



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**  
**DIRECCION GENERAL**  
**MAESTRO**

**ANÁLISIS COMPARATIVO DEL FENOTIPO RENAL DEL RATÓN  
MUTANTE POR EL GEN M<sub>sx2</sub>: ESTUDIO DEL METABÓLISMO RENAL**

**AUTORA: MARÍA CRISTINA AGUILERA M**  
**C.I: V- 15.205.776**

**VALENCIA, SEPTIEMBRE 2014**



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
DIRECCIÓN DE POSTGRADO  
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA ORAL**

**ANÁLISIS COMPARATIVO DEL FENOTIPO RENAL DEL RATÓN  
MUTANTE POR EL GEN Msx2: ESTUDIO DEL METABÓLISMO RENAL**

Trabajo de Grado presentado para optar al Título de Magister en Biología  
Oral

**AUTORA: MARÍA CRISTINA AGUILERA M**

**TUTOR: DOMINIQUE HOTTON**

**VALENCIA, SEPTIEMBRE 2014**

## AVAL DEL TUTOR

Dando cumplimiento a lo establecido en el reglamento de Estudios de Postgrado de la Universidad de Carabobo en su artículo 133, quien suscribe **DOMINIQUE HOTTON** titular deL pasaporte N° **08CI38414** en mi carácter de Tutor del **Trabajo de Magister** titulado:

**“ANÁLISIS COMPARATIVO DEL FENOTIPO RENAL DEL RATON MUTANTE POR EL GEN Msx2. ESTUDIO DEL METABOLISMO RENAL”.**

Presentado por la ciudadano **MARÍA CRISTINA AGUILERA M** titular de la Cédula de Identidad N° **V-15.205.776**, para optar por el título de **MAGISTER EN BIOLOGÍA ORAL**, hago constar que dicho trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la presentación pública y evaluación por parte del jurado examinador que se designe.

En Valencia a los veinticuatro días del mes de Septiembre del año Dos Mil Catorce.

---

**DOMINIQUE HOTTON**  
**PASAPORTE N° 08CI38414**

**Se dedica este trabajo a:**

A mis padres que donde quiera que estén, espero disfrutan viendo el producto de su siembra que con mucho esfuerzo y sacrificio han realizado.

A mis hermanos, mis aliados y bastones ante las aventuras que se me ocurren, sobre todo a Tojin, por ser tan incondicional.

A mis sobrinos por ser la alegría y la esperanza ante cada vicisitud.

A mis compañeras de trabajo de la Asignatura Microbiología, a mis “profes” y amigas, por hacerme el recorrido más ameno

A mis estudiantes por ser el motor que me impulsa a perfeccionarme para ofrecerles cada vez mas excelencia y mantener siempre ese espíritu curioso e irreverente en mi.

A mis “Chicas Superpoderosas”; Maribel, Daisy y Marxlenin, ya que su sabiduría, inteligencia y ecuanimidad hicieron de estos 4 años una de las experiencias más gratificante de la vida..

***Se agradece por su contribución para el desarrollo de esta tesis a:***

Al Dr. Dominique Hotton, y Dra Alba Bolaños, gracias por confiar desde el primer momento en mí y guiarme como profesional y como persona. Gracias por ver en mí algo que ni sabía que existía, gracias por su motivación, comprensión, paciencia, seriedad, generosidad, responsabilidad y compromiso para conmigo, sin su valiosa colaboración no hubiera sido posible la realización de este maravilloso trabajo.

Al Dr Alain Doucet director del Laboratorio de Genómica, Fisiología y Fisiopatología Renal de la Universidad Paris Descartes 3, y a la Dra Arianne Berdal, directora del laboratorio de Biología, Patología y Fisiopatología Oral Molecular de la universidad Paris descartes 7 por su hospitalidad, receptividad y sobre todo por enseñarme que la investigación es un trabajo en equipo y que todos somos importantes.

A la Dra Emilia Barrios directora de Biomolp UC por su hospitalidad, alegría, profesionalismo, practicidad y sobre todo por ser esa sonrisa amable cuando todo se tornaba oscuro

A los profesores de la Maestría, por ser ejemplo de profesionalismo, brindándome sus conocimientos y experiencias, permitiéndome lograr tan anhelada meta.

A **Marco Tulio Mérida** ideólogo de este gran proyecto, por permitirme entender que mientras más aprendemos, más ignorantes somos. mi eterno agradecimiento (QEPD).

A mis amigos, a mis compañeros de vida y de circunstancias que durante este tiempo con cada palabra de apoyo, de interés o simplemente por

curiosidad me recordaban que había una meta que cumplir en fin, a todas aquellas personas que de una u otra forma, colaboraron en la elaboración de este trabajo de grado.

Pero sobre todo.....Gracias A Dios!!!!!!

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>Genes Homeoticos</b>	3
<b>Morfología Renal</b>	5
Glomerulo Renal	6
Sistema tubular de la nefrona	8
<b>Metabolismo renal del calcio</b>	13
Regulación metabólica del calcio. Proteínas de transporte de calcio	
Calbindina D28K	16
Receptores Transitorios Potenciales (TRP)	20
<b>Familia de canales TRP</b>	20
Organización familia TRP	20
Topología Canales TRP	21
Canales TRP en el riñón	23
Intercambiador Sodio / Calcio (NCX)	25
Intercambiador Sodio / Calcio en la membrana plasmática	25
Características moleculares del intercambiador Sodio/Calcio	26
Estructura y topología en la membrana del intercambiador Sodio/Calcio	27
Papel fisiológico del intercambiador Sodio/Calcio	29
<b>Objetivos de la investigación</b>	32
Objetivo general	32
Objetivos específicos	32

<b>II. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>33</b>
<b>Tipo de Investigación</b>	<b>33</b>
<b>Estudio con jaulas metabólicas</b>	<b>33</b>
Animales de Experimentación	33
Controles de peso diario	36
Recolección de muestras de orina	36
Toma de muestra de sangre	36
Tratamiento con Bifosfonato	36
<b>Fase de Biología Celular</b>	<b>36</b>
Histología	36
Coloración van Gieson	37
Western Blot	37
Inmunohistoquímica	38
Fotografía	38
<b>III. RESULTADOS</b>	<b>39</b>
Estudio metabólico con jaulas	39
Fase Biología Celular	43
Coloración Van Gieson. Análisis fenotípico renal	43
Western Blot	45
Inmunohistoquímica	47
<b>IV. DISCUSIÓN</b>	<b>50</b>
<b>V CONCLUSIONES</b>	<b>54</b>
<b>VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>56</b>





**UNIVERSIDAD DE CARABOBO  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
DIRECCIÓN DE POSTGRADO  
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA ORAL**

**ANÁLISIS COMPARATIVO DEL FENOTIPO RENAL DEL RATÓN MUTANTE  
POR EL GEN *Msx2*: ESTUDIO DEL METABOLISMO RENAL**

María Cristina Aguilera Monroy  
Septiembre 2014

**RESUMEN**

Los genes *Msx* involucrados en el desarrollo de los tejidos mineralizados han sido estudiados en modelos biológicos (ratones machos de 60 días de vida), reportándose la expresión de ciertas proteínas que intervienen en el metabolismo del calcio de los ratones mutantes *Msx2*. Al respecto, el propósito de esta investigación es analizar las alteraciones renales consecutivas en la invalidación del gen *Msx2* en los ratones mutantes; para ello se realizó un estudio exploratorio, descriptivo, preexperimental, explicativo y expostfacto en dos fases, una fase en jaulas metabólicas y una segunda de biología celular, específicamente, con técnicas de coloración, western blot e Inmunohistoquímica. Los resultados en jaula metabólica reportan la hipercalciuria con un índice  $\text{Ca/Cr}$  de 0.79 en los ratones *Msx2*  $-/-$ , el cual es reversible luego de tratamiento con bifosfonatos. Se expresan las proteínas involucradas con el metabolismo del calcio TRPV5 y NCX1 en tejido renal de *Msx2*  $+/+$ . La expresión de las proteínas NCX1 a nivel de nefrona distal, túbulo conector y tubo colector se observó con mayor intensidad que la expresión de TRPV5 en esos mismos tejidos en los ratones *Msx2*  $-/-$ . El ratón *Msx2*  $-/-$  posee proteínas para el metabolismo del calcio, presentando características fenotípicas relacionadas con hipercalciuria la cual se relaciona con metabolismo del calcio a nivel óseo.

**Palabras Clave:** Biología Oral, *Msx2*, TRPV5, NCX1 Metabolismo renal





**UNIVERSIDAD DE CARABOBO  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
DIRECCIÓN DE POSTGRADO  
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA ORAL**

**COMPARATIVE ANALYSIS OF THE RENAL PHENOTYPE OF THE  
MUTANT MOUSE BY THE Msx2 GENE: STUDY OF THE RENAL  
METABOLISM**

María Cristina Aguilera Monroy  
September 2014

**ABSTRACT**

The Msx genes involved in the development of the mineralized tissues have been studied in biological models (male mice 60 days of life), reported the expression of certain proteins involved in calcium metabolism in mutant mice Msx2. In this regard, the purpose of this research is to analyze the consecutive renal alterations in the invalidation of the Msx2 gene in the mutant mice; for this exploratory study was carried out, descriptive, pre, and explanatory ex postfact in two phases, a phase in metabolic cages and a second of cell biology, specifically, with coloring techniques, western blot and immunohistochemistry. the results in metabolic cage reported the hypercalciuria with an index Ca/Cr 0.79 in mice Msx2 - /- ,which is reversible after treatment with bisphosphonates. Expressing the proteins involved in calcium metabolism TRPV5 and NCX1 in kidney tissue of Msx2 +/+ . The expression of the NCX1 protein at the level of distal nephron, tubule and collecting duct connector was observed with greater intensity than the expression of TRPV5 in these same tissues in mice Msx2- / - . The mouse Msx2- /- contains proteins for the metabolism of calcium, presenting phenotypic characteristics associated with hypercalciuria which is related to metabolism of calcium in bone

Key words: Oral Biology, Msx2, TRPV5, NCX1 renal metabolism.

l.

## II. INTRODUCCIÓN

La genética es una disciplina científica que estudia, a nivel celular, las moléculas que codifican las características morfológicas y fisiológicas de los seres vivos. Desde esta perspectiva, se reporta, que algunos desequilibrios que ocurren a nivel celular y molecular durante la embriogénesis, tienen repercusiones en el fenotipo de las estructuras, y por consiguiente generaría mutaciones en la expresión del individuo.

Por consiguiente, la identificación de variantes genéticas puede aportar conocimiento para avanzar en nuevos descubrimientos biológicos que permitan explicar la evolución de alteraciones morfológicas y el consecuente desarrollo de biomarcadores que mejoren la terapéutica y prevención de las mismas <sup>(1)</sup>.

En ese sentido, la mutación del gen Msx2 ha permitido el estudio de la expresión de las proteínas relacionadas con el proceso de mineralización, las cuales se encuentran alteradas en el ratón mutante Msx2 KI , ya que se ha observado la expresión de ciertas son las proteínas Calbindina <sub>28k</sub>, NCX1 y TRPV5, a nivel renal de esos ratones mutantes, relacionados con la osteogénesis y odontogénesis. <sup>(2)(3)</sup>

Se ha demostrado que ratón Msx2 KI presenta alteraciones en la expresión de proteínas cálcicas, y la mayoría de éstas parecen proceder del metabolismo, según lo reportado por La Cruz <sup>(4)</sup>, en donde se han evidenciado los canales cálcicos renales. En función de eso, se considera estudiar el principal órgano transportador de calcio, aunque no realiza mineralización., como lo es el riñón.

Por otra parte, se encuentra el aporte de Suda <sup>(5)</sup>, en donde se describe la relación entre anomalías dentarias por Amelogenesis Imperfecta y patologías renales , particularmente un caso de nefrocalcinosis en un paciente de 21

años que presenta mutación del gen Msx2 , lo cual evidencia la relación de los dos órganos alterados por dicha mutación.

En otros estudios se determina la relación de Msx2 en las calcificaciones vasculares renales y su relación con el daño renal. <sup>(6) (7)</sup>. Dado que hay ciertas coincidencias funcionales en los movimientos de calcio entre los tejidos dentarios durante la histogénesis y renales en las diferentes regiones estructurales del riñón, unido esto a la evidencia de resultados in vitro que sugieren que Msx2 podría ser un represor de la Calbindina D<sub>28k</sub> <sup>(3)</sup>, una proteína transportadora de calcio y considerando que se han realizado pocos estudios sobre la acción de Msx2 sobre el metabolismo del calcio a nivel renal, por lo que se plantea analizar las proteínas que intervienen a nivel renal con el fin de asociar las anomalías del metabolismo mineral con el daño renal de origen genético.

Por lo tanto, en el presente estudio, posee la finalidad de obtener mayor información sobre las funciones del gen Msx2, tomando en consideración que podría controlar la expresión de transportadores de calcio en la homeostasia, por lo que se describe la presencia de los canales transportadores de calcio a nivel renal en los ratones mutantes por Msx2 ya que la regulación de las concentraciones del calcio depende en gran parte de las proteínas transportadoras, <sup>(8)</sup> y particularmente la expresión de los niveles de estas proteínas, TPRV5 y NCX1 en ratones Msx2 utilizando técnicas de inmunohistoquímica.

El transporte transcelular de calcio (Ca<sup>2+</sup>) implica tres pasos secuenciales: 1) afluencia de calcio en las células epiteliales, mediadas por los canales de calcio apicales de la familia de receptor transitorio electroquímico potencial vanilloide (TRPV) y promovidas por un gradiente a través de la membrana apical; 2) el transporte citosólico de calcio unido a proteínas de unión a

calcio, las Calbindinas; y 3) extrusión de calcio a través de la membrana basolateral al líquido extracelular, por un proceso que requiere consumo de energía donde intervienen las bombas sodio-calcio <sup>(9)</sup>

### **Genes Homeóticos**

Los genes homeóticos son genes conservados a través de la evolución que intervienen en el desarrollo de las estructuras craneofaciales. En el desarrollo se produce una cascada de acontecimientos químicos que conllevan a la formación de estructuras, como el sistema nervioso central, estructuras musculares, extremidades y el complejo craneofacial. Además los genes homeóticos codifican para proteínas que le informan a las células del embrión en desarrollo, la posición y la función que deben ejercer.

En particular, los genes homeóticos Msx, juegan un papel muy importante en el desarrollo craneofacial, contribuyendo a mantener un balance entre la proliferación y la diferenciación celular, durante la morfogénesis del cráneo en estados pre y postnatal, y están representados por los genes: Msx1, Msx2, Msx3. <sup>(10)</sup>

En este sentido, las proteínas Msx son importantes moduladores del desarrollo craneofacial, de brazos, piernas y del sistema nervioso. La expresión de estos genes se encuentra correlacionada con la formación del patrón del primordio facial desde el mesénquima indiferenciado hasta la formación de cartílagos, músculos y nervios y con cambios en el desarrollo esquelético. Los genes Msx1 y Msx2 son ampliamente expresados en varias regiones (cráneo, cara, meninges, suturas, corazón, duramadre, dientes) especialmente en los sitios donde las interacciones epitelio - mesénquima están presentes, como los datos estructurales y funcionales que se presentan en el estudio de Blin-Wakkach demuestran que existe un mecanismo para la diferenciación de las estructuras craneofaciales,

especialmente aquellos asociados con las matrices mineralizadas, relacionado con los genes Msx1.<sup>(11)</sup>

Es por ello que se ha observado la expresión de ciertas proteínas que intervienen en la mineralización en los ratones mutantes Msx2, ya que normalmente, el gen Msx2 se expresa en el esqueleto craneofacial, huesos del maxilar y de la mandíbula, gérmenes dentales, y células del miocardio; por lo tanto, una mutación del gen Msx2 causa una patología muy particular, conocida como Craneosinostosis tipo Boston.

