^+ o el canal de sodio.

El efecto del cotransportador $2\text{Cl}/\text{Na}^+-\text{K}^+$ sobre el transporte de sodio apical fué considerado en este trabajo, sin embargo no se demostró una importante contribución de este transportador con respecto al mecanismo inhibitorio del PNA.

Como una prueba de la aplicación del PNA se investigó el suero de ratas urémicas sobre el efecto en el transporte de sodio apical en las monocapas de células MDCK. Resultando un efecto inhibitorio del suero sobre la incorporación apical de sodio; el comportamiento del suero en su efecto inhibitorio se comporta de manera similar al PNA. Esto podría evidenciar la presencia del PNA en el suero de ratas urémicas.

CONCLUSIONES.

Los resultados evidencian la presencia de receptores al PNA en las células MDCK, localizados en la cara basolateral, por determinación de la captación específica del ligando radiactivo ^{125}I -PNA en presencia y en ausencia del PNA frío.

El PNA (10^{-8}M) inhibe la incorporación de ^{22}Na apical en las células MDCK, cuando el PNA es aplicado en la cara basolateral como se presenta en las series experimentales, lo cual confirma la presencia de una molécula receptora en la cara basolateral con afinidad específica para el PNA.

La incorporación de ^{22}Na a las células MDCK en presencia de ouabaína (10^{-4}M) aumenta gradualmente siendo cuantificables los cambios en dicha incorporación a tiempos cortos, menores de 60". Esta incorporación en ausencia de ouabaína rápidamente alcanza niveles saturables por lo cual no es posible cuantificar los cambios en semejantes condiciones.

La inhibición producida por el PNA sobre la incorporación apical de sodio es dependiente de la dosis aplicada, siendo su $\text{CI}_{50} = 5 \times 10^{-9}\text{M}$. Esta concentración es cercana a dosis farmacológicas por lo consiguiente consideramos al sistema como de alta afinidad.

El PNA (10^{-8}M) inhibe la incorporación apical de sodio en las células MDCK un 58% cuando es aplicado en la cara basolateral esto confirma la presencia de una molécula receptora para el PNA.

La ouabaína (10^{-4}M) inhibe la incorporación apical de sodio en las células MDCK un 41% cuando se aplica en la cara basolateral. Esta inhibición es diferente de la producida por el PNA (10^{-8}M) con una $p < 0.05$. Esto significaría que el mecanismo de acción del PNA es diferente al generado por las bombas de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPasa}$.

La amilorida (10^{-3}M) y la furosemida (10^{-4}M) aplicadas en la región apical de las células MDCK inhiben el flujo de sodio, la furosemida de manera similar a la reportada en otros estudios.

8. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- **ALMEIDA. F. A., Suzuki M., Scarborough R. M., Lewicki J. A. and Maack T.:**
Clearance function of type C receptors of atrial natriuretic factor in rats.
Am. J. Physiol. 256 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 25): R469-R475, 1989.
- 2.- **ANNER. B.M., Imesch E. and Moosmayer M.:**
Sodium transport defect of ouabain-resistant renal Na,K-ATPase.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 165(1):360-367, 1989.
- 3.- **APPEL, R.G., Wang J., Simonson M.S. and Dunn M.J.:**
A mechanism by which atrial natriuretic factor mediates its glomerular actions.
Am. J. Physiol. 251 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 20): F1036-F1042, 1986.
- 4.- **BIANCHI, Cesario., Gutkowska J., Thibault G., García R., Genest J., and Cantin M.:**
Distinct localization of atrial natriuretic factor and angiotensin II binding sites in the glomerulus.
Am. J. Physiol. 251 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 20): F594-F602, 1986.
- 5.- **BOLIVAR, G.J.J.:**
Mecanismos de pasaje de iones a través de la membrana de células epiteliales cultivadas (MDCK).
Tesis Doctoral, Departamento de Fisiología y Biofísica (Q.P.39.5. B65) CIEA-IPN, 1987.
- 6.- **BOVY, P.R.*, O' Neal J.M., Olins G.M., Patton D.R., Mehta P.P., McMahon E.G., Palomo M., Schuh J., and Blehm D.:**
A synthetic linear decapeptide binds to the Atrial Natriuretic Peptide receptors and demonstrates cyclase activation and vasorelaxant activity.
J. of Biol. Chem. 264(34):20309-20313, 1989.
- 7.- **BUTLEN, D., Mistaoui, M. and Morel F.:**
Atrial natriuretic peptide receptors along rat and rabbit nephrons: rat atrial natriuretic peptide binding in microdissected glomeruli and tubules.
Pflugers Archiv. 408, 356, 1987.
- 8.- **BRADFORD, M.M.:**
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding.
Anal. Bioch. 72:248-254, 1976.

