



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO

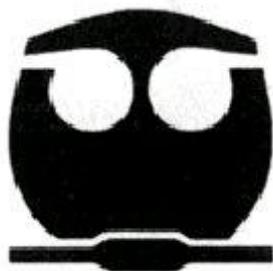
FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

BÚSQUEDA DE VARIANTES FUNCIONALES
EN LOS GENES *WNK1* Y *WNK4*
QUE PUDIERAN CONFERIR SUSCEPTIBILIDAD A LA
HIPERTENSIÓN ARTERIAL ESENCIAL
EN INDIVIDUOS MEXICANOS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)
P R E S E N T A :
ERIKA ANTÚNEZ ARGÜELLES

Tutor: DRA. MARÍA TERESA TUSIÉ LUNA



MÉXICO, D. F.

MARZO 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y a CONACYT, por el apoyo y financiamiento de mis estudios de posgrado. Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición ‘Salvador Subirán’ (INNSZ), y a su Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica, en consorcio con la UNAM, lugar donde realicé mi tesis.

Particularmente a la Dra. Teresa Tusié Luna, al Dr. Gerardo Gamba Ayala y a la Dra. Marina Gavilanes Ruíz, miembros del comité tutor; a la Dra. Teresa Villarreal Molina, miembro activo de este proyecto y mi tutora en la práctica; al Dr. Salvador Ramírez Jiménez y a la M. en C. María Luisa Ordoñez Sánchez, asesores técnicos; a Jesús Lázaro López Velázquez, ayudante técnico y experimental; al Dr. Rafael Valdez Ortiz, responsable de la toma de muestras y selección de pacientes en el INNSZ; a la Dra. Juliette Hadchouel y a la Dra. Emilie Elvira Matelot, por su participación desde el ‘Institut National de la Santé et la Reserché Médicale’ en Francia, a través de la Fundación Leducq; y al jurado de examen. A todos ellos agradezco su apoyo y colaboración en el desarrollo de este proyecto.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Hipertensión Arterial.....	7
1.2 Regulación de la presión arterial.....	8
1.3 Papel del riñón en la regulación de la presión arterial.....	9
1.3.1 Túbulo Proximal.....	11
1.3.2 Asa de Henle.....	12
1.3.3 Túbulo contorneado distal.....	15
1.3.4 Túbulos conectores y colectores.....	17
1.3.5 Ductos colectores medulares.....	19
1.3.6 Sistema renina-angiotensina-aldosterona.....	20
1.4 Las cinasas WNKs	22
1.5 El pseudohipoaldosteronismo tipo II.....	24
1.6 Papel de las WNKs en el manejo renal de electrolitos.....	25
1.6.1 WNK4 tiene tres estados funcionales.....	29
1.7 Componente genético de la HTA.....	30
1.8 Variación genética reportada en los genes <i>WNK1</i> y <i>WNK4</i>	35

II. JUSTIFICACIÓN..... 38

III. HIPÓTESIS.....39

IV. OBJETIVOS.....40

4.1 Objetivos particulares.....	40
---------------------------------	----

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Población de estudio.....	41
5.2 Extracción de DNA.....	42
5.3 Amplificación de <i>WNK1</i> y <i>WNK4</i>	42
5.4 Secuenciación de los genes <i>WNK1</i> y <i>WNK4</i>	44
5.5 Análisis de predicción.....	44

VI. RESULTADOS

6.1 Población de estudio.....	46
6.2 Secuenciación de <i>Wnk4</i>	48
6.3 Variación en el gen <i>Wnk4</i>	48
6.3.1 Variación no sinónima en <i>Wnk4</i>	49
6.3.2 Variación sinónima en <i>Wnk4</i>	50
6.3.3. Variantes en los límites intrón-exón.....	53
6.4 Variación del gen <i>Wnk1</i>	54

VII. DISCUSIÓN

7.1 Captación de la población de estudio.....	56
7.2 Variación en <i>Wnk4</i>	56
7.2.1 Variación en el dominio ácido de <i>Wnk4</i>	57
7.2.2 Variación en el dominio cinasa de <i>Wnk4</i>	58
7.2.3 Variación en el dominio C-terminal de <i>Wnk4</i>	59
7.2.4 Variación en los límites exón-intrón de <i>Wnk4</i>	61
7.3 Variación en el represor de la isoforma renal KS- <i>Wnk1</i>	61

VIII. CONCLUSIONES.....64

IX. PERSPECTIVAS.....65

X. ANEXO.....66

XI. REFERENCIAS.....67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Canales iónicos, intercambiadores y co-transportadores renales expresados en los diferentes segmentos de la nefrona.....	10
Figura 1.2. Esquema del sistema de co-transportadores, canales e intercambiadores iónicos en el túbulo proximal de la nefrona.....	11
Figura 1.3. Sistema contracorriente del asa de Henle.....	13
Figura 1.4. Esquema del sistema de co-transportadores y canales iónicos en la porción ascendente gruesa del a.sa de Henle (TAL).....	13
Figura 1.5. Aparato yuxtaglomerular.....	14
Figura 1.6. Esquema del sistema de co-transportadores y canales iónicos en túbulo contorneado distal.....	16
Figura 1.7. Esquema del sistema de co-transportadores y canales iónicos en las células principales y células intercaladas <i>a</i> del túbulo colector cortical.....	18
Figura 1.8. Reciclaje de urea y reabsorción de agua en presencia de la hormona antidiurética.....	18
Figura 1.9. Miembros de la familia WNK.....	23
Figura 1.10. Dominio ácido de WNK4.....	25
Figura 1.11. Gen <i>WNK1</i>	35
Figura 1.12. Gen <i>WNK4</i>	36
Figura 6.1. Frecuencia de variantes del gen <i>WNK4</i> encontradas en individuos hipertensos de inicio temprano y normotensos de edad avanzada.....	48
Figura 6.2. Variante G227W en <i>WNK4</i>	49
Figura 6.3. Variante G448C en el exón 6 de <i>WNK4</i>	50
Figura 6.4. Variante A601S en el exón 8 de <i>WNK4</i>	50
Figura 6.5. Alineamiento del residuo Gly227 con el programa Polyphen Harvard.....	51
Figura 6.6. Variante P961S en el exón 14 de <i>WNK4</i>	52

Figura 6.7. Variantes sinónimas en el exón 7 de <i>WNK4</i>	52
Figura 6.8. Secuencia del intrón 7 de <i>WNK4</i> empleada para la predicción de sitios de <i>splicing</i> alternativo con el programa <i>Human Splicing Finder 2.4.1</i>	53
Figura 6.9. Variante IVS7-25G/A en el intrón 7 de <i>WNK4</i>	54
Figura 6.10. Variante IVS14-40T/C en el intrón 14 de <i>WNK4</i>	54
Figura 6.11. Predicción de sitios aceptores, donadores y de unión a factores de <i>splicing</i> para la variante IVS14-40T/C según el programa <i>ESE finder 3.0</i>	55
Figura 7.1. Topología general del dominio catalítico de la proteína WNK1.....	60
Figura 10.1. Región amplificada por el par de oligonucleótidos “Exón 14-16” amplificada en el gen <i>WNK4</i>	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Criterios para definir normotensión y diferentes grados de hipertensión arterial en adultos según el <i>JNC7</i>	7
Tabla 1.2. Efectos de <i>Wnk4</i> en tres estados funcionales diferentes.....	29
Tabla 1.3. Genes que causan síndromes mendelianos raros de hipotensión o hipertensión arterial.....	32
Tabla 1.4. Estudios de asociación del gen <i>Wnk1</i>	36
Tabla 1.5. Estudios de asociación del gen <i>Wnk4</i>	37
Tabla 5.1. Criterios de inclusión y exclusión de los grupos ‘hipertensos de inicio temprano’ y ‘normotensos de edad avanzada’.....	41
Tabla 5.2. Oligonucleótidos sentido y antisentido para la amplificación de la región represora.....	42
Tabla 5.3. Condiciones para la PCR de amplificación.....	43
Tabla 5.4. Temperatura de alineamiento para la PCR de amplificación.....	44
Tabla 5.5. Concentraciones de reactivos y condiciones para la PCR de secuenciación.....	45
Tabla 6.1. Cifras de presión arterial sistólica y diastólica del grupo II ‘hipertensos de inicio temprano’.....	46
Tabla 6.2. Cifras de presión arterial sistólica y diastólica del grupo II ‘normotensos de edad avanzada’.....	47
Tabla 6.3. Variación encontrada en el gen <i>Wnk4</i> de individuos de este estudio.....	49

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Hipertensión Arterial

La hipertensión arterial (HTA) es un padecimiento caracterizado por el aumento sostenido de la presión arterial sistólica o diastólica.¹ Es uno de los principales factores que predisponen al desarrollo de enfermedad cardiovascular (ECV) y enfermedad renal, consideradas como causas primarias de morbilidad y mortalidad a nivel mundial.² Afecta a más de un cuarto de la población adulta en naciones industrializadas y sociedades urbanas.^{3,4} En México, La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, reportó en el año 2006 que el 30.8% de la población mexicana adulta padece esta enfermedad.⁵

Actualmente las cifras de presión arterial iguales o mayores a 140/90 mmHg se catalogan como HTA o presión arterial elevada, como se define en el '*Séptimo reporte del Comité Nacional Conjunto para la prevención, detección, evaluación y tratamiento de la hipertensión arterial*' (JNC7) y en la '*Guía para el manejo de la hipertensión arterial de la Sociedad Europea de Hipertensión y la Sociedad Europea de Cardiología 2007*', basados en reportes donde se muestra la relación lineal y directa entre la presión arterial y la ECV, así como la disminución en el riesgo a padecer ECV cuando los valores de PA se reducen por debajo de 140/90 mmHg con el uso de antihipertensivos.^{1,6} Los criterios para definir normotensión y diferentes grados de hipertensión arterial en adultos según el JNC7 se resumen en la Tabla 1.1.

	PAS (mmHg)	PAD (mmHg)
Normotensión	<120	<80
Prehipertensión	120-139	80-89
Hipertensión	≥140	≥90
Estadío 1	140-159	90-99
Estadío 2	≥160	≥100

Tabla 1.1. Criterios para definir normotensión y diferentes grados de hipertensión arterial en adultos según el JNC7. **PAS:** Presión arterial sistólica; **PAD:** Presión arterial diastólica.

El origen de la hipertensión arterial está determinado por la interacción entre factores genéticos y ambientales.³ Varios estudios epidemiológicos y familiares han mostrado que entre el 30-50% de los factores que originan la hipertensión arterial esencial son genéticos.^{7,8} Son pocos los casos donde hay una causa definida de HTA. En el 5 a 10% de los casos existe una causa directamente responsable de la elevación de las cifras de presión arterial (*e.g.* falla renal, aldosteronismo, feocromocitoma, síndromes monogénicos) y se le denomina hipertensión arterial secundaria. En cambio, en el 90-95% de los casos la causa se desconoce y se le denomina hipertensión arterial esencial, primaria o idiopática.² Factores tan diversos como la obesidad (asociada a hiperleptinemia y a la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona);⁹ la rigidez arterial, factor clave en la patogénesis de la hipertensión en individuos de edad avanzada;¹⁰ el tono vascular, controlado por diferentes sistemas de regulación;¹¹ y el volumen circulante definido principalmente por la función renal, contribuyen en la etiología de la hipertensión arterial esencial evidenciándola como un desorden complejo y heterogéneo.² Tal complejidad ha dificultado definir la patogénesis de la HTA, y cómo estos factores influyen la fisiología, para alterar la presión arterial, ha sido motivo de extensiva investigación.³

1.2 Regulación de la presión arterial

La fisiología que define la presión arterial es, en principio, aparentemente simple, gobernada por la ley de Ohm (la presión arterial es proporcional al gasto cardíaco y a la resistencia vascular que se opone al flujo sanguíneo).¹² Sin embargo, existe una gran variedad de sistemas fisiológicos con efectos pleiotrópicos y que interactúan entre sí de manera compleja, que pueden influir en la presión arterial.³ Entre ellos, pueden mencionarse a los barorreceptores, que perciben cambios agudos en la presión de los vasos y transmiten la señal al sistema nervioso; péptidos natriuréticos, producidos por el corazón y el cerebro en respuesta a la elevación de la presión arterial en estos órganos; el sistema renina-angiotensina-aldosterona, que influye la homeostasis del volumen sanguíneo y el tono vascular; el sistema quinina-callicreína, que afecta el tono vascular y el manejo renal de electrolitos; el sistema adrenérgico, que regula la frecuencia y la fuerza de contracción

cardíacas y el tono vascular; factores como la endotelina y el óxido nítrico, que regulan el tono vascular. Estos sistemas actúan de manera integrada para mantener niveles adecuados de presión arterial a lo largo del día o por periodos prolongados de tiempo.^{3,13}

En función de las necesidades fisiológicas del organismo, la presión arterial puede ser regulada a corto, mediano y largo plazo. El efecto instantáneo de los sistemas que controlan la presión arterial a corto plazo, en su mayoría reflejos del sistema nervioso autónomo, permite una respuesta rápida a cambios bruscos en la presión arterial y/o adapta al cuerpo a situaciones de peligro.^{3,12} Sin embargo, cuando la presión arterial varía lentamente a lo largo de varias horas o días, estos mecanismos pierden gradualmente la capacidad de oponerse a los cambios en la presión arterial. En este punto, los mecanismos de control a mediano plazo (que responden transcurridos pocos minutos), como el *sistema renina-angiotensina-aldosterona*, la *relajación de estrés de la vascularización*, que consiste en la relajación o contracción por minutos u horas de los vasos sanguíneos en respuesta a cambios en la presión arterial, y el *desplazamiento del líquido a través de las paredes de los capilares* para reajustar el volumen sanguíneo según sea necesario, constituyen la manera de controlar la presión arterial. Sin embargo, la verdadera regulación a largo plazo, corre a cuenta del *sistema renal y de los líquidos corporales*, que normaliza casi *totalmente* y de manera crónica la presión arterial, a través de la excreción de sodio (natriuresis) y control del volumen del líquido extracelular. Es por ello, que entre todos los sistemas de control, la función renal constituye el mecanismo más importante en la regulación de la presión arterial.^{3,12}

1.3 Papel del riñón en la regulación de la presión arterial

El riñón tiene la capacidad intrínseca de regular la presión arterial a través del control de la excreción de electrolitos (especialmente Na^+) y agua, en respuesta a cambios en la presión arterial.¹² La sed y la liberación de la hormona antidiurética son mecanismos que permiten mantener la osmolalidad del líquido extracelular constante, por lo que cualquier cambio en la cantidad de Na^+ en el cuerpo produce un cambio en el volumen extracelular.¹³

Siendo el Na^+ el electrolito más abundante en el líquido extracelular, la regulación de su excreción es la más relevante en el control del volumen extracelular y por tanto de la presión arterial. El mantenimiento de la homeostasis del Na^+ depende de la reabsorción y secreción de Na^+ y otros electrolitos en la nefrona. Un sistema integrado por diversos canales iónicos, intercambiadores y co-transportadores expresados en el epitelio tubular de las nefronas llevan a cabo esta tarea. La expresión diferencial de éstos lo largo de la nefrona, confiere a cada segmento capacidades específicas de reabsorción y secreción, importantes en el excreción final de cada electrolito y otras sustancias en el riñón.^{3, 13}

El 60% del sodio filtrado se reabsorbe en el túbulo proximal de la nefrona, principalmente por el intercambiador Na/H ; el 30% se reabsorbe por la porción ascendente del asa de Henle por el co-transportador Na-K-2Cl ; el 7% se reabsorbe por el co-transportador Na-Cl en el túbulo contorneado distal; y el 2% se reabsorbe por el canal de sodio epitelial ENaC en los túbulos colectores corticales.³

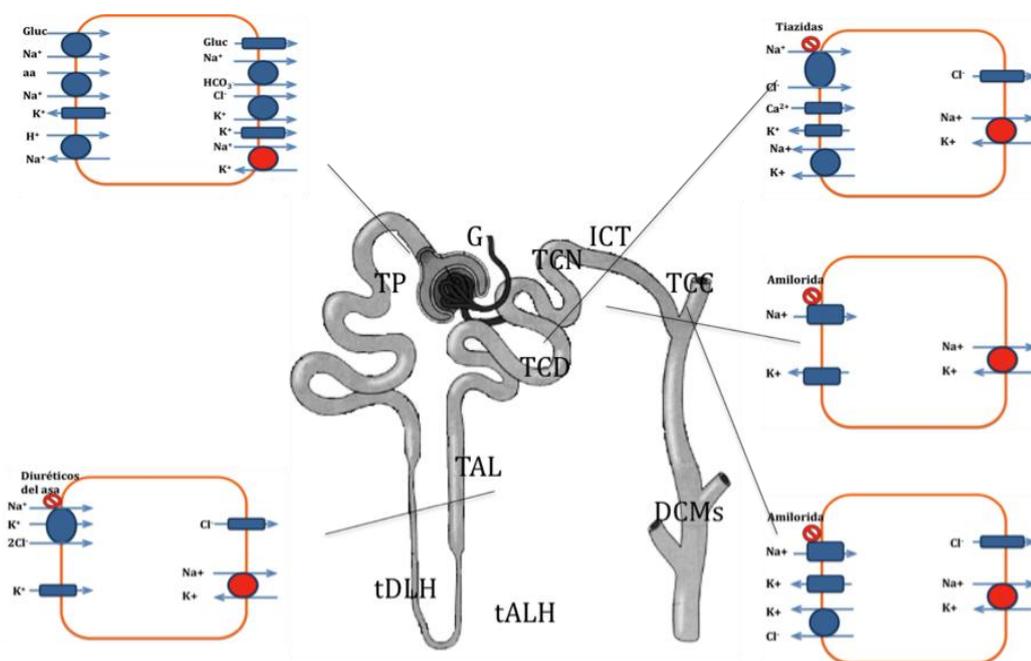


Figura 1.1. Canales iónicos, intercambiadores y co-transportadores renales expresados en los diferentes segmentos de la nefrona. Glomérulo (G), Túbulo Proximal (TP), Porción descendente delgada (tDLH), ascendente delgada (tALH) y ascendente gruesa (TAL) del Asa de Henle, Túbulo contorneado distal (TCD), Túbulo conector, (TCN), Túbulo colector inicial (TCI) y cortical (TCC), Ductos colector medulares (DCMs).

1.3.1 Túbulo Proximal

Inmediatamente después de atravesar la membrana glomerular, el *filtrado glomerular* ingresa al túbulo proximal (TP). En este punto tiene exactamente la misma composición que la sangre, exceptuando el contenido celular y de proteínas que no atraviesan la membrana glomerular debido a su tamaño o a su carga eléctrica.¹² En su recorrido por el TP, todas las moléculas nutrientes en el filtrado glomerular (*e.g.* glucosa, aminoácidos, ácidos orgánicos) se reabsorben y se reincorporan al torrente sanguíneo, evitando que se pierdan en la orina. Su reabsorción ocurre secundariamente al transporte de Na^+ , a través de co-transportadores específicos en la membrana apical, favorecido por el gradiente electroquímico que genera la bomba basolateral ATPasa Na^+-K^+ (Figura 1.2).¹³ Basolateralmente, los nutrientes difunden al intersticio a través de proteínas transportadoras específicas, para finalmente reincorporarse a la circulación.¹⁴ Además del co-transporte con nutrientes, el Na^+ también se reabsorbe apicalmente a través del intercambiador apical Na^+/H^+ (NHE3), el cual es también importante en la secreción renal de ácido.¹⁵

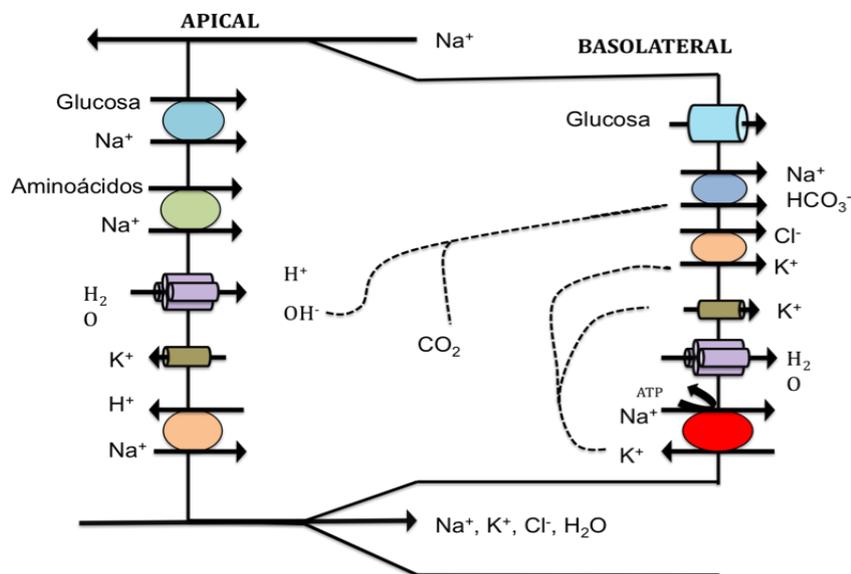


Figura 1.2. Esquema del sistema de co-transportadores, canales e intercambiadores iónicos en el túbulo proximal de la nefrona.