La Craneosinostosis tipo Boston se presenta en humanos, y se produce por la sustitución de una prolina por una histidina, en la posición 7 del homeodominio del gen Msx2, lo que genera un aumento en la función normal de craneosinostosis. Aunque Msx1 y Msx2, muestran un sitio de preferencia similar de unión al ADN y ambos pueden reprimir la transcripción, presentan propiedades bioquímicas diferentes por tener dominios únicos N-terminal, que le confiere a Msx2 una gran afinidad por el ADN.<sup>(5)</sup>

Estos genes han sido descritos durante la formación de todos los tejidos mineralizados mientras que en desarrollo tardío su expresión ha sido poco estudiada. La mutación del gen Msx2 ha permitido el estudio de la expresión de las proteínas de la mineralización,<sup>(12)</sup> la cual se ve perturbada en el ratón mutante Msx2 KI por inserción del gen B- galactosidasa<sup>(13)</sup> lo cual se manifiesta fenotípicamente como pérdida de pelos en forma cíclica del lomo hacia el vientre, seguida por una fase de recrecimiento, el número de los folículos pilosos en los ratones mutantes es de 1/3 de la totalidad del que cuentan los ratones salvajes.

Estos ratones presentan, además una involución en la formación de las glándulas mamarias y además otros apéndices ectodérmicos están

alterados: las uñas y las orejas son de gran tamaño. A los 30 días, el ratón adulto muestra deficiencia en la osificación del hueso frontal. La dentición está alterada: los dientes presentan hipoplasia del esmalte, no se encuentran alineados, con la consecuencia de dificultad para masticar, por lo tanto, estos animales requieren una dieta blanda. <sup>(14)(15)</sup>

Estos reportes de la comunidad científica indican una clara atribución del gen *Msx2* en los procesos morfológicos y fisiológicos donde se encuentra involucrado el calcio; el gen es responsable de la modificación de los niveles cálcicos generando alteraciones estructurales en órganos específicos con alta constitución de este mineral.

### **Morfología renal.**

La unidad morfofuncional del riñón es la nefrona, la cual se encuentran repartidas por toda la corteza renal y en ellas se pueden distinguir dos componentes principales: el glomérulo renal y el sistema tubular. ( Figura 1)

Las nefronas aparecen en la corteza renal siguiendo un patrón establecido que se repite periódicamente y que se denomina lobulillo renal. Este lobulillo está constituido por la subunidad de corteza comprendida entre dos arterias interlobulillares contiguas y está centrado por un rayo medular que, a modo de eje, aparece surcado por un conducto colector principal que desciende, verticalmente, hacia las pirámides, recibiendo la orina concentrada en las nefronas situadas a ambos lados del rayo medular.  
<sup>(16)</sup>

Se reconocen cuatro subdivisiones en la porción tubular de la nefrona: el túbulo contorneado proximal, el asa de Henle, el túbulo contorneado distal y los túbulos colectores.

El extremo ciego de la porción proximal del sistema tubular aparece dilatado e invaginado, para formar una estructura hueca, de finas paredes epiteliales, denominada cápsula de Bowman. La concavidad externa de dicha cápsula está ocupada por un capilar glomerular en forma de ovillo, el corpúsculo renal, ya que el glomérulo está constituido solamente por los capilares y sus elementos asociados. Es así, como, el corpúsculo entero; junto al sistema tubular, completan la nefrona.

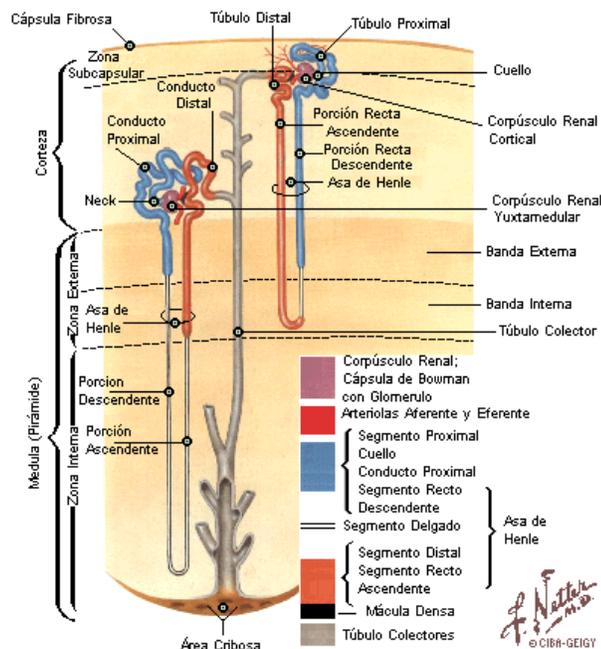


Figura 1: Esquema de la anatomía renal y su relación con la disposición de las nefronas y sus partes. (Tomado de Netter, 2011)

### Glomérulo renal

Posee una forma esférica y un diámetro de 100 a 150  $\mu\text{m}$ . El lugar por donde entran y salen los vasos en el glomérulo o corpúsculo se denomina polo vascular, localizándose en el lado opuesto a la zona que conecta con el

túbulo proximal o polo urinario

La envoltura del corpúsculo renal es la cápsula de Bowman, estructura a modo de copa de doble pared, compuesta por un epitelio externo o parietal. Este epitelio presenta células muy finas y se refleja, a nivel del polo vascular, hacia el interior, originando una capa interna o visceral, cuyas células se apilan, íntimamente, contra los capilares glomerulares. Las células de esta capa son de mayor tamaño y poseen una estructura con prolongaciones, por lo que se las denomina podocitos (Figura. 2).

Entre las capas parietal y visceral de la cápsula queda una cavidad estrecha denominada espacio urinario o de Bowman, que está en continuidad y abierto a la luz del túbulo proximal. La capa parietal de la cápsula de Bowman (Figura. 2) está constituida por un epitelio plano simple de células poligonales, ricas en organelas, que asientan sobre una membrana basal.

El epitelio parietal de la cápsula de Bowman, junto con la pared de los capilares, constituye un dispositivo muy especializado, que permite que la sangre que llega hasta los capilares glomerulares sea sometida a un proceso de ultrafiltrado, con el fin de controlar el equilibrio hidroelectrolítico del organismo y eliminar productos de desecho. Este dispositivo se denomina: barrera de filtración glomerular (Figura. 2) y está constituido, específicamente, por la pared del endotelio capilar, la membrana basal glomerular y por los podocitos.

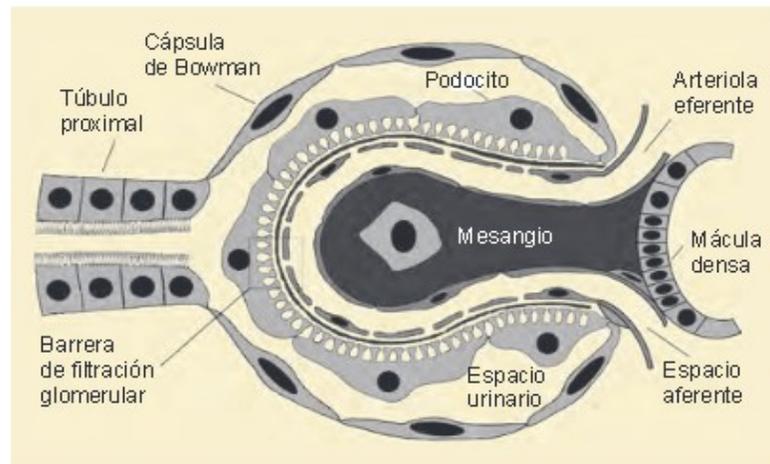


Figura 2: Esquema del Corpúsculo Renal. ( Tomado de Avendaño, 2008)

### **Sistema tubular de la nefrona**

El glomérulo renal se continúa con la primera porción tubular conocida como túbulo proximal . Los túbulos proximales constituyen el segmento más largo de la nefrona y, en conjunto, ocupan la mayor parte de la corteza. Arranca del polo urinario tras una transformación brusca de las células del epitelio plano de la cápsula de Bowman. En sus porciones iniciales se contornea cerca del corpúsculo renal, originando una porción tortuosa para, a continuación, formar un bucle que se dirige hacia la superficie del riñón, reflejándose para volver a la proximidad del corpúsculo y localizarse en la vecindad de un rayo medular. Desde ahí se dirige directamente hacia la médula formando la porción recta (pars recta), inicio del asa de Henle.

El túbulo proximal mide unos 14 mm de largo por 60  $\mu\text{m}$  de calibre. Histológicamente, está tapizado por un epitelio cúbico simple, de aspecto eosinófilo, en el que destaca ultraestructuralmente una membrana citoplásmica dotada, en su cara luminal, con un ribete en cepillo muy desarrollado que amplía más de 20 veces la superficie apical. En esta superficie posee también invaginaciones de la membrana denominadas

canalículos apicales.

Las superficies celulares laterales presentan numerosos repliegues, al igual que la cara basal que se invagina con las vecinas para formar un complejo laberinto de interdigitaciones.

Las características morfológicas del túbulo proximal no son idénticas en todo su recorrido. Cuando se estudia con microscopia electrónica se pueden observar diferencias regionales que permiten diferenciar tres segmentos distintos. El segmento denominado S1 ocupa las porciones iniciales de la porción contorneada; sus células son las más altas, presentan grandes interdigitaciones y tienen más vacuolas y mitocondrias. El segmento S2 surge por transformación gradual del anterior y ocupa la parte distal de la porción contorneada y la inicial de la porción recta. Sus células son más bajas, con interdigitaciones basolaterales menores y las mitocondrias son más pequeñas y aparecen en menor número. Finalmente, el segmento S3 abarca el resto de la porción recta y presenta células cuboides con muy pocas interdigitaciones y mitocondrias, pero con las microvellosidades más largas de los tres segmentos.<sup>(17)</sup>

En las células del túbulo proximal se reabsorben múltiples elementos que vienen con el ultrafiltrado. En este segmento se captan, aproximadamente, las dos terceras partes del agua, el cloruro y el sodio, así como la práctica totalidad del bicarbonato, azúcares, aminoácidos y péptidos filtrados

El túbulo proximal se continúa con la porción delgada del asa de Henle, al formarse un estrechamiento brusco de la porción descendente recta del túbulo proximal en la parte externa de la médula, para formar un asa, cuya porción descendente inicial es recta y delgada, al igual que la porción inicial ascendente que se continúa tras la inflexión del

asa.

La longitud y morfología de esta porción es diferente dependiendo de que el corpúsculo renal de la nefrona a la que pertenezca sea superficial o esté localizado en la profundidad de la corteza. En general, las asas cortas corresponden a corpúsculos superficiales y son más numerosas, situándose su inflexión en la zona medular externa. Las asas largas pueden extenderse incluso hasta la punta de la papila.

Morfológicamente, la porción delgada del asa de Henle posee un diámetro de 15  $\mu\text{m}$ , y se compone de un epitelio plano, en el que desaparece el ribete en cepillo, para presentar sólo alguna microvellosidad apical. En asas cortas, las células, denominadas de tipo I, son poligonales y no presentan interdigitaciones entre ellas, mostrando la misma apariencia a lo largo de todo el trayecto. En nefronas de asas largas se pueden reconocer morfológicamente hasta tres segmentos distintos. Las porciones iniciales están tapizadas por células de tipo II que presentan numerosas interdigitaciones laterales con las células vecinas y pliegues basales. A medida que desciende el asa, las células pierden interdigitaciones, transformándose en tipo III. Finalmente, las células de porciones ascendentes de asas largas vuelven a tener interdigitaciones pero carecen de pliegues basales, denominándose células de tipo IV.<sup>(17)</sup>

La porción delgada del asa de Henle actúa como un sistema de amortiguación, a fin de reducir el contenido intratubular de sodio a unas dimensiones manejables por los túbulos distal y colector. La porción descendente es, prácticamente, impermeable al NaCl y muy permeable al agua, aumentando la osmolaridad del fluido tubular. En la rama ascendente delgada, el epitelio es más permeable al NaCl y es completamente impermeable al agua, lo que determina que el líquido que fluye por el asa ascendente delgada se vaya haciendo progresivamente menos

hipertónico.

La porción ascendente delgada del asa de Henle se continúa con el inicio del túbulo distal, cuya porción inicial se engrosa bruscamente y forma la última porción del asa. El túbulo distal es más corto y delgado que el túbulo proximal, pero el diámetro de la luz es ligeramente mayor. En un principio es de localización medular, para dirigirse directamente hasta la corteza, justamente en la entrada del polo vascular del corpúsculo renal de la nefrona a la que pertenece <sup>(18)</sup>. En este lugar, algunas células de su pared sufren una transformación para originar la mácula densa, que va a formar parte del aparato yuxtaglomerular.

Aquí finaliza la porción ascendente gruesa del asa de Henle. La parte gruesa de la rama ascendente del asa de Henle es impermeable al agua y existe un transportador en el borde en cepillo de la célula para Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> a su interior. La reabsorción de solutos sin reabsorción de agua hace que el líquido que sale del asa ascendente gruesa sea hipotónico con respecto al plasma, por lo que esta parte de la nefrona recibe el nombre de «segmento diluyente» y es importante cuantitativamente en el manejo tubular de potasio. A continuación, el túbulo distal se hace más tortuoso, formando la porción contorneada, que se sitúa, generalmente, por encima del corpúsculo y que será la que desemboque en el tubo colector.

La pared del túbulo distal está compuesta por un epitelio de células cúbicas, que es más alto en la porción contorneada. En la superficie luminal de la membrana citoplásmica no hay ribete en cepillo, aunque pueden observarse algunas microvellosidades cortas. La superficie basal posee múltiples invaginaciones y plegamientos en los que, de forma característica, se alojan mitocondrias perpendicularmente a la base de las células, lo que confiere al túbulo una estriación característica cuando se observa con el microscopio

óptico. El núcleo es redondeado y suele localizarse más cerca del polo luminal debido a los pliegues basales. En el citoplasma no existen vacuolas ni canalículos bajo la superficie apical. <sup>(18)</sup>

El túbulo contorneado distal es completamente impermeable al agua; la osmolaridad del fluido tubular disminuye todavía más, haciéndose hipoosmótica con respecto al plasma y al intersticio cortical vecino. Por esta razón, esta porción del túbulo se le llama segmento dilutor cortical.

La transición de los túbulos distales a los colectores no se hace de forma brusca, sino que existe un segmento de conexión corto en el que se pueden encontrar células de ambos repartidas aleatoriamente. La porción inicial del sistema de túbulos colectores discurre a lo largo de los rayos medulares, donde unos túbulos convergen con otros similares para descender hasta la médula interna y confluir cerca de la pelvis en los llamados conductos papilares de Bellini, que llegan hasta la papila, donde se abren en la denominada área cribosa

El epitelio que constituye la pared de los túbulos distales presenta dos tipos celulares distintos. La mayor parte son células claras o principales, apareciendo en menor cantidad las células oscuras o intercaladas

Las células claras son casi planas en porciones proximales y van ganando altura, progresivamente, hasta adquirir un aspecto cúbico a medida que se desciende por el túbulo para convertirse en prismáticas en las porciones finales del sistema colector.

Las células oscuras son cúbicas, sobre todo, en las porciones iniciales, donde son similares a las de los túbulos distales, el citoplasma es oscuro, destacando en él numerosas mitocondrias repartidas por toda la

célula.

El sistema de túbulos colectores es la parte más importante de la nefrona a la hora de ajustar la excreción renal de agua,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{H}^+$  al estado de llenado del volumen extracelular y a su composición. La permeabilidad al agua de los túbulos colectores está regulada por la hormona ADH. En los túbulos colectores corticales se produce cuantitativamente la mayor salida de agua, mientras que en los túbulos colectores medulares y papilares, la osmolaridad del intersticio se va haciendo progresivamente mayor, al ir avanzando este segmento de la nefrona hacia la papila, lo que determina una reabsorción adicional de agua, hasta alcanzar una osmolaridad máxima de 1.200 mOsm/l (Figura. 3).