- 9.- **CANTIello H.F.** and **Ausiello D.A.:**
Atrial natriuretic factor and cGMP inhibit amiloride sensitive Na^+ transport in the cultured renal epithelial cell line, LLC-PK1
Biochem. Biophys. Res. Comm. 134 (2):852-860, 1986.
- 10.- **CANTIN, M.,** Thibaut G., Haile-Meskel H., Ding J., García R. and Genest J.:
Atrial natriuretic factor in the impulse - conduction system of rat cardiac ventricles.
Cell Tissue Res 256:309-325, 1989.
- 11.- **CEREIJIDO, M.,** Ehrenfeld J., Fernández- Castelo S.* and Meza I.:
Fluxes, junctions and blisters in cultured monolayers of epithelioid cells (MDCK).
Ann. N.Y. Acad. Sci. 372:422-441, 1981b.
- 12.- **CEREIJIDO M,** Robbins E.S, Dolan W.J., Rotunno C.A. and Sabatini D.O.:
Polarized monolayers formed by epithelial cells a permeable and translucent support.
J. Cell. Biol. 77:853-880, 1978.
- 13.- **CRAVEN, T. G.,** Kem D.C., and Schiebinger R. J.*:
Atrial Natriuretic Peptides: The role of phenylalanine on biological activity.
Endocrinology 122(3):826-830, 1988.
- 14.- **CURRIE, M.G.,** Schomer H., Lanier-Smith K.L., and Baron D.A.:
Atrial natriuretic peptide binding site in the mammalian heart: Localization to endomural vessels.
Cell Tissue Res. 256:233-239, 1989.
- 15.- **De BOLD, A.J.,** Borenstein, H.B., Veress, A.T. and Sonnenberg H.:
A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats.
Life Sci. 28:89-94, 1981.
- 16.- **FLYNN, T.G.,** de Bold M.L. and de Bold A.J.:
The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties.
Bioch. Biophys. Res. Comm. 117(3):859-865, 1983.
- 17.- **FONTOURA, B.M.A.,** Nussenzveig D.R., Pelton K.M. and Maack T:
Atrial natriuretic factor receptors in cultured renomedullary interstitial cells.
Am. J. Physiol. 258(Cell Physiol. 27):C692-C699, 1990.