Debido a que el Na^+ es un ion osmóticamente activo, su transporte en el TP siempre se acompaña por movimiento de agua, tanto por la vía paracelular, como por la transcelular, a través de la proteína acuaporina 1 (AQ1) expresada en las membranas apical y basolateral.¹⁶ Por ello, la concentración de Na^+ a lo largo del TP se mantiene constante (a diferencia de otros electrolitos).¹³

La mayoría del Na^+ y Cl^- filtrados por el riñón se reabsorben en el túbulo proximal. El cloruro se reabsorbe en la segunda mitad del TP a cambio de la secreción de diferentes aniones (*i.e.* formato, oxalacetato, OH^- y HCO_3^-) a través del intercambiador apical CFEX.¹⁷ Así mismo, un co-transportador K^+-Cl^- (KCC) facilita la reabsorción basolateral del Cl^- y del K^+ intracelular que ingresa a la célula por la bomba ATPasa Na-K. La reabsorción basolateral de K^+ también ocurre a través de canales basolaterales de ‘rectificación interna’ (ROMK). Estos canales generan un voltaje transepitelial negativo que provoca el retorno paracelular de cerca de 1/3 del Na^+ reabsorbido.¹³

1.3.2 Asa de Henle

El asa de Henle se encuentra subdividida en tres zonas: la porción delgada descendente (tDLH, por sus siglas en inglés *Thin Descending Limb*) y las porciones ascendentes delgada y gruesa (tALH y TAL, por sus siglas en inglés *Thin Ascending Limb* y *Thick Ascending Limb* respectivamente).¹³ Las porciones ascendentes son poco permeables al agua y su función principal es remover NaCl del lumen, depositándolo en el intersticio y volviéndolo hipertónico. La porción descendente previa, en consecuencia a esta acción, reabsorbe agua a través de canales acuaporina 1 (AQ1).¹⁶ hasta alcanzar el equilibrio osmótico con el nuevo intersticio altamente hipertónico. La forma en ‘U’ del asa y la acción continua de estas porciones comprenden un sistema de *contracorriente* que permite multiplicar la osmolalidad del intersticio medular conforme se repiten los ciclos de reabsorción por estas zonas (Figura 1.3). La alta osmolalidad que se genera en el intersticio medular es un componente esencial en la formación de una orina concentrada en presencia de la hormona antidiurética (AVP) (Figura 1.8).¹³

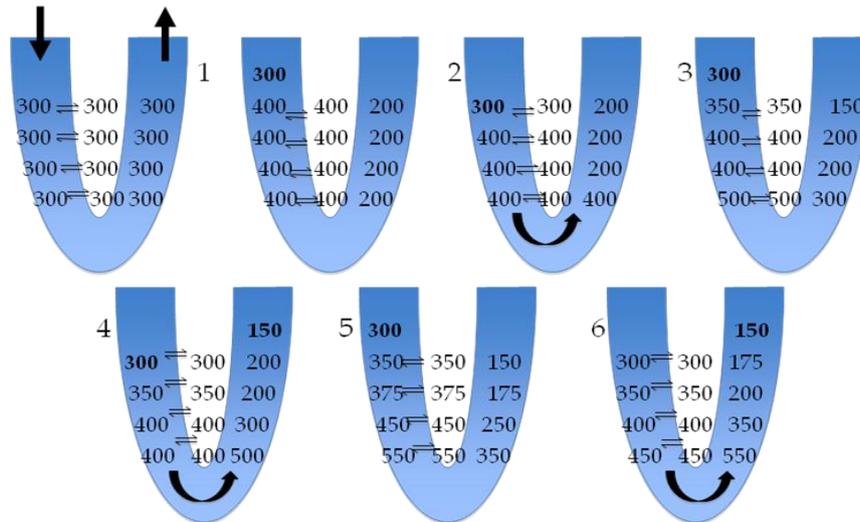


Figura 1.3. Etapas del sistema contracorriente del asa de Henle para la producción de una médula renal hiperosmótica (los valores numéricos son miliosmoles por litro).

Aunque ambas porciones ascendentes del asa de Henle reabsorben NaCl, el mecanismo de transporte de cada una de ellas es diferente. En la tALH el movimiento de Na^+ y Cl^- parece ser un proceso enteramente pasivo y paracelular, debido a la elevada concentración de NaCl que genera la pérdida de agua en la tDLH (especialmente en las nefronas yuxtaglomerulares, cuyas largas asas de Henle penetran más profundamente en la médula renal).¹³ En contraste, la TAL transporta cerca de la mitad del Na^+ a través del co-transportador electroneutro Na-K-2Cl (NKCC2) de la familia SLC12A y el intercambiador NHE3, ambos expresados en la membrana apical, y a través de la bomba ATPasa Na-K basolateral, que genera el gradiente electroquímico para el transporte apical de sodio (Figura 1.4).^{18,19}

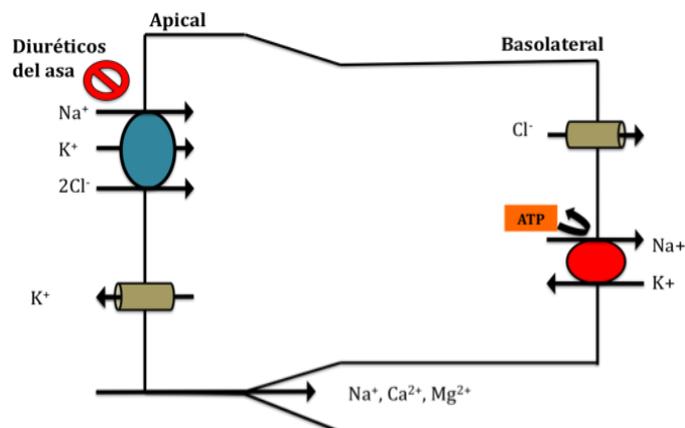


Figura 1.4. Esquema del sistema de co-transportadores y canales iónicos en la porción ascendente gruesa del asa de Henle (TAL).

Por otra parte, el cloruro y el potasio reabsorbidos por el co-transportador apical NKCC2, abandonan la célula a través de canales basolaterales de Cl^- (CLC-Kb) y los canales apicales de potasio ROMK (Kir1.1), respectivamente.^{18,19} Siendo la concentración del potasio en el ultrafiltrado glomerular (4meq/L) mucho menor que la del sodio y del cloruro (145meq/L; 110meq/L, respectivamente), este reciclaje permite al co-transportador NKCC2 seguir funcionando, además de contribuir (junto con la reabsorción transcelular de sodio y cloruro) a la formación de un voltaje transcelular lumen-positivo, el cual favorece la reabsorción paracelular de Na^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} a través de las uniones intercelulares (Figura 1.4).^{13,20}

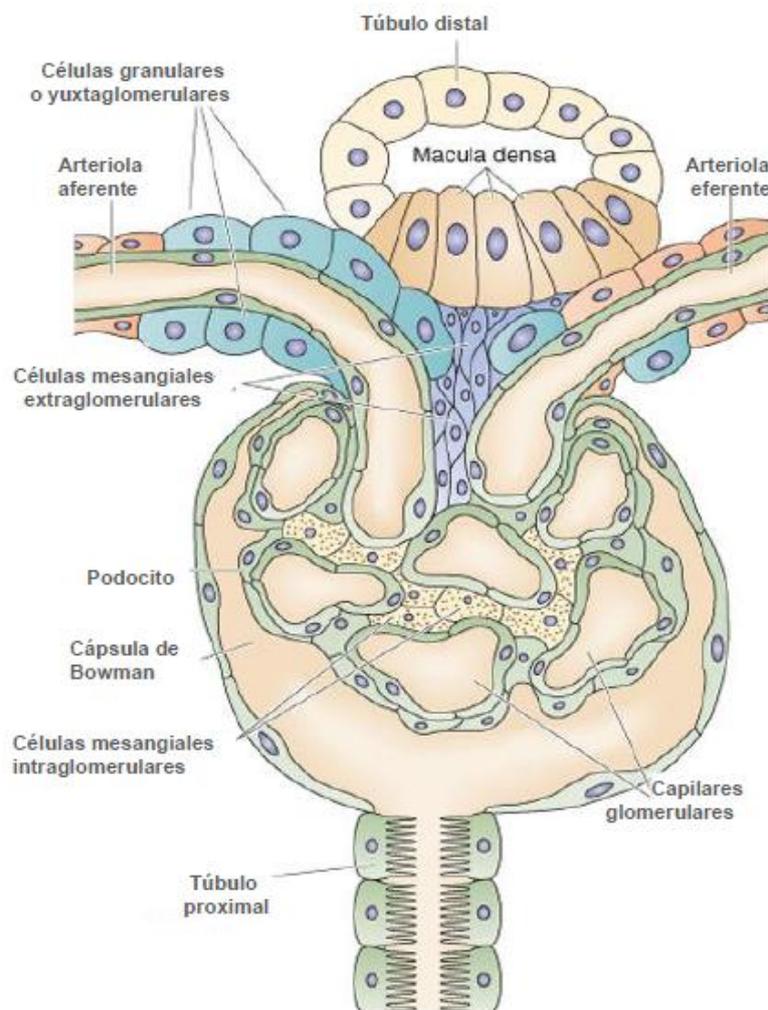


Figura 1.5. Aparato yuxtaglomerular, que histológicamente comprende células epiteliales especializadas del túbulo distal: células de la mácula densa y células de músculo liso especializado de la arteriola aferente: células granulares o células yuxtaglomerulares (Imagen modificada de Boron y Boulpaep. 2009).

El co-transportador NKCC2 es el principal blanco farmacológico de los diuréticos del asa (*i.e.* furosemida, bumetamida, ácido etacrínico, torasemida y piretanida), considerados como los agentes natriuréticos más potentes disponibles para uso clínico.²⁰ Al bloquear el co-transportador con estos fármacos, la tasa de reabsorción de sodio en la TAL disminuye, provocando que una mayor cantidad de sal llegue a la nefrona distal y se produzca una natriuresis y diuresis significativas.

Cuando los receptores en la *mácula densa*, ubicada en la porción inicial del túbulo contorneado distal (Figura 1.5), perciben un incremento en la carga de NaCl luminal, usualmente lo compensan disminuyendo la tasa de filtración glomerular, como resultado de la activación del mecanismo de retroalimentación túbulo-glomerular. Sin embargo, si el aumento en la carga de NaCl se ocasiona por el uso de diuréticos del asa, esta compensación no puede llevarse a cabo, ya que la proteína encargada de percibir la concentración de NaCl es el co-transportador NKCC2.²⁰

1.3.3 Túbulo contorneado distal

El túbulo contorneado distal (TCD) comienza unas pocas células después de la mácula densa. Cualquier cambio en la reabsorción de NaCl en este segmento tiene un impacto en la excreción final de la sal, ya que no se encuentra compensado por el mecanismo de retroacción túbulo-glomerular.²⁰ La reabsorción de sodio en la nefrona distal (*i.e.* TCD, TCN y TCC) del riñón es crítica para el control de la presión arterial.²³ La ruta principal de reabsorción de Na⁺ en la membrana apical del TCD está mediada por el co-transportador electroneutro Na⁺:Cl⁻ sensible a tiazidas (NCC), de la familia de co-transportadores de solutos 12 (SLC12).^{20,21} En la primera porción del TCD (TCD1) la reabsorción de Na⁺ depende exclusivamente del co-transportador NCC, mientras que en la segunda porción (TCD2), la expresión de NCC se sobrelapa con la del canal de sodio epitelial ENaC sensible al inhibidor amilorida. La bomba ATPasa Na⁺-K⁺ basolateral genera y mantiene el gradiente que impulsa la reabsorción apical de Na⁺ en ambos segmentos.^{13,20}

El potasio que entra a la célula por la bomba ATPasa Na-K se secreta por los canales de potasio ROMK y los co-transportadores K-Cl (KCC) expresados en la membrana apical, por lo que la secreción de potasio está determinada en parte por la reabsorción de NaCl.²⁰ El canal de cloruro CLC-Kb reabsorbe al ión cloruro en la membrana basolateral.¹⁸ El TCD también modula la reabsorción de magnesio y calcio, en una relación opuesta.²² El canal de calcio apical TRPV5, de la familia de canales catiónicos TRP (*Transient Receptor Potential*), es el responsable de la reabsorción de Ca^{2+} que ocurre en el TCD y en el TCN.¹⁴ La expresión de este canal está acompañada de la expresión de otra proteína citosólica, la calbindina D_{K28} que se une al Ca^{2+} amortiguando su concentración en el citosol, hasta que éste abandona la célula a través de la membrana basolateral. Los intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y las bombas de Ca^{2+} facilitan la reabsorción basolateral.¹⁴ El bloqueo de la actividad de NCC incrementa la reabsorción de Ca^{2+} , mientras que el aumento en la expresión o actividad de NCC la disminuyen. Es por ello que las tiazidas (inhibidores específicos del co-transportador NCC incrementan la reabsorción de Ca^{2+} .²⁰

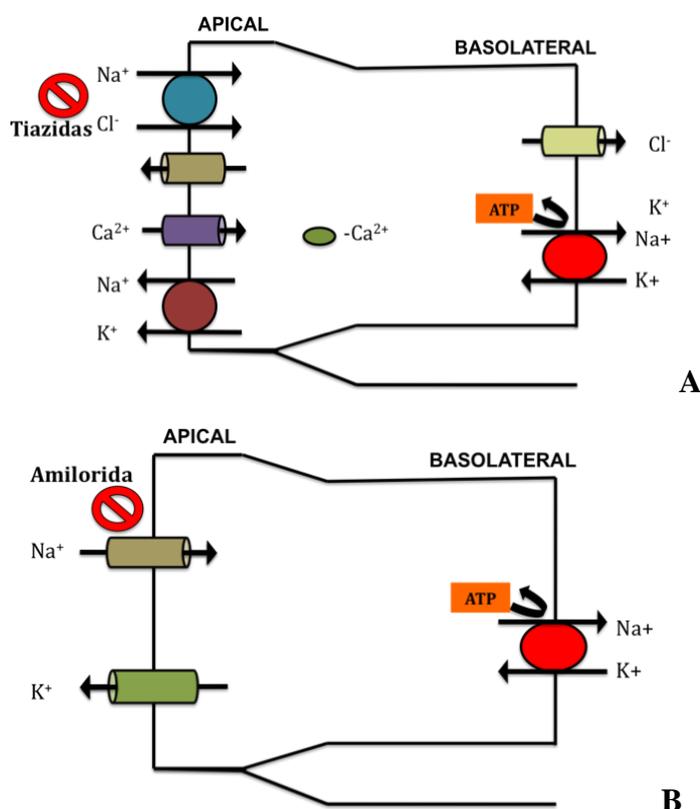


Figura 1.6. Esquema del sistema de co-transportadores y canales iónicos en la (A) primera y (B) segunda porción del túbulo contorneado distal (TCD1 y TCD2).

Los cambios en los niveles de la aldosterona o de la hormona antidiurética (ADH) pueden modular el número de canales ENaC que están abiertos en la membrana, así como la fosforilación y abundancia del co-transportador NCC en la membrana apical.²⁵⁻²⁸ La elevación de la aldosterona plasmática (por infusión o por restricción de Na⁺ en la dieta) incrementa el transporte de Na⁺ sensible a tiazidas en el TCD, al inducir la abundancia del co-transportador NCC.^{26,28} La elevación de los niveles de ADH y la hiperinsulinemia en condiciones como la obesidad, también producen un aumento en la abundancia de este transportador.^{25,27,48} Así mismo, estudios *in vivo* e *in vitro* han mostrado que el aumento o disminución de la angiotensina II (AngII) aumenta o disminuye la expresión de NCC en la membrana respectivamente.^{88,120} La expresión y abundancia del canal ENaC también incrementa al elevarse los niveles de aldosterona y ADH, y se ha sugerido que la AngII también puede elevar la actividad de este canal.^{25,26,121}

1.3.4 Túbulos conectores y colectores

Los túbulos conectores y túbulos colectores iniciales y corticales (TCN, ICT y TCC) están compuestos por dos tipos de células morfológica y funcionalmente distintas: las células principales (el tipo celular más abundante) y las células intercaladas. Las células intercaladas A o *a* secretan H⁺ y reabsorben K⁺, mientras que las B o *b* secretan HCO₃⁻.¹³ La reabsorción de Na⁺ sólo ocurre en las células principales, mediada por el canal de sodio epitelial ENaC en la membrana apical y la bomba ATPasa Na-K basolateral. Debido a que el transporte de Na⁺ a través de ENaC despolariza la membrana apical, la secreción de potasio a través de canales de potasio apicales ROMK se favorece.^{13,23,}

El manejo de K⁺ en los TCN, ICT y TCC puede variar en función del consumo de potasio en la dieta. Cuando el consumo es bajo, las células intercaladas α de los TCD, TCN, ICT y TCC reabsorben K⁺, a través de la bomba ATPasa H-K apical y de los canales de potasio basolaterales. Debido a que la abundancia de las bombas apicales ATPasa H-K aumenta dramáticamente, la carencia de potasio en la dieta muchas veces se asocia con la secreción acelerada de H⁺ y el desarrollo de alcalosis metabólica. En cambio si el consumo es normal

o elevado, las células principales de los ICT y TCC, y de la porción más proximal de los ductos medulares (*i.e.* sistema secretor de potasio distal) secretan K^+ , a través de canales de potasio apicales y la bomba ATPasa Na-K basolateral, aunque también puede ser secretado apicalmente por co-transportadores K-Cl de la familia SLC12 (Figura 1.7).

La entrada apical de Na^+ por ENaC y salida de K^+ a través de canales de potasio basolaterales en las células principales de los ICT y TCC constituyen dos baterías de igual signo que generan un voltaje transepitelial lumen-negativo (*i.e.* $\sim -40mV$), que favorece la reabsorción *paracelular* de Cl^- en estos segmentos. Sin embargo, el Cl^- también se reabsorbe en las células intercaladas β , a través del intercambiador apical $Cl^-HCO_3^-$ y de los canales basolaterales de Cl^- . Adicionalmente, los túbulos colectores pueden reabsorber Mg^{2+} y Ca^{2+} , aunque su papel en la regulación de la excreción de Ca^{2+} no está bien definido.¹³

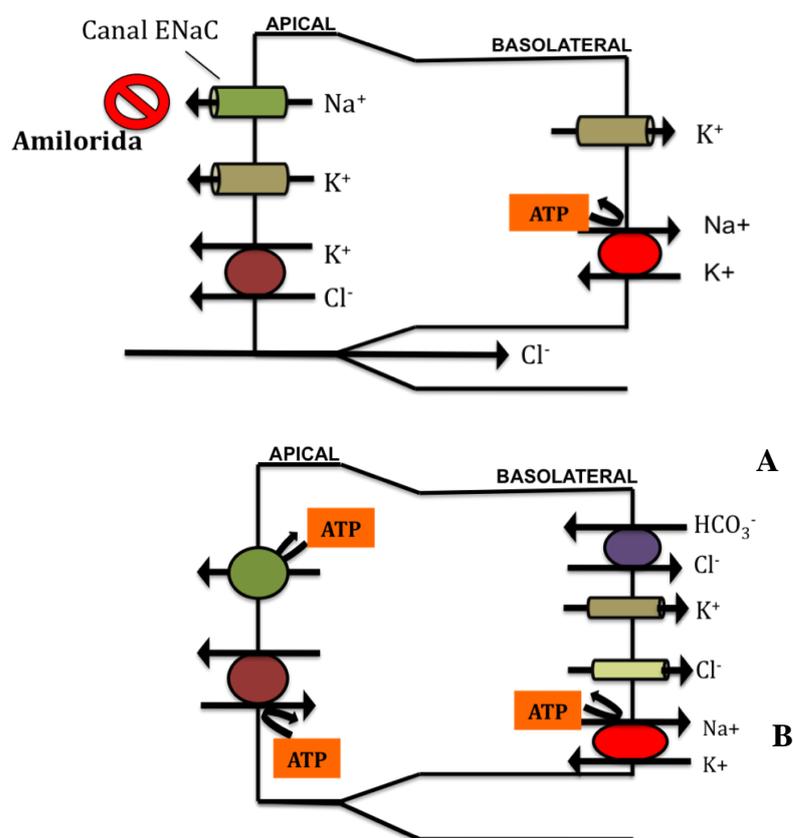


Figura 1.7. Esquema del sistema de co-transportadores y canales iónicos en (A) las células principales y (B) células intercaladas α del túbulo colector cortical (TCC).

1.3.5 Ductos Colectores Medulares

Los ductos colectores medulares (DCMs) reabsorben y depositan K^+ en el intersticio de la médula renal, independientemente del consumo de potasio en la dieta. El aumento en la concentración de este electrolito en el intersticio medular causa que las tDLHs de las nefronas yuxtamedulares lo secreten pasivamente hacia el lumen. En consecuencia, la tALH y TAL reabsorben el potasio depositándolo nuevamente en el intersticio, y contribuyendo, junto con los DCMs, a elevar su concentración en el intersticio medular. Este *reciclaje de potasio* es importante para maximizar la excreción de K^+ , cuando su consumo es elevado: ya que la concentración de K^+ en el intersticio medular se eleva, el potasio secretado en el lumen del ICT, TCC y la porción más proximal de los ductos medulares no se pierde más adelante, mediante la reabsorción pasiva en los DCMs, por lo que el potasio es excretado en la orina.¹³

Por otro lado, los ductos colectores medulares (DCMs) tienen un papel importante en la generación de un intersticio medular hipertónico y la formación de una orina concentrada. En condiciones normales, los DCMs (al igual que los ICT y TCC) son relativamente impermeables al agua, urea y NaCl.¹³ Sin embargo, en presencia de la hormona antidiurética (ADH), pueden reabsorber agua gracias a la expresión apical y basolateral de la proteína acuaporina 2 (AQP2).²⁸ Resultado de la reabsorción de agua, la urea *luminal* se concentra progresivamente hacia la papila renal, favoreciendo su reabsorción en las porciones más distales de los DCMs (*i.e.* médula interna), que se vuelven permeables a urea en presencia de ADH. Así, la urea se acumula en el intersticio medular y se secreta pasivamente en las tDLH y tALH de las nefronas yuxtglomerulares (cuyas asas se encuentran inmersas en la médula renal). La urea nuevamente alcanza el IMCD, donde puede reabsorberse nuevamente. Este *reciclaje de urea*, es un mecanismo que favorece la formación de una orina concentrada en presencia de ADH por la siguiente razón: dada la alta concentración de urea en el intersticio, el agua se reabsorbe, a favor del gradiente osmótico, a través de un epitelio transitoriamente permeable al agua. En una situación opuesta, cuando la ADH no está presente, los ICT, TCC y DCM reabsorben menos agua y la DCMI menos urea, por lo que una mayor cantidad de urea se excreta en orina diluida.