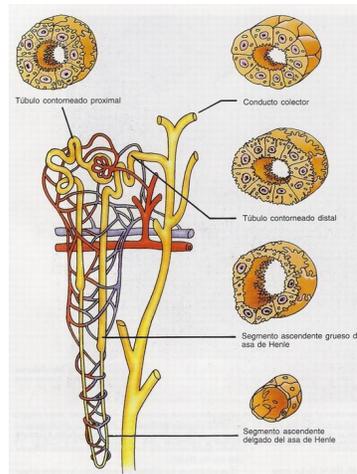


Figura 3: Esquema de la nefrona y su morfología de la sección transversal. (Tomado de Gartner & Hiatt, 2008)

### Metabolismo Renal del Calcio

Si bien el calcio es un importante elemento para el mantenimiento de las funciones orgánicas, y fundamental para: desarrollo de huesos, contracción muscular, liberación de neurotransmisores; es imperante destacar que ejerce funciones de segundo mensajero, activando la señalización intracelular, por lo tanto los efectos de una hipocalcemia, se traducen en tetania y trastornos

estructurales, que en los adultos conduce a la osteoporosis y en la población infantil al raquitismo. <sup>(19)</sup>

Tan importante como el déficit de calcio, es su exceso, que conduce a la hipercalcemia provocando: fatiga, anorexia, vómitos, náuseas, debilidad muscular, trastornos cardiacos, y sobre todo la osteopetrosis, <sup>(20)</sup> caracterizada por un hueso muy compacto y duro, que se puede romper por un golpe seco. Adicionalmente, el exceso de retención de calcio puede conducir a disminuir la absorción de otros minerales, por lo tanto mantener los niveles apropiados de calcio es esencial.

Para llevar a cabo la función niveladora del calcio, el organismo se vale de 3 mecanismos, la hormona Paratiroidea (PTH), la Vitamina D y la Calcitonina. <sup>(21)</sup> permitiendo al organismo regular la absorción y reabsorción del calcio y responder a la demanda del cuerpo. La absorción dietética activa de calcio se produce principalmente en el intestino delgado proximal, mientras que en el riñón la reabsorción activa se limita al túbulo contorneado distal y el túbulo colector. En función a esto, el intestino delgado, específicamente el duodeno, y el riñón son los principales órganos encargados de mantener las concentraciones adecuadas de calcio extracelular. <sup>(22)</sup>

Al respecto, el riñón actúa como tecla reguladora de la homeostasis del calcio cambiando la cantidad que se reabsorbe de la orina primaria: para esto, la mayoría de calcio que se filtra a través del glomérulo es reabsorbido en el túbulo proximal a través del espacio paracelular, el cual es absorbido gradualmente disminuyendo su concentración a lo largo de la nefrona. Es así, como la regulación de la absorción del calcio se produce en el túbulo distal y el túbulo colector. <sup>(23)</sup>

El riñón junto con el intestino y el hueso constituyen los órganos que controlan la calcemia. Esto lo hace limitando la pérdida urinaria de calcio, a

fin de compensar la captación intestinal, así el riñón permite mantener la calcemia, sin que sea necesario reclutar calcio de los huesos. En este proceso de reabsorción tres segmentos de la nefrona tienen una acción importante : el túbulo proximal, la parte ancha cortical del asa ascendente de Henle y el túbulo contorneado distal y conector.

Los principales reguladores del metabolismo del calcio son la hormona paratiroidea (PTH) y la forma activa de la vitamina D, la 1,25-dihydroxyvitamina D. La PTH, que disminuye por el aumento de la calcemia, estimula la reabsorción renal de calcio en la parte inferior del túbulo proximal. En el túbulo distal y el canal colector, aumenta la reabsorción transcelular de calcio pero los actores moleculares comprometidos en este efecto no se han dilucidado hasta ahora. La PTH activa así mismo la 1 $\alpha$ hydroxylasa mitocondrial en las células del túbulo proximal, produciendo un aumento de la síntesis de 1,25-dihydroxyvitamina D. En el túbulo distal la 1,25-dihydroxyvitamina D aumenta la reabsorción tubular del calcio, vía la inducción de la expresión de la calbindina D<sub>28K</sub> y del canal calcio-dependiente TRPV5 (ECaC1).<sup>(24)</sup> El calcio penetra a la célula por el polo apical de la membrana, gracias a la presencia de un canal calcio-especifico llamado TRPV5 (ECaC1).<sup>(24)</sup> En el citoplasma el calcio se une a las proteínas de transporte como son las calbindinas 28 kDa y 9 kDa y sale por el polo basolateral de la membrana, contra un gradiente electroquímico, gracias a un intercambiador sodio-calcio o NCX1 y/o a una calcio-ATPasa (PMCA1b).

El metabolismo renal del calcio está controlado de igual manera por el mismo calcio, vía la activación de receptores de membrana sensibles al calcio (CaSR) y acoplados a proteínas G; este receptor controla también la secreción de PTH por las glándulas paratiroides, inhibe la reabsorción de calcio en la zona ancha cortical del asa de Henle, disminuyendo la

producción de AMPc. <sup>(25)</sup> Se observa que los ratones mutantes exhiben un fenotipo dentario y óseo particular. <sup>(26)</sup>

En todo caso, el mecanismo por el cual la absorción de calcio es similar, en el caso del túbulo distal con respecto al túbulo delgado proximal, por lo cual, se describe en las células epiteliales del túbulo distal la expresión de TRPV5 a nivel apical de la célula, lo cual permite la de entrada de calcio, a nivel intracelular la molécula de Calbindina  $D_{28k}$  y las moléculas NCX1 y PMCA1b a nivel basolateral como extrusoras de calcio. La mayoría de estas proteínas trabajan en un esfuerzo para aumentar la reabsorción renal de calcio <sup>(8)</sup>.

## **Regulación Metabólica del Calcio: Proteínas de Transporte de calcio**

### **Calbindina $D_{28k}$**

La Calbindina  $D_{28k}$  es una proteína de unión a calcio con una muy fuerte afinidad por el calcio. En el riñón, existen varias teorías sobre el papel de Calbindina  $D_{28k}$  y es ahí posible que la proteína tenga múltiples funciones en primer plano dentro de este órgano solamente. Aunque aproximadamente 60 % de calcio es reabsorbido en el túbulo proximal, es en el túbulo contorneado distal donde se produce la reabsorción selectiva de calcio.

La proteína Calbindina  $D_{28k}$  contiene 261 residuos aminoácidos, y tiene un peso molecular aproximadamente de 28000 KDaltons, se encuentra en mamíferos y aves, siendo identificada por primera vez en estas últimas, ha conservado su estructura a lo largo de la evolución de las especies, demostrando su fundamental e importante rol en los procesos intracelulares calciodependientes; en efecto, pertenece a la familia de proteínas de unión al calcio de alta afinidad, que contiene más de 200 miembros.

Ciertamente dichas proteínas se caracterizan por la estructura EF hand, el

cual radica en una estructura octaédrica consistente en dos alfa hélices separadas por 12 aminoácidos en bucle que contienen cadenas de oxígeno necesarias para orientar los cationes de calcio divalentes. La molécula de Calbindina posee dos sitios de unión al calcio. Como se presenta en la figura 4

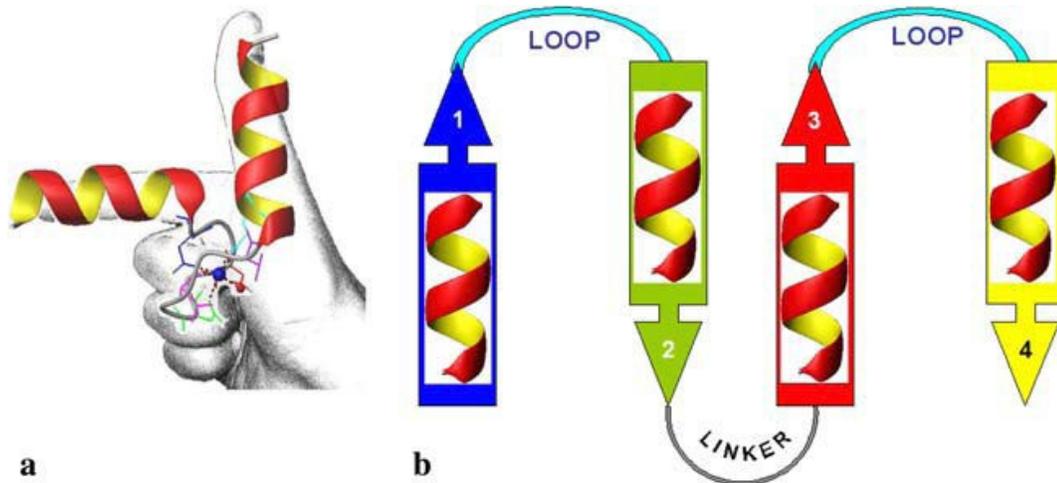


Figura 4: Estructura de la Calbindina D<sub>28k</sub> a) revela un solo pliegue globular compuesto por b) cuatro distintos subdominios EF-mano que coordinan Ca<sup>2+</sup> en bucles. (Tomado de Capozzi, Casadei & Luchinat, 2006)

Estudios inmunohistoquímicos han reportado la localización exclusiva de la Calbindina D<sub>28k</sub> en la nefrona distal, que abarca el túbulo distal y la conexión de éste con el túbulo colector, en una variedad de especies incluidos mamíferos aves y reptiles. Dicha Calbindina renal está ubicada específicamente a nivel del citosol y del núcleo, y no se asocia a las membranas. Se ha reportado que es inducida por 1,25 dihidroxivitamina D a nivel renal. <sup>(27)</sup>.

Entonces, el transporte transcelular del calcio en el túbulo contorneado distal es similar al del intestino, involucra la entrada del calcio a través de la

membrana apical, su difusión a lo largo de la célula, y su extrusión a través de la membrana basolateral mediante la acción dependiente de la ATPasa. De igual manera, la proteína TRPV5 se coexpresa con la Calbindina  $D_{28k}$ , corregulada por el 1,25 dihidroxivitamina D y el calcio de la dieta en la nefrona distal y actúa como portero de la entrada apical de calcio durante la reabsorción activa. <sup>(28)</sup>.

Es así como la Calbindina  $D_{28k}$  interactúa directamente con TRPV5 en la membrana apical en condiciones de niveles de calcio intracelular bajo y ha demostrado regular la actividad de los canales epiteliales de calcio lo cual sugiere un rol adicional de la Calbindina  $D_{28k}$  renal como modulador del flujo de calcio.

También se ha hablado de la acción de la Calbindina  $D_{28k}$  como “ferry” transportando calcio a lo largo de la célula, lo cual la protege, mediando la concentración de calcio intracelular para evitar la muerte celular, por otra parte, algunas teorías sugieren que la Calbindina  $D_{28k}$  actúa como un búffer (manteniendo el calcio intracelular debajo de un nivel tóxico) o desempeña un papel en la bomba de calcio de membrana basolateral de las células epiteliales renales, hecho que se corrobora ya que las proteínas de transporte de calcio tales como la Calbindina  $D_{28K}$ , TRPV5, NCX1, PMCA1b están involucrados en la reabsorción de calcio del túbulo renal mediante transporte transcelular, <sup>(29)</sup>.

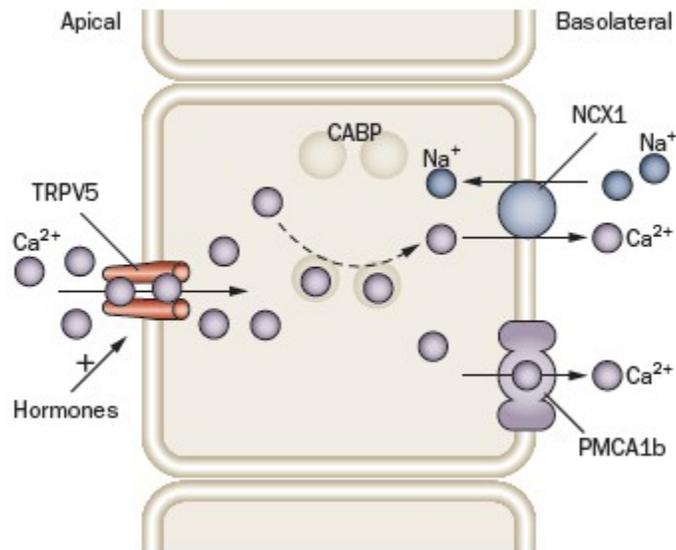


Figura 5: Papel de TRPV5 en la reabsorción de  $\text{Ca}^{2+}$  en el túbulo contorneado distal y túbulo conector. (Tomado de Abel, M. van, J. G. J. Hoenderop, and R. J. M. Bindels. 2005)

La afluencia de  $\text{Ca}^{2+}$  se produce a través TRPV5, que se encuentra en la membrana apical de la célula epitelial. El transportate intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  está mediado por la calbindina  $\text{D}_{9\text{k}}$  y la Calbindina  $\text{D}_{28\text{k}}$  (en sentido de ida y vuelta) y el  $\text{Ca}^{2+}$  se libera en la sangre a través de NCX1 y PMCA1b, los cuales están incrustados en la membrana basolateral de la célula. Varias hormonas estimulan la actividad TRPV5. Abreviaturas: CABP, calbindina; NCX1, intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ; PMCA1b,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la membrana plasmática; TRPV, proteína de receptor potencial transitorio relacionada receptor vanillnoide <sup>(22)</sup>

Por último, es importante destacar que en función a investigaciones realizadas en ratones los cuales se les ha suprimido el gen que codifica Calbindina- $\text{D}_{28\text{k}}$  o estudios utilizando drogas inmunosupresoras y con patologías renales han resultado concluyentes en la importancia de la

Calbindina D<sub>28k</sub> renal para el mantenimiento de la homeostasis del calcio <sup>(30)</sup>.

### **Receptores Transitorios Potenciales.**

#### **Familia de canales TRP**

Los canales TRP (Transient Receptor Potential) son canales de iones, que permiten a la célula responder a diferentes estímulos, en su mayoría son poco selectivos y permeables a iones calcio. Mediante aumento del calcio intracelular y despolarización de la membrana plasmática participan en una diversidad de procesos fisiológicos <sup>(31)</sup>. Los canales TRP forman una gran familia, el primer miembro en ser identificado y al cual esta familia de canales iónicos debe su nombre fue al canal TRP de *Drosophila melanogaster* <sup>(32)</sup>.

Los canales TRP son de particular importancia en la fisiología sensorial permitiendo al organismo, percibir diversos estímulos como luz, presión, olor, gusto, tacto, sonido y temperatura. A nivel celular, permiten responder a cambios locales tales como estrés mecánico, pH, cambios en el flujo de fluidos y frente a una diversidad de agonistas tanto exógenos como endógenos <sup>(31)</sup>. Son también parte de la maquinaria regulatoria de la homeostasis de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> <sup>(29)</sup>.

Los receptores TRP son canales catiónicos que permiten principalmente el flujo de Ca<sup>2+</sup> y Na<sup>+</sup> <sup>(33)</sup>. Se ha observado que distintas isoformas presentan variabilidad en su permeabilidad y selectividad entre cationes mono y divalentes <sup>(29)</sup>. Siendo su distribución tisular muy amplia, y su expresión prácticamente en todos los tejidos.

#### **Organización de la Familia TRP**

Luego de haber descubierto el canal TRP de *Drosophila*, los investigadores empezaron a buscar en otros organismos, encontrándose hoy en día alrededor de 28 canales TRP en mamíferos los que están siendo estudiados a nivel estructural y funcional. La familia de canales TRP es una de las más

grandes y conocidas, con representantes en especies muy distantes desde las levaduras hasta el humano <sup>(34)</sup>.

A diferencia de la mayoría de los canales de iones, los miembros de la familia de canales TRP se identifican por su homología de secuencia (Latorre, 2009). Es así como hasta hoy en día en mamíferos la familia de canales TRP se han agrupado en 6 subfamilias: TRPC1-7 (Canónica), TRPV1-6 (Vanilloide), TRPM1-8 (Melastatina), TRPP1-3 (Polycistina), TRPA1 (Ankyrina) y TRPML1-3 (Mucolipina) <sup>(31)</sup>.