- 18.- GAUSH Ch.R., Hard W.L. and Smith T.F.:
Characterization of an established line of canine kidney cells
(MDCK)(31293).
P.S.E.B.M.122:931-935,1966
- 19.- HERZLINGER D.A., Easton T.G. and Ojakain G.K.:
The MDCK epithelial cell line expresses a cell surface antigen of
the kidney distal tubule.
J. Cell. Biol. 93:269-277,1982.
- 20.- HIRATA, Y., Takata Sh., Tomita M., and Takaichi Sh.:
Binding, internalization, and degradation of atrial natriuretic
peptide in cultured vascular smooth muscle cells of rat.
Bioch. Biophys. Res. Comm. 132(3):976-984, 1985.
- 21.- INAGAMI, T.:
Atrial Natriuretic Factor.
J. Biol. Chem. 264(6):3043-3046, 1989.
- 22.- KNOCK, C.A. and de Wardener:
Evidence in vitro for a circulating natriuretic substance in rats
after expanding the blood volume.
Clin. Sci. 59:411-421, 1980.
- 23.- JESPERSEN, B., Eiskjaer H. and Pedersen E.B.:
Effect of atrial natriuretic peptide on blood pressure, guanosine
3':5'-cyclic monophosphate release and blood volume in uraemic
patients.
Clin. Sc. 78:67-73, 1990.
- 24.- JOHNSTON, C.I., M.B., B.S., Hodsmann P.G., M.D., Casley D.J.,
Sc. Appl. M., Fabris B., M.D., and Phillips P.A.:
Interaction between atrial natriuretic peptide and the renin
angiotensin aldosterone system.
Am. J. Med. 87(Suppl 6B):6B-24S - 6B-28S, 1989.
- 25.- KANGAWA, K and Matsuo H.:
Purification and complete amino acid sequence of alpha-human
atrial natriuretic polypeptide (alpha-hANP).
Bioch. biophys. Res. Comm. 118(1):131-139, 1984.
- 26.- KAWAGUCHI, Sh., Uchida K., Ito T., Kozuka M., Shimonaka M.,
Mizuno T., and Hirose Sh.:
Immunohistochemical localization of atrial natriuretic peptide
receptor in bovine kidney and lung.
J. Histochem. Cytochem. 37(11):1739-1742, 1989.
- 27.- KIM, J.K., Summer S.N., Durr J., and Schrier R.W.:
Enzymatic and binding effects of atrial natriuretic factor in
glomeruli and nephrons.
Kidney Int. 35:799-805, 1989.

- 28.- **KITAJIMA, Y., Minamitake Y., Furuya M., Takehisa M., Katayama T., and Tanaka S.**
Linear alpha-human atrial natriuretic peptide analogs display receptor binding activity and inhibit alpha-hANP-induced cGMP accumulation.
Bioch. Biophys. Res. Comm. 164(3):1295-1301, 1989.
- 29.- **KONDO, Y., Imai, M. Kangawa, K, and Matsuo, H.:**
Lack of direct action of human atrial natriuretic polypeptide on the in vitro perfused segments of Henle's loop isolated from rabbit kidney.
Pflugers Archiv, 406, 273, 1986.
- 30.- **KRIETER, P.A. and Trapani A.J.:**
Metabolism of atrial natriuretic peptide extraction by organs in the rat.
Drug Metab. and Disp. 17(1):14-19, 1989.
- 31.- **LEIGHTON, J., Brada Z., Estes L.W. and Juslh G.:**
Secretory activity and oncogenicity of a cell line (MDCK) derived from canine kidney.
Sci. 163:472-473, 1969.
- 32.- **LEIGHTON, J., M.D., Estes L.W., Mansukhani S., and Brada Z.:**
A cell line derived from normal dog kidney (MDCK) exhibiting qualities of papillary adenocarcinoma and of renal tubulas epithelium.
Cancer. 26:1022-1028, 1970.
- 33.- **LEITMAN, D.C., Agnost V.L., Tuan J.J., Andresen J.W. and Murad F.:**
Atrial natriuretic factor and sodium nitroprusside increase cyclic GMP in cultured rat lung fibroblasts by activating different forms of guanylate cyclase.
Bioch. J. 244:69-74, 1987.
- 34.- **LEITMAN, D.C., Andresen J.W.*, Catalano R.M., Waldman S.A., Tuan J.J. and Murad F.:**
Atrial natriuretic peptide binding, Cross-linking, and stimulation of cyclic GMP accumulation and particulate guanylate cyclase activity in cultured cells.
J. Biol. Chem. 263(8):3720-3728, 1988.
- 35.- **LEITMAN, D.C.*, Andresen J.W., Kuno T., Kamisaki Y., Chang J.K. and Murad F.:**
Identification of multiple binding sites for atrial natriuretic factor by affinity cross-linking in cultured endothelial cells.
J. Biol. Chem. 261(25):11650-11655, 1986.