Por esta razón, la hormona antidiurética permite conservar agua en el organismo y constituye uno de los elementos más importantes en la regulación de la osmolalidad del líquido extracelular (y por tanto del líquido intravascular). El aumento en la osmolalidad o una gran reducción en el volumen del líquido extracelular estimulan la liberación de la hormona antidiurética por la pituitaria posterior (neurohipófisis).¹³

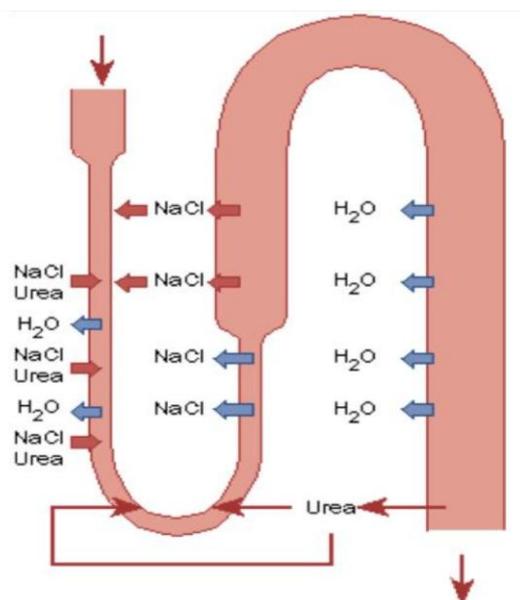


Figura 1.8. Reciclaje de urea y reabsorción de agua en presencia de la hormona antidiurética (ADH). También se muestra el papel de las porciones ascendentes del asa de Henle en la formación de un intersticio hipertónico a través del sistema contracorriente (Adaptada de Boron & Boulpaep, 2009).

1.3.6 Sistema renina-angiotensina-aldosterona

El manejo renal de NaCl controla el volumen de líquido intravascular y constituye el mecanismo básico para la regulación a largo plazo de la presión arterial.³ Las múltiples interacciones con el sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) confieren al riñón capacidades de control específicas.¹² La renina es una enzima sintetizada en las células yuxtglomerulares (YG) del aparato yuxtglomerular de los riñones (Figura 1.5). Cuando la presión arterial desciende, reacciones intrínsecas del riñón provocan la liberación de renina por las células YG. Una pequeña cantidad permanece en los riñones e inicia varias funciones en ellos, mientras que la mayor parte se incorpora a la circulación sanguínea.

Una vez en la circulación, la renina actúa enzimáticamente sobre la proteína plasmática *angiotensinógeno* sintetizada en el hígado, liberando un péptido de 10 aminoácidos denominado *angiotensina I*, con propiedades ligeramente vasoconstrictoras que no causan alteraciones significativas en la función circulatoria. Pocos segundos después, la *enzima convertidora de angiotensina* (ECA), presente en el endotelio, escinde a la angiotensina I en un péptido de 8 aminoácidos llamado *angiotensina II* (AngII). La AngII, un vasoconstrictor extremadamente potente, persiste en la sangre durante 1 ó 2 minutos y luego es inactivada por múltiples enzimas sanguíneas y tisulares que en conjunto se denominan *angiotensinasa*.¹²

Durante su permanencia en la sangre, la AngII ejerce dos efectos principales que pueden elevar la presión arterial. El primero es la *vasoconstricción*, que se produce rápidamente y ocurre de manera intensa en las arterias y en menor grado en las venas. La constricción de las arteriolas aumenta la resistencia periférica, elevando la presión arterial, mientras que la discreta constricción de las venas aumenta el retorno venoso al corazón, lo que eleva el volumen sanguíneo. El segundo efecto de la AngII es la disminución de la excreción de sal y de agua en el riñón, que permite aumentar el volumen de líquido extracelular y de la presión arterial a lo largo de un periodo de horas y días. Este efecto a largo plazo resulta más potente que el mecanismo vasoconstrictor agudo, y se logra a través de dos mecanismos: 1) actuando directamente sobre los riñones, y 2) provocando la liberación de aldosterona, los cuales aumentan la reabsorción de sal y agua en los túbulos renales.

La AngII posee varios efectos intrarenales que favorecen la retención de sal y de agua. Probablemente el más importante, es la constricción de vasos sanguíneos renales, lo cual disminuye el flujo sanguíneo a través de los riñones. Como consecuencia se filtra menos líquido a los túbulos a través de los glomérulos. El flujo lento de sangre a través de los capilares peritubulares reduce su presión, lo que permite una reabsorción osmótica rápida del líquido tubular. Por ambas razones se excreta menos cantidad de orina. Además, la AngII ejerce un moderado efecto sobre las propias células tubulares, aumentando la reabsorción de sodio y agua. En conjunto, estas acciones de la AngII pueden disminuir la diuresis de cuatro a seis veces.¹²

Una de las funciones más importantes de la aldosterona es causar un aumento en la reabsorción renal de sodio, provocando la retención de agua y la elevación del volumen extracelular y de la presión arterial en el cuerpo. Tanto el efecto directo de la AngII como el efecto indirecto de la aldosterona sobre el riñón son importantes para el control a largo plazo de la presión arterial.¹²

1.4 Las cinasas WNKs

Las WNKs son un pequeño grupo de cinasas serina/treonina ubicadas dentro de la superfamilia de cinasas, que fue descubierto en el año 2000 en un intento por identificar nuevos miembros de la familia de cinasas MEK (Cinasas MAPK/ERK^{**}).⁵⁵ Fueron llamadas WNKs (Whit No lysine [K]) debido a que carecen de la lisina catalítica característica en el resto de las cinasas Ser/Thr, ubicada en el subdominio II del dominio cinasa. En contraposición, la lisina catalítica de las WNKs se ubica en el subdominio I del dominio cinasa.⁵⁶ A la fecha, la familia de WNKs se compone por 4 genes, *WNK1-4* ubicados en el cromosoma 12, 9, X y 17 respectivamente.⁵⁷

Las WNKs poseen una estructura de dominios semejante, que incluye un dominio catalítico altamente conservado (~85-90% de similitud), flanqueado por un dominio amino-terminal corto y uno carboxilo terminal de tamaño variable (Figura 1.9).⁴⁹ El dominio C-terminal contiene un dominio autoinhibitorio, capaz de suprimir la actividad de cinasa, un dominio ácido y numerosos motivos de interacción proteína-proteína, que incluyen entre uno y dos dominios *coiled coil* y múltiples motivos ricos en prolina.^{55,54,58,59} Fuera de estos dominios y motivos conservados, el resto de los aminoácidos entre los miembros de la familia divergen.⁴⁹

^{**} **MAPK:** Proteína Cinasa Activada por Mitógeno, **ERK:** Cinasa Regulada por Señal Extracelular

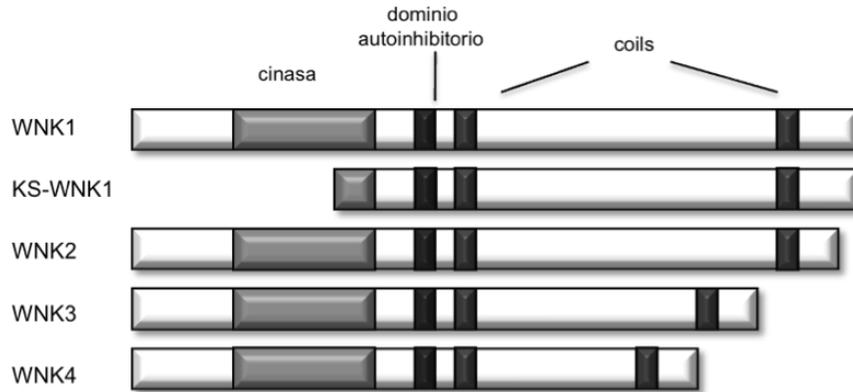


Figura 1.9. Miembros de la familia WNK. Se muestra en color gris el dominio cinasa, en color negro el dominio autoinhibitorio y en gris oscuro los dominios *coiled coil*.

Las WNKs no están presentes en levaduras y bacterias, dejando ver que éstas tienen un papel importante en las funciones biológicas multicelulares. Las WNKs regulan varios procesos, como el balance electrolítico, señalización celular, supervivencia, proliferación y desarrollo de órganos.⁶² Las WNKs pueden interactuar entre sí físicamente o a través de fosforilación, formando homo y heterodímeros.^{59,62,63,64,65} También pueden hacerlo con otras cinasas, que incluyen cinasas activadas por mitógenos, cinasas de la vía de señalización del factor de crecimiento β , la sinaptotagmina y SPAK y OSR1, dos cinasas serina/treonina similares de la familia ‘cinasas relacionadas con Ste20’.^{66,67,68}

Las WNKs se expresan en diversos tejidos, y existen diferentes formas de *splicing* con expresión tejido-específica.^{55,69,70} La expresión de WNK1, WNK3 y WNK4 ocurre en epitelios que absorben o secretan Cl⁻. En riñón, WNK1 y WNK3 se expresan a lo largo de la nefrona, mientras que la isoforma alternativa específica de riñón KS-WNK1, que carece del dominio cinasa debido a *splicing* alternativo, se expresa en la ‘nefrona distal sensible a aldosterona’ (*i.e.* TCD, TCN y TCC). De modo similar, WNK4 se expresa principalmente en la nefrona distal sensible a aldosterona. Wilson *et al.* reportaron que WNK1 se encuentra en el citosol, mientras que WNK4 está presente en las uniones estrechas.⁵⁴ WNK2 se expresa principalmente en cerebro, hígado e intestino y es la única isoforma que no está presente en riñón.¹²⁵

1.5 Pseudohipoaldosteronismo tipo II

El pseudohipoaldosteronismo tipo II (PHAI; OMIM No.145260), también conocido como síndrome de Gordon o hipertensión hipercalemica familiar (FHHt), es una entidad autosómica dominante caracterizada por hipertensión arterial, hipercalemia, acidosis metabólica, hipercalciuria e hipercloremia, que se corrige con bajas dosis de diuréticos tipo tiazida (inhibidores específicos del co-transportador NCC expresado el TCD).⁴⁷

Los estudios iniciales para definir las bases genéticas del PHAI se enfocaron en el co-transportador de $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ sensible a los diuréticos tipo tiazidas (NCC) por dos razones principales: 1) el fenotipo de este síndrome se corrige por completo con diuréticos tipo tiazidas y 2) es la imagen en espejo del síndrome de Gitelman, una enfermedad de herencia autosómica recesiva caracterizada por alcalosis metabólica, hipocalemia e hipotensión arterial, que se origina por mutaciones en el gen *SLC12A3* que codifica al co-transportador NCC, las cuales provocan la pérdida de su función.⁴⁸ Ya que el fenotipo del PHAI es consistente con la hiperfunción del NCC, inicialmente se sugirió que la presencia de mutaciones que producen ganancia en la función de NCC podrían ser las causantes del PHAI.⁴⁹ Sin embargo, un análisis genómico mostró la falta de ligamiento entre el PHAI y el gen *SLC12A3*, eliminando al co-transportador como responsable directo del síndrome.⁵⁰ Más adelante, se mostró que el PHAI es causado por más de un gen, al encontrar ligamiento entre el síndrome y los *loci* 1q31–q42 y 17p11–q21.⁵¹ En estudios posteriores dos regiones más se involucraron con el PHAI. Disse-Nicodeme *et al.*⁵² observaron ligamiento positivo con el *locus* 12p13.3 en una familia francesa, mientras que en otra familia con PHAI, no hallaron ligamiento con ninguno de los cromosomas antes mencionados (1, 12 y 17), por lo que el PHAI se atribuyó a un *locus* distinto aun por definir.⁵³ Por tanto, al menos 4 genes son responsables de causar PHAI de manera independiente.

En el año 2001, Wilson *et al.* encontraron que los genes causantes del PHAI en los cromosomas 12 y 17 son *WNK1* y *WNK4*, y que grandes deleciones en el intrón 1 de *WNK1* (que provocan un aumento en la expresión de *WNK1*) y mutaciones sin sentido

presentes en su mayoría en un pequeño dominio ácido altamente conservado de WNK4 son las responsables del PHAI. ⁵⁴ Este dominio ácido (Figura 1.10) está ubicado inmediatamente después del primer dominio *coiled-coil* y está constituido por 10 residuos de aminoácidos, 5 de los cuales son ácidos y poseen una carga negativa que es eliminada por las mutaciones que causan PHAI (*i.e.* E562K, D564A, D564H, Q565E; R1185C fuera del motivo y ubicado después del segundo *coiled-coil*). ^{54,61}

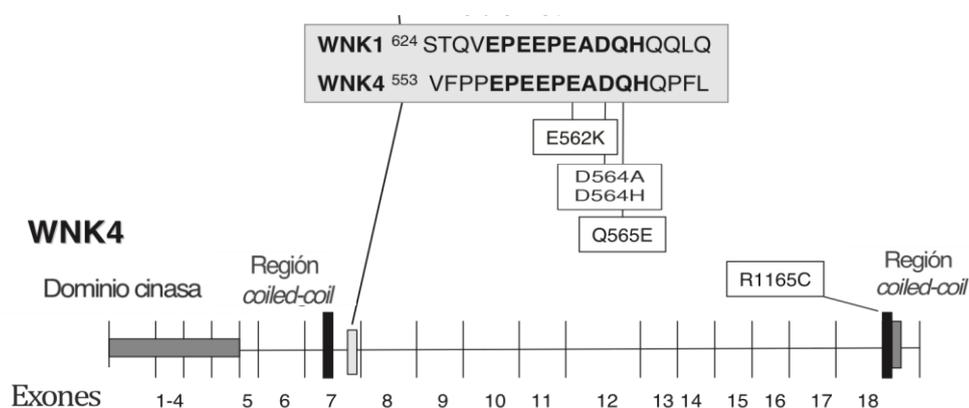


Figura 1.10. Dominio ácido de WNK4. Se muestra su ubicación en el gen (exón 7) y las mutaciones reportadas por Wilson *et al.* que provocan PHAI (Imagen tomada de Cope *et al.* 2005).⁷¹

1.6 Papel de WNK1 y WNK4 en el manejo renal de electrolitos

El descubrimiento de que mutaciones en los genes *WNK1* y *WNK4* causan el PHAI y la identificación de su expresión en el túbulo distal contorneado y colector por ensayos de inmunoprecipitación, fueron los primeros indicios de su participación en la regulación del manejo renal de electrolitos y en el control de la presión arterial. A la fecha los mecanismos que provocan el PHAI no están entendidos del todo, sin embargo, diversos estudios sobre el papel fisiopatológico de WNK1 y WNK4 han permitido definir, al menos en parte, el papel fisiológico de estas proteínas en la regulación de la presión arterial y comprender los mecanismos de regulación en los que participan.

Ya que los estudios iniciales para definir las bases genéticas del PHAII se enfocaron en el co-transportador de Na^+ - Cl^- sensible a los diuréticos tipo tiazidas (NCC), se consideró la posibilidad de que las WNKs regularan su función y que las alteraciones de dicha regulación provocaran la hiperfunción de NCC responsable de la HTA característica del PHAII. Esta hipótesis se evaluó por dos grupos distintos de investigación y en ambos casos se demostró que WNK4 puede regular negativamente la actividad de NCC.^{72,74} Cuando este transportador se co-expresó con WNK4 en ovocitos de *Xenopus laevis* (un sistema de expresión heterólogo que permite clonar y analizar las propiedades funcionales de éste y otros transportadores) la captación de Na^+ por NCC disminuyó notablemente (>70%). Este efecto está mediado por la reducción en la expresión del co-transportador a la membrana plasmática del ovocito. Este efecto fue dependiente de la actividad cinasa ya que al co-inyectar una mutante de WNK4 sin actividad cinasa, no se produjo ninguna reducción en la función del NCC.⁷² Cuando se analizó el efecto de las mutaciones de *WNK4* que originan PHAII (Q562E y E559K en WNK4 de ratón), se encontró que éstas eliminan la actividad inhibitoria de WNK4 sobre NCC y reducen la expresión del transportador en la membrana. Estas observaciones han sido corroboradas por otros grupos utilizando células en cultivo como sistemas de expresión y han demostrado que la reducción de la expresión de NCC está mediada por degradación lisosomal (*i.e.* no por vesículas cubiertas clatrina).^{65,73} Por otro lado, Yang *et al.* mostraron que el dominio C-terminal de WNK4 es suficiente para inhibir a NCC y que esta inhibición no depende de la actividad de cinasa.⁶⁴

A diferencia de WNK4, la cinasa WNK1 no ha mostrado tener un efecto directo sobre NCC ni en otros sistemas de transporte de la nefrona distal. Al parecer, WNK1 tiene efecto indirecto a través de la interacción y de la regulación de otras cinasas, incluyendo a WNK4. Por ejemplo, se ha mostrado que la isoforma completa de WNK1 (L-WNK1) suprime la inhibición que WNK4 tiene sobre NCC, es decir WNK1 inhibe a WNK4. Sin embargo WNK1 no tiene ningún efecto directo sobre el co-transportador NCC.⁷⁴ Esta acción, es a su vez modulada negativamente por la isoforma alternativa KS-WNK1, que abate el efecto de L-WNK1 sobre WNK4.⁶³ En individuos con PHAII causado por deleciones intrónicas en el gen *WNK1*, la disminución en el cociente KS-WNK1/L-WNK1 permite la activación de NCC, lo que provoca hipertensión arterial.⁷⁵

Ya que una de las características más prominentes del PHAII es la hipercalemia, la localización de WNK4 en el TCD y los ductos colectores sugirieron que esta cinasa podría tener un efecto directo sobre el canal de potasio ROMK (ruta principal de secreción renal de K^+). Apoyando esta idea, Kahle *et al.* demostró que la actividad de ROMK disminuye notablemente por la WNK silvestre y que este mecanismo no parece estar relacionado con la actividad de cinasa, ya que la mutante de WNK4 sin actividad de cinasa (D318A) y constructos de WNK4 que carecen de los tres primeros subdominios del dominio cinasa inhibieron en igual medida al canal ROMK.¹¹⁶ A diferencia del efecto sobre NCC, el mecanismo de inhibición consiste en la internalización de ROMK a través de vesículas cubiertas de clatrina.⁷⁶ Por otro lado, estudios en células embrionarias de riñón (HEK-293) han mostrado que WNK1 participa en la modulación negativa de la actividad basal de ROMK.⁷⁶ Esta inhibición es independiente de la actividad de cinasa y resultado de la internalización del canal a través de vesículas cubiertas de clatrina, y se contrarresta por efecto de la isoforma corta KS-WNK1.⁷⁶ Las mutaciones WNK4-PHAI, contrario al efecto que tienen sobre NCC, provocan un aumento en la inhibición de ROMK (así como un aumento en la interacción del canal con la intersectina, necesaria en el proceso de endocitosis mediado por clatrina).⁷⁷

Un tercer blanco de regulación de WNK4 es el canal epitelial de sodio (ENaC), importante vía de reabsorción de sodio en la nefrona distal. Ring *et al.* mostraron que WNK4 inhibe la actividad del canal ENaC a través de la acción de Nedd4-2, una ubiquitina ligasa que promueve la endocitosis del canal en vesículas cubiertas de clatrina.^{24,78,79} Esta inhibición es independiente de la actividad de cinasa y revertida por mutaciones en WNK4-PHAI (Q562E en ratón).⁷⁸ Contrariamente, WNK1 estimula la expresión de ENaC en la superficie celular, al prevenir la ubiquitinación que causa Nedd4-2 en el canal de la siguiente manera: WNK1 induce la fosforilación de la cinasa SGK1 (*Serum and glucocorticoid-induced kinase 1*) y ésta a su vez fosforila e inactiva a Nedd4-2.^{80,81}

Un cuarto blanco de regulación de WNK4 son las claudinas, proteínas que regulan el flujo paracelular de Cl^- en la nefrona distal. WNK4 incrementa el flujo paracelular de Cl^- , efecto que depende de la actividad de cinasa. Las mutaciones WNK4-PHAI se asocian a un

incremento en la permeabilidad de Cl⁻. Finalmente WNK4, también puede inhibir la actividad de los co-transportadores K⁺-Cl⁻: KCC1, KCC3 y KCC4, que en la nefrona distal son críticos para la secreción de potasio y de protones (H⁺), en el TCD y ductos colectores, respectivamente. Este efecto es dependiente de la actividad de cinasa.