La necesidad de entender el funcionamiento de los canales TRP se ha visto acrecentada debido a que estudios de asociación genética han relacionado mutaciones en estos receptores con enfermedades humanas <sup>(33)</sup>. Por ejemplo, mutaciones en miembros de la subfamilia TRPP producen la enfermedad autosómica dominante conocida como policistitis renal, la mutación de TRPML conduce a la mucolipidosis tipo IV, la alteración de TRPC6 produce la enfermedad autosómica dominante glomeruloesclerosis, y una mutación en TRPM6 causa hipomagnesemia e hipocalcemia <sup>(32)(33)</sup>.

### **Topología de Canales TRP**

Algoritmos de predicción indican que los segmentos transmembrana de canales TRP están relacionados con la superfamilia de canales catiónicos dependientes de voltaje tipo Shaker <sup>(35)</sup>, caracterizándose por presentar 6 dominios de transmembrana (S1-S6), con sus regiones amino y carboxilo terminales intracelulares, con diferentes dominios característicos de cada subfamilia

La región transmembrana es altamente conservada y puede ser dividida en 2 módulos, el sensor de voltaje/agonistas (S1 –S4) y la región del poro (S5 – S6) <sup>(35)</sup>.

El empleo de técnicas tanto bioquímicas como de microscopía sugieren que los canales TRP se oligomerizan formando un tetrámero funcional. Adicionalmente, la oligomerización de los canales TRP sería tanto homo como heterotetramérica, aunque esto solo se ha demostrado para algunos miembros de la familia <sup>(34)</sup>.

Otro de los motivos conservados en la secuencia de muchos canales TRP es el llamado “Dominio TRP”. Este dominio ubicado en la región C-terminal, justo después del segmento transmembrana S6 estaría relacionado con la sensibilidad a PIP2 y el control de la apertura de la compuerta <sup>(35)</sup>. Este dominio es una herramienta más al momento de reconocer canales TRP por homología de secuencias (Figura 6)

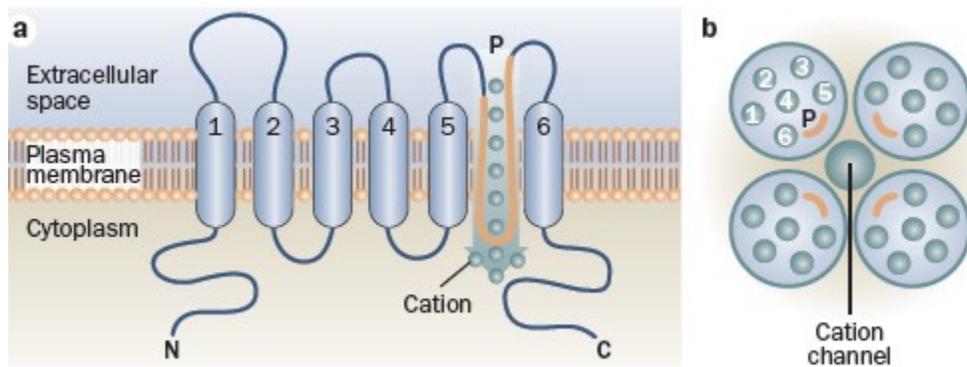


Figura 6: Estructura de receptor transitorio proteínas potenciales. (Tomado de Abel, M. van, J. G. J. Hoenderop, and R. J. M. Bindels. 2005)

La imagen esquemática de los seis dominios que atraviesan la membrana (1-6) de una proteína potencial receptor transitorio presenta el bucle de poro (P) se encuentra entre el dominio 5 y 6, y los terminales intracelulares amino (N) y carboxi (C) también se representan. En la figura b se observa como cuatro monómeros receptores transitorios potenciales se ensamblan en un canal catiónico funcional. <sup>(22)</sup>

### **Canales TRP en el riñón**

Los canales TRP están expresados en varios segmentos de la nefrona humana (Figura 7). TRPCs están presentes en los glomérulos y túbulos. específicamente, TRPC1 se expresa en el Mesangio glomerular, túbulo proximal, porción delgada, gruesa y ascendente del asa de Henle, mientras que TRPC3 y TRPC6 están confinados a los podocitos glomerulares y a las células principales de los túbulos colectores TRPM6 es altamente expresado en el complejo túbulo distal Sin embargo, las familias TRPP han sido encontrados en cilios primarios de células epiteliales renales de la túbulo distal y en el túbulo colector.

Se han encontrado TRPV1 en nervios sensitivos en el riñón, el TRPV4 en la porción descendente del asa de Henle y en la porción gruesa ascendente del asa de Henle, túbulo contorneado distal conexión del túbulo contorneado distal con el túbulo proximal Mientras que TRPV5 y TRPV6 se expresan en el túbulo contorneado distal y la conexión del túbulo distal con el túbulo colector, el con TRPV6 que se extiende en la región cortical y medular del túbulo colector. Por su parte, el TRPM3 se expresa predominantemente en el epitelio del túbulo colector, el papel de los canales TRP se relaciona en la patogénesis de diversos trastornos relacionados el manejo renal del calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y iones de magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ).

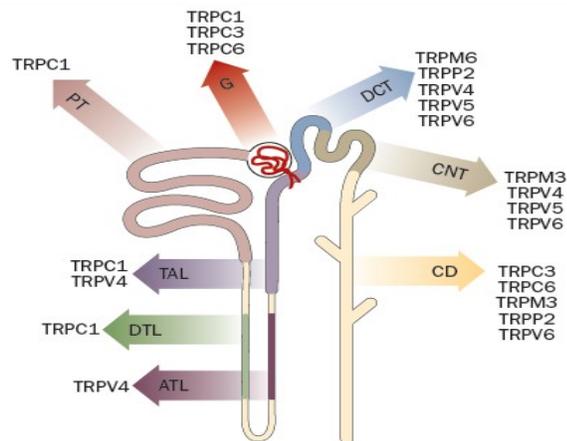


Figura 7: Expresión de los Receptores de potencial transitorio canal de expresión en la nefrona humana. Abreviaturas: ATL, porción delgada ascendente; CD, conductos colectores; CNT, túbulo conector; DCT, túbulo contorneado distal; DTL, extremidad delgada descendiente; G, glomérulo; PT, túbulo proximal; TAL, rama gruesa ascendente del asa de Henle; TRPC, receptor transitorio potencial de proteína canónica; TRPM, receptor transitorio potencial de la proteína melastatina; TRPP receptor transitorio potencial, de la proteína policistina; TRPV, receptor transitorio potencial de proteína vanilloide. (Tomado de Abel, M. van, J. G. J. Hoenderop, and R. J. M. Bindels. 2005).

El Calcio disponible en forma ionizada en el torrente sanguíneo pasa al citoplasma celular a través de transportadores de calcio, como lo son las proteínas de canales del calcio, proteínas de transferencia y bombas excretoras de proteínas. Uno de esos transportadores de calcio lo representan los canales TRPV (receptor transitorio potencial de proteína vanilloide). Estos canales poseen seis dominios transmembrana, permeabilidad a cationes monovalentes y a calcio y tienen importantes papeles en un amplio rango de procesos como fisiología sensorial, vasodilatación y transporte de calcio epitelial.

Los más conocidos son los canales epiteliales de calcio ECaC 1 y 2 correspondientes a los canales TRPV 5 y 6, los cuales parecen cumplir un papel importante en el incremento de calcio intracelular secundario a

desafíos osmóticos hiposmolares. Específicamente, TRPV5 apoya la resorción activa del calcio en el túbulo contorneado distal a nivel renal facilitando la entrada apical del calcio, tomando el ion calcio del espacio luminal a la célula epitelial, además de ser esencial para la resorción ósea por osteoclastos; su deficiencia se asocia a poliuria, acidificación de la orina y reducción del espesor óseo. <sup>(22)</sup>

### **Intercambiador sodio/calcio (ncx)**

El intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) se encuentra en la membrana plasmática y tiene por función universal al actuar como una vía de expulsión del Calcio hacia el espacio extracelular, protegiendo así a las células de una sobrecarga de Calcio utilizando la energía almacenada en el gradiente electroquímico de  $\text{Na}^+$  para extruir  $\text{Ca}^{2+}$  de la célula, sin embargo, el intercambiador puede, en ocasiones, operar en el modo reverso y causar influjo de  $\text{Ca}^{2+}$ , como ocurre en el potencial de acción cardíaco, donde un incremento temporal de la concentración de  $\text{Na}^+$  en el citoplasma revierte la dirección de operación del intercambiador, que resulta en un rápido influjo de  $\text{Ca}^{2+}$ . Una vez que la concentración de  $\text{Na}^+$  disminuye en el interior de la célula, el intercambiador revierte su acción a la extrusión de  $\text{Ca}^{2+}$ .

### **El intercambiador Sodio/ Calcio de la membrana plasmática**

En la década de los años 60, se obtuvieron las primeras evidencias acerca de la existencia del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  en el músculo cardíaco y desde entonces esta proteína ha sido detectada virtualmente en todos los tejidos y en especies, como el hombre, el perro, el calamar y la mosca de la fruta. Siendo la función principal del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  extruir  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citoplasma, intercambiándolo por  $\text{Na}^+$ , sin consumo directo de ATP, ya que utiliza el gradiente electroquímico favorable del Sodio en forma iónica. <sup>(19)</sup> Además, el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  puede realizar intercambios  $\text{Ca}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+/\text{Na}^+$ . Todas las formas del movimiento de iones del intercambiador se

resumen en la figura 8.

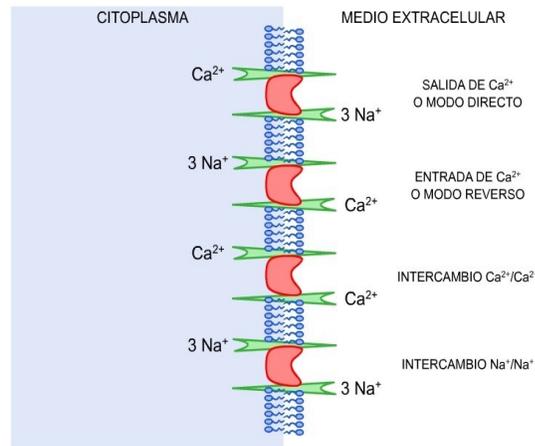


Figura 8. Diferentes modos de transporte de iones vía el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (Tomado de Díaz ,2003)

Es importante destacar que el intercambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  es electrogénico, pues su estequiometría es  $3\text{Na}^+:1\text{Ca}^{2+}$ , creándose una corriente eléctrica hacia el citoplasma por el movimiento de una carga positiva neta. Además, el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  es sensible a cambios en el potencial de membrana y al gradiente de  $\text{Na}^+$ .

El intercambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  es una reacción que incluye 2 sustratos y su mecanismo puede ser clasificado como secuencial o consecutivo (ping-pong). En el mecanismo consecutivo, el primer sustrato es unido por la proteína y el primer producto es liberado antes de la unión del segundo sustrato, mientras que en el secuencial, ambos sustratos se unen a la proteína antes de la liberación de los productos.

### **Características moleculares del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$**

Existen 3 isoformas del intercambiador que han sido identificadas en mamíferos: la NCX1, la NCX2 y la NCX3. La NCX1 se encuentra ampliamente distribuida en el corazón y en muchos otros tejidos y tipos

celulares. En cambio, la expresión de la NCX2 y la NCX3 se limita al cerebro y al músculo esquelético.

La isoforma NCX1 posee sitios de splicing alternativos en 6 exones: A, C, D, E y F. Sin embargo, todas las variantes incluyen a los exones A o B, que se excluyen mutuamente. Las isoformas con combinaciones de exones diferentes presentan variabilidades especie-específicas y expresiones tejido-específicas. Los tejidos excitables poseen usualmente intercambiadores que contienen el exón A, mientras que en otros tejidos predomina el exón B. Por ejemplo: en el corazón se encuentra una isoforma única (NCX1, combinación de exones ACDEF) del intercambiador, mientras otros órganos como el riñón o el cerebro, presentan 2 o más isoformas. Hasta el momento, no se conoce el significado fisiológico y funcional de la existencia de diferentes variantes de splicing descritas. <sup>(36)</sup>

### **Estructura y topología en la membrana del intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>.**

El intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> posee dos dominios hidrofóbicos que contienen los fragmentos transmembrana. Estos dominios están separados por un lazo intracelular largo constituido por 550 aminoácidos (figura 9). El dominio hidrofóbico N-terminal posee 5 segmentos transmembrana y el C-terminal está formado por 4 segmentos de este tipo. Mediante la eliminación del lazo intracelular, se demostró que esta región no es esencial para el transporte iónico y que los segmentos transmembranas son los responsables de la función de la proteína. Sin embargo, el lazo intracelular contiene secuencias relacionadas con funciones reguladoras, tales como una zona de splicing alternativo y un dominio de unión a Ca<sup>2+</sup>.

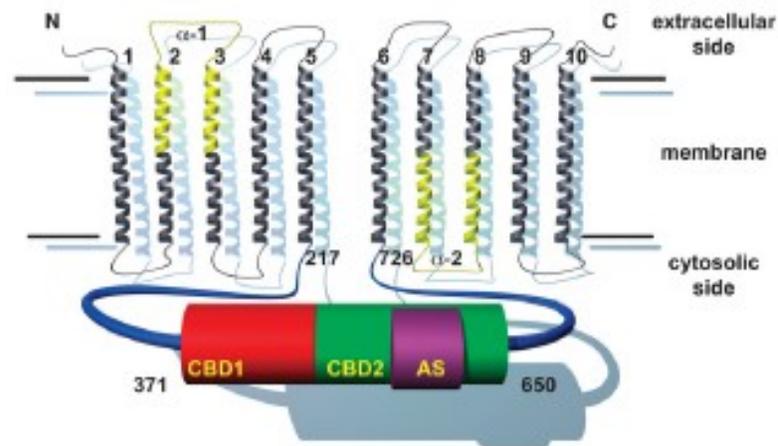


Figura. 9. Modelo actual de la topología del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . La proteína posee 10 segmentos, los cuales atraviesan la membrana plasmática, el sitio de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  regulatorio (CBD1, CBD2) y la región correspondiente a la secuencia de ARN donde ocurre el splicing alternativo (AS). (Tomado de Mark Hilge 2012).

Normalmente, el intercambiador utiliza solamente el ion sodio para realizar su función y este requerimiento es muy riguroso. La sustitución de la treonina por la valina en la posición 103 no solo permite la realización de intercambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , sino también  $\text{Li}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Existen también secuencias homólogas en el lazo intracelular. Estas poseen un tamaño aproximado de 60 aminoácidos y se denominaron  $\beta$ -1 y  $\beta$ -2. Sin embargo, hasta el presente no se conoce la importancia de estas regiones en la función de la proteína.<sup>(19)</sup>

Generalmente, el intercambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  no se afecta por mutaciones en el lazo intracelular, aunque algunas de estas pueden influir sobre las propiedades reguladoras del propio  $\text{Ca}^{2+}$ . Por ejemplo, el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  se inactiva si no hay  $\text{Ca}^{2+}$  unido a un sitio localizado en el lazo intracelular. Algunos autores han propuesto que las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  inferiores a 100-300 nmol/L pueden inactivar el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  y otros sugirieron que estas pueden ser menores (20-50 nmol/L). Hasta el presente, no existe un consenso en relación con estos valores.

### **Papel fisiológico del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$**

En el músculo cardíaco, el acoplamiento de la excitación-contracción comienza cuando se activan los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L por la despolarización del potencial de membrana. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de estos canales incrementa localmente la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , hasta valores suficientes para activar además la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico por los canales R y R, mediante un fenómeno conocido como "liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$ ". El intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  extruye el  $\text{Ca}^{2+}$  que entra a la célula desde el espacio extracelular, y este es distribuido por toda la superficie extracelular, incluyendo los túbulos transversales. El intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  puede además operar en el modo reverso y suministrar el  $\text{Ca}^{2+}$  necesario para activar los canales RyR, del mismo modo que lo hacen los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-L. Esto posiblemente ocurriría después de la despolarización, cuando los niveles locales de  $\text{Na}^+$  intracelular pudieran favorecer la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ .

El intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  a nivel neuronal se ha demostrado a través de imágenes obtenidas mediante técnicas de inmunofluorescencia que existe una alta concentración del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  en las zonas de sinapsis neuronal y en las uniones neuromusculares. Debido a que las señales locales de  $\text{Ca}^{2+}$  parecen ser importantes en la sinapsis neuronal, probablemente el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  participe en la extrusión de  $\text{Ca}^{2+}$  que entra a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática.<sup>(36)</sup>

El intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  en el riñón, junto al corazón y al cerebro, son 3 fuentes ricas en proteína del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . En el riñón, la más alta concentración del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  se localiza en el túbulo colector de la nefrona, el NCX1 de las células epiteliales de la nefrona distal está involucrado en activar la reabsorción del Calcio <sup>(37)</sup>. Por otra parte, se han

descrito diferentes isoformas del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  en el riñón y estas pudieran explicar funciones diferentes para este tejido

Recientemente, el papel fundamental del NCX en la homeostasis celular de calcio ha sido definitivamente demostrado por la generación de ratones con destrucción de un gen funcional NCX. Los ratones deficientes NCX1 homocigotos -no son viables, y mueren entre 9 y 10 días de estado embrionario, debido principalmente a la falta de desarrollo del sistema cardiovascular <sup>(38)</sup>; por lo tanto, el intercambiador Sodio /Calcio NCX es esencial para la vida.

En este sentido, los riñones contribuyen a la homeostasis del calcio por controlar excreción de calcio. Sólo sin consolidar el calcio, que es el 60% del calcio total, se filtra y la mayoría del calcio filtrado se reabsorbe en el túbulo proximal (PT) y en la porción ascendente del asa de Henle (TAL) en forma pasiva mediante espacios intercelulares impulsado por reabsorción de sodio y agua (1).

La regulación precisa de excreción de calcio se produce en la nefrona distal, donde una pequeña fracción de calcio filtrado es reabsorbido por transporte de calcio activo transcelular.

Los transportistas involucrados en este proceso son los receptores transitorios potencial vanilloide receptor 5 (TRPV5) y receptores transitorios potencial vanilloide receptor 6 (TRPV6) en la membrana luminal, la Calbindina  $\text{D}_{28\text{k}}$  en el citoplasma, y el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  tipo 1 (NCX1) y el transportador de  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa de membrana plasmática (PMCA) en el área de la membrana basolateral (21). De estos transportadores el TRPV5 se ha considerado que desempeña el papel más importante en la reabsorción de calcio activo y su coexistencia con

Calbindina D<sub>28k</sub> , NCX1 y PMCA ha sido demostrada por inmunohistoquímica  
(30)

Estos hallazgos conllevan a profundizar en el análisis de las atribuciones del gen *Msx2* en los procesos nefrológicos de nivelación del calcio y sus consecuencias, a efectos de completar o confirmar los descubrimientos reportados por la comunidad científica, como los reportados por Bolaños, 2010 quien observó en Ratones *MSX2* alteraciones en la proteína Calbindina D<sub>28k</sub> , involucrada en el metabolismo del Calcio a nivel renal con variaciones en la expresión de las proteínas TRPV5, SLC8A1a nivel de la nefrona renal.

En función a lo expuesto anteriormente, se plantea el estudio a nivel renal del ratón mutante *MSX2* para contestar las siguientes interrogantes:

Los ratones mutantes por el gen *Msx2* KI tienen una morfología renal diferente a los ratones salvajes? Existirá una modificación del nivel de expresión de las proteínas transportadoras de calcio en los ratones mutantes *Msx2* KI? De ser así, ¿En cuales zonas del tejido renal se expresarán las proteínas transportadoras de calcio en los ratones mutantes por *Msx2*?

## **OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION**

### **OBJETIVO GENERAL:**

- Analizar las alteraciones renales consecutivas en la invalidación del gen Msx2

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Identificar la expresión de los canales TRPV5 y NCX1 en los riñones de los ratones salvajes Msx2<sup>+/+</sup> y ratones transgenicos Msx2<sup>-/-</sup>
- Determinar la especificidad de los anticuerpos dirigidos contra TRPV5 y NCX1 con Western Blot
- Comparar las condiciones del metabolismo del calcio en ratones salvajes Msx2<sup>+/+</sup> y ratones transgenicos Msx2<sup>-/-</sup>
- Analizar la morfología renal de los ratones salvajes Msx 2 <sup>+/+</sup> y ratones transgénicos Msx2 <sup>-/-</sup> con coloraciones.

## **II MATERIALES Y MÉTODOS**

El presente estudio constituye una investigación de tipo exploratoria, debido a que el problema de investigación no ha sido abordado antes; descriptiva, porque refiere minuciosamente lo que es; explicativa, ya que responde a las causas de los eventos físicos y en función al diseño se trata de investigación de tipo preexperimental y por tratarse de una investigación sistemática en la cual no tiene control directo sobre la variable independiente se considera ex post facto, (39)(40). En función a esto, se hace necesario abordar el problema desde diferentes aspectos, razón que explica los métodos que se utilizaron y se exponen a continuación.

### **ESTUDIO CON JAULAS METABÓLICAS**

En esta fase se utilizaron modelos animales, específicamente ratones WT tipo Swiss y ratones transgénicos Msx2 sometiéndolos a un régimen alimenticio normal durante una semana; posteriormente ambos modelos animales estarían con régimen alimenticio bajo en calcio para analizar las condiciones metabólicas renales del calcio y posteriormente, se someten a ambos modelos animales a tratamiento con bifosfonatos. Los medicamentos con bisfosfonato se utilizan para disminuir los efectos de los osteoclastos en el hueso y así determinar, si existe alguna condición de excreción o acumulación de calcio puede ser reversible.

**Animales de Experimentación:** El modelo experimental se realizó en ratones machos WT CD1 Swiss Webster con peso de 36 a 32 grs y 90 días de nacidos y ratones machos transgénicos MSX2 con peso de 27 a 22 grs y 90 días de nacidos.

Para efectos de esta investigación, la población es infinita tanto para ratones CD1 Swiss como para ratones mutantes knock-in (KI) del gen Msx2, estos

últimos fueron generados por la inserción del gen LacZ bacteriano dentro de la secuencia de codificación del gen Msx2.

Los ratones Msx2 / lacZ fueron generados en el laboratorio de Genética Molecular de la morfogénesis en el Instituto Pasteur (Dr. Robert Benedict). La construcción hecha consistió en la sustitución del gen de interés, Msx2, por el gen lacZ en células madre embrionarias (ES) por recombinación homóloga.

Estas células fueron inyectadas de nuevo a los ratones pseudo embarazadas para dar lugar a ratones mosaicos, que por cruzamiento han dado lugar a la supresión de una copia del gen Msx2 en todas las células en los ratones heterocigotos para la segunda generación. Cruces sucesivos de estos animales heterocigotos permitieron la obtención de ratones mutantes nulos para Msx2 (homocigotos para la mutación). Después de la recombinación homóloga, el locus del gen Msx2 / LacZ corresponde a una región que contiene la 5 'UTR del exón 1, la secuencia LacZ (insertado en el codón ATG iniciador por creación de un sitio NcoI), la secuencia Neo (a terminando en el codón de parada en lugar de un sitio web GbvII modificado EagI) y la mayoría de la 3 'UTR del exón 2. Por lo tanto una delección completa del gen de Msx2 y sustituyendo el gen lacZ que codifica la  $\beta$ -galactosidasa dió origen a estos modelos animales transgénicos. (Figura 10).

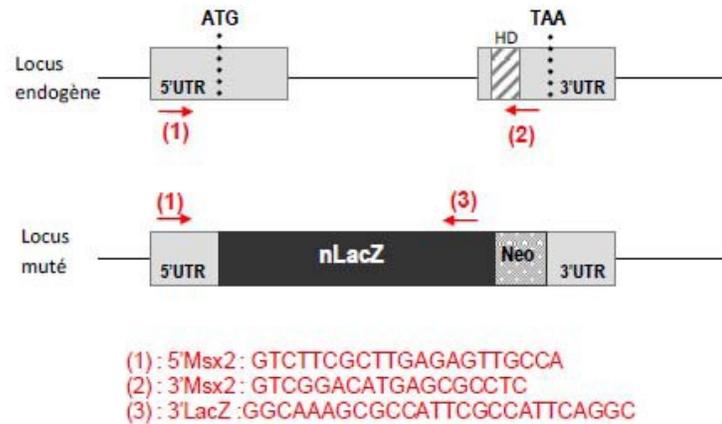


Figura 10: Esquema del knock-in del gen Msx2; rojo, la posición de los cebadores utilizados para el genotipado (Tomado de Bolaños, 2010)

Se aparearon machos y hembras heterocigotos (utilizando un fondo genético CD1 Swiss).<sup>(13)</sup>

Sus camadas se dividieron en dos grupos, con fines comparativos, el ratón tipo salvaje homocigoto para el gen Msx2 (+/+), y ratón tipo transgénico homocigoto para el gen Msx2 (-/-)

Los animales se mantuvieron en el Laboratorio de Genómica, Fisiología y Fisiopatología Renal de la Universidad Paris Descartes 3 con las siguientes condiciones: ciclo luz-día de 12 horas, temperatura 22-26 °C, un animal por cada jaula, agua y comida ad libitum. Siendo en total 3 ratones machos WT Swiss (Msx2 +/+) y 3 ratones transgénicos Msx2 (Msx2 -/-)

Todo esto, siguiendo las normas de Bioética reglamentadas por el Centro de Investigaciones de Cordeliers, el cual está certificado bajo el número n°A-7506-12 y se rigen por las normas del Consejo Europeo de 1985 y la convención STE 123.

**Controles de peso diarios:** Se realizaban a la misma hora 9:30 am en balanza compacta Serie DL 500g 0,1g Modelo DL-501, plato de 138x138 mm. Marca Denver Instruments.

**Recolección de muestras de orina:** En el envase dispuesto en cada jaula metabólica se tomó con pipeta la muestra de orina recolectada en 24 horas y se almacenó en tubos Eppendorf identificados por modelo animal durante los 5 días de la dieta normal para luego determinar valores de Calcio, y Creatinina en orina.

**Recolección de sangre:** A cada modelo animal, el quinto día de la dieta normal se les tomó una muestra de sangre con le técnica de punción retroorbital, de la vena retroorbital del ojo derecho de cada modelo, tomando de 1 a 2 ml aproximadamente para analizar directamente en el analizador de gases sanguíneo Marca Radiometer Copenague modelo ABL77.

**Tratamiento con Bifosfonato:** Se preparó una solución de 10 ml en 5 ml de Acido Zoledronico (Zometa®), un derivado del bifosfonato en solución salina isotónica, inyectándose en dosis de 100  $\mu$ g / gr peso , la cual se aplicó vía subcutánea durante 6 días tanto a modelos animales Msx2 +/+ y Msx2 -/-.

### **Fase de Biología Celular**

En esta fase se consideró como muestra la constituida por riñones de ratones machos, de 90 días de nacidos, Msx2+/+ y de ratones Msx2-/-, de los cuales se tomaron 30 cortes histológicos para cada grupo, en donde se identifiquen estructura renal.

### **Histología:**

Se realizó la disección de riñones y se fijaron durante la noche en 4% de paraformaldehído, posteriormente se deshidrataron, e incluyeron en

parafina. Una vez obtenido el bloque, se realizaron cortes en micrótopo de 4 micras de ancho, posteriormente se eliminó la parafina con xilol y se rehidrataron los cortes por una serie de baños de alcohol graduadas a diferentes concentraciones para posteriormente ser procesados por técnica de coloración Van Gieson e Inmunohistoquímica (Universal Quick Kit, Vectastain).

### **Coloración Van Gieson**

Se lavan los cortes con agua destilada por 5 minutos y posteriormente se introducen en los tanques con hematoxilina por 5 minutos, para posteriormente lavar con agua destilada hasta que los núcleos se observan al microscopio, posteriormente se pasa por alcohol acidulado 1 segundo y se lava profusamente con agua destilada y teñir con solución de Van Gieson por 4 minutos para luego lavar con alcohol absoluto y xilol.

### **Western Blot**

Se realizó un análisis de Western de tejido renal homogeneizado de los modelos animales de TRPV5, Calbindina D<sub>28k</sub>, NCX1 y B-Actina como control positivo para validar la presencia de las proteínas en ese tejido.

Los trozos de tejido se homogeneizaron por un mortero homogeneizador en hielo y las concentraciones de las proteína de TRPV5, Calbindin-D<sub>28k</sub> y NCX1 fueron determinados por espectrofotómetro ultravioleta. Después de la electroforesis, se presentaron todos los geles a electrotransferencia para transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa que se lavó con solución salina tampón PBS 1X. Después del lavado, la membrana se incubó con solución buffer bloqueadora "Odyssey " durante 1 h y luego durante 1 h con un anticuerpo primario policlonal conejo anti-rata TRPV5 diluido a 1: 500. El anticuerpo secundario de cabra anti-ratón a la dilución 1: 10000 seguido por la detección con Cabra anti-conejo IgG a 1:10000 y se

incubó con tampón de bloqueo durante 45 minutos. Por fin, la membrana de nitrocelulosa se lavó cuatro veces por 5 minutos con PBS 1X +0.1% Tween 20.

El mismo procedimiento se realizó para NCX1, con un anticuerpo primario policlonal de conejo en dilución 1:400 y para Calbindina  $D_{28k}$ , se empleó un anticuerpo primario de conejo anti-rata en concentración 1:100. Todas las proteínas incluyendo TRPV5, Calbindina  $D_{28k}$ , NCX1 y el patrón interno ( $\beta$ -actina) se detectan con sistema infrarojo de imágenes Odyssey CLx y se cuantificaron por Image Studio™ Software de Odyssey

### **Inmunohistoquímica:**

Los cortes de 4 micras ancho se incubaron en la solución de trabajo del suero bloqueante del sistema (Universal Quick Kit, Vectastain, Vector Laboratories, England) por 10 minutos, para luego ser incubados en el anticuerpo primario (TRPV5 monoclonal de conejo, Abcam Laboratories, England) 1/100; NCX1 policlonal de conejo Santa Cruz, USA 1/100 y 1/50; Calbindina  $D_{28k}$  polyclonal de conejo Swant, Bellinzona, Switzerland; 1/1000) durante 1 hora.

Posteriormente se incubó en anticuerpo secundario biotinilado del sistema Universal Quick Kit, Vectastain por 10 minutos y en streptavidina/peroxidasa por 5 minutos para finalmente incubar en sustrato peroxidasa (Sistema Impact Nova Red; Vector Laboratories, England) por un tiempo máximo de 8 minutos. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente.

### **Fotografías:**

Los resultados de las técnicas de coloración e inmunohistoquímica se registraron en laboratorios de Francia con microscopio DMRB acoplado a una cámara digital N°DF7000 de Leica, y en Venezuela con microscopio

Nikon Eclipse E600 acoplado a cámara digital Nikon Coolpix 995.

### **III RESULTADOS**

#### **Estudio metabólico con jaulas**

Este estudio hasta la fecha solo presenta resultados preliminares ya que el diseño de esta fase es de larga data, en este caso, se observa la relación del índice calcio/creatinina en orina durante la etapa de dieta normal y dieta baja en calcio (Tabla N° 1)

Tabla 1 : Índice calcio /creatinina en Modelos animales Msx2+/+ y Msx2 -/- bajo régimen alimenticio normal y bajo en calcio n= 6

Índice Calcio / Creatinina	Valor promedio dieta normal en calcio	Valor promedio dieta baja en calcio
Modelo animal Msx2 +/+ (WT)	0,40	0,22
Modelo animal Msx2 -/-	0,79	0,79

Fuente: Notas del autor. 2014.