- 36.- **LEITMAN, D.C., and Murad F.:**
Comparison of binding and cyclic GMP accumulation by atrial natriuretic peptides in endothelial cells.
Bioch. Biophys. Acta 885:74-79, 1986.
- 37.- **LEVER, J.E.:**
Regulation of dome formation in kidney epithelial cell cultures.
Ann. New York Acad. Sci. 372:371-383, 1981.
- 38.- **LEWICKI, J.A.:**
Cellular actions of atrial natriuretic peptide.
Contemporary issues in nephrology. 21(4) Edited by B. M. Brenner and J. H. Stein. Churchill Livingstone Inc. 1989.
- 39.- **LIGHT, D.B., Schwiebert E.M., Karlson K.H., and Stanton B.A.:**
Atrial natriuretic peptide inhibits a cation channel in renal inner medullary collecting duct cells.
Sci. 243(4889):383-385, 1989.
- 40.- **MADIN, S.H. and Darby N.B.**
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 98:574, 1958.
- 41.- **MADIN, S.H. and Darby N.B.:**
MDCK Register
American Type Culture Collection. Catalogue of Strains II. 2:
,1979.
- 42.- **MARTINEZ, M.J.F.:**
Presencia de receptores a la prostaglandina E₂ (PGE₂) y a la hormona antidiurética (HAD) en las células renales en cultivo (MDCK).
Tesis Doctoral. Farmacología CIEA - IPN. 1987.
- 43.- **MARTINEZ, F. and Reyes J.L.:**
Prostaglandin receptors and hormonal actions on water fluxes in cultured canine renal cells (MDCK).
J. Physiol. 347:533-543, 1984.
- 44.- **MEJIA, R., Sands J.M., Stephenson J.L., and Knepper M.A.:**
Renal actions of atrial natriuretic factor: a mathematical modeling study.
Am. J. Physiol. 257(Renal Fluid Electrolyte Physiol. 26): F1146-F1157, 1989.
- 45.- **McMURRAY, J., Seidelin P.H., and Struthers A.D.:**
Evidence for a proximal and distal nephron action of atrial natriuretic factor in man.
Nephron 51:39-43, 1989.

- 46.- **McROBERTS, J.A., Erlinger S., Rindler M.J. and Saier M.H., Jr.:**
 Furosemide-sensitive salt transport in the Madin-Darby canine kidney cell line.
 J. Biol. Chem., 257(5):2260-2266, 1982.
- 47.- **MISFELDT, D.S., Hamamoto S.T. and Pitelka D.R.:**
 Transepithelial transport in cell culture.
 Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73(4):1212-1216, 1976.
- 48.- **MIYATA, A., Kangawa K., Toshimori T., Hatoh T. and Matsuo H.:**
 Molecular forms of atrial natriuretic polypeptides in mammalian tissues and plasma.
 Bioch. Biophys. Res. Comm. 129(1):248-255, 1985.
- 49.- **RABELINK, T.J., Koomans H.A., Stolpe A.V., Bijlsma J.A., and Mees E.J.D.:**
 Effects of atrial natriuretic peptide on distal tubule function in humans.
 Kidney Int. 37:996-1001, 1990.
- 50.- **RABITO, C.A., and Tchao R.:**
 [³H] ouabain binding during the monolayer organization and cell cycle in MDCK cells.
 Am. J. Physiol. 238(Cell Physiol. 7):C43-C48, 1980.
- 51.- **RABITO, C.A., Tchao R., Valentich J. and Leighton J.:**
 Distribution and characteristics of the occluding junctions in a monolayer of a cell line (MDCK) derived from canine kidney.
 J. Membrane Biol. 43:351-365, 1978.
- 52.- **RANDALL T.S., Schultz S.G. and Lever J.E.:**
 Stimulation of dome formation in MDCK kidney epithelial cultures by inducers of differentiation: Dissociation from effects on transepithelial resistance and cyclic AMP levels.
 J. Cell. Physiol. 113:427-432, 1982.
- 53.- **REINHARDT H.W., Kaczmarczyk G., Mohnhaupt R., Oelkers W. and Schimmrich B.:**
 The control of sodium excretion by reflexes from the low pressure system independent of adrenal activity.
 Pflügers Arch. 384:171-176, 1980.
- 54.- **REINHARDT, H.W., Kaczmarczyk G., Mohnhaupt R. and Simgen B.:**
 Atrial natriuresis under the conditions of a constant renal perfusion pressure.
 Pflügers Arch. 389:9-15, 1980.
- 55.- **RINDLER M.J., Chuman L.M., Shaffer L. and Saier M.H., Jr.:**
 Retention of differentiated properties in an established dog kidney epithelial cell line (MDCK):
 J. Cell. Biol. 81:635-648, 1979.