Así mismo, diversos análisis bioquímicos y funcionales han mostrado que las WNKs y los co-transportadores catión-cloruro de la familia SLC12A pueden interactuar con SPAK (*Ste20-related proline and alanine rich kinase*) y OSR1 (*oxidative stress responsive kinase 1*), dos proteínas cinasas similares de la familia 'cinasas relacionadas con Ste20'. El dominio C-terminal conservado (TCC) de SPAK y OSR1 interactúa con proteínas que contienen motivos RFXV/I.^{67,68,82} WNK1 y WNK4 contienen dominios RFXV/I que les permiten interactuar con SPAK/OSR1 y fosforilarlas en residuos conservados del asa T y del motivo S (Thr233 y Ser373 de SPAK; Thr185 y Ser325 de OSR1). La fosforilación del residuo del asa T (presente en la mayoría de las cinasas) activa a SPAK y OSR1.^{66,83} Estas cinasas también interactúan con los co-transportadores NCC, NKCC1 y NKCC2 que contienen motivos RFXV/I. Una vez asociados, SPAK y OSR1 activan a los co-transportadores por fosforilación en residuos conservados del dominio N-terminal.^{84,85,86} Estudios recientes han mostrado que, tanto WNK1 como WNK4, estimulan a NCC y NKCC1-2, a través de una vía de fosforilación y activación de las cinasas SPAK y OSR1.^{84, 89, 90}

Estudios en cultivos celulares, han mostrado que WNK1 se activa por estrés hiperosmótico (*e.g.* sorbitol, NaCl o KCl) y en condiciones hipotónicas con bajas concentraciones de Cl⁻ (mientras que activadores de otras vías de señalización, como factores de crecimiento, estrés celular no-osmótico o inhibidores de fosfatasas, no la estimulan).^{55,62,83,85,87} Esta activación se da por la fosforilación del residuo Ser382 localizado en el asa T, conservado en todas las WNKs. Zagorka *et al.* mostraron que el estrés hipertónico también fosforila y activa a SPAK y OSR1, y que esta activación disminuye notablemente en ausencia de WNK1, sugiriendo que SPAK y OSR1 son sustratos fisiológicos naturales de esta cinasa bajo estas condiciones.⁸³ De manera interesante el estrés hipotónico con bajas concentraciones de cloruro también fosforila y activa a SPAK y al co-transportador NCC,

mientras que las condiciones hipertónicas provocan la fosforilación de NKCC2.⁸⁶

1.6.1 WNK4 tiene tres estados funcionales

Los distintos efectos de WNK4 sobre el sistema de transporte renal han llevado a pensar que esta cinasa puede existir al menos en 3 estados funcionales.^{88,89} Un estado basal o de equilibrio, que inhibe a NCC, ROMK y ENaC, y estimula ligeramente el flujo paracelular de Cl⁻; un segundo estado claramente identificado, simulado por las mutaciones que provocan PHAI, donde WNK4 ya no inhibe a NCC y ENaC, aumenta la inhibición sobre ROMK y simultáneamente estimula el flujo paracelular de Cl⁻; y un tercer estado, que involucra el efecto de WNK4 cuando ha sido fosforilada por la SGK1, una cinasa cuya transcripción es inducida por aldosterona. Una mutación a ácido aspártico en el sitio canónico de fosforilación para SGK1 (S1169D en WNK4 de ratón) simula el tercer estado. Esta mutación no altera el efecto sobre NCC, sin embargo elimina el efecto inhibitorio de WNK4 sobre ENaC y ROMK (Tabla 1.3).^{56,78,88,89,90}

	WNK4	WNK4-PHAI	S1169D-WNK4	WNK1
NCC	↓	↑	↓	-
ROMK	↓	↓↓↓	↑	↓
ENaC	↓	↑	↑	↑
Claudina	↑	↑↑	ND	↑
NKCC	↓	↓	ND	ND

Tabla 1.2. Efectos de WNK1 y WNK4 en tres estados funcionales diferentes simulados por las mutaciones PHAI y S1169D, sobre diferentes canales y co-transportadores expresados en la nefrona distal (Tomada de San Cristóbal *et al.*, 2009.).⁸⁸

Como puede notarse el fenotipo PHAI-WNK4 aumenta la reabsorción de Na⁺ en la nefrona distal, al mismo tiempo que potencia la inhibición de la secreción renal de K⁺. En contraste, la mutación S1169A-WNK4 continua suprimiendo la actividad de NCC, mientras que maximiza la secreción de K⁺, resultado de la activación del canal ROMK y la formación de un voltaje lumen-negativo que la reabsorción de Na⁺ a través del canal ENaC genera.^{78,88,89} En base a ello, se ha propuesto que WNK4 actúa como un ‘interruptor’

molecular que permite al riñón responder de manera diferencial a la aldosterona (*i.e.* paradoja de la aldosterona), una hormona liberada en dos situaciones fisiológicas diferentes: la hipovolemia y la hipercalcemia. Durante la hipovolemia, la liberación de aldosterona maximiza la reabsorción renal de sal, preservando y restaurando el volumen intravascular. En la hipercalcemia, la liberación de aldosterona maximiza la secreción de potasio sin alterar la reabsorción de Na^+ .^{89,90}

Ya que la AngII se libera durante la hipovolemia, y no durante la hipercalcemia, se ha propuesto que el receptor acoplado a proteína G de AngII (AT_1R) es la contraparte fisiológica del estado funcional generado por las mutaciones *WNK4-Phaii*.^{13,88} En ovocitos de *Xenopus*, se demostró que la señalización de AngII mediada por su receptor activa al co-transportador NCC al eliminar la actividad inhibitoria de WNK4 y que el efecto de la AngII sobre NCC requiere de la modulación de la actividad de SPAK.⁸⁸ Así, se ha propuesto que durante la normovolemia, cuando el sistema renina-angiotensina-aldosterona está suprimido, WNK4 actúa como un inhibidor natural de NCC, al reducir la actividad de los co-transportadores en la membrana apical. En cambio en la hipovolemia, cuando el sistema renina-angiotensina-aldosterona se activa, la AngII interactúa con el receptor AT_1R , convirtiendo a WNK4 en un activador de NCC al incrementar el tráfico del co-transportador hacia la membrana plasmática, posiblemente mediado por SPAK.⁸⁹ De acuerdo con esta propuesta, en ratones *knock-in* *WNK4*^{D561A/+} que desarrollan un fenotipo *Phaii* (hipertensión hipercalcémica y alta sensibilidad a tiazidas) se observa un incremento en la fosforilación de SPAK y OSR1, mientras que en ratones *knock-in* *SPAK*^{243A/243A}, cuya Thr en el asa T (Thr243) ha sido mutada a Ala para prevenir su activación por WNKs, se observa una disminución notable tanto en la fosforilación de NCC como en la cantidad del co-transportador (con niveles de mRNA normales).^{90,84} Así mismo, Rozansky *et al.*, mostraron que la fosforilación simultánea sobre WNK4 en los residuos S1169 y S1196 que lleva a cabo SGK1, también puede eliminar el efecto negativo de WNK4 sobre NCC, por lo que esta vía también podría participar en la respuesta a hipovolemia que involucra a la AngII.²⁶

1.7 Componente genético de la HTA

Diversos estudios epidemiológicos y familiares, han mostrado que entre el 30-50% de los factores que originan la hipertensión arterial esencial son genéticos.^{7,8} Sin embargo, se conoce poco sobre las bases genéticas de la HTA. Las estrategias que se han utilizado para buscar variantes genéticas que participan en la regulación de la presión arterial son básicamente dos:

1) Escrutinio del genoma completo.

Este tipo de estrategia incluye estudios de mapeo por ligamiento y estudios de asociación por escrutinio del genoma completo (GWAS por sus siglas en inglés ‘genome-wide association studies’).²⁹ Aunque este tipo de estudios ha permitido encontrar algunos genes que confieren susceptibilidad a distintas enfermedades comunes; en el caso de la hipertensión arterial los resultados han sido un tanto desalentadores.^{30,31,32} Posiblemente esto se deba a la gran heterogeneidad y la alta prevalencia de la enfermedad, y en particular a que no se han buscado asociaciones a subfenotipos específicos.³³

2) Los estudios de genes candidatos.

Consisten en buscar variantes polimórficas (comunes o raras) en genes de función conocida, y que pudieran conferir susceptibilidad a padecer hipertensión arterial en la población general. El estudio de enfermedades mendelianas raras que cursan con hipertensión o hipotensión ha aportado información valiosa en este tipo de estrategia. De manera sorprendente, todos estos síndromes son producto de mutaciones en genes que afectan el manejo renal de sal.¹² Las mutaciones que causan un incremento neto en la reabsorción de sal producen hipertensión, mientras que las que causan pérdida renal de sodio generan hipotensión.³⁴ Estos genes codifican para distintos transportadores y canales iónicos renales encargados de la reabsorción y secreción de iones en la nefrona; o bien, son proteínas citoplásmicas encargadas de la regulación de dichos transportadores (ver Tabla 1.3).

Nombre del gen	Proteína Codificada	Función	Síndrome	Descripción
SLC12A3 (11q24.3)	TSC/NCC (Co-transportador de Na ⁺ -Cl ⁻)	Responsable de la reabsorción de Na ⁺ -Cl ⁻ en TCD	Gitelman ³	Mutaciones que causan pérdida de función en NCC. El síndrome se caracteriza por síntomas y signos neuromusculares y presión arterial más baja de lo normal, niveles bajos de Mg ²⁺ sérico y de Ca ²⁺ urinario.
SCNN1B/G (16p12.1)	ENaC (Subunidad 1 β y γ del canal Na ⁺ no-dependiente de voltaje)	Media la electro-difusión apical del Na ⁺ en la nefrona distal sensible a aldosterona	Liddle ³	HTA temprana acompañada de alcalosis hipocalémica, actividad plasmática de renina suprimida y bajos niveles plasmáticos de aldosterona. Las mutaciones provocan un aumento en la actividad de ENaC, atribuible a un incremento de estos canales en la superficie celular.
SCNN1A (12p13.31) SCNN1B/G (16p12.1)	ENaC (Subunidad α , β , γ del canal Na ⁺ no-dependiente de voltaje)	Media la electro-difusión apical del Na ⁺ en la nefrona distal sensible a aldosterona	PHAI recesivo ³	Mutaciones que causan pérdida de función en cualquiera de las 3 subunidades de ENaC causan una <i>forma recesiva de PHAI</i> , caracterizado por pérdida de sal e hipotensión en el periodo neonatal, con hipercalemia y acidosis metabólica, pese a niveles altos de aldosterona. A diferencia del PHAI estos paciente no mejoran con la edad.
SLC12A1 (15q21.1)	BSC1/NKCC2 (Co-transportador Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻)	Reabsorbe Na: K: 2Cl en membrana apical de la TAL	Bartter tipo I ³⁵	Mutaciones con pérdida de función en NKCC2 eliminan la reabsorción apical de Na ⁺ , Cl ⁻ y K ⁺ en la TAL, lo que provoca pérdida renal de NaCl con la consecuente activación del sistema renina-angiotensina y alcalosis hipocalémica.
SCNN1B (16p12.1)	KCNJ1/ROMK (Canal de potasio)	Secreta K ⁺ en la membrana apical de varios segmentos de la nefrona	Bartter tipo II ³⁵	Debido a que el fluido luminal en la TAL tiene una alta concentración de Na ⁺ y Cl ⁻ y baja concentración de K ⁺ , mutaciones en ROMK provocan la pérdida renal de sal, debido a que el canal no puede reciclar el K ⁺ que reabsorbe el co-transportador NKCC2. Por tanto la reabsorción de NaCl y K en la TAL se detiene. El síndrome se caracteriza por deshidratación severa, hipoercalciuria, nefrocalcinosis. No se distingue del Bartter I.
CLCNKB (1p36.13)	CICKb (Canal de cloro, isoforma Kb)	Reabsorbe Cl ⁻ en la membrana basolateral de la TAL	Bartter tipo III ³⁵	Mutaciones en <i>CLCNKB</i> también provocan la pérdida renal de sal, debido a que el Cl ⁻ que reabsorbe NKCC2 no puede atravesar la membrana basolateral hacia el intersticio. Como resultado la reabsorción de NaCl y K ⁺ se detiene causando pérdida de NaCl, hipovolemia, elevación de renina y aldosterona e hipercalemia.

BSND	Barttina (Subunidad accesoria del canal CLC-Kb en el riñón y oído)	La barttina modula la estabilidad, localización en la superficie celular y función de los canales CLC-Ks.	Bartter tipo IV ³⁶	Mutaciones en BSND evitan que el CLCNKB reabsorba Cl ⁻ en varias secciones de la nefrona, así como en la <i>estria vascularis</i> y el laberinto vestibular del oído interno. Este síndrome está caracterizado por pérdida renal de NaCl, alcalosis metabólica hipocalémica, poliuria fetal y postnatal, resultado de la reabsorción tubular alterada, y sordera.
CASR (3p21.1)	CaSR (Receptor que censa Ca ²⁺ extracelular)	Receptor acoplado a proteína G que se activa por el incremento en la [Ca ²⁺] extracelular en la TAL.	Bartter V ³⁷	Mutaciones autosómicas dominantes que causan ganancia en la función en este receptor causan un fenotipo tipo Bartter, caracterizado por hipocalcemia.
WNK1 (12p13.33)	Wnk1/WNK1 (Cinasa sin lisina 1)	Regula la actividad de ROMK y ENaC, y regula negativamente el efecto que WNK4 tiene sobre NCC.	Pseudo-hipoaldosteronismo II (PHAI) ⁴⁷	Enfermedad autosómica dominante caracterizada por hipertensión arterial, hipercalemia, acidosis metabólica e hipercalciuria, con un fenotipo dependiente de Cl ⁻ y corregido con bajas dosis de diuréticos tipo tiazida
WNK4 (17q21.31)	Wnk4/WNK4 (Cinasa sin lisina 4)	En estado basal inhibe la expresión y actividad del co-transportador NCC, reduce la expresión y actividad de ROMK. Promueve la endocitosis del canal ENaC. Regula a NKCC2 en la TAL. Regula claudinas y KCCs expresados renalmente.	Pseudo-hipoaldosteronismo II (PHAI) ⁴⁷	Enfermedad autosómica dominante caracterizada por hipertensión arterial, hipercalemia, acidosis metabólica e hipercalciuria, con un fenotipo dependiente de Cl ⁻ y corregido con bajas dosis de diuréticos tipo tiazida

Tabla 1.3. Genes que participan en la regulación de la homeostasis renal de electrolitos, volumen intravascular y presión arterial y cuyas mutaciones provocan síndromes mendelianos raros caracterizados por hipotensión o hipertensión.

La estrategia más utilizada para el estudio de genes candidato es comparar la frecuencia de polimorfismos conocidos reportados en el HapMap en casos y controles. Aunque esta estrategia ha sido útil para encontrar la participación de algunos genes en diferentes enfermedades multifactoriales, tiene algunas limitaciones:

- Los resultados suelen diferir de acuerdo a la población estudiada;
- En poblaciones genéticamente heterogéneas, como la mexicana, pueden dar resultados falsos-positivos o negativos si existe estratificación de la población^{38,39};

- Si el alelo en estudio es poco frecuente y tiene un efecto relativamente pequeño, se necesitan muestras demasiado grandes (decenas de miles de casos) para tener un poder estadístico adecuado, pudiendo dar resultados falsos-negativos⁴⁰.

Este tipo de estudios ha demostrado que la variación genética en los genes del sistema renina-angiotensina aldosterona confiere susceptibilidad a la hipertensión arterial esencial en diferentes poblaciones.⁴¹ Sin embargo, en general se calcula que las variantes comunes explican sólo una pequeña fracción de la susceptibilidad a enfermedades comunes como la hipertensión esencial.²⁹

En el caso de la población mexicana existen dos limitantes más: la población amerindia y las poblaciones mestizas derivadas no están incluidas en el HapMap; y se ha reportado que éstas poseen marcadores genéticos que no están presentes en otras poblaciones.^{42,43} Esto recalca la necesidad de buscar polimorfismos o variantes no descritas, que pudieran ser propias de nuestra población.

Una estrategia alternativa que permite encontrar variantes nuevas consiste en la secuenciación de genes candidato en grupos reducidos de individuos con fenotipos extremos.⁴⁴ Si la frecuencia de variantes es distinta en ambos grupos, es probable que dicha(s) variante(s) sean funcional(es). Cuando la variable a estudiar es continua (*i.e.* presión arterial), los grupos extremos consisten en individuos con niveles de presión arterial más alta y de presión arterial más baja de la población (por percentilas de acuerdo a edad y género). Esta estrategia se utilizó recientemente en población caucásica, en donde se encontró que diferentes variantes raras en genes transportadores que participan en el metabolismo renal de sodio (NTCC, NKCC2 y ROMK) involucrados en la regulación de la presión arterial en la población general.⁴⁵ En caso de variables dicotómicas (hipertensión *versus* normotensión) se busca alguna característica que indica mayor gravedad o mayor probabilidad de un componente genético en los casos, como lo sería una edad de inicio temprano.⁴⁶

1.8 Variación génica reportada en los genes *WNK1* y *WNK4*

El gen *WNK1*, localizado en el cromosoma 12, está compuesto por 28 exones que codifican una proteína completa de 2,382 aminoácidos (Figura 1.11). Se han reportado 1,814 polimorfismos en este gen, 82 ubicados en la región codificante, de los cuales 44 son polimorfismos de un solo nucleótido que producen cambios de aminoácido (cSNPs). El dominio N-terminal, cinasa y C-terminal contienen 5, 7 y 32 cSNPs respectivamente.⁹¹ La variación en la región codificante está especialmente contenida en los exones 1, 5, 19 y 24. La gran mayoría de los polimorfismos de la región codificante tienen una frecuencia baja (<0.1), y son pocos los que están validados por proyectos como el HapMap y el proyecto 1000Genome. El resto de los 1,816 cambio reportados en el gen *WNK1* se ubican en las regiones intrónicas y no codificantes del gen.⁹¹

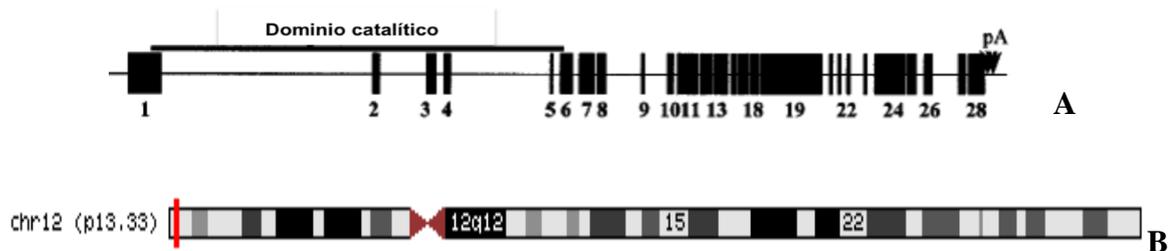


Figura 1.11. Gen *WNK1*. (A) Dominio cinasa del gen *WNK1*. (B) Ubicación relativa del *WNK1* en el cromosoma 12 humano (Imágenes tomadas de Verissimo & Jordan, 2001; USCS Genome Browser).^{58,92}

Existen alrededor de 600 SNPs en el intrón 1 de *WNK1*. En un estudio en diferentes cohortes, Newhouse *et al.* encontraron múltiples haplotipos y *tag* SNPs asociados significativamente con niveles de presión arterial, hipertensión arterial y excreción de K^+ urinaria.⁹³ Especialmente, la variante rs765250 ubicada en el intrón 1, tuvo la mayor evidencia de asociación a variación de PA, mientras que los SNPs asociados con la excreción de potasio se ubicaron a lo largo del gen.⁹³ Por otro lado, Turner *et al.* reportaron un SNP en el intrón 1 de *WNK1* asociado a cambios en la presión arterial en respuesta al uso de tiazidas (Tabla 1.4).⁹

RESPUESTA A TIAZIDAS	
Mayatoshi <i>et al.</i> (2004) ⁹⁵	No asociación (n=76 japoneses; secuenciaron población general para identificar SNPs).
Turner <i>et al.</i> (2005) ⁹⁴	Asociación reportaron 3 SNPs asociados a diferencias en la presión arterial en respuesta a tiazidas. Uno de estos SNPs se localiza en el intrón 1. (n=585 caucásicos; buscaron SNPs 39 SNPs conocidos en 18 genes).
ASOCIACIÓN CASO-COTROL CON HTA ESENCIAL	
Kokubo <i>et al.</i> (2004) ⁹⁶	No asociación N=1818 japoneses, secuenciaron población general para identificar SNPs
Newhouse <i>et al.</i> (2005) ⁹⁷	Asociación. Tendencia entre la severidad de HTA y una variante cercana al promotor. (n=100 familias europeas caucásicas con HTAE grave; buscaron SNPs conocidos y haplotipos).
ASOCIACIÓN A NIVELES DE PA	
Tobin <i>et al.</i> (2005) ⁹⁸	Asociación. (996 europeos de 225 familias, SNPs comunes y haplotipos se asociaron a niveles de TA ambulatoria.
Tobin <i>et al.</i> (2008) ⁹⁹	No asociación a niveles de TA; asociación a nivel de cambio de TA de los 7 a los 11 años. (Cohorte de 5326 niños de GB; SNPs y haplotipos.
Newhouse <i>et al.</i> (2009) ⁹³	Asociación. Estudio caso-control (hipertensos-normotensos) n=1700 para cada grupo; buscaron SNPs conocidos del HapMap y buscaron asociación de fenotipos con función de WNK1. Encontraron que múltiples variantes se asocian a PAS, PAD y excreción de potasio en orina de 34 horas.

Tabla 1.4. Estudios de asociación entre el gen *WNK1* y presión arterial, HTA o cambios de presión en respuesta tiazidas (inhibidor específico del co-transportador NCC).

El gen *WNK4* (Figura 1.11), que se localiza en el cromosoma 17, en la banda q21.31, está conformado por 19 exones que codifican una proteína completa de 1,243 aminoácidos. Se han reportado 218 polimorfismos en este gen, 51 ubicados en la región codificante, de los cuales 44 son polimorfismos de un solo nucleótido que producen cambios de aminoácido (cSNPs). El dominio N-terminal, cinasa y C-terminal contienen 4, 2 (más un cambio en el marco de lectura) y 25 cSNPs respectivamente.¹⁰⁰

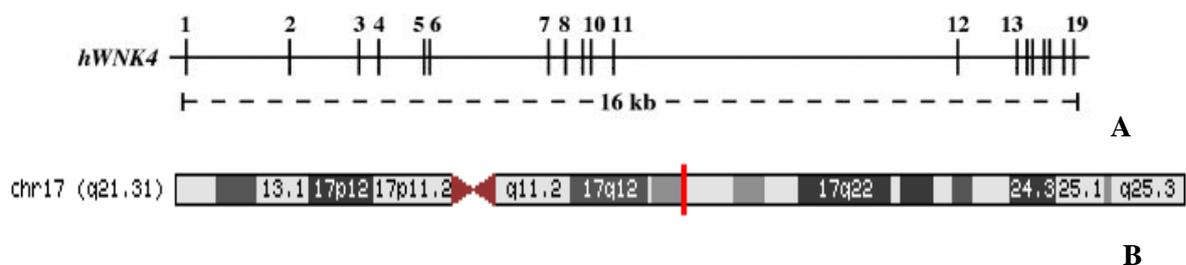


Figura 1.12. Gen *WNK4*. A. Dominio cinasa del gen *WNK4*. B. Ubicación relativa del *WNK4* en el cromosoma 17 humano. (Imágenes tomadas de Wilson *et al.*, 2001; USCS Genome Browser).^{54,101}

La variación en la región codificante está especialmente contenida en los exones 1, 5, 19 y 24. La gran mayoría de los polimorfismos de la región codificante tienen una frecuencia baja (<0.1), y son pocos los que están validados por proyectos como el HapMap y el proyecto 1000Genomes. El resto de los 1,816 cambio reportados en el gen *WNK1* se ubican en las regiones intrónicas y no codificantes del gen.

Los exones 1, 7 y 14 de *WNK4* son los más polimórficos, mientras que no hay variantes reportadas en los exones 5, 11, 12, 15, y 18.¹⁰⁰ La gran mayoría de los polimorfismos en la región codificante tienen una frecuencia baja (<0.1), y pocos están validados por proyectos como el HapMap y el proyecto 1000Genomes.¹⁰⁰ Los estudios que han buscado asociar la variación en el gen *WNK4* con niveles de presión arterial o hipertensión se resumen den la Tabla 1.5.

RESPUESTA A TIAZIDAS	
Matayoshi et al. (2004) ⁹⁵	No asociación. Secuenciaron para identificar SNPs.
ASOCIACIÓN CASO-COTROL CON HTA ESENCIAL	
Erlich et al. (2003) ¹⁰²	Asociación a HTAE en caucásicos. No asociación a HTAE en afroamericanos.
Speir & Morris (2004) ¹⁰³	No asociación en población australiana.
Beujafeld et al. (2003) ¹⁰⁴	No asociación en población australiana
Tobin et al. (2005) ⁹⁸	No asociación en caucásicos europeos.
ASOCIACIÓN A NIVELES DE PA	
Kokubo et al. (2004) ⁹⁶	Asociación a mayor PAS en género masculino, en población japonesa.