Grafico 1 : Índice calcio /creatinina en Modelos animales Msx2+/+ (WT) y Msx2 -/- bajo régimen alimenticio normal y bajo en calcio

**Ca/Cr**



Grafico 2 : Índice calcio /creatinina en Modelos animales Msx2<sup>+/+</sup> (WT) y Msx2<sup>-/-</sup> bajo régimen alimenticio normal y bajo en calcio

Se observa que la relación calcio/creatinina en orina en los ratones Msx2<sup>-/-</sup> es alta, de 0.79; en comparación con la relación calcio/creatinina en orina de los ratones Msx2<sup>+/+</sup> que es de 0,40. A su vez, se observa una vez administrado el régimen alimenticio bajo en calcio, los valores del índice calcio/creatinina disminuyen en los ratones Msx2<sup>+/+</sup> a 0.22; mientras que en los ratones Msx2<sup>-/-</sup> se mantienen iguales.

Con respecto a los resultados de la gasometria en sangre se tiene que

existen diferencias interesantes en cuanto a valores de hematocrito, sodio, potasio cloro y bicarbonato, sin embargo, los valores de calcio en sangre de ambos modelos animales se presentan muy similares

Tabla 2 : Valores de gasometria en sangre de Modelos animales Msx2+/+ y Msx2 -/-

Modelo Animal	pH	Hct	Na mmol/L	K mmol/L	Ca mmol/L	cCl	cHCO3(P)
Msx2 +/+	7,29	38%	137,25	7,10	1,10	48,35	22,90
Msx2 -/-	7,25	49%	151,50	6,65	1,21	119,50	52,60

Fuente: Notas del autor. 2014.

En función a lo observado con respecto a la hipercalciuria en los modelos animales, se procede al tratamiento con bifosfonatos, específicamente, ácido zoledrónico, un derivado de bifosfonatos se observa lo siguiente

Tabla 3 : Índice calcio /creatinina en Modelos animales Msx2+/+ y Msx2 -/- bajo tratamiento con Acido Zoledrónico ( Zometa®). n= 6

Índice Calcio / Creatinina	Valor promedio dieta normal en calcio	Valor promedio dieta normal en calcio con tratamiento con Zometa
Modelo animal Msx2 +/+ (WT)	0,43	0,42
Modelo animal Msx2 -/-	1,42	0,93

Fuente: Notas del autor. 2014.

Grafico 3: Índice calcio /creatinina en Modelos animales Msx2+/+ (WT) y Msx2 -/- bajo tratamiento con Acido Zoledrónico (Zometa<sup>®</sup>).

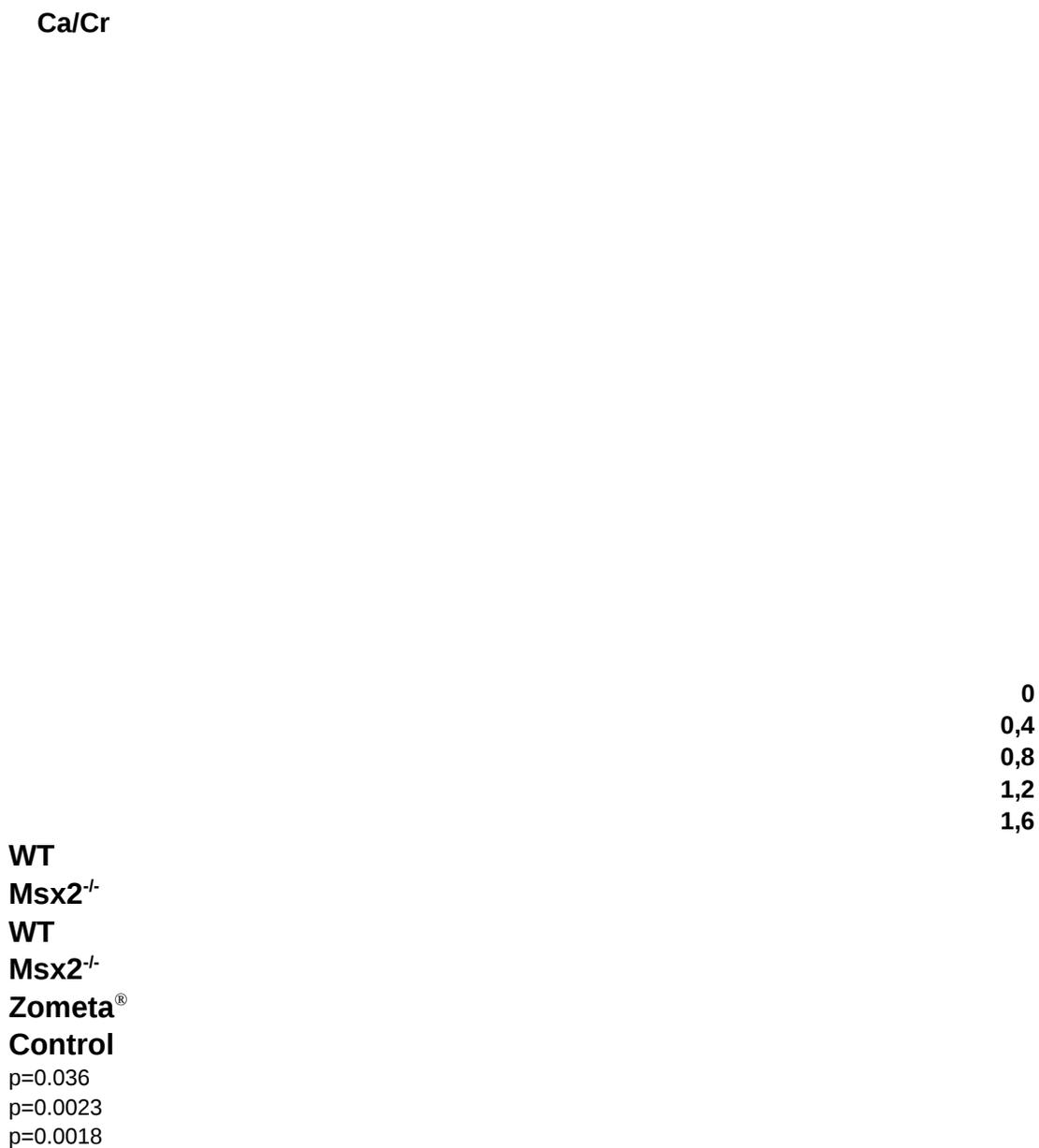


Grafico 3: Índice calcio /creatinina en Modelos animales Msx2+/+ (WT) y Msx2 -/- bajo tratamiento con Acido Zoledrónico (Zometa<sup>®</sup>).

Como se observa en los resultados, los ratones Msx2 +/+ (WT) antes y después del bifosfonato presentaron valores muy similares de índice calcio. Creatinina, de 0,42 y 0,43, respectivamente mientras que los ratones Msx2 -/- presentan una disminución notable de los valores del índice de calcio/creatinina de 1,42 a 0,93.

### **Fase Biología Celular**

#### **Coloración Van Gieson. Análisis fenotípico descriptivo**

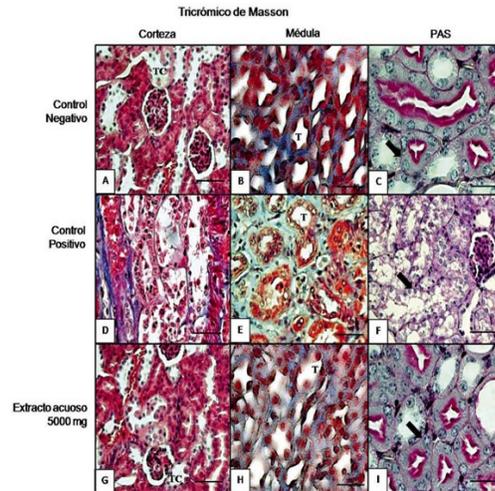
Los túbulos renales y otras microestructuras fueron identificados en base a características microscópicas y localización anatómica en el microscopio óptico tomando como referencia estructuras identificables con coloraciones como hematoxilina - eosina (Figura 11) en las láminas teñidas con la coloración Van Gieson para identificar colágeno el cual debe verse de color rojo, el núcleo de color marrón a negro y el citoplasma de color amarillo.

En ambos modelos animales, a nivel de la corteza renal, se encuentran los túbulos proximales, de mayor calibre y la estructura más larga de la nefrona, compuesto de dos sectores: el túbulo contorneado proximal y tubo recto proximal.

El tubo proximal nace del polo urinario de la cápsula de Bowman por lo que el epitelio plano simple de ésta última se continua con el epitelio cúbico simple. El túbulo contorneado proximal poseen células en cuyo extremo apical posee microvellosidades muy apretadas por lo tanto la luz de esas

estructuras posee un aspecto de “estrella”.

También a nivel de corteza se encuentra una mayor proporción de túbulos distales cuyo epitelio es cúbico simple con células más pequeñas y escasas microvellosidades cortas por lo que carece de un borde en cepillo por lo que la luz de los túbulos es ancha.

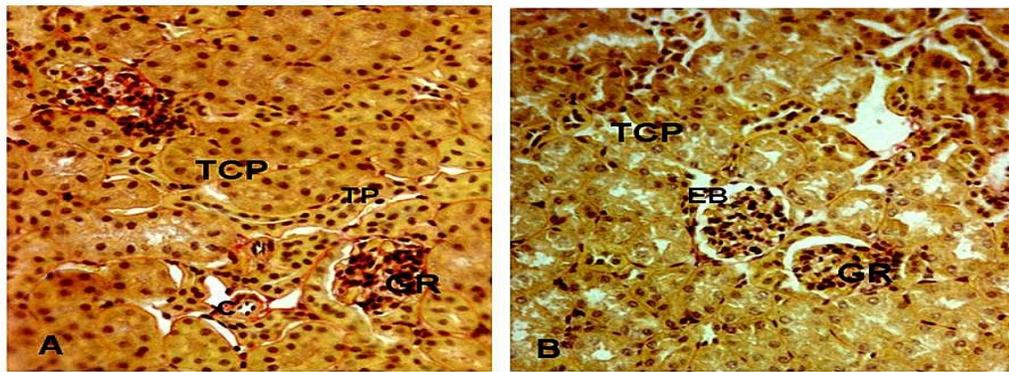


**Figura 11:** Corteza renal que muestra la presencia de glomérulos renales (G) y túbulos contorneados (TC) de características histológicas normales con coloración de Hematoxilina eosina en riñón de ratón (Tomado de Rivero et al, 2011)

A nivel medular es común encontrar el asa de Henle, el segmento delgado posee un epitelio plano simple y los núcleos sobresalen en la luz del conducto. El segmento grueso es semejante al túbulo distal.

El túbulo colector tiene epitelio cúbico simple con células principales y células intercalares. Los conductos colectores tienen una porción cortical y otra medular. Su epitelio cambia al descender en la médula, las células se hacen más altas y tienen más uniones complejas. El diámetro del conducto aumenta progresivamente (41)

Llama la atención como en el ratón *Msx2*<sup>+/+</sup> se observa a nivel de glomérulo el pigmento color rojo característico del tejido colágeno de la tinción de Van Gieson, lo cual se relaciona directamente con la alta presencia de capilares en la zona (Figura 12 A). Mientras tanto en el ratón *Msx2*<sup>-/-</sup> los glomérulos presentan menos intensidad del color rojo correspondiente al tejido conectivo (Figura 12B).



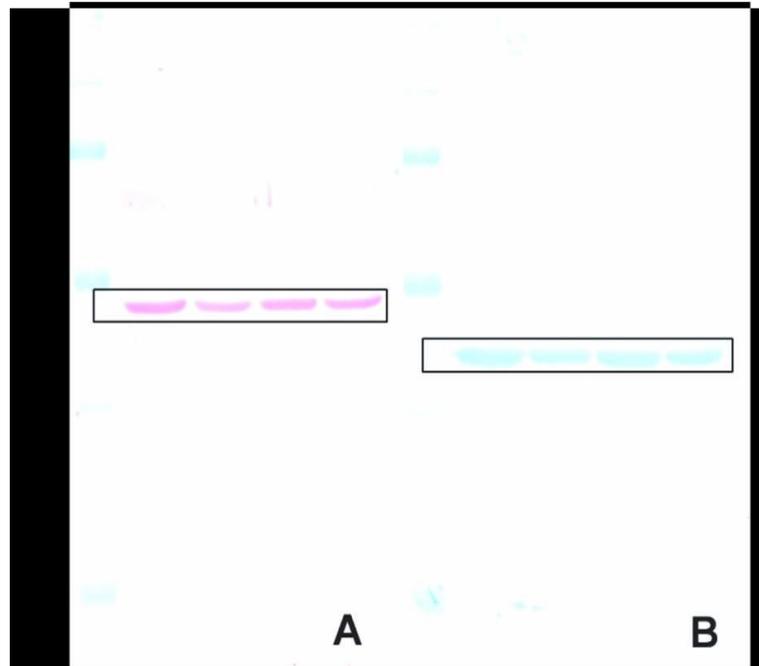
**Figura 12: A)** Coloración Van Gieson: Riñón Ratón<sup>+/+</sup> 90 días Obj 20X Corteza renal, se observan las células correspondientes a glomérulos renales (**GR**) se observan tubo proximal con epitelio plano simple (TP), la presencia de capilares (**c**) y las células altas del túbulo contorneado proximal (**TCP**) se ven casi ocluyendo la luz en el corte histológico. **B)** Coloración Van Gieson Riñón Ratón <sup>-/-</sup> 3 meses 90 días Obj 20X. Corteza renal, se observan las células correspondientes a glomérulos renales (**GR**) con un amplio espacio de Bowman (**EB**) Las células altas del túbulo contorneado proximal se ven casi ocluyendo la luz en el corte histológicos.

### Western Blot

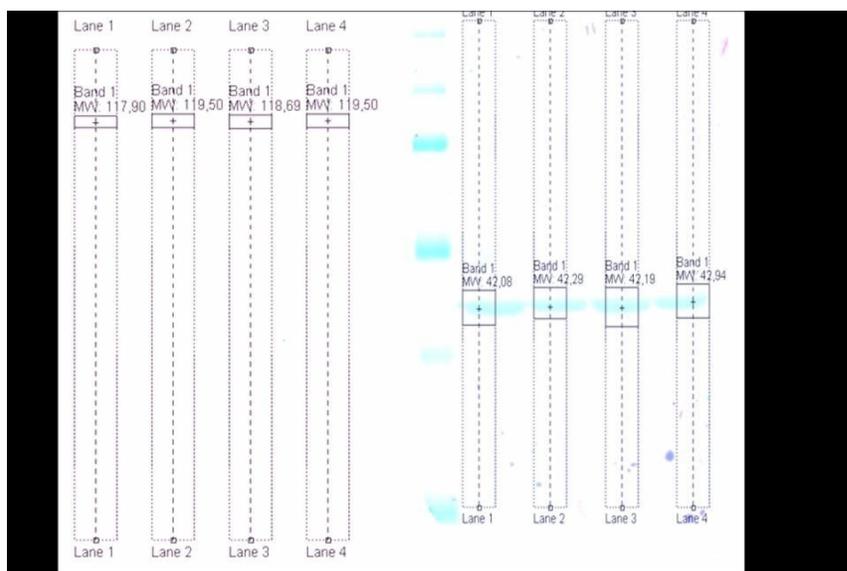
En vista de la dificultad de tener un anticuerpo específico de cada proteína, esta fase se realizó para probar diferentes anticuerpos con la técnica de Western Blot. Se reveló la proteína TRPV5 cuyo peso molecular es de 85

kD (Figura 13). Se determino la presencia de las TRPV5 y NCX1 por Western Blot en el tejido renal de ratones MSX2+/+.

Por su parte, la proteína NCX1 se expresa de igual manera en el tejido renal de MSX2 ++ ya que se expresó con su peso molecular de 119 kD (Figura 14).



**Figura 13:** Expresión de proteínas en tejido renal MSX2 ++ de manera específica para los anticuerpos **A)** TRPV5 1:500PM: 85 kD y **B)**  $\beta$ -ACTINA 1:100 PM: 43 kD (Control positivo).