- 56.- RINDLER M.J., McRoberts J.A., and Saier M.H., Jr.:
(Na⁺,K⁺)-cotransport in the Madin Darby canine kidney cell line.
J. Biol. Chem. 257(5):2254-2266, 1982.
- 57.- ROSTGAAR, J. and Moller O.:
Localization of Na⁺,K⁺-ATPase to the inside of the basolateral
cell membranes of epithelial cells of proximal and distal tubules
in rabbit kidney.
Cell. Tissue Res. 212:17-28, 1980.
- 58.- ROTHMAN, J.E. and Lenard J.:
Membrane Asymmetry.
Sci. 195:743-753, 1977.
- 59.- SAHEKI, T., Shimonaka M., Uchida K., Mizuno T., and Hirose S.:
Immunochemical and biochemical distinction of subtypes of atrial
natriuretic peptide receptor.
J. Bioch. 106:627-632, 1989.
- 60.- SAIER, M.H.:
Growth and differentiated properties of a kidney epithelial cell
line (MDCK).
Am. J. Physiol. 240(Cell Physiol. 9):C106-C109, 1981.
- 61.- SCOTT, J.N., and Jennes L.H.:
Ontogeny of atrial natriuretic peptide receptors in fetal rat
kidney and adrenal gland.
Histochem. 91:395-400, 1989.
- 62.- TAUB, M., Chuman L., Saier M.H., and Sato G.:
Growth of Madin-Darby canine kidney epithelial cell(MDCK) line in
hormone-supplemented, serum-free medium.
Proc. Natl. Acad. Sci. 76(7):3338-3342, 1979.
- 63.- TAUB, M. and Saier M.H., Jr.:
Amiloride-resistant Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells
exhibit decreased cation transport.
J. Cell. Physiol. 106:191-199, 1981.
- 64.- TAUB, M. and Saier M.H., Jr.:
Regulation of ²²Na⁺ transport by calcium in an established kidney
epithelial cell line.
J. Biol. Chem. 254:11440-11444, 1979.
- 65.- TALLARIDA, R.J. and Murray R.B.:
Manual of Pharmacological calculations, with computer program.
Springer-Verlag Eds. New York, Inc. 20-28, 1981.