Tabla 1.5. Estudios de asociación entre el gen *WNK4* y presión arterial, HTA y cambios de presión en respuesta tiazidas.

II. JUSTIFICACIÓN

La hipertensión arterial esencial es un problema de salud pública y sus bases genómicas en la población mexicana no se conocen. Tomando en cuenta que la población mexicana es mestiza (principalmente de origen europeo y amerindio), es importante buscar variantes genéticas que pudieran ser propias de nuestra población y que pudieran conferir susceptibilidad a la hipertensión arterial sistémica.

El efecto de variantes genéticas en *WNK1* y *WNK4* en la presión arterial y/o en la susceptibilidad a la hipertensión arterial esencial se ha sido poco estudiado en poblaciones caucásicas y asiáticas y no se ha estudiado en la población mexicana. El conocer estas bases genéticas podría ayudar eventualmente a identificar individuos en riesgo.

III. HIPÓTESIS

Existen variantes en los genes *WNK1* y *WNK4* que causan susceptibilidad a padecer hipertensión arterial esencial en la población mexicana.

IV. OBJETIVO

Identificar variantes de secuencia de los genes *WNK1* y *WNK4* que puedan conferir susceptibilidad a la hipertensión arterial esencial en individuos mexicanos.

4.1 Objetivos particulares

- Identificar polimorfismos de los genes *WNK1* y *WNK4* secuenciando las regiones de cada gen en individuos con hipertensión arterial de inicio temprano y controles no hipertensos.
- Determinar y comparar las frecuencias de las variantes identificadas en individuos con fenotipos extremos.
- Predecir mediante programas informáticos la probabilidad de que las variantes encontradas tengan repercusión funcional (en la proteína o en la expresión del gen).
- Establecer las bases para el diseño de estudios de asociación caso-control para hipertensión arterial en la población mexicana.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Población de estudio

La población de estudio consiste en dos grupos de individuos que representan fenotipos contrastantes de presión arterial en la población mexicana: el grupo I ‘hipertensos de inicio temprano’ y el grupo II ‘normotensos de edad avanzada’. Los individuos del grupo II tienen cifras de presión arterial que tienden a ser bajas dentro del contexto de normotensión, sin alcanzar cifras patológicas. Los individuos del grupo I fueron captados en el Instituto Nacional de Nutrición y Ciencias Médicas Salvador Zubirán (INNSZ). Los individuos del grupo II fueron seleccionados del banco de sangre del área de Biología Molecular y Medicina Genómica del INNSZ, captados originalmente en la ENSANUT 2006. Los criterios de inclusión y exclusión para reclutar a cada grupo se encuentran resumidos en la Tabla 4.1.

GRUPOS	CRITERIOS DE INCLUSIÓN	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN
I. Hipertensos de inicio temprano (N=50)	Individuos con hipertensión arterial sistémica esencial de inicio temprano (≤ 35 años) Mestizos mexicanos (≥ 3 generaciones).	Hipertensión arterial secundaria Obesidad Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 Endocrinopatías - Tiroides - Sx Cushing - Hiperaldosteronismo - Otras Nefropatía - Infecciosa - Secundaria a fármaco - Por lupus - Por T2D Disautonomía Tumores (feocromocitoma)
II. Normotensos de edad avanzada (N=18)	Individuos mayores de 50 años, clínicamente sanos. Mestizos mexicanos (≥ 3 generaciones).	Hipertensión arterial secundaria Antecedentes heredofamiliares de HTAS en familiares de primer grado

Tabla 5.1. Criterios de inclusión y exclusión para los grupos ‘hipertensos de inicio temprano’ y ‘Normotensos de edad avanzada’ con fenotipos extremos.

5.2 Extracción de DNA

El DNA genómico se extrajo a partir de leucocitos en sangre total en EDTA con KIT de QIAGEN (QIAamp Blood Midi Kit), y se cuantificó por espectrofotometría. La integridad del DNA extraído se observó mediante electroforésis en gel de agarosa 1.0% previamente teñido con bromuro de etidio [0.5 ug/uL] en amortiguador TBE 1X (Tris base 0.089 M; ácido bórico 0.089 M; EDTA, pH 8.0, 0.002 M). El DNA se diluyó a una concentración de 10 ug/uL para el ensayo de amplificación por PCR.

5.3 Amplificación de *WNK1* y *WNK4*

Los oligonucleótidos específicos para la amplificación de la región reguladora C1 del intrón 1 de *WNK1* (gentilmente proporcionada por la Dra. Juliette Hadchouel y la Dra. Emilie Elvira Matelot, del ‘Institut National de la Santé et la Reserché Médicale’ de Francia), y de las regiones codificantes de *WNK4*, se diseñaron con el programa ‘Oligos’ versión 8.6 (Tabla 5.2). Los oligonucleótidos se sintetizaron en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM. La amplificación se realizó por PCR con kit comercial (Taq Gold o Master Mix) en condiciones específicas para cada par de oligonucleótidos (Tabla 5.3 y Tabla 5.4).

Región	Gen	Oligonucleótidos	Tamaño del Amplificado
Región C1	<i>WNK1</i>	5' TGCTCTGCGTGGTGTGTTGTATCCG 3' 5' GTGGGCCAAGATCGCACCCT 3'	491 b
Exón 2	<i>WNK4</i>	5'-CCCATCTGTGGGCTCCAACC -3' 5'-GGACATTGCCACTCACCGAGG -3'	449 b
Exón 3	<i>WNK4</i>	5'-GCTGGCAGAAGATGCGGAGG -3' 5'-TCCTGCTGAGGGGAGGGAGTC -3'	422 b
Exón 4	<i>WNK4</i>	5'-GCACCCATCCCAACCCCACTG -3' 5'-TCCTCTGTGTTACCAAGGCGAC -3'	423 b
Exón 5-6	<i>WNK4</i>	5'-GCAGCTGTCCAAGGAGGGAG -3' 5'-TCCGTTGCACTGTCCTCCCG -3'	557 b
Exón 7	<i>WNK4</i>	5'-GGAGTTCCAAGAAGGCGTC -3' 5'-GGCTAGAGGTGGAAGGCAGG -3'	455 b
Exón 8	<i>WNK4</i>	5'-GCCATGAAGCTCTCCCCAGG -3' 5'-GGAGATGGTGTCAAGGATGCTGG-3'	426 b
Exón 9-10	<i>WNK4</i>	5'-CCACCATCTTGCTCTCCC -3' 5'-CTCCCGTTTCTGGGTGACC -3'	496 b
Exón 11	<i>WNK4</i>	5'-GCTGTCACTTGGCTGGGGTAGGG-3' 5'-GCTCCAGCTGAGAAGCCAAATCCC -3'	411 b
Exón 14-16*	<i>WNK4</i>	5'-CCACTTCTTTCCTCCTCCCAACC -3' 5'-CCAGCCCCCAGACTCCCAGC -3'	698 b

Tabla 5.2. Oligonucleótidos *sentido* y *antisentido* que amplifican la región represora C1 de *WNK1* y distintos exones de *WNK4*. *El par ‘Exón 14-16’ amplifica sólo una porción de los exones 14 y 16 como se muestra en el ANEXO (p. 66).

Fase	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Iniciación	94 ° C	10 minutos	1
Desnaturalización	94 ° C	45 segundos	
Alineamiento	X° C	45 segundos	35
Extensión	72 ° C	45 segundos	
Extensión final	72 ° C	10 minutos	1
Conservación	4 ° C	∞	-

A

Reactivo	Cantidad
Buffer Taq Gold (10x)	2.0 uL
Mg ²⁺ (25mM)	1.0 uL
dNTPs (10mM)	0.5 uL
DNA (10ng/uL)	2.0 uL
Oligonucleótido (50ng/uL) <i>sentido</i>	1.0 uL
Oligonucleótido (50ng/uL) <i>antisentido</i>	1.0 uL
Polimerasa Taq Gold	0.1 uL
H ₂ O grado miliQ	12.4 uL
Volumen Final	20.0 uL

B

Reactivo	Cantidad
Master Mix	4.5 uL
DNA (10ng/uL)	2.0 uL
Oligonucleótido (50ng/uL) <i>sentido</i>	1.0 uL
Oligonucleótido (50ng/uL) <i>antisentido</i>	1.0 uL
H ₂ O grado miliQ	7.5 uL
Volumen Final	16.0 uL

C

Tabla 5.3. A. Condiciones para la PCR de amplificación utilizando kit comercial B. Taq Gold o C. Master Mix.

Región	Gen	Temperatura de Alineamiento	Mezcla
Región C1	<i>WNK1</i>	60 ° C	Master Mix
Exón 2	<i>WNK4</i>	59 ° C	Taq Gold
Exón 3	<i>WNK4</i>	58 ° C	Taq Gold
Exón 4	<i>WNK4</i>	58 ° C	Taq Gold
Exón 5-6	<i>WNK4</i>	63 ° C	Master Mix
Exón 7	<i>WNK4</i>	59 ° C	Master Mix
Exón 8	<i>WNK4</i>	58 ° C	Taq Gold
Exón 9-10	<i>WNK4</i>	59 ° C	Taq Gold
Exón 11	<i>WNK4</i>	58 ° C	Master Mix
Exón 14-16	<i>WNK4</i>	58 ° C	Master Mix

Tabla 5.4. Temperatura de alineamiento para la PCR de amplificación de la región represora C1 en el intrón 1 de *WNK1* y distintos exones de *WNK4*. Se especifica el kit utilizado para amplificar cada región.

5.4 Secuenciación de los genes *WNK1* y *WNK4*

Los amplicones obtenidos en la PCR de amplificación se purificaron con el kit comercial (QIAGEN) y se reamplificaron en una reacción de PCR de secuenciación con kit comercial (BIGDYE versión 3.1, Applied Biosystems). Los reactivos y las condiciones para la reacción de PCR de secuenciación se enlistan en la Tabla 5.5. Los productos fueron analizados en un secuenciador automático ABI-3100 y los electroferogramas analizados con el programa 4Peaks versión 1.7.

5.5 Análisis de predicción

Se utilizó el programa computacional Polyphen Harvard para predecir el posible efecto de SNPs que causan cambios de aminoácido.¹⁰⁸ El programa *Human Splicing Finder 2.4.1* y *ESE finder 3.0*, se utilizaron para predecir probables sitios aceptores, donadores y de unión a factores de *splicing*.^{105,106,107}

Fase	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Iniciación	96 ° C	15 minutos	1
Desnaturalización	95 ° C	6 minutos	
Alineamiento	52 ° C	3 minutos	35
Extensión	60 ° C	2 minutos	
Extensión final	60 ° C	10 minutos	1
Conservación	4 ° C	∞	-

A

Reactivo	Cantidad
Big Dye Terminator 3.1 ®	0.5 uL
Buffer Big Dye 3.1	3.0 uL
DNA (10ng/uL)	2.0 uL
Oligonucleótido (50ng/uL) (<i>sentido o antisentido</i>)	2.0 uL
H ₂ O grado miliQ	12.5 uL
<i>Volumen Final</i>	<i>20.0 uL</i>

B

Tabla 5.5. (A) Condiciones y (B) concentraciones de los reactivos para la *PCR de secuenciación* utilizando kit comercial Big Dye Terminator 3.1 ®.

VI. RESULTADOS

6.1 Población de estudio

Se capturaron 18 individuos (edad ≤ 35 años) con hipertensión arterial esencial de inicio temprano para el grupo I ‘hipertensos de inicio temprano’. Las cifras de presión arterial al momento de ingreso al INNSZ y edad de inicio para la HTA se resumen en la Tabla 6.1. El grupo II se conformó por 50 individuos (edad ≥ 50 años) con cifras de presión arterial normal (90-120/50-80 mmHg). Las cifras de presión arterial de cada individuo medidas durante la ENSANUT 2006 se muestran en la Tabla 6.2, indicando la edad y el diagnóstico de obesidad al momento de la encuesta.

Individuo	Sexo	PAS	PAD	Edad de inicio
H1	F	160	90	34
H2	M	130	70	33
H3	F	160	100	33
H4	F	160	110	18
H5	M	140	100	35
H6	F	160	90	34
H7	M	140	80	34
H8	M	130	80	20
H9	M	140	80	34
H10	F	130	100	23
H11	M	140	90	17
H12	F	160	100	34
H13	F	150	90	35
H14	M	130	90	17
H15	F	170	100	35
H16	M	130	90	32
H17	F	150	90	33
H18	F	130	80	28

Tabla 6.1. Cifras de presión arterial sistólica y diastólica del grupo II ‘hipertensos de inicio temprano’.

Individuo	Obesidad	Sexo	PAS	PAD	Edad
N1	No	F	100	58	50
N2	No	F	80	60	58
N3	No	F	90	60	54
N4	Si	F	100	60	56
N5	No	F	100	60	67
N6	No	F	100	60	64
N7	No	F	100	60	57
N8	No	F	100	60	65
N9	No	F	100	60	51
N10	No	F	110	60	59
N11	No	F	110	60	53
N12	No	F	110	70	53
N13	No	F	120	70	67
N14	No	F	90	70	50
N15	Si	F	100	70	52
N16	No	F	100	70	50
N17	No	M	90	60	62
N18	No	M	100	60	53
N19	Si	M	100	60	60
N20	No	M	108	60	52
N21	No	M	110	70	57
N22	No	M	110	70	53
N23	No	M	110	70	58
N24	No	M	110	70	50
N25	No	M	110	70	55
N26	No	M	110	70	54
N27	No	F	100	70	59
N28	No	M	110	70	50
N29	No	M	110	70	50
N30	No	F	100	65	55
N31	No	F	90	60	55
N32	No	M	110	60	62
N33	No	M	100	70	58
N34	No	F	100	58	53
N35	No	M	110	70	54
N36	Si	F	110	60	50
N37	Si	M	90	60	51
N38	Si	F	110	70	61
N39	Si	F	100	70	57
N40	Si	M	90	60	55
N41	Si	M	110	70	62
N42	Si	F	100	70	58
N43	Si	F	110	70	54
N44	Si	M	90	60	58
N45	Si	M	100	70	60
N46	Si	M	105	70	50
N47	No	M	110	70	55
N48	No	M	100	70	52
N49	Si	M	110	70	50
N50	Si	M	90	60	58

Tabla 6.2. Cifras de presión arterial sistólica y diastólica del grupo II ‘normotensos de edad avanzada’.

6.2 Secuenciación de *WNK4*

Se secuenciaron los exones 2-6 de *WNK4* que comprenden casi el total del dominio cinasa y los exones 7-11 y 14-16, que codifican la región del dominio C-terminal más próxima al dominio cinasa, en los 18 individuos hipertensos jóvenes y 50 individuos normotensos de la población de estudio. Los exones 14 y 16 se secuenciaron parcialmente. Las secuencias obtenidas se analizaron en el programa 4Peaks versión 1.7. Las variantes encontradas en cada grupo de estudio se muestran en la Tabla 6.3.

6.3 Variación en el gen *WNK4*

La frecuencia de polimorfismos encontrados en *WNK4* en el grupo de individuos ‘Hipertensos de inicio tardío’ y ‘Normotensos de edad avanzada’ fue similar (2/18 y 8/50 respectivamente). Entre las ocho variantes encontradas en *WNK4*, las variantes G227W, IVS7-25G/A y IVS14-40T/C podrían ser dañinas para la función de *WNK4*, constituyendo el 100% de la variación encontrada en el grupo de hipertensos de inicio temprano y el 28.6% (2/7) de la variación en el grupo de normotensos de edad avanzada (Figura 6.1). Entre las ocho variantes encontradas en *WNK4* seis se ubican en la región codificante del gen. Únicamente cuatro de ellas causan cambio de codón (cSNPs), mientras que las dos variantes ubicadas en regiones no codificantes del gen se encontraron en los límites exón-intrón (Tabla 6.3).

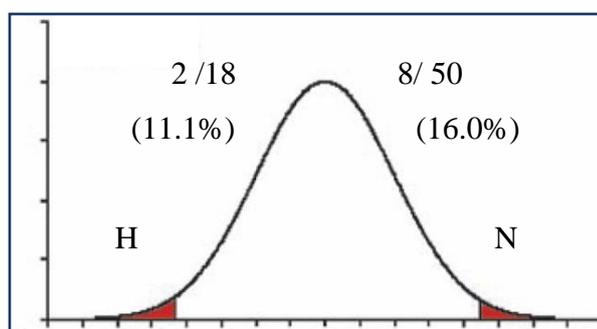


Figura 6.1. Frecuencia de variantes del gen *WNK4* encontradas en individuos hipertensos de inicio temprano (H) y normotensos de edad avanzada (N).

	Variante	Ubicación	Indiv.	Report.	Predicción
Grupo I 'Hipertensos de Inicio Temprano' N=18	G227W	Exón 2	H04	No	Dañino
	IVS14-40T/C	Intrón 14	H14	Sí	Pb/sitio aceptor
Grupo II 'Normotensos de Edad Avanzada' N=50	G227W	Exón 2	N12	No	Dañino
	G448C	Exón 6	N38	No	Benigno
	P551P	Exón 7	N05	Sí	Sinónima
	V553V	Exón 7	N23	No	Sinónima
	IVS7-25G/A	Intrón 7	N30	No	Pb/sitio aceptor
	A601S	Exón 8	N04	No	Benigno
	P961S	Exón 14	N04	Si	Benigno

Tabla 6.3. Variación del gen *WNK4* en este estudio. Se indica la predicción del posible efecto en la función de la proteína de cada polimorfismo y se indica si ésta ha sido previamente reportada.

6.3.1 Variación no sinónima en *WNK4*

El polimorfismo G227W (GGG>TGG) ubicado en el exón 2 de *WNK4* fue encontrado en un individuo hipertenso de inicio temprano y en un normotenso de edad avanzada (Figura 6.2). Únicamente el cambio sinónimo G227G se ha reportado previamente en esta posición sin que su frecuencia haya sido determinada en alguna población. El programa Polyphen Harvard predice que el cambio de Gly→Trp en este residuo es posiblemente dañino para la función de la proteína por ser un residuo de aminoácido muy conservado. Esta predicción está dada en base a un alineamiento (Figura 6.5).

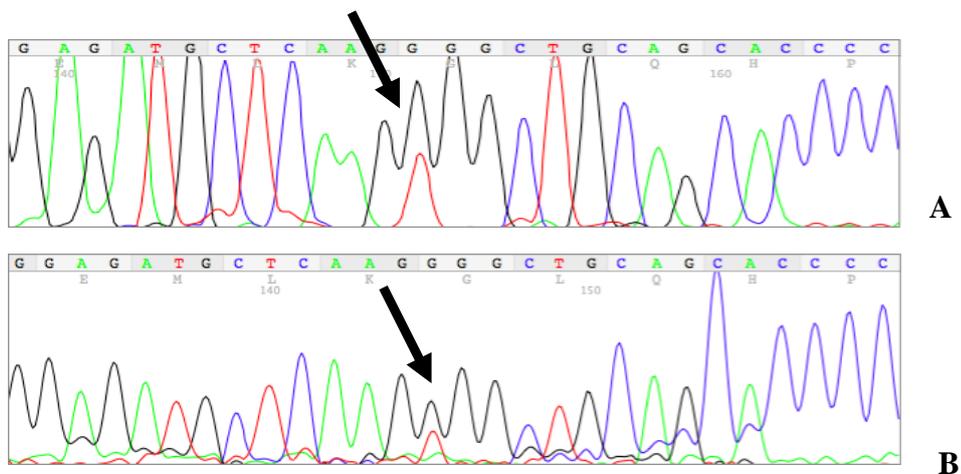


Figura 6.2. Variante G227W en *WNK4* en (A) un individuo normotenso de edad avanzada y (B) en un individuo hipertenso de inicio temprano.

La variante no sinónima G448C (GGC>TGC) en el exón 6 de *WNK4* se encontró en un individuo normotenso de edad avanzada. No ha sido reportada previamente y genera un cambio de aminoácido que el programa Polyphen Harvard predice como benigno para la función de la proteína (Figura 6.3).

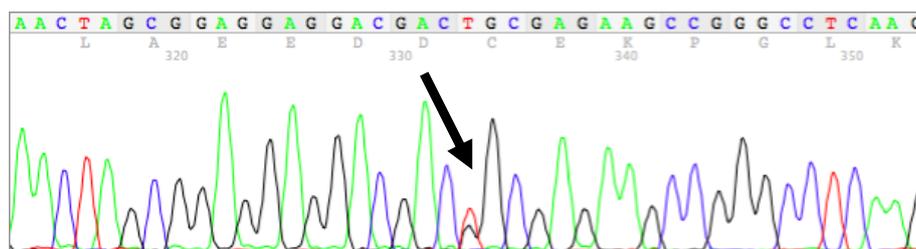


Figura 6.3. Variante G448C en el exón 6 de *WNK4* en un individuo normotenso de edad avanzada.

La variante no sinónima A601S (GCC>TCC) en el exón 8 de *WNK4* se encontró en dos individuos normotensos de edad avanzada (Figura 6.4). Esta variante se ha reportado previamente y tiene una frecuencia promedio calculada de 0.213. En base a alineación, el programa Polyphen Harvard predice este cambio como benigno para la función de la proteína.