**A B**

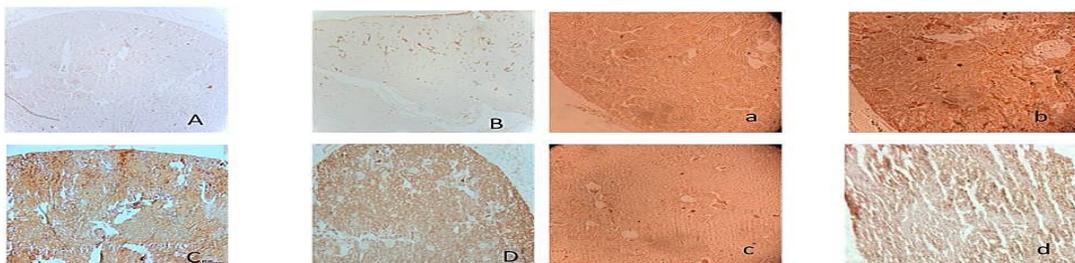
**Figura 14:** Expresión de proteínas en tejido renal MSX2 +/- de manera específica para proteínas **A)** NCX1 1:400 PM: 119 kD y **B)**  $\beta$ -ACTINA 1:100 PM: 43 kD (Control positivo)

### Inmunohistoquímica

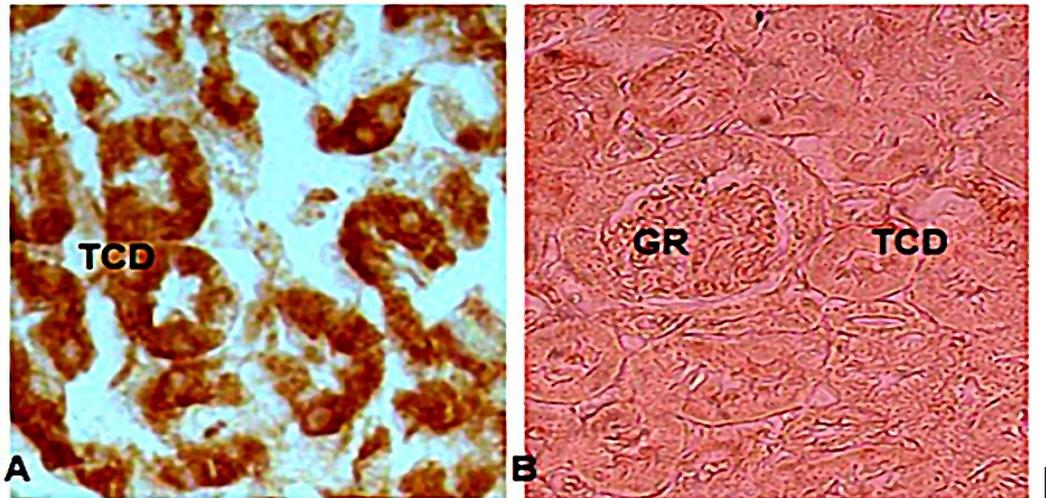
La localización de las proteínas transportadores de calcio en el riñón se examinó mediante inmunohistoquímica; la observación se realizó con microscopios ópticos de diferentes laboratorios por motivos de localización de los tejidos y cortes, de las proteínas transportadoras de calcio TRPV5, Calbindina-D<sub>28k</sub> y NCX1 se detectaron de manera específica en la corteza renal de ratones *Msx2 + / +* y *Msx2 - / -*. (Figura 15)

Con respecto a TRPV5 se observa la expresión de la proteína a nivel del túbulo contorneado distal y túbulo colector de ratones *MSX2+/+*, mientras que la tinción fue baja en los modelos animales transgénicos *Msx2 -/-*. (Figura 16)

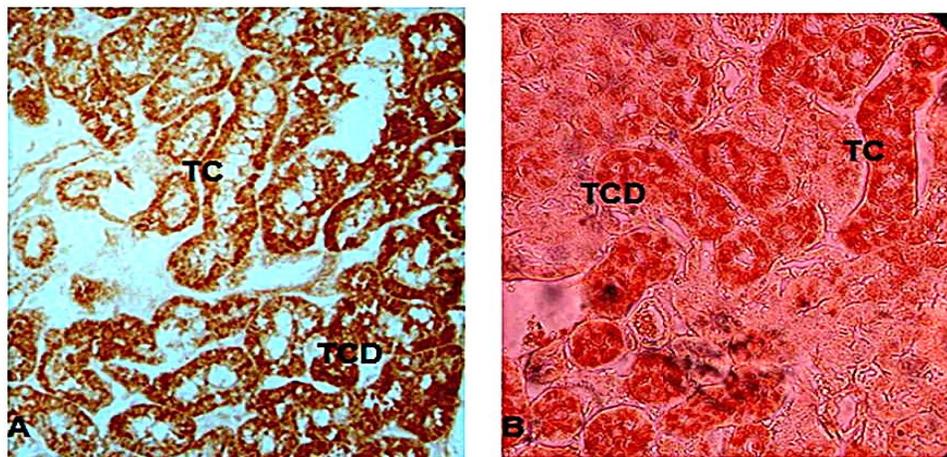
Sin embargo, la expresión NCX1 se observó en ambos grupos de tejidos, específicamente a nivel de los tubos conectores y tubo colector con mayor intensidad que TRPV5 incluso. (Figura 17). Con respecto a la presencia de Calbindina D<sub>28k</sub>, es altamente notoria con la misma intensidad en ambos grupos en ratones de estudio. (Figura 18)



**Figura 15:** Inmunohistoquímica de corteza renal. Ratones *MSX2 +/+* Obj 5X **A:** control negativo **B:** control positivo con Calbindina D<sub>28k</sub> **C:** TRPV5 1/100 **D:** NCX1 1/100. Ratones *MSX2-/-* Obj 10X **a:** control negativo, **b:** control con Calbindina D<sub>28k</sub>, **c:** TRPV5 1/100. **d:** NCX1 1/100

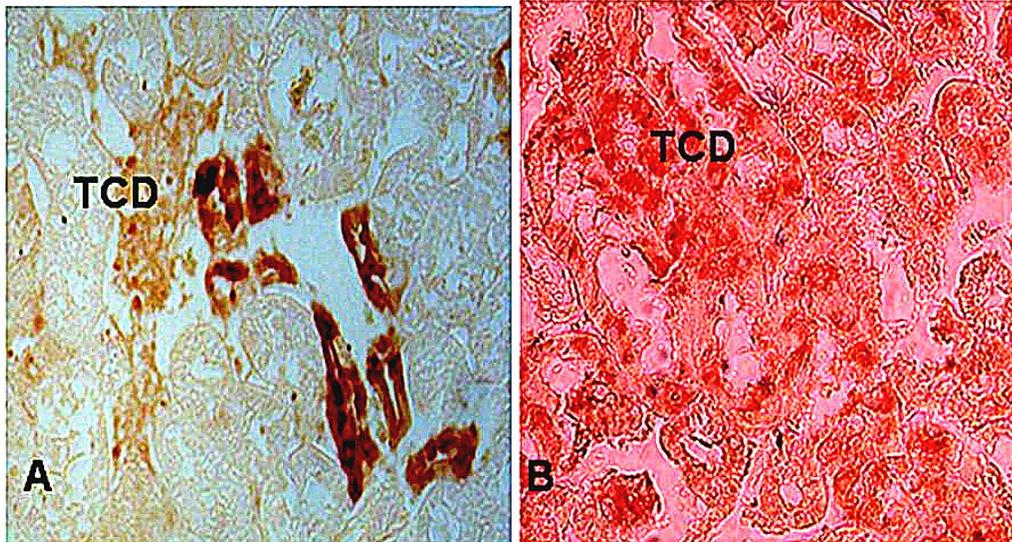


**Figura 16:** Inmunohistoquímica de corteza renal. Acs TRPV5 1:100 **A)** Raton MSX2 +/+ Obj 40X. Se observan los túbulos contorneado distal (**TCD**) el marcaje de la proteína en color marrón. **B)** Ratón MSX2 -/- Obj 40X .Se observa glomérulo renal (**GR**) y túbulo contorneado distal (**TCD**) sin marcaje.



**Figura 17:** Inmunohistoquímica de medula renal. Acs NCX1 1:100 **A)** Raton MSX2 +/+ Obj 40X. Se observan túbulo conector (**TC**) y túbulo contorneado distal (**TCD**) con marcaje en color marrón. **B)** Ratón MSX2 -/- . Obj 40X. Se

observan túbulo conector (**TC**) y túbulo contorneado distal (**TCD**) con marcaje en color marrón.



**Figura 18:** Inmunohistoquímica medula renal. Acs Calbindina D<sub>28k</sub> 1:100 **A)** Ratón MSX2 +/+ Obj 40X. Tubulo contorneado distal marcaje en color marron (**TCD**) **B)** Ratón MSX2 -/-. Obj 40X. tubulo contorneado distal (**TCD**) marcaje en color marrón claro.

#### **IV. DISCUSIÓN**

Es importante destacar en los resultados lo observado en relación al índice calcio /creatinina en ratones *Msx2* <sup>-/-</sup> con dieta normal lo cual sería indicativo de una hipercalcemia, considerando la excreción urinaria de calcio, principal signo de la hipercalcemia, y así podría estar relacionada con fallas en la reabsorción de calcio a nivel de nefrona distal, una falla en la absorción de calcio a nivel intestinal por otro lado, o incremento de la función de resorción ósea en última instancia. <sup>(8)</sup>

Se podría entonces pensar en una disfunción tubular renal, por esa razón, al realizar la prueba de índice de calcio/creatinina bajo diferentes condiciones nutricionales se determina que estos ratones *Msx2* <sup>-/-</sup> presentan tendencia a la hipercalcemia, la cual se puede atribuir a su condición genética, considerando que la Hipercalcemia es un trastorno autosómico dominante caracterizado por la excesiva absorción intestinal de  $\text{Ca}^{2+}$  o la reabsorción tubular renal defectuosa de  $\text{Ca}^{2+}$  <sup>(42)</sup>. Tomando en cuenta que en ratones con la disrupción del canal TRPV5 se observa el aumento de la absorción de calcio a nivel intestinal y la pérdida renal <sup>(43)</sup> los animales presentan hipoparatiroidismo y altos niveles de calcio sérico, no obstante, en el caso del *Msx2* <sup>-/-</sup> dicha hipercalcemia es de naturaleza netamente renal, ya que no se presentan hipoparatiroidismo ni diferencias en los valores a nivel sérico en comparación con los ratones *Msx2* <sup>+/+</sup>.

Con referencia en investigaciones, donde se reporta que un aumento de la excreción urinaria de  $\text{Ca}^{2+}$  es un factor de riesgo considerable y está implicada la hipercalcemia en 40 – 50% de los individuos formadores de cálculo renal. <sup>(22)</sup>, es obvio suponer entonces, que los ratones *Msx2* <sup>-/-</sup> deberían presentar patologías como cálculos renales o focos de calcificación en el parénquima renal.

Por otra parte, es significativo considerar los resultados obtenidos a partir de la aplicación del medicamento con bifosfonatos como lo es el ácido zoledrónico (Zometa<sup>®</sup>), en los cuales se observó un importante disminución del índice calcio/creatinina en los ratones Msx2<sup>-/-</sup>, lo cual permite conjeturar que la hipercalciuria presente en los ratones Msx2<sup>-/-</sup> podría tener relación con el metabolismo óseo del calcio; considerando que la aplicación de bifosfonatos en el tratamiento de hipercalciuria, ha demostrado eficacia, normalizando la excreción de calcio urinario y mejorando la densidad mineral ósea<sup>(44)</sup>.

Es así como, en función a lo reportado en los resultados expuestos y considerando que el índice de calcio /creatinina es útil para el estudio de función ósea en relación al metabolismo del calcio, se plantea la posibilidad de que la hipercalciuria presente en los ratones Msx2<sup>-/-</sup> se relaciona con alteraciones de la función osteoclastica, no obstante es importante tomar en cuenta que el ratón Msx2<sup>-/-</sup> presenta dentinogénesis imperfecta y osteopetrosis regional, con inclusión del tercer molar mandibular<sup>(45)</sup> más aún, el papel de osteopetrosis observados en ratones Msx2<sup>-/-</sup> no está claro.

Investigaciones reportan que ratones con hipercalciuria presentan infiltrados inflamatorios de células, dilatación tubular, aplanamiento de los epitelios tubulares y la presencia de numerosas células y / o restos de células dentro de la luz dilatados de algunos túbulos corticales en los riñones<sup>(46)</sup> Sin embargo, en este caso, ambos modelos animales presentan características morfológicas muy similares, se describe la poca presencia de capilares que se observó en el glomérulo renal en la coloración de Van Gieson de los ratones Msx2<sup>-/-</sup> en relación a la que se observó los ratones Msx2<sup>+/+</sup> puede suponer que haya un déficit en cuanto a la irrigación capilar en el riñón del ratón Msx2<sup>-/-</sup>. Lo que pudiese estar asociado a fibrosis intersticial, característica de riñones con hipercalciuria<sup>(46)(47)</sup>

En otro orden de ideas, los resultados de la prueba del Western Blot demuestra la especificidad del anticuerpo utilizado, anticuerpo primario policlonal conejo anti-rata TRPV5 y el anticuerpo policlonal de conejo NCX1, corroborando la presencia de TRPV5 y NCX1 en tejido renal de ratones Msx2 +/+ (9)(48)(49); quienes incluso han planteado que cada uno de estos receptores se han determinado genéticamente para incluso el desarrollo de modelos animales modificados específicos para así estudiar su comportamiento. <sup>(50)</sup>

Es así como estos resultados presentan una expresión diferencial de la presencia de las proteínas transportadoras de calcio TRPV5 y NCX1 en los ratones mutantes por Msx2, ratificando lo hallado en estudios anteriores <sup>(3)</sup>, además de describir la presencia de estos mismos marcadores en ratones salvaje MSX2 +/+ <sup>(30)</sup>.

De igual manera, se indica y reconoce la presencia de la Calbindina D<sub>28k</sub>, la cual se expresa en alta proporción en ratones Msx2 +/+, a nivel de la medula renal como es también descrito en la literatura <sup>(49)</sup>, lo cual destaca su papel como transportador de calcio <sup>(51)</sup>. Sin embargo, en los ratones Msx2 -/- se expresan pobremente.

En cuanto a la ubicación de dichos transportadores a nivel renal y el metabolismo del calcio, el túbulo contorneado distal y el túbulo conector son responsables de la reabsorción de calcio en el riñón. Para lograr este objetivo, están equipadas con maquinaria molecular, como lo son TRPV5, Calbindina-D<sub>28k</sub> y NCX1 para absorber calcio contra su gradiente electroquímico a través de la ruta transcelular. <sup>(8)(52)</sup>.

En vista de que se expresan a nivel de la nefrona distal renal los transportadores de calcio TRPV5 y NCX1 en los modelos animales Msx2-/-,

surge entonces la interrogante en relación a lo que está sucediendo a nivel metabólico renal, es decir, si se expresan los mismos transportadores en modelos salvajes y en modelos mutantes, es entonces imprescindible entender en qué momento el metabolismo del calcio se altera y no es absorbido por la nefrona, lo cual ocasiona como consecuencia las manifestaciones fenotípicas anteriormente mencionadas.

En cuanto a la función electrolítica renal los resultados manifiestan la presencia de los transportadores de calcio TRPV5 en túbulo contorneado distal de la nefrona y NCX1 en túbulo conector de la nefrona y túbulo colector en ambos tejidos renales de los modelos animales *Msx2* +/+ y *Msx2* -/- como se demostró por la inmunohistoquímica.

En relación a lo comentado anteriormente, con respecto al estudio a nivel óseo es interesante considerar, a pesar de no ser objetivo de este trabajo, los hallazgos de algunos estudios que han sugerido que la osteopetrosis en ratones mutantes *Msx2* - / - podría tener dos orígenes, uno relacionado con el hecho de que el gen *Msx2* se expresa durante el crecimiento por una subpoblación de los osteoclastos de hueso alveolar este subconjunto de los osteoclastos puede faltar en los mutantes nulos, y en segunda instancia, la expresión del gen del factor de diferenciación clave osteoclastos RANKL está severamente disminuida en el epitelio dental y el hueso alveolar de ratones *Msx2*-/- <sup>(13)(15)</sup>.