- 66.- **THIBAULT**, G., Garcia R., Seidah N.G., Lazune C., Cantin M., Chretien M. and Genest J.:
Purification of three rat atrial natriuretic factors and their amino acid composition.
FEBS. 164(2):286-290, 1983.
- 67.- **TRIPPODO**, N.C., MacPhee A.A., Cole F.E., and Blakesley H.L.:
Partial chemical characterization of a natriuretic substance in rat atrial heart tissue (41465).
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 170:502-508, 1982.
- 68.- **UCHIDA**, K., Mizuno T., Shimonaka M., Sugaira N., Ling N., Hagiwara H. and Hirose S.:
Purification and properties of active atrial natriuretic peptide receptor (type C) from bovine lung.
Bioch. J. 263:671-678, 1989.
- 69.- **VALENTICH**, J.D.:
Morphological similarities between the dog kidney cell line MDCK and the mammalian cortical collectin tubule.
Ann. New York Acad. Sci., 372:384-405, 1981.
- 70.- **WALDMAN**, S.A., Leitman D.C., Chang L.Y., and Murad F.:
Comparison of particulate guanylate cyclase in cells with and without atrial natriuretic peptide receptor binding activity.
Mol. Cell. Bioch. 90:19-25, 1989.
- 71.- **WARDENER**, H.E., and Clarkson E.M.:
Natriuretic Hormone.
Kidney Physiol. and Pathophys. 42:1013-1031, 1985.
- 72.- **WILSON**, P.D., and Horster M.R.:
Differential response to hormones of defined distal nephron epithelia in culture.
Am. J. Physiol. 244(Cell Physiol. 13):C166-C174, 1983.
- 73.- **WOODS**, R.L.:
Contribution of the kidney to metabolic clearance of atrial natriuretic peptide.
Am. J. Physiol. 255(Endocrinol. Metab. 18):E934-E941, 1988.
- 74.- **YATES**, N. A., Coghlan J. P., Murphy G. J., Scoggins B. A., and Renal actions of atrial natriuretic factor: modulation of effect by changes in sodium status and aldosterone.
Am. J. Physiol. 258(Renal Fluid Electrolyte Physiol. 27): F684-F689, 1990.

75.- YUSUFI, A.N.K., Berndt T.J., Moltaje H., Donovan V., Donsa T.P., and Knox F.G.:

Rat atrial natriuretic factor (ANP-III) inhibits phosphate transport in brush border membrane from superficial and juxtamedullary cortex (42833).

PSEBM.190(1):87-90, 1989.

76.- ZEIDEL, M.L.:

Renal actions of atrial natriuretic peptide.

"Atrial natriuretic peptides" Contemporary issues in nephrology 21(8) Edited by B. M. Brenner and J. H. Stein. Churchill Livingstone Inc., 1989.

77.- ZEIDEL, M.L.:

Direct transport Effects of atrial natriuretic peptide in inner medullary collecting duct cells.

Adv. Ad. Peptide Res. Vol. II (14). Am. Soc. Hypertension Sym. Series Edited by B. M. Brenner and H. Baragh Raven Press. New York, 1988.

78.- ZEIDEL, M.L., Kikeri D., Silva P., Burrowes M., and Brenner B.M.:

Atrial natriuretic peptides inhibit conductive sodium uptake by rabbit inner medullary collecting duct cells.

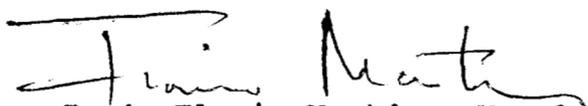
Am. Soc. Clin. Inv. Inc. 82:1067-1074, 1988.

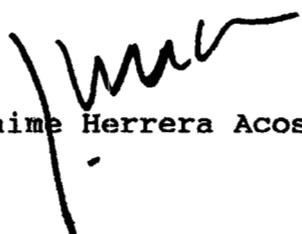
79.- ZEIDEL, M.L., Silva P., Brenner B.M., and Seifter J.L.:

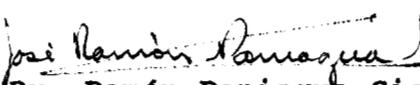
cGMP mediates effects of atrial peptides in medullary collecting duct cells.

Am. J. Physiol. 252(Renal Fluid Electrolyte Physiol. 21):F551-F559, 1987.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, aprobó la presente Tesis a los diez días del mes de enero del año mil novecientos noventa y dos.


Dr. Jesús Flavio Martínez Morales


Dr. Jaime Herrera Acosta


Dr. Ramón Paniagua Sierra


Dra. Ma. Concepción Gutierrez Ruiz