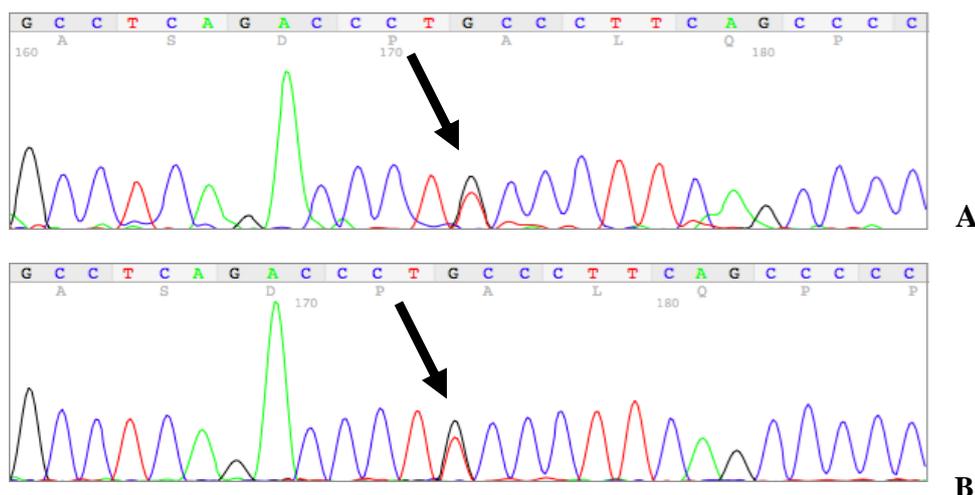


Figura 6.4. Variante A601S en el exón 8 de *WNK4* en dos individuos normotensos de edad avanzada

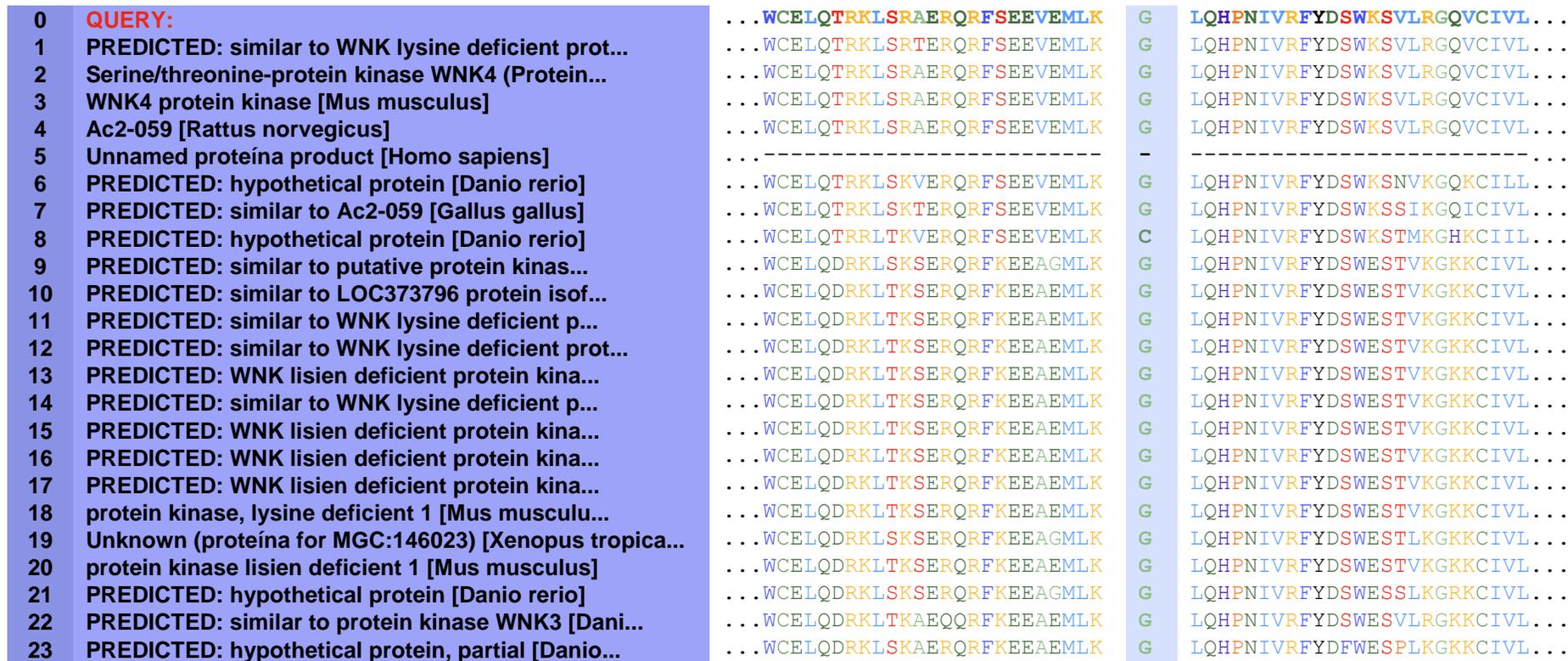


Figura 6.5. Alineamiento del residuo Gly 227 de WNK4 con secuencias similares u homólogas de otras proteínas con el programa Polyphen Harvard. El residuo G227 (marcado en azul) se encuentra muy conservado.

El polimorfismo P961S (TCC>TCT) en el exón 14 de *WNK4* se encontró en dos individuos normotensos de edad avanzada (Figura 6.6). Esta variante se reportó previamente (rs2290041), y tiene una frecuencia promedio calculada de 0.152 en población africana. En base a alineación, el programa Polyphen Harvard predice este cambio como benigno para la función de la proteína.

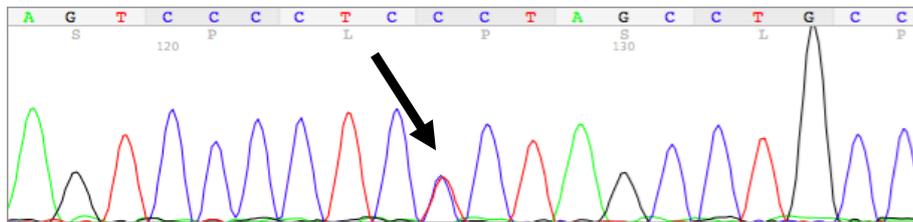


Figura 6.6. Variante P961S en el exón 14 de *WNK4* en un individuo normotenso de edad avanzada.

6.3.2 Variación sinónima en *WNK4*

Las variantes sinónimas P551P (CCC>TCC) y V553V (GTC>GTT) en el exón 7 de *WNK4* se encontraron por separado en dos individuos normotenso de edad avanzada distintos (Figura 6.7). Sólo la variante P551P se ha reportado previamente y tiene una frecuencia global del 0.017 en población caucásica. Estas variantes se encuentran a una distancia de -7 y -4 residuos de aminoácidos respecto al dominio ácido de *WNK4*.

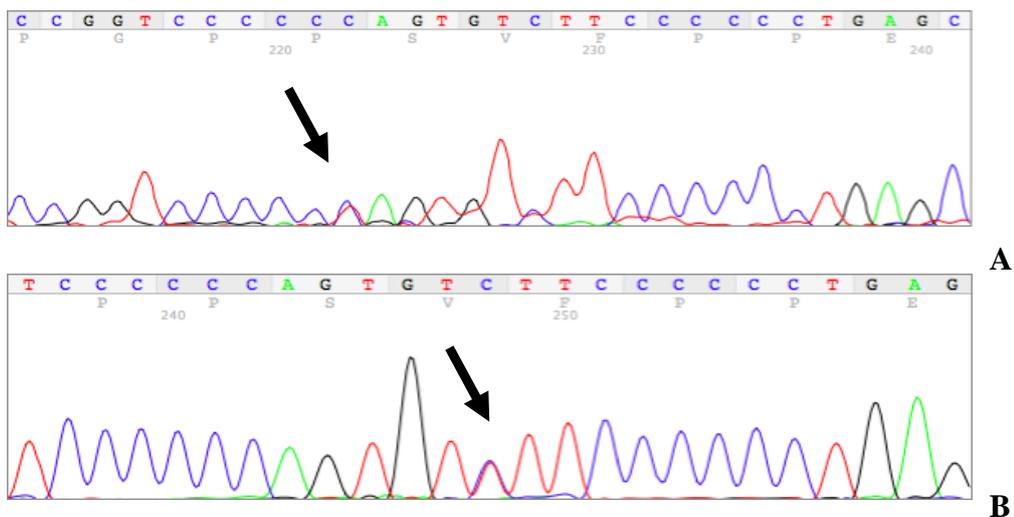


Figura 6.7. Variantes sinónimas en el exón 7 de *WNK4*. (A) Variante P551P en el individuo normotenso de edad avanzada N05. (B) Variante V553V en el individuo normotensos de edad avanzada N23.

6.3.3. Variantes en los límites intrón-exón

En el intrón 7 (posición +25) de *WNK4* se encontró la variante IVS7-25G/A (Figura 6.9). El programa computacional *Human Splicing Finder 2.4.1* predice dos sitios aceptores y un donador donde la variante se encuentra (Figura 6.8). El programa *ESE finder* predice que la variante está incluida en un probable sitio aceptor (sitio de *splicing* 5') y reconoce la secuencia GAGACGT, dentro de la que se localiza la variante IVS7-25G/A, como sitio de unión del factor de *splicing* **SF2/ASF** (*alternative splicing factor/splicing factor 2*).

```

1   GTGGCTCTGG GCTTGGTCTG TGAAGCCGAT TACCAGCCAG TGGCCCCTGC
51  AGTACGTGAA CGGGTTGCTG CCATCCAGCG AAAGCGTGAG AAGCTGCGTA
101 AAGCAAGGGA ATTGGAGGCA CTCCCACCAG AGCCAGGACC TCCACCAGCA
151 ACTGTGCCCC TGGCCCCCGG TCCCCCAGT GTCTTCCCCC CTGAGTCCGA
201 GGAGCCAGAG GCAGACCAGC ACCAGCTCCT TCCTTTCCGC CACGCCAGCT
251 ACTCATCTAC CACTTgtaag tcacctccga tcttgagacg taggtcccag
301 aacatcctgg tccctgcccc ctaccagaa gttcaccccc acagcagtca
351 cttactcegc cttccatccc tagccatgaa gctctcccca ggaaggaact
401 ctcccacagc tccaggcccc ttctgctta ggcaggcccc attcctgcc
451 actattctcc tttatttccc ctttttttga ttccctctcc ccccaaccag
501 CGGATTGCGA GACTGATGGC TATCCCAGCT TCCCCGGCTT TCCGGATGCC
551 TCAGACTCCG CTCCTCAGCC CTCCGGGGGG GTGCCATCCA GTCCGGCTGA
601 GTCCCATCTC TGTCCGCTCC CG

```

A

Posición	Tipo de sitio de <i>splicing</i>	Motivo	Nuevo sitio potencial de <i>splicing</i>	Valor consenso (0-100)
263	Donor	CTTgtaagt	CTTgtaagt	84.38
282	Acceptor	Cttgagacgtaggt	cttgagacgtagGT	77.81
287	Donor	Gacgtaggt	GACgtaggt	78.89
289	Acceptor	Cgtaggtcccagaa	cgtaggtcccagAA	81.26
380	Acceptor	AgctcTCCccagga	agctcTCCccagGA	91.51

B

Figura 6.8. (A) Secuencia del intrón 7 de *WNK4* (letras minúsculas) empleada para la predicción de sitios de *splicing* alternativo con el programa *Human Splicing Finder 2.4.1*. La variante encontrada G/T se muestra en gris oscuro (B) Sitios potenciales de *splicing* alternativo que predice el programa *Human Splicing Finder 2.4.1*. Se muestran los sitios de coincidencia con la variante, así como el sitio donador y aceptor con mayor valor consenso.

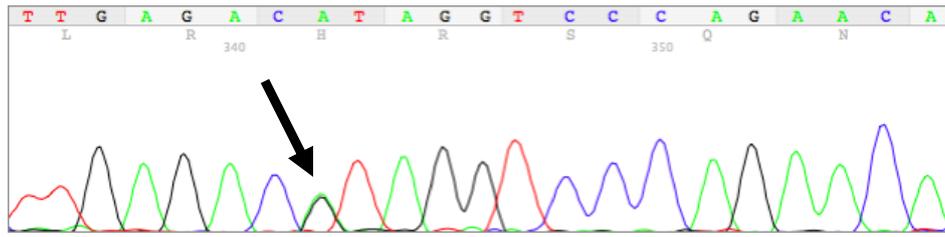


Figura 6.9. Variante IVS7-25G/A en el intrón 7 de *WNK4* en un individuo normotenso de edad avanzada.

La variante intrónica IVS14-40T/C [rs2290040] se encontró en un individuo hipertenso de inicio temprano (Figura 6.10). Esta variante ya se ha reportado previamente y una tiene frecuencia global de 0.095 en población asiática. El programa *Human Splicing Finder 2.4.1* no detectó ningún sitio donador o aceptor de *splicing*. Sin embargo, el programa *ESE Finder 3.0* considera varias zonas que pueden funcionar como donador o aceptor que sobrelapan con la posición de la variante y sugiere un probable sitio de unión para el factor de *splicing* SF2/ASF (ACTCCAC) que contiene a la variante (Figura 6.11).

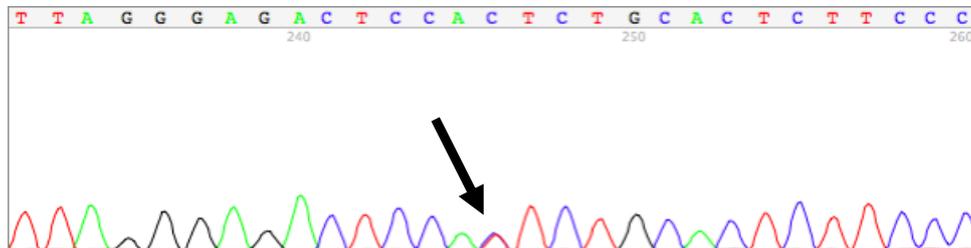


Figura 6.10. Variante IVS14-40T/C en el intrón 14 de *WNK4* en un individuo hipertenso de inicio temprano.

6.4 Variación del gen *WNK1*

La region C1 en el intrón 1 de *WNK1*, reportada como importante en la regulación de la expresión de la isoforma corta de *WNK1*, se secuenció en todos los individuos del grupo ‘hipertensos de inicio temprano’ y ‘normotensos de edad avanzada’. No se encontró ningún cambio de secuencia.

5SS_U2_human Threshold: 6.67		
8 (-71)	gaaaccaagagggatgattaggagactc	-33.31340
3 (-56)	tgattaggagactccactctgcactcttc	-32.08050
28 (-51)	aggagactccactctgcactcttctctc	-33.97100
6 (-33)	actcttctctctcatggccccactttc	-36.20530

A

3SS_U2_human Threshold: 6.632		
1 (-78)	gtgagtagaaaaccaagagggatgattagg	-35.20010
4 (-75)	agtagaaaaccaagagggatgattaggag	-35.32960
7 (-72)	agaaaaccaagagggatgattaggagact	-30.14400
8 (-71)	gaaaccaagagggatgattaggagactc	-45.65570
11 (-68)	aaccaagagggatgattaggagactccac	-39.01570
13 (-66)	ccaagagggatgattaggagactccactc	-30.69360
14 (-65)	caagagggatgattaggagactccactct	-31.37310
18 (-61)	agggatgattaggagactccactctgcac	-38.13040
20 (-59)	ggatgattaggagactccactctgcactc	-36.60760
22 (-57)	atgattaggagactccactctgcactctt	-36.39440
24 (-55)	gattaggagactccactctgcactcttcc	-32.12220
25 (-54)	attaggagactccactctgcactcttccc	-32.92230
32 (-47)	agactccactctgcactcttctctctcat	-34.29040

B

SF2/ASF threshold: 1.956		
Posición	Sitio	Score
2 (-77)	tgagtag	-7.85546
5 (-74)	gtagaaa	-6.43080
7 (-72)	agaaaac	-5.98144
21 (-58)	gatgatt	-5.20381
23 (-56)	tgattag	-7.39775
30 (-49)	ggagact	-6.10874
32 (-47)	agactcc	-6.97499
34 (-45)	actcca	-5.72949
39 (-40)	actctgc	-5.67548
41 (-38)	tctgcac	-8.08982
44 (-35)	gcactct	-5.47194
46 (-33)	actcttc	-7.79551
51 (-28)	tctctc	-5.93080
56 (-23)	tctcatg	-6.76096
58 (-21)	tcatggc	-5.65849

C

Figura 6.11. Predicción de sitios aceptores (A), donadores (B) y de unión a factores de *splicing* (C) para la variante IVS14-40T/C (rs2290040), según el programa *ESE finder 3.0* para la región de *WNK4* donde se encuentra la variante IVS14-40T/C (rs2290040).

VII. DISCUSIÓN

7.1 Captación de la población de estudio

El tamaño de la muestra de ambos grupos de estudio (*i.e.* I ‘hipertensos de inicio temprano’ y II ‘normotensos de edad avanzada’) estaba pensado originalmente como N=50 con la intención de estudiar al menos 100 alelos en cada grupo.⁴⁴ En el caso del grupo I el 100% de la muestra logró captarse. Sin embargo, tan sólo 18 individuos hipertensos de inicio temprano cumplieron con los criterios de inclusión para este estudio. La captación de este grupo fue complicada y lenta debido a que la HTA suele ser un padecimiento silencioso y los pacientes jóvenes y aparentemente sanos pocas veces acuden al médico para una revisión general de rutina.² A esto debe añadirse que la captación se realizó en el Instituto Nacional de Nutrición y Ciencias Médicas ‘Salvador Zubirán’, un centro de salud no especializado en patología cardiovascular. Generalmente la HTA esencial no es motivo de ingreso en este Instituto, por lo que en numerosas ocasiones fue imposible determinar la edad de inicio. Además, la hipertensión arterial secundaria muchas veces no queda completamente descartada, particularmente en casos complicados donde determinar la causa no es prioridad en el tratamiento del paciente. Por esta razón el tamaño de la muestra del grupo I fue reducido, lo que probablemente limitó encontrar un mayor número de polimorfismos. Sin embargo, debido a que todos los individuos cumplieron con los criterios de inclusión, las características cualitativas del grupo aun permiten contrastar la variación genética de un grupo respecto al otro, y permite hacer inferencias sobre su posible efecto en la regulación de la presión arterial en la población general mexicana.

7.2 Variación en *WNK4*

Aun cuando la HTA esencial es un rasgo heredable (*i.e.* 30-50%) su arquitectura genética y la naturaleza de la variación que la compone está poco entendida. Se ha propuesto que la distribución de la presión arterial en la población podría ser el reflejo de la contribución de múltiples *variantes comunes*, cada una con un efecto pequeño.¹²² Sin embargo, los estudios de asociación que existen a la fecha sobre HTA, enfocados principalmente en la búsqueda de variantes comunes, han tenido poco éxito y baja reproducibilidad.^{110,123} En los últimos años se ha propuesto que las variantes comunes,

en general, explican sólo una pequeña fracción de la susceptibilidad a enfermedades comunes, por lo que es muy probable que *variantes raras*, con un fuerte efecto fenotípico, también contribuyan a la variación de la HTA.⁴⁰ Diversos estudios han sugerido que la contribución de este tipo de variación podría ser más importante que la contribución de la variación común.^{29,44,45,111}

En el presente estudio se encontraron variantes con un probable efecto funcional que no necesariamente son comunes en la población mexicana. Aunque la frecuencia poblacional de cada polimorfismo encontrado tendrá que determinarse a través de estudios posteriores caso-control en población abierta, los resultados de este estudio sugieren que tanto la variación rara como la común en el gen *WNK4* participan en la regulación de los niveles de presión arterial en individuos mexicanos. Cabe resaltar que aunque la frecuencia de variantes en *WNK4* encontradas en ambos grupos de estudio fue similar (11.1 y 16.0%), los programas de predicción sugirieron que el 100 % de la variación tiene repercusión funcional en el grupo de individuos hipertensos de inicio temprano, mientras que sólo el 28.6% de la variación parece ser funcional en el grupo de individuos normotensos de inicio tardío. Esto sugiere que la variación funcional de *WNK4* está asociada a un fenotipo de hipertensión arterial, lo cual sería de esperarse dado que *WNK4* tiene múltiples funciones en la regulación del volumen intravascular y la presión arterial, además de que las mutaciones en un solo alelo del gen son suficientes para generar el PHAII (caracterizado por HTA).⁴⁷ Los estudios funcionales podrán confirmar y definir si en efecto estas variantes modifican la función de la proteína.