Por lo tanto, con el fin de investigar la importancia de la osteopetrosis en defectos dentales de ratones *Msx2*-/- <sup>(45)</sup>, desarrollan una estrategia para rescatar la resorción del hueso sobreexpresando los precursores osteoclasticos de ratones *Msx2*-/- analizando el fenotipo dental de dichos ratones, sirviendo como marco referencial para ampliar el conocimiento en cuanto al origen de la hipercalcuria idiopática manifiesta en estos modelos animales.

## V CONCLUSIONES

En virtud a que el presente estudio es de carácter exploratorio, ya que por ser la primera vez que se realiza un estudio comparativo de la expresión de los efectores del transporte del calcio en los tejidos epiteliales de diente y riñón es importante destacar que si bien alguno de los resultados que se han obtenido son preliminares representan un adelanto en el estudio del modelo animal *Msx2*<sup>-/-</sup>.

Ahora bien, la presencia de los transportadores en ambos modelos animales debería garantizar un metabolismo del calcio similar, sin embargo, es interesante destacar las diferencias fenotípicas presentes en ratones *Msx2*<sup>+/+</sup> y ratones *Msx2*<sup>-/-</sup> relacionadas principalmente a nivel dentario, donde el metabolismo del calcio es relevante para la formación y maduración de estructuras bucodentales como lo son esmalte, dentina y del hueso alveolar.

Cabria preguntarse si en los ratones *Msx2*<sup>-/-</sup> los transportadores TRPV5 y NCX1 se encuentran en la misma proporción que en los ratones *Msx2*<sup>+/+</sup>, y de ser así, al mismo tiempo sería importante estudiar el tejido intestinal de ambos modelos animales ya que al estar involucrado en la absorción del calcio, al igual que el tejido óseo, lo cual podría explicar en parte la hipercalciuria que aparentemente poseen los ratones *Msx2*<sup>-/-</sup>.

Entonces, el estudio metabólico renal del ratón *Msx2*<sup>-/-</sup>, permitió ahondar en el metabolismo renal del ratón mutante *Msx2*<sup>-/-</sup> identificando la hipercalciuria presente en ellos y discriminar parte de su origen, el cual aparentemente se relaciona con el metabolismo de calcio a nivel óseo.

Sin embargo, la continuación de este estudio, se basa en estudios con microscopía electrónica, los estudios en jaulas metabólicas y pruebas de biología molecular como inmunofluorescencia y Western Blot en riñón, y

ampliar estudios de los otros tejidos relacionados con el metabolismo del calcio como intestino y hueso, con el objeto de dilucidar con exactitud como es la dinámica del metabolismo de este mineral en los ratones *Msx2* <sup>-/-</sup> y así entender su expresión fenotípica, de tal manera que sea una ventana ante las incertidumbres que representa patologías como lo es la hiper calciuria idiopática

## VI BIBLIOGRAFIA

- 1) Brunotto, M ; Zarate, A. M. (2012). Trabajo De Revisión. Modelos Predictivos Para Enfermedades Complejas *Revista Facultad de Ciencias Medicas*, 69(1), 33-41
- 2) Okumura R, Shibukawa Y, Muramatsu T, Hashimoto S, Nakagawa K, Tazaki M, Shimono M Sodium-calcium exchangers in rat ameloblasts. *J Pharmacol Sci.* 2010;112(2):223-30. Epub 2010 Jan 30
- 3) Bolaños, A. (2010). *Régulation de l'expression de la Calbindine-D<sub>28k</sub> par le gène Msx2 dans les cellules épithéliales* (Dr). UNIVERSITE PARIS. DIDEROT (Paris 7).
- 4) Lacruz R., Smith Ch., Bringas P, Smith SM, Sneal ML, Kurts I, Chen YB, Hubbard MJ, Hacia JG, Paine M. Identification of Novel Candidate Genes Involved in Mineralization of Dental Enamel by Genome-Wide Transcript Profiling. *J. Cell. Physiol.* 2012; 227: 2264–2275
- 5) Suda, N., Kitahara, Y., & Ohyama, K. (2006). A case of amelogenesis imperfecta, cleft lip and palate and polycystic kidney disease. *Orthodontics & Craniofacial Research*, 9(1), 52--56.
- 6) Prié, D., Torres, P. U., & Friedlander, G. (2009). Latest findings in phosphate homeostasis. *Kidney international*, 75(9), 882-889.
- 7) Davies, M. R., Lund, R. J., Mathew, S., & Hruska, K. A. (2005). Low turnover osteodystrophy and vascular calcification are amenable to skeletal anabolism in an animal model of chronic kidney disease and the metabolic syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology*, 16(4), 917-928.
- 8) Kopic, S., & Geibel, J. (2013). Gastric acid, calcium absorption, and their impact on bone health. *Physiological Reviews*, 93(1), 189--268.
- 9) Bouillon, R., Carmeliet, G., Verlinden, L., van Etten, E., Verstuyf, A., & Luderer, H. et al. (2008). Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocrine Reviews*, 29(6), 726--776.
- 10) Merida, I. "Terapia Génica Como Coadyuvante En La Ortodoncia". *Revista Latinoamericana de Ortodoncia y Odontopediatria* "Ortodoncia.ws edición electrónica marzo 2011. Obtenible en: [www.ortodoncia.ws](http://www.ortodoncia.ws). Consultada 05/02/13
- 11) Blin-Wakkach, C., Lezot, F., Ghouli-Mazgar, S., Hotton, D., Monteiro, S., & Teillaud, C. et al. (2001). Endogenous Msx1 antisense transcript: in vivo and in vitro evidences, structure, and potential involvement in skeleton development in mammals. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 98(13), 7336--7341.
- 12) Bolaños, Hotton, Agalliu, Molla, Lézot, Ferbus, and Berdal, III Congreso de la Region Latinoamericana de la IADR y VIII de la División Venezolana de la IADR Margarita Island. Abril 2009
- 13) Aioub, M., Lezot, F., Molla, M., Castaneda, B., Robert, B., & Goubin, G. et al. (2007). *Msx2* transgenic mice develop compound

- amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta and periodontal osteopetrosis. *Bone*, 41(5), 851--859.
- 14) Bolaños, A; Berdal, A; Lezot, F; Hotton, D Cartografía de la Expresión del Gen Msx2 en el Ratón. Análisis de las Alteraciones Relacionadas con la Invalidación del Gen Msx2. ODOUS CIENTIFICA Vol. 9 No. 2, Julio - Diciembre 2008 p. 8-26
  - 15) Molla M, Descroix V, Aïoub M, Simon S, Castañeda B, et al. (2010) Enamel protein regulation and dental and periodontal physiopathology in MSX-2 mutant mice. *Am J Pathol* 177: 2516–2526. doi: 10.2353/ajpath.2010.09122
  - 16) Netter, F. (2011). *Atlas de Anatomía Humana + StudentConsult* (1st ed.). London: Elsevier Health Sciences Spain.
  - 17) Hernando Avendaño, L. (2008). *Nefrología clínica* (1st ed.). Madrid: Médica Panamericana.
  - 18) Gartner, L., & Hiatt, J. (2008). *Texto atlas de histología* (1st ed.). México [etc.]: McGraw-Hill Interamericana.
  - 19) Díaz Horta, O. (2003). El ion calcio: su regulación y función en la célula  $\beta$  pancreática. *Revista Cubana de Endocrinología*, 14(3), 0-0.
  - 20) Villarejo, A. L. D. (2006) Metabolismo Y Alteraciones En La Regulación Del Calcio. *Enfermedades Metabólicas*, 151.
  - 21) Hwang, I., Jung, E. M., Yang, H., Choi, K. C., & Jeung, E. B. (2011). Tissue-specific expression of the calcium transporter genes TRPV5, TRPV6, NCX1, and PMCA1b in the duodenum, kidney and heart of *Equus caballus*. *The Journal of veterinary medical science/the Japanese Society of Veterinary Science*, 73(11), 1437
  - 22) Abel, M. van, J. G. J. Hoenderop, and R. J. M. Bindels. "The epithelial calcium channels TRPV5 and TRPV6: regulation and implications for disease." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 371 (2005): 295.
  - 23) Renkema, K., Velic, A., Dijkman, H., Verkaart, S., Van der Kemp, A., & Nowik, M. et al. (2009). The calcium-sensing receptor promotes urinary acidification to prevent nephrolithiasis. *Journal Of The American Society Of Nephrology*, 20(8), 1705--1713.
  - 24) Lambers, T. T., Mahieu, F., Oancea, E., Hoofd, L., de Lange, F., Mensenkamp, A. R., ... & Bindels, R. J. (2006). Calbindin-D<sub>28k</sub> dynamically controls TRPV5-mediated Ca<sup>2+</sup> transport. *The EMBO journal*, 25(13), 2978-2988.
  - 25) Hebert, S. (2004). Calcium and salinity sensing by the thick ascending limb: a journey from mammals to fish and back again. *Kidney International*, 66, 28--33.
  - 26) Sun W, Sun W, Liu J, Zhou X, Xiao Y, Karaplis A, Pollak MR, Brown E, Goltzman D, Miao D. [Alterations in phosphorus, calcium and PTHrP contribute to defects in dental and dental alveolar bone formation in calcium-sensing receptor-deficient mice.](#) *Development*.

- 2010 Mar;137(6):985-92.
- 27) Davies, J. (1994). Control of calbindin-D<sub>28k</sub> expression in developing mouse kidney. *Developmental dynamics*, 199(1), 45-51.
  - 28) Hemmingsen, C. (1999). Regulation of renal calbindin-D<sub>28k</sub>. *Pharmacology & toxicology*, 87, 5-30.)
  - 29) Hwang, (2014) I., Hong, E. J., Yang, H., Kang, H. S., Ahn, C., An, B. S., & Jeung, E. B. (2014). Regulation of tight junction gene expression in the kidney of calbindin-D<sub>9k</sub> and/or-D<sub>28k</sub> knockout mice after consumption of a calcium-or a calcium/vitamin D-deficient diet. *BMC biochemistry*, 15(1), 6).
  - 30) Brandt, L., Bohn, A., Charles, J., & Ehrhart, E. (2012). Localization of canine, feline, and mouse renal membrane proteins. *Veterinary Pathology Online*, 49(4), 693--703.
  - 31) Clapham, D. E. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature*, 426(6966), 517-524.
  - 32) Venkatachalam, K., & Montell, C. (2007). TRP channels. *Annu. Rev. Biochem.*, 76, 387-417.
  - 33) Nilius, B., Owsianik, G., & Voets, T. (2008). Transient receptor potential channels meet phosphoinositides. *The EMBO journal*, 27(21), 2809-2816.
  - 34) Arias Darraz, L. (2011). *Canales Iónicos Trp En El Alga Unicelular Chlamydomonas reinhardtii* (Licenciado en Bioquímica). Universidad Austral de Chile.
  - 35) Latorre, R., Zaelzer, C., & Brauchi, S. (2009). Structure–functional intimacies of transient receptor potential channels. *Quarterly reviews of biophysics*, 42(03), 201-246.
  - 36) Hilge, M. (2012). Ca<sup>2+</sup> regulation of ion transport in the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger. *Journal of Biological Chemistry*, 287(38), 31641-31649.
  - 37) Preciado Valdovinos, R. (2001). *Intercambiador Sodio/Calcio En El Músculo Esquelético*. (Maestra En Ciencias Fisiológicas Con Especialidad En Fisiología). Universidad de Colima Mexico.
  - 38) Wakimoto, K., Kuro-o, M., Yanaka, N., Omori, K., Komuro, I., Imai, Y., & Nabeshima, Y. I. (2000). Isolation and Characterization of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Exchanger Gene and Splicing Isoforms in Mice. *Mitochondrial DNA*, 11(1-2), 75-81.
  - 39) Ary, Donald y Otros. (1986). *Introducción a la Investigación Pedagógica*. México: Interamericana. 2da. edición.
  - 40) Hernández, Angela F. De. (1991). *La Investigación-Acción Participativa Y La Producción De Conocimientos*. Revista De Faces. Facultad De Ciencias Económicas Y Sociales. Universidad De Carabobo.
  - 41) Rivero-Cruz, I., Duarte, G., Navarrete, A., Bye, R., Linares, E., & Mata, R. (2011). Chemical Composition and Antimicrobial and Spasmolytic Properties of *Poliomintha longiflora* and *Lippia graveolens* Essential Oils\*\*. *Journal of food science*, 76(2), C309-C317.

- 42) Asplin JR, Favus MJ, Coe FL (1996) Nephrolithiasis. In: Rector BA(ed) The kidney, 5th edn. Saunders, Philadelphia, pp 1893–1935
- 43) Sánchez, A., Sarano, D., & del Valle, E. (2011). Nefrolitiasis. Fisiopatología, Evaluación Metabólica Y Manejo Terapéutico. *Actual. osteol*, 7(3), 195-234.
- 44) Freundlich, M., & Alon, U. S. (2008). Bisphosphonates in children with hypercalciuria and reduced bone mineral density. *Pediatric Nephrology*, 23(12), 2215-2220.
- 45) Castaneda, B., Simon, Y., Jacques, J., Hess, E., Choi, Y., & Blin-Wakkach, C. et al. (2011). Bone resorption control of tooth eruption and root morphogenesis: Involvement of the receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANK). *Journal Of Cellular Physiology*, 226(1), 74--85.
- 46) Loh, N., Bentley, L., Dimke, H., Verkaart, S., Tammaro, P., & Gorvin, C. et al. (2013). Autosomal dominant hypercalciuria in a mouse model due to a mutation of the epithelial calcium channel, TRPV5. *Plos One*, 8(1), 55412.
- 47) Boulanger, H., & Flamant, M. (2013). Hipercalciuria. *EMC-Aparato Locomotor*, 46(2), 1-6.
- 48) Nijenhuis, T., Hoenderop, J., Van Der Kemp, A., & Bindels, R. (2003). Localization and Regulation of the Epithelial Ca<sup>2</sup> Channel TRPV6 in the Kidney. *J Am Soc Nephrol*, 14, 2731–2740.
- 49) Bauchet, A., Masson, R., Guffroy, M., & Slaoui, M. (2011). Immunohistochemical identification of kidney nephron segments in the dog, rat, mouse, and cynomolgus monkey. *Toxicologic Pathology*, 39(7), 1115--1128.
- 50) Thyagarajan, T., Totey, S., Danton, M., & Kulkarni, A. (2003). Genetically altered mouse models: the good, the bad, and the ugly. *Critical Reviews In Oral Biology & Medicine*, 14(3), 154--174.
- 51) Dittmer, K., & Thompson, K. (2011). Vitamin D Metabolism and Rickets in Domestic Animals A Review. *Veterinary Pathology Online*, 48(2), 389--407.
- 52) Wang, S., Hu, D., Xi, Q., Su, S., Bai, J., Liu, J., & Ye, Z. (2008). The expression and implication of TRPV5, calbindin-D28k and NCX1 in idiopathic hypercalciuria. *Journal Of Huazhong University Of Science And Technology [Medical Sciences]*, 28, 580--583.
- 53) Capozzi, F., Casadei, F., & Luchinat, C. (2006). EF-hand protein dynamics and evolution of calcium signal transduction: an NMR view. *JBIC Journal Of Biological Inorganic Chemistry*, 11(8), 949--962.
- 54) Cavanagh-lab.bch.ncsu.edu,. (2014). ...: Cavanagh-lab Cavanagh Lab Research Topics October 10<sup>th</sup>2007 [Calcium Binding Proteins::...](http://cavanagh-lab.bch.ncsu.edu/calcium.html) Retrieved 19 September 2014, from <http://cavanagh-lab.bch.ncsu.edu/calcium.html>