7.2.1 Variación en el dominio ácido de *WNK4*

Uno de los dominios con especial impacto en la modulación de la presión arterial es el motivo ácido de *WNK4*, en el que se han descrito varias mutaciones capaces de producir HTA (*i.e.* PHAII).⁵⁴ Sin embargo, pese a su marcada importancia, no se encontró variación dentro de este motivo en ninguno de los grupos de estudio. Únicamente dos SNPs sinónimos, cercanos al dominio ácido y ubicados en el mismo exón, se hallaron en dos individuos normotensos de edad avanzada distintos. Sin embargo, puesto que estas variantes no alteran la secuencia de aminoácidos de la proteína, se descartó la posibilidad de un efecto funcional.¹²⁴

7.2.2 Variación en el dominio cinasa de WNK4

Otro dominio importante de WNK4 involucrado en la regulación de la reabsorción renal de sodio y de la presión arterial es el dominio cinasa.⁷³ Este dominio es el responsable de la inhibición o activación del co-transportador NCC en diferentes condiciones fisiológicas.⁶⁵ En el estado basal, la actividad de cinasa es necesaria para regular negativamente la expresión del co-transportador NCC en la membrana apical.^{65,72,73} En presencia de angiotensina II, el dominio cinasa fosforila a la cinasa SPAK, lo que resulta en la fosforilación y activación del co-transportador NCC (efecto simulado de manera constitutiva por las mutaciones PHAI1).⁸⁸ Basado en ello, es probable que la variación en el dominio cinasa pueda afectar la ruta principal de reabsorción de NaCl en el TCD de la nefrona, así como los niveles de presión arterial.^{3,20,21}

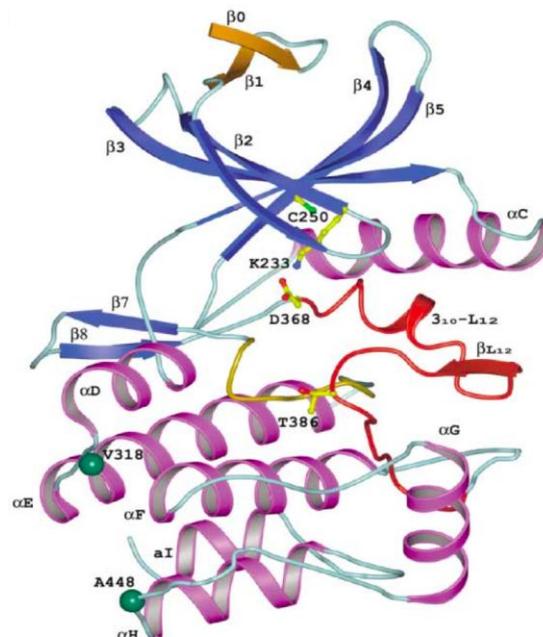
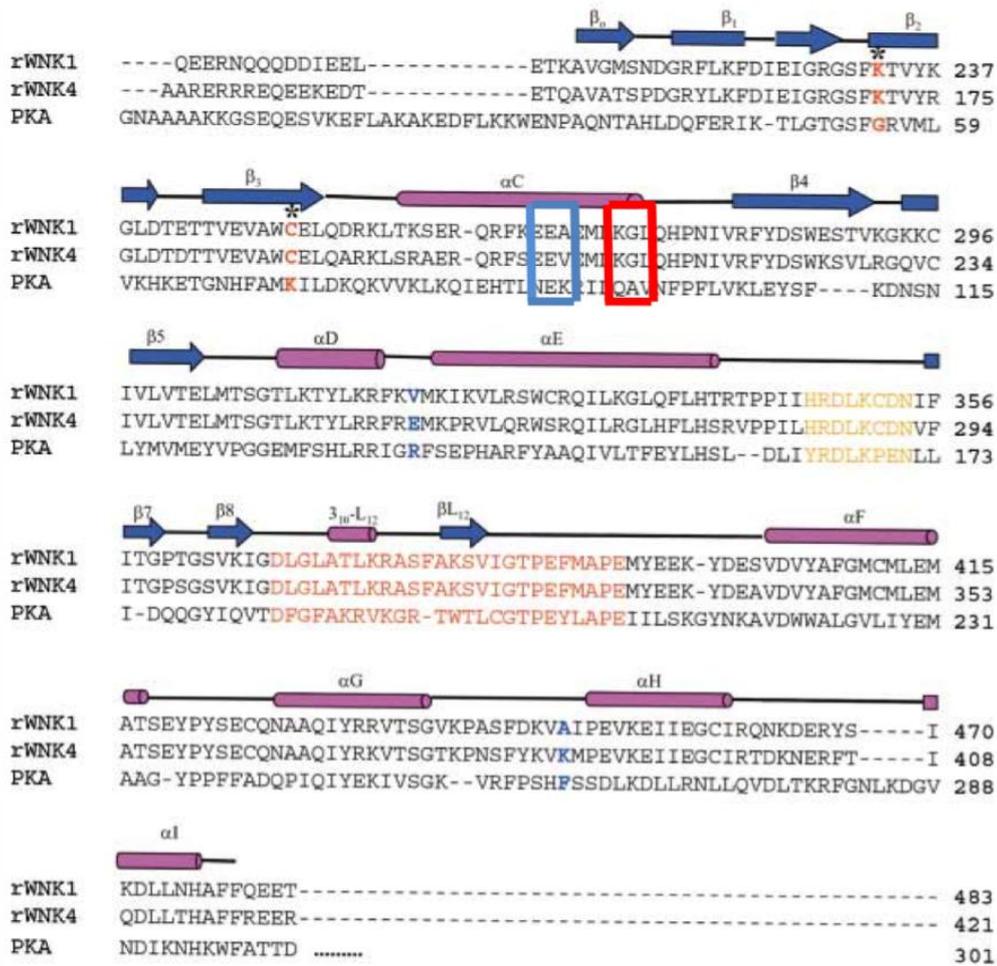
En nuestro estudio, encontramos el polimorfismo G227W en un individuo normotenso de edad avanzada y en uno hipertenso de inicio temprano. El programa Polyphen Harvard predijo este cambio como dañino para la función de la proteína, por ser un residuo muy conservado. En el año 2002, logró resolverse la estructura tridimensional del dominio cinasa de WNK1, mostrando que el residuo E268 tiene un papel fundamental en la estabilidad de la estructura tridimensional de la proteína (debido a que forma un par iónico con la R348 y un puente de hidrógeno con la T373 dentro del dominio cinasa) (Figura 7.1).¹¹⁵ Si la acción de E268 en WNK1 se encuentra conservada en WNK4 (E221), podría ser que el polimorfismo G227W influenciara la función del dominio cinasa o la proteína a través de cambios en la estructura tridimensional. Si la variante disminuyera la función de cinasa favorecería el aumento en los niveles de presión arterial, mientras que si la variante aumentara la función de cinasa los niveles de presión arterial tenderían a ser bajos. En cualquier caso, la presencia de la variante en ambos grupos de estudio podría explicarse por la presencia de otros factores tanto genéticos como ambientales, que afecten la regulación de la homeostasis renal de electrolitos y que compensen el posible efecto de G227W. Por esto es necesario realizar estudios funcionales *in vitro* que permitan determinar el efecto de G227W en distintos estados fisiológicos.

El haber encontrado a la variante G227W en más de un individuo de un total de 68 sugiere que podría ser frecuente en la población mexicana, por lo que valdría la pena genotipificar esta variante en una muestra de la población general. Por otro lado, aunque G227W podría tener un efecto modesto sobre los niveles de presión arterial, por tratarse de un dominio muy conservado, el efecto podría ser mayor. Para confirmar esto es necesario conjuntar la evidencia de estudios funcionales y estudios de asociación caso-control en la población mexicana.

7.2.3 Variación en el dominio C-terminal de WNK4

La porción más distal del dominio C-terminal de WNK4 tiene un efecto importante en la regulación de la reabsorción renal de sodio y de la presión arterial a través de varios sitios de fosforilación. La fosforilación del residuo S11690 en el ratón (sitio canónico de la fosforilación para la cinasa SGK1 y homólogo del sitio S1190 en el humano) suprime el efecto inhibitorio de WNK4 sobre ENaC aumentando la reabsorción de Na⁺ a través de esta vía;⁷⁸ mientras que la fosforilación simultánea de los residuos S1169 y S1196 (S1190 y S1217 en humanos) en presencia de aldosterona puede activar a NCC en presencia de SGK1.²⁶ En el humano el residuo R1185 es fosforilado por SGK1⁶¹, y una mutación en este residuo (R1185C) es causa de PHAI.^{72,113}

Debido a su clara participación en la regulación de la reabsorción de Na⁺ en la nefrona distal, la variación genética en esta parte del dominio C-terminal (exones 17 y 18 de *WNK4*) pudiera conferir susceptibilidad a padecer HTA en la población mexicana. En el presente estudio no se secuenció, sin embargo sería interesante analizar si su variación a nivel genético se asocia con cambios en los niveles de presión arterial.



A

B

Figura 7.1. Topología general del dominio catalítico de la proteína WNK1. (A) Alineamiento múltiple de WNK1, WNK4 y la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) que muestra las estructuras secundarias bajo la nomenclatura empleada en PKA. Las secuencias del asa de activación y el asa catalítica se muestran en rojo y amarillo respectivamente. En recuadros azul y rojo se muestran E268 de WNK1 y G227 de WNK4 respectivamente. (B) Representación de la estructura 3D del dominio cinasa de WNK1. (Imágenes tomadas de Min *et al.*, 2004).

7.2.4 Variación en los límites exón-intrón de *WNK4*

Sorprendentemente, la mayor parte de la variación que se predice funcional en *WNK4* fue intrónica, en probables sitios de *splicing* cercanos a las uniones intrón-exón. Debido a que a las mutaciones en estos sitios pueden provocar y contribuir a la susceptibilidad y severidad de distintas enfermedades comunes,¹¹⁷ las variantes IVS7-25G/A y IVS14-40T/C en *WNK4* podrían participar en la variación de los niveles de presión arterial en la población mexicana. El factor SF2/ASF (*splicing factor 2/alternative splicing factor*) es necesario para todas las reacciones de *splicing*, además de participar en la exportación del mRNA desde núcleo y en la traducción.^{118,119} Debido a que ambas variantes se encontraron en probables sitios de unión a este factor, podrían afectar la función y/o expresión de *WNK4* a través de alteraciones en el procesamiento y traducción del mRNA. Esto sugiere que la variación en la región codificante de *WNK4* no es la única que podría explicar la susceptibilidad a la HTA y que la variación intrónica podría constituir un elemento importante en la regulación de los niveles de presión arterial.

En un estudio caso-control en población japonesa, Kokubo *et al.* mostraron que la variante IVS14-40T/C se asoció con niveles más elevados de presión arterial sistólica en hombres. El genotipo TT aumentó 3.1 mmHg la PAS ($p=0.042$) respecto al genotipo CT+CC, una vez ajustados los datos respecto a factores como edad, IMC, hiperlipidemia, DM2, uso de antihipertensivos, tabaco y alcohol.⁹⁶ En base a ello, resulta factible que la variante IVS14-40T/C tenga un efecto similar en la población mexicana, lo que es consistente con su presencia en el grupo de hipertensos de inicio temprano. En contraparte, la variante IVS7-25G/A se encontró en un individuo normotenso, por lo que de ser funcional se esperaría que ésta tuviera un efecto opuesto. Estas son otras variantes que valdría la pena analizar en la población mexicana buscando posibles asociaciones con niveles de presión arterial.

7.3 Variación en el represor de la expresión de la isoforma renal KS-WNK1

El balance que existe entre las isoformas L-WNK1 y KS-WNK1 parece ser crucial en la regulación del manejo renal de sodio y potasio.⁶⁹ En humanos, existen 2

promotores (pP) que controlan la transcripción de L-WNK1 y un tercer promotor renal (rP) en el intrón 4 que controla la expresión de KS-WNK1. En el año 2008, Delaloy *et al.* encontraron un dominio con actividad *represora* sobre rP, al cual denominaron C1, incluido en la región de 22Kb cuya delección provoca PHAII. También se encontró que un segundo fragmento dentro de esta delección, denominado C5, con actividad de *aislador* que bloquea la interacción entre el *enhancer* renal y el pP.⁷⁵ Delaloy *et al.* observaron que las delecciones *WNK1*-PHAII que eliminan a C1 y C5 provocan la expresión ubicua de KS-WNK1 y la sobre-expresión de L-WNK1 y KS-WNK1 en el TCD, en una relación $[L-WNK1]/[KS-WNK1]>1$. Este aumento relativo de L-WNK1 elimina la inhibición de NCC por WNK4, activa al ENaC vía SGK1 e inhibe la actividad de ROMK, provocando el fenotipo característico de HTA hipercalémica del PHAII.⁷⁵

En base a esto, se pensó que en la región C1 podrían encontrarse variantes con ‘ganancia’ o ‘pérdida’ de la función represora de este elemento sobre KS-WNK1, que en consecuencia afectarían los niveles de presión arterial. Sin embargo, no se encontró variación alguna en esta región, lo que sugiere, junto con el hecho de que no se han reportado previamente variantes en C1, que está altamente conservada dentro de *WNK1*. Por esto, se puede decir que la variación genética en C1 no parece participar en la variación de la presión arterial en la población mexicana.⁹¹

Este es uno de los primeros estudios en mexicanos que busca determinar la composición genética de la HTA en nuestra población y es el primero sobre estos genes que realizado utilizando la estrategia de los fenotipos extremos. La población mexicana presenta variación genética del gen *WNK4* que podría conferir susceptibilidad a la hipertensión arterial. Aunque la variación en la región codificante de *WNK1* no se analizó en este estudio es probable que también confiera susceptibilidad a esta enfermedad en mexicanos. Para entender mejor las bases genéticas de la hipertensión arterial en nuestro país, es necesario completar los grupos de estudio y la secuenciación de los genes *WNK4* y *WNK1*, secuenciar otros genes candidato (Tabla 1.3) y realizar estudios funcionales *in vitro* de las variantes encontradas. Dado que el costo de las técnicas de secuenciación de nueva generación es cada vez más reducido y que algunas de estas

técnicas se encuentran disponibles en nuestro país, una estrategia atractiva para buscar otros genes de susceptibilidad a la hipertensión arterial sería seleccionar algunos casos familiares de hipertensión de inicio temprano y realizar secuenciación del exoma completo.

VIII. CONCLUSIONES

- La estrategia de los fenotipos extremos permitió encontrar variantes con un probable efecto funcional que podrían o no ser comunes en la población mexicana.
- La variación posiblemente funcional parece concentrarse especialmente en el reducido grupo de hipertensos de inicio temprano, por lo que podría estar involucrada en la etiología de la HTA en población mexicana.
- El polimorfismo G227W en el dominio cinasa de *WNK4* es potencialmente dañino para la función de la proteína y podría ser frecuente en la población mexicana. Por encontrarse en el dominio cinasa podría influenciar la actividad del co-transportador NCC expresado en la nefrona distal influyendo en la variación de la presión arterial.
- La mayor parte de la variación posiblemente funcional en *WNK4* se concentró en probables sitios de *splicing* presentes en las regiones intrónicas del gen, lo que sugiere que las alteraciones en la edición y traducción del mRNA podrían participar en la susceptibilidad a HTA en la población mexicana.
- No se encontró variación genética en el motivo ácido de *WNK4*, el cual alberga la mayor parte de las mutaciones que producen PHAII.
- Ningún polimorfismo se encontró en la región C1 de *WNK1*, lo que sugiere que la región está altamente conservada dentro de este gen. Ya que ninguna variante se ha reportado previamente en esta región, es probable que la variación genética en C1 no participe en la modulación de la presión arterial en la población mexicana.

IX. PERSPECTIVAS

- Completar la muestra del grupo de hipertensos de inicio temprano.
- Secuenciar el resto de *WNK4* y *WNK1*, así como otros genes candidato involucrados en la regulación de la reabsorción de Na⁺ y la presión arterial.
- Genotipificar por PCR tiempo real las variantes G227W, IVS7-25G/A y IVS14-40T/C en una muestra más grande de casos y controles en la población mexicana, buscando una posible asociación con la HTA.
- Secuenciar la región C5 con actividad *aisladora* de la transcripción del gen *WNK1* en individuos hipertensos de inicio temprano y normotensos de edad avanzada.
- Realizar estudios en algún sistema de expresión para determinar el posible efecto funcional del polimorfismo G227W.

XI. REFERENCIAS

1. **Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT Jr, and Roccella EJ.** 2004. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: The JNC 7 Report. *JAMA* **289**: 2560–2571.
2. **Carretero OA, Oparil S.** 2000. Essential hypertension: Part I: Definition and etiology. *Circulation*. **101**: 329-335.
3. **Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS.** 2001. Molecular Mechanisms of Human Hypertension. *Cell*. **104**: 545–556.
4. **Fields LE, Burt VL, Cutler JA, Hughes J, Roccella EJ, Sorlie P.** 2004. The burden of adult hypertension in the United States 1999 to 2000: A rising tide. *Hypertension*. **44**: 398-404.
5. **Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT).** 2006. Instituto Nacional de salud Pública. Secretaría de Salud Pública de México.
6. **Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, Grassi G, Heagerty AM, Kjeldsen SE, Laurent S, Narkiewicz K, Ruilope L, Rynkiewicz A, Schmieder RE, Struijker-Boudier HAJ, Zanchetti Z.** 2007 Guidelines for the management of arterial hypertension: The task force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens*. **25**:1751–1762.
7. **Ward R. Familial aggregation and genetic epidemiology of blood pressure. En Laragh JH, Brenner BM.** 1990. Ed. Hypertension, Pathophysiology, Diagnosis and Management. 2º edición. Raven Press, New York.
8. **García EA, Newhouse S, Caulfield MJ, Munroe PB.** 2003. Genes and hypertension. *Curr Pharmaceut Design*. **9**: 1679-1689.
9. **Rahmouni K, Correia MLG, Haynes WG, Mark AL.** 2005. Obesity-associated hypertension, new insights into mechanisms. *Hypertension*. **45**: 9-14.
10. **Willum-Hansen T, Staessen JA, Torp-Pedersen C, Rasmussen S, Thijs L, Ibsen H, Jeppesen J.** 2006. Prognostic value of aortic pulse wave velocity as index of arterial stiffness in the general population. *Circulation*. **113**: 664-670.
11. **Charron S, Duong C, Menard A, Roy J, Eliopoulos V, Lambert R, Deng AY.** 2005. Epistasis, not numbers, regulates functions of clustered Dahl rat quantitative trait loci applicable to human hypertension. *Hypertension*. **46**: 1300-1308.
12. **Guyton A, Hall JE.** 1998. Tratado de Fisiología Médica. 9º edición. Ed. McGrawHill Interamericana. México.
13. **Boron WF, Boulpaep EL.** 2009. Medical Physiology. 2nd edition. Saunders Elsevier. Canadá, pp1337.

14. **Gkika D, Hsu YJ, van der Kemp AW, Christakos S, Bindels RJ, Hoenderop JG.** 2006. Critical Role of the Epithelial Ca²⁺ Channel TRPV5 in Active Ca²⁺ Reabsorption as Revealed by TRPV5/Calbindin-D28K Knockout Mice. *J Am Soc Nephrol.* **17**: 3020–3027.
15. **Wang T, Yang CL, Abbiati T, Shull GE, Giebisch G, Aronson PS.** 2001. Essential role of NHE3 in facilitating formate-dependent NaCl absorption in the proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol.* **281**: F288–F292
16. **Tradtrantip L, Tajima M, Li L, Verkman AS.** 2009. Aquaporin water channels in transepithelial fluid transport. *J Med Invest.* **56**:179-184.
17. **Aronson PS.** 2006. Essential roles of CFEX-mediated Cl⁻-oxalate exchange in proximal tubule NaCl transport and prevention of urolithiasis CFEX-mediated Cl⁻-oxalate Exchange. *Kidney Intern* **70**, 1207-1213.
18. **Jentsch TJ.** 2005. Chloride Transport in the Kidney: Lessons from Human Disease and Knockout Mice. *J Am Soc Nephrol.* **16**: 1549–1561.
19. **Kleta R, Bockenhauer D.** 2006. Bartter Syndromes and Other Salt-Losing Tubulopathies. *Nephron Physiol.* **104**:73–80.
20. **Gamba G.** 2005. Molecular physiology and pathophysiology of electroneutral cation-chloride cotransporters. *Physiol Rev.* **85**: 423-493.
21. **Ellison DH, Velazquez H, and Wright FS.** 1987. Thiazide-sensitive sodium chloride cotransport in early distal tubule. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol.* **253**: F546–F554.
22. **Wagner CA.** 2009. New roles for renal potassium channels. *J Nephrol.* **23(1)**:5-8.
23. **Guyton AC.**1991.Blood pressure control. Special role of the kidneys and body fluids. *Science.* **252(5014)**:1813-6.
24. **Flores SY, Loffing-Cueni D, Kamynina E, Daidie D, Gerbex C, Chabanel S, Dudler J, Loffing J,Staub O.** 2005 Aldosterone-induced serum and glucocorticoid-induced kinase 1 expression is accompanied by Nedd4-2 phosphorylation and increased Na⁺ transport in cortical collecting duct cells. *J Am Soc Nephrol.* **16**: 2279–2287.
25. **Ecelberger CA, Kim GH, Wade JB, Knepper MA.** 2001. Regulation of the abundance of renal sodium transporters and channels by vasopressin. *Exp Neurol.* **171(2)**:227-34.
26. **Rozansky DJ, Cornwall T, Subramanya AR, Rogers S, Yang YF, David LL, Zhu X, Yang CL, Ellison DH.** 2009. Aldosterone mediates activation of the Tayside-sensitive Na-Cl cotransporter through an SGK1 and WNK4 signaling pathway. 2009. *J Clin Invest.* **119**:2601–2612.

27. **Pedersen NB, Hofmeister MV, Rosenback LL, Nielsen J, Fenton RA.** 2010. Vasopressin induces phosphorylation of the thiazide-sensitive sodium chloride cotransporter in the distal convoluted tubule. *Kidney Int.* **78(2)**: 160-169.
28. **Kim GH, Masilamani S, Turner R, Mitchell C, Wade JB, Knepper MA.** 1998. The thiazide-sensitive Na–Cl cotransporter is an aldosterone-induced proteína. *Proc Natl Acad Sci USA.* **(95)**: 14552–14557.
29. **Hirschhorn JN, Daly MJ.** 2005. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet.* **6**: 95-108.
30. **Mein CA, Caufield MJ, Dobson RJ, Munroe PB.** Genetics of essential hypertension. *Hum Mol Genet.* 2004. **13** : R169-R175.
31. **Munroe PB, Wallace C, Xue MZ, Marcano AC, Dobson RJ, Onipinla AK, Burke B, Gungadoo J, Newhouse SJ, Pembroke J.** 2006. Increased support for linkage of a novel locus on chromosome 5q13 for essential hypertension in the British Genetics of Hypertension Study. *Hypertension.* **48**:105-111.
32. **Pausova Z, Gaudet D, Gossard F, Bernard M, Kaldunski ML, Jomphe M, Tremblay J, Hudson TJ, Bouchard G, Kotchen TA.** 2005. Genome-wide scan for linkage to obesity-associated hypertension in French Canadians. **46** :1280-85.
33. **Padmanabhan S, Melander O, Hastie C, Menni C, Delles C, Connell JM, Dominiczak AF.** 2008. Hypertension and genome-wide association studies: combining high fidelity phenotyping and hypercontrols. *J Hypertens.* **26 (7)**: 1275-81
34. **Gharavi A, Lifton RP.** 2001. The inherited basis of blood pressure variation and hypertension. Capítulo 21 en: Scriver, Beaudet, Valle, Sly, Childs, Kinzler, Vogelstein. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8° edición, volumen IV.
35. **Simon DB, Lifton R.** 1998. Ion transporter mutations in Gitelman’s and Bartter’s síndromes. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* **7**:43-47.
36. **Janssen AGH, Scholl U, Domeyer C, Nothmann D, Leinenweber A, Fahlke C.** 2009. Disease-Causing Dysfunctions of Barttin in Bartter Syndrome Type IV. *J Am Soc Nephrol.* **20**: 145–153
37. **Hebert S.** 2003. Bartter syndrome. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **12**:527–532.
38. **Hinds DA, Stokowski RP, Patil N, Konvicka K, Kershenobich D, Kershenobich D, Cox DR, Ballinger DG.** 2004. Matching strategies for genetic association studies in structured populations. *Am J Hum Genet.* **74**:317-25.
39. **Ziv E, Burchard EG.** 2003. Human population structure and genetic association studies. *Pharmacogenomics.* **4**:431-41.
40. **Wang WY, Barratt BJ, Clayton DG, Todd JA.** 2005. Genome-wide association Studies: theoretical and Practical concerns. *Nat Rev Genet.* **6(2)**:109-18.

41. **Sigmund DC.** 2008. A growing chain of evidence linking genetic variation in angiotensinogen with essential hypertension: focus on "A haplotype of human angiotensinogen gene containing -217A increases blood pressure in transgenic mice compared with -217G," by Jain *et al.* *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 295:R1846-R1848
42. **Schroeder KB, Schurr TG, Long JC, Rosenberg NA, Crawford MH, Tarskaia LA, Osipova LP, Zhadanov SI, Smith DG.** 2007. A private allele ubiquitous in the Americas. *Biol Lett*, 3:218-233.
43. **Villarreal-Molina MT, Aguilar-Salinas CA, Rodríguez-Cruz M, Riaño D, Villalobos-Comparan M, Coral-Vázquez R, Menjivar M, Yescas-Gómez P, Königsoerg-Fainstein M, Romero-Hidalgo S, Tusie-Luna MT, Canizales-Quinteros S.** 2007. The ATP-binding cassette transporter A1 R230C variant affects HDL cholesterol levels and BMI in the Mexican population: association with the obesity and obesity-related comorbidities. *Diabetes.* 56(7): 1881-7.
44. **Cohen JC, Kiss RS, Pertsemlidis A, Marcel YL, McPherson R, Hobbs HH.** 2004. Multiple rare alleles contribute to low plasma levels of HDL cholesterol. *Science.* 305(5685): 869-72.
45. **Ji W, Foo JN, O'Roak BJ, Zhao H, Larson MG, Simon DB, Newton-Cheh C, State MW, Levy D, Lifton RP.** 2008. Rare independent mutations in renal salt handling genes contribute to blood pressure variation. *Nat Genet.* 40(5): 592-9.
46. **Bodmer W, Bonilla C.** 2008. Common and rare variants in multifactorial susceptibility to common diseases. *Nat Genet.* 40: 695-701.
47. **Huang CL, Yang SS, Lin SH.** 2008. Mechanism of regulation of renal ion transport by WNK kinases. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 17:519-525.
48. **Gamba G.** 2005. Molecular Physiology and Pathophysiology of Electroneutral Cation-Chloride Cotransporters. *Physiol Rev.* 85: 423-493.
49. **San Cristobal P, De Los HP, Ponce-Coria J, Moreno E, Gamba G.** 2008a. WNK kinases, renal ion transport and hypertension. *Am J Nephrol.* 28: 860 – 870.
50. **Simon DB, Farfel Z, Ellison D, Bia M, Tucci J, Lifton RP.** 1995. Examination of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter as a candidate gene in Gordon's syndrome. 632.
51. **Mansfield TA, Simon DB, Farfel Z, Bia M, Tucci JR, Lebel M, Gutkin M, Vialettes B, Christofilis MA, Kauppinen-Makelin R, Mayan H, Risch N, Lifton RP.** 1997. Multilocus linkage of familial hyperkalaemia and hypertension, pseudohypoaldosteronism type II, to chromosomes 1q31-42 and 17p11-q21. *Nat Genet.* 16: 202-205.
52. **Disse-Nicodeme S, Achard JM, Desitter I, Houot AM, Fournier A, Corvol P, Jeunemaitre X.** 2000. A new locus on chromosome 12p13.3 for pseudohypoaldosteronism type II, an autosomal dominant form of hypertension. *Am J*

Hum Genet. **67**: 302–310.

53. **Disse-Nicodeme S, Desitter I, Fiquet-Kempf B, Houot AM, Stern N, Delahousse M, Potier J, Ader JL, Jeunemaitre X.** 2001. Genetic heterogeneity of familial hyperkalaemic hypertension. *J Hypertens.* **19**: 1957–1964.

54. **Wilson FH, Disse-Nicodeme S, Choate KA, Ishikawa K, Nelson- Williams C, Desitter I, Gunel M, Milford DV, Lipkin GW, Achard JM, Feely MP, Dussol B, Berland Y, Unwin RJ, Mayan H, Simon DB, Farfel Z, Jeunemaitre X, Lifton RP.** 2001. Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science* **293**: 1107–1112.

55. **Xu B, English JM, Wilsbacher JL, Stippec S, Goldsmith EJ, Cobb MH.** 2000. WNK1, a novel mammalian serine/ threonine protein kinase lacking the catalytic lysine in subdomain II. *J Biol Chem.* **275**: 16795–16801

56. **Huang CL, Cha SK, Wang HR1, Xie J, Cobb MH.** 2007. WNKs: protein kinases with a unique kinase domain. *Exp Mol Med.* **39(5)**: 565-573.

57. **Kahle KT, Rinehart J, Ring A, Gimenez I, Gamba G, Hebert SC, Lifton RP.** 2006. WNK protein kinases modulate cellular Cl⁻ flux by altering the phosphorylation state of the Na-K-Cl and K-Cl cotransporters. *Physiology* **21**: 326 –335.

58. **Verissimo F, Jordan P.** 2001. WNK kinases, a novel protein kinase subfamily in multicellular organisms. *Oncogene* . **20**: 5562–5569.

59. **Xu BE, Min X, Stippec S, Byung-Hoon Lee, Goldsmith EJ, Cobb MH.** Regulation of WNK1 by an autoinhibitory domain and autophosphorylation. *J Biol Chem* 2002; 277:48456–48462.

60. **Masilamani S, Kim GH, Mitchell C, Wade JB, and Knepper MA.** 1999. Aldosterone-mediated regulation of ENaC alpha, beta, and gamma subunit proteins in rat kidney. *J Clin Invest.* **104**: R19 –R23.

61. **Golbang AP, Murthy M, Hamad A, Liu CH, Cope G, Hoff WV, Cuthbert A, O’Shaughnessy KM.** 2005. A new kindred with pseudohypoaldosteronism type II and a novel mutation (564D>H) in the acidic motif of the WNK4 gene. *Hypertension.* **46**:295–300

62. **Lenertz LY, Lee BH, Min X, Xu B, Wedin K, Earnest S, Goldsmith EJ, Cobb MH.** 2005. Properties of WNK1 and implications for other family members. *J Biol Chem.* 2005. **280**: 26653–26658.

63. **Subramanya AR, Yang CL, Zhu Xiaoman, Ellison DH.** 2006. Dominant-negative regulation of WNK1 by its kidney-specific kinase- defective isoform. *Am J Physiol Renal Physiol.* **290**: F619–F624.

64. **Yang CL, Zhu X, Wang Z, Subramanya AR, Ellison DH.** 2005. Mechanisms of WNK1 and WNK4 interaction in the regulation of thiazide-sensitive NaCl cotransport. *J Clin Invest.* 115:1379–1387.

65. **Yang CL, Zhu X, Ellison DH.** 2007a. The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter is regulated by a WNK kinase signaling complex. *J Clin Invest.* 2007.**117**: 3403–3411.
66. **Vitari A, Deak M, Morrice NA, Alessi DR.** 2005. The WNK1 and WNK4 protein kinases that are mutated in Gordon’s hypertension syndrome phosphorylate and activate SPAK and OSR1 protein kinases. *Biochem J.* **391**: 17–24
67. **Vitari AC, Thastrup J, Rafiqi FH, Deak M, Morrice NA, Karlsson HK, Alessi DR.** 2006. Functional interactions of the SPAK/OSR1 kinases with their upstream activator WNK1 and downstream substrate NKCC1. *Biochem J.* **397**: 223–231.
68. **Anselmo AN, Earnest S, Chen W, Juang YC, Kim SC, Zhao Y, Cobb MH.** 2006. WNK1 and OSR1 regulate the Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ cotransporter in HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* **103**:10883 – 10888.
69. **Delaloy C, Lu J, Houot AM, Disse-Nicodeme S, Gasc JM, Corvol P, Jeunemaitre X.** 2003. Multiple Promoters in the WNK1 Gene: One Controls Expression of a Kidney-Specific Kinase-Defective Isoform . *Mol Cell Biol.* **23**: 9208–9221.
70. **O’Reilly M, Marshall E, Speirs HJL, Brown RW.** WNK1, a gene within a novel blood pressure control pathway, tissue-specifically generates radically different isoforms with and without a kinase domain. *J Am Soc Nephrol.* 2003. **14**: 2447–2456.
71. **Cope G, Goldbang A, O’Shaughnessy KM.** 2005. WNK kinases and the control of blood pressure. *Pharmacol Ther.* **106**(2): 221–231
72. **Wilson FH, Kahle KT, Sabath E, Lalioti MD, Rapson AK, Hoover RS, Hebert SC, Gamba G, and Lifton RP.** 2003. Molecular pathogenesis of inherited hypertension with hyperkalemia: the Na-Cl cotransporter is inhibited by wild-type but not mutant WNK4. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 680 – 684.
73. **Yang CL, Zhu X, Ellison DH.** 2007. The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter is regulated by a WNK kinase signaling complex. *J Clin Invest.* **117**: 3403–3411.
74. **Yang CL, Angell J, Mitchell R, Ellison DH.** 2003. WNK kinases regulate thiazide-sensitive Na-Cl cotransport. *J Clin Invest.* **111**: 1039-1045.
75. **Delaloy C., Matelot E., Clemessy M., Zhou X., Teboul M., Houot AM., Jeunemaitre X, Hadchouel J.** 2008. Deletion of *WNK1* First Intron Results in Misregulation of Both Isoforms in Renal and Extrarenal Tissues. *Hypertension.* **52**:1-6
76. **Lazrak A, Liu Z, Huang CL.** 2006. Antagonistic regulation of ROMK by long and kidney-specific WNK1 isoforms. *PNAS.* **103**(5): 1615–1620
77. **He G, Wang HR, Huang SK, Huang CL.** 2007. Intersectin link WNK kinases to endocytosis of ROMK1. *J clin Invest.* **117**:1078-1087.
78. **Ring AM, Cheng SX, Leng Q, Kahle KT, Rinehart J, Lalioti MD, Volkman**

HM, Wilson FH, Hebert SC, Lifton RP. 2007. WNK4 regulates activity of the epithelial Na⁺ channel *in vitro* and *in vivo*. *PNAS*. **104(10)**: 4020-4024.

79. **Abriel H, Loffing J, Rebhun JF, Pratt JH, Schild L, Horisberger JD, Rotin D, Staub O.** 1999a. Defective regulation of the epithelial Na⁺ channel by Nedd4 in Liddle's syndrome. *J Clin Invest*. **103(5)**: 667-673.

80. **Xu BE, Lee BH, Min X, Lenertz L, Heise CJ, Stippec S, Goldsmith EJ, Cobb MH.** 2005. WNK1: analysis of protein kinase structure, downstream targets, and potential roles in hypertension. *Cell Research*. **15(1)**: 6-10.

81. **Xu BE, Stippec S, Chu PY, Lazrak A, Li XJ, Lee BH, English JM, Ortega B, Huanh CL, Cobb MH.** 2005. WNK1 activates SGK1 to regulate the epithelial sodium channel. *PNAS*. **102 (29)**:10315–10320.

82. **Gagnon KB, England R, Delpire E.** 2006. Volume sensitivity of cation-Cl⁻ cotransporters is modulated by the interaction of two kinases: Ste20-related proline-alanine-rich kinase and WNK4. *Am J Physiol Cell Physiol*. **290**:C134 – C142.

83. **Zagorska A, Pozo-Guisado E, Boudeau J, Vitari AC, Rafiqi Fatema, Thastrup J, Deak M, Campbell DG, Morrice NA, Prescott AR, Alessi DR.** 2007. Regulation of the activity and localization of the WNK1 protein kinase by hyperosmotic stress.

84. **Rafiqi S, Anand S, Roberts R.** 2010. Genome-Wide Association Studies of Hypertension: Have They Been Fruitful?. *J Cardiovasc Trans Res*. **3(189)**:189-196.

85. **Richardson C, Rafiqi FH, Karlsson HKR, Moleleki N, Vandewalle A, Campbell DG, Morrice NA, Alessi DR.** 2008. Activation of the thiazide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter by the WNK-regulated kinases SPAK and OSR. *J Cell Sci*. **121**: 675-684.

86. **Richardson C, Alessi DR.** 2008. The regulation of salt transport and blood pressure by the WNK-SPAK/OSR1 signalling pathway. *J Cell Science*. **121**: 3293-3304.

87. **Moriguchi T, Urushiyama S, Hisamoto N, Iemura SI, Uchida S, Natsume T, Matsumoto K, Shibuya H.** 2005. WNK1 regulates phosphorylation of cation-chloride-coupled cotransporters via the STE20-related kinases, SPAK and OSR1. *J Biol Chem*. **280**:42685–42693.

88. **San Cristóbal P, Pacheco-Alvarez D, Richardson C, Ring AM, Vazquez N, Rafiqi FH, Chari D, Kahle KT, Leng Q, Bobadilla NA, Hebert SC, Alessi DR, Lifton, Gamba G.** 2009. Angiotensin II signaling increases activity of the renal Na-Cl cotransporter through a WNK4-SPAK-dependent pathway, *PNAS*. **108 (11)**:4384–4389.

89. **Gamba G.** 2009. The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter: molecular biology, functional properties, and regulation by WNKs. *Am J Physiol Renal Physiol*. **297**: F838-F848.

90. **Yang SS, Morimoto T, Rai T, Chiga M, Sohara E, Ohno M, Uchida K, Lin SH, moriguchi T, Shibuya H, Kondo Y, Sasaki S, Uchida S.** 2007a. Molecular Pathogenesis of Pseudohypoaldosteronism Type II: Generation and Analysis of a

Wnk4D561A/+ Knockin Mouse Model. *Cell Metabolism*. **5**: 331-344.

91. **SNPs en WNK1**. 2010. Base de datos SNPs. PubMed del NCBI. Dirección Web: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?showRare=on&chooseRs=all&locusId=65125&mrna=NM_018979.3&ctg=NT_009759.16&prot=NP_061852.3&orientation=forward&refresh=refresh.

92. **USCS Genome Bioinformatics Browser**. WNK1. *USCS Genome Bioinformatics*. Dirección Web: <http://genome.uscs.edu/dgi>

93. **Newhouse S, Farral, M, Wallace C, Hoti M, Burke B, Howard P, Onipinia A, Lee K, Shaw-Hawkins S, Dobson R, Brown M, Samani NJ, Dominiczak AF, Connell JM, Lathrop GM, Kooner J, Chambers J, Elliott P, Clarke R, Collins R, Laan M, Org E, Juhanson P, Velcre G, Viigimaa M, Eyheramendy S, CAppuccio FP, Ji C, Iacone R, Strazzullo P, Kumari M, Marmot M, Brunner E, Caulfield M, Munroe PB**. 2009. Polymorphisms in the WNK1 Gene Are Associated with Blood Pressure Variation and Urinary Potassium Excretion. *PLOS One*. **4(4)**: 1-14.

94. **Turner ST, Schwartz L, Chapman AB, Boerwinkle E**. 2005. WNK1 Kinase Polymorphism and Blood Pressure Response to a Thiazide Diuretic. *Hypertension*. **46**: 758-765.

95. **Matayoshi T, Kamide K, Takiuchi S, Yoshi M, Miwa Y, Takami Y, Tanaka C, Banno M, Horio T, Nakamura S, Nakamura H, Yoshihara F, Inenaga T, Miyata T, Kawano Y**. 2004. The thiazide-sensitive Na(+)-Cl(-) cotransporter gene, C1784T, and adrenergic receptor-beta3 gene, T727C, may be gene polymorphisms susceptible to the antihypertensive effect of thiazide diuretics. *Hypertens Res*. **27(11)**:821-33.

96. **Kokubo Y, Kamide K, Inamoto N, Tanaka C, Banno M, Takiuchi S, Kawano Y, Tomoike H, Miyata T**. 2004. Identification of 108 SNPs in TSC, WNK1 and WNK4 and their association with hypertension in a Japanese general population. *J Hum Genet*. **49**: 507-15.

97. **Newhouse SJ, Wallace C, Dobson R, Mein C, Pembroke J, Farral M, Clayton D, Brown M, Samani N, Dominiczak A, Connell JM, Webster J, Lathrop GM, Caulfield M, Monroe PB**. 2005. Haplotypes of the WNK1 gene associate with blood pressure variation in a severely hypertensive population from the British Genetics of Hypertension study. *Hum Molec Genet*. **14(13)**: 1805-1814.

98. **Tobin, MD, Raleigh SM, Newhouse S, Braund P, Bodycote C, Ogleby J, Cross D, Gracey J, Hayes S, Smith T, Ridge C, Caulfield M, Sheehan NA, Munroe PB, Burton PR, Samani NJ**. 2005. Association of WNK1 Gene Polymorphisms and Haplotypes With Ambulatory Blood Pressure in the General Population. *Circulation*. **112**: 3423-3429.

99. **Tobin MD, Timpson NJ, Wain LV, Ring S, Jones LR, Emmett PM, Palmer TM, Ness AR, Samani NJ, Smith GD, Burton PR**. 2008. Common Variation in the WNK1 Gene and Blood Pressure in Childhood The Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *Hypertension*. **52**: 974-979.

100. **SNPs en WNK4**. 2010. Base de datos SNPs. PubMed del NCBI. Dirección Web: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?showRare=on&chooseRs=all&locusId=65266&mrna=NM_032387.4&ctg=NT_010783.15&prot=NP_115763.2&orientation=forward&refresh=refresh.
101. **USCS Genome Bioinformatics Browser**. WNK4. *USCS Genome Bioinformatics*. Dirección Web: http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGene?hgid=173570819&db=hg19&hgg_gene=uc002ibj.2&hgg_chrom=chr17&hgg_start=40932695&hgg_end=40949079.
102. **Erlich PM, Cui J, Chazaro I, Farrer LA, Baldwin CT, Gavras H, DeStefano AL**. 2003. Genetic Variants of *WNK4* in Whites and African Americans With Hypertension *Hypertension*. **41**:1191-1195.
103. **Speir JL, Morris BJ**. 2004. WNK4 Intron 10 Polymorphism Is Not Associated With Hypertension. *Hypertension*. **43**: 766-768.
104. **Benjafield AV, Katyk K, Morris BJ**. 2003. Association of EDNRA, but not WNK4 or FKBP1B, polymorphisms with essential hypertension. *Clin Genet*. **64(5)**:433-438.
105. **Smith, P. J., Zhang, C., Wang, J. Chew, S. L., Zhang, M. Q. and Krainer, A. R**. 2006. An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers. *Hum Mol Genet*. **15(16)**: 2490-2508.
106. **Cartegni L., Wang J., Zhu Z., Zhang M. Q., Krainer A. R**. 2003. ESE finder: a web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acid Research*. **31(13)**: 3568-3571. Dirección Web del programa ESE finder: <http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home>
107. **Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Beroud G, Claustres M, Beroud C**. 2009. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acid Research*. Dirección Web del programa *Human Splicing Finder 2.4.1*: <http://www.umd.be/HSF/>
108. **Vasily Ramensky, Peer Bork, and Shamil Sunyaev**. 2002. European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, D-69117 Heidelberg, Germany. *Nucleic Acids. Res*. **30(17)**: 3894-900. Dirección web del programa *Polyphen Harvard*: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/references.html>.
109. **Hastie CE, Padmanabhan S, Dominiczak AF**. 2010. Genome-Wide Association Studies of Hypertension: Light at the End of the Tunnel. *Int J Hypertens*. **2010**: 509581.
110. **Goldstein DB**. 2009. Common genetic variation and human traits. *N Engl J Med* **360(17)**:1696-1698.
111. **The 1000 Genomes Project Consortium**. 2010. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*. **467**: 1061-1073.

112. **Kraft P, Wacholder S, Cornelis MC, Hu FB, Hayes RB, Thomas G, Hoover R, Hunter DJ, Chanock S.** 2009. Beyond odds ratios--communicating disease risk based on genetic profiles. *Nat Rev Genet.* **10(4):**264-9.
113. **Ring AM, Leng Q, Rinehart J, Wilson FH, Kahle KT, Hebert SC, Lifton RP.** 2007. An SGK1 site in WNK4 regulates Na⁺ channel and K⁺ channel activity and has implications for aldosterone signaling and K⁺ homeostasis. *PNAS.* **104(10):**4025-4029.
114. **Wang Y, O'Connell JR, McArdle PF, Wade JB, Dorff SE, Shah SJ, Shi X, Pan L, Rampersaud E, Shen H, Kim JD, Subramanya AR, Steinle NI, Parsa A, Ober CC, Welling PA, Chakravarti A, Wader AB, Cooper RS, Mitchell BD, Shuldiner AR, Chang YP.** 2009. From the Cover: Whole-genome association study identifies STK39 as a hypertension susceptibility gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* **106:** 226-231.
115. **Min X, Lee BH, Cobb MH, Goldsmith EJ.** 2004. Crystal structure of the kinase domain of WNK1, a kinase that causes a hereditary form of hypertension. *Structure.* **12:** 1303-1311.
116. **Chen M, Manley JL.** 2009. Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **10(11):** 741-754.
117. **Ward AJ, Cooper TA.** 2010. The pathobiology of splicing. *J Pathol.* **220(2):**152-163.
118. **Zuo P, Manley JL.** 1993. Functional domains of the human splicing factor ASF/SF2. *EMBO Journal.* **12(12):** 4727-4737.
119. **Michlewski G, Sanford JR, Cáceres JF.** 2008. The splicing factor SF2/ASF regulates translation initiation by enhancing phosphorylation of 4E-BP1. *Mol Cell* **30(2):** 179-89.
120. **Sandberg MB, Riquier AD, Pihakaski-Maunsbach K, McDonough AA, Maunsbach AB.** 2007. Angiotensin II provokes acute trafficking of distal tubule NaCl cotransporter (NCC) to apical membrane. *Am J Physiol Renal Physiol.* **293:**F662-F669.
121. **Peti-Peterdi J, Warnock DG, Bell PD.** 2002. Angiotensin II Directly Stimulates ENaC Activity in the Cortical Collecting Duct via AT1 Receptors. *J Am Soc Nephrol.* **13:** 1131-1135.
122. **K. E. Lohmueller, C. L. Pearce, M. Pike, E. S. Lander, J. N. Hirschhorn.** 2003. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat Genet.* **33(2):** 177-182.
123. **J. K. Pritchard.** 2001. Are rare variants responsible for susceptibility to complex diseases?. *Am J Hum Genet.* **69(1):** 124-137.

124. **Chamary JV, Parmley JL, Hurst LD.** 2006. Hearing silence: Non-neutral evolution at synonymous sites in mammals. *Nat Rev Genet* **7**: 98–108.
125. **Moniz S, Jordan P.** 2010. Emerging roles for WNK kinases in cancer. *Cell. Mol Life Sci.* **67**:1265–1276.