



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

REGULACIÓN DEL COTRANSPORTADOR RENAL DE SAL SENSIBLE A TIAZIDAS POR
UNA CASCADA DE CINASAS MODULADA POR LA INSULINA Y LA ANGIOTENSINA II

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

MARÍA DE JESÚS CHÁVEZ CANALES

DIRECTOR DE TESIS

DR. GERARDO GAMBA AYALA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR

DR. JESÚS ADOLFO GARCÍA SÁINZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

DRA. NORMA BOBADILLA SANDOVAL
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

MÉXICO D.F. MARZO DE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Contenido

RECONOCIMIENTOS	3
RESUMEN	5
PROPUESTA DEL PLAN	7
PREFACIO	11
INTRODUCCIÓN	16
EL RIÑÓN REGULA LA CONCENTRACIÓN DEL LÍQUIDO EXTRACELULAR EN EL ORGANISMO	17
EL RIÑÓN REGULA A LARGO PLAZO LA PRESIÓN ARTERIAL	26
EL AUMENTO DE LA REABSORCIÓN RENAL DE SAL PRODUCE HIPERTENSIÓN ARTERIAL CRÓNICA	30
EFFECTO DEL EJE RENINA ANGIOTENSINA SOBRE LA REABSORCIÓN DE SAL	37
EL PAPEL DEL NCC EN LA HOMEOSTASIS DE LA SAL, EL POTASIO Y LA PRESIÓN ARTERIAL.	41
REGULACIÓN DEL NCC POR LAS CASCADA DE SEÑALIZACIÓN WNK-SPAK	49
PAPEL DEL NCC EN LA REABSORCIÓN DE SAL EN CONDICIONES DE HIPERINSULINISMO	55
JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO	58
HIPÓTESIS	62
OBJETIVOS	64
MÉTODOS	66
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	75
LAS CINASA L-WNK1 ES UNA ACTIVADOR DEL NCC	76
LA CINASA WNK4 INHIBE AL NCC AL INHIBIR A LAS CINASAS L-WNK1 Y WNK3	87
LA ANGIOTENSINA II ACTIVA AL NCC AL PREVENIR LA INHIBICIÓN DE WNK4 SOBRE L-WNK1 Y WNK3	93
LA PROTEÍNA KS-WNK1 ES UN REGULADOR POSITIVO DEL NCC	97
LA CINASA L-WNNK1 ES SUSTRATO DEL COMPLEJO DE UBIQUITILACIÓN KLHL3-CUL3.	103
LA INSULINA ACTIVA AL NCC DE MANERA DEPENDIENTE DE WNK3	110
DISCUSIÓN GENERAL	125
CONCLUSIONES	129
PUBLICACIONES	131
ARTÍCULO PARA OBTENCIÓN DE GRADO	132
BIBLIOGRAFÍA	142
APÉNDICES	159

Reconocimientos

Esta tesis doctoral se presentan los resultados obtenidos durante mis estudios de doctorado realizados en el laboratorio del Dr. Gerardo Gamba en la Unidad de Fisiología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Algunos experimentos se hicieron en colaboración con investigadores cuya participación fue la siguiente:

- Dra. Rocío Bautista del Instituto Nacional Cardiología Ignacio Chávez que ayudó a la perfusión *ex vivo* de riñones
- Dra. Juliette Hadchouel en el INSERM U970 y al *Paris Cardiovascular Research Center*, en Paris Francia que generó el ratón $WNK1^{FHHT/+}$ que se utilizó para generar al ratón $WNK4^{-/-}$: $WNK1^{FHHT/+}$
- Dr. David Ellison que perteneciente a la *Division of Nephrology & Hypertension, Oregon Health & Science University*, Portland, Oregon, USA que colaboró con la transfección de células HEK295 con el NCC.
- Dr. Robert Hoover del *Emory University Hospital*, en Atlanta que donó las células mDCT15 utilizadas en los experimentos de insulina.

Este trabajo fue posible gracias a los siguientes financiamientos:

- Donativo proporcionado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) con el número 16815, titulado: Regulación del cotransportador de NaCl. Implicaciones en la hipertensión arterial y la obesidad.
- Proyecto DGAPA/PAPIIT de la UNAM No. IN200503
- Proyecto Welcome Trust No. 091415, titulado: “*Modulation of renal NaCl transporter via angiotensin II-WNK4-SPAK signalling pathways*”
- Donativo otorgado por la fundación Leducq dentro del programa “*Transatlantic Network on Hypertension*”.

Este trabajo fue posible gracias al apoyo técnico de la Química Norma Hilda Vázquez, técnico académico del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, adscrita al grupo del Dr. Gerardo Gamba.

Durante mis estudios de doctorado recibí una beca del Programa de Becas para Estudios de Posgrado perteneciente al CONACyT (Número de becario: 363552)

Mi comité tutorial estuvo conformado por el Dr. Jesús Adolfo García Sáinz y a la Dra. Norma Bobadilla Sandoval que apoyaron y asesoraron el desarrollo de este trabajo.

Los miembros del Jurado para el examen de grado, designados por el Comité Académico fueron:

Dr. Martha Franco Guevara (Presidenta)
Dr. Gerardo Gamba Ayala (Secretario)
Dra. Soledad Funes Argüello (Vocal)
Dra. Martha Robles Flores (Vocal)
Dr, José Vazquez Prado (Vocal)

Resumen

La homeostasis es una propiedad fundamental de la vida que requiere mecanismos de control muy precisos para mantener la estabilidad fisiológica. En los animales, el riñón es un órgano prioritario en el mantenimiento de la homeostasis, ya que regula tanto el balance de agua y electrolitos como los niveles de presión arterial. Desde esta perspectiva, el cotransportador renal sensible a las tiazidas, el NCC, tiene un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis. Estudios de diferentes enfermedades monogénicas han permitido identificar elementos genéticos causantes de hipertensión arterial y de desordenes electrolíticos. Así, tanto las cinasas WNK1 y WNK4 como las ubiquitin ligasas KLHL3-CUL3 se han reconocido como importantes elementos en la regulación de la reabsorción renal de sal y la presión arterial. Todas estas proteínas, ubicadas en el túbulo contorneado distal donde el NCC está, pertenecen a una vía de regulación del cotransportador, la cual incluye a la cinasas WNK3, SPAK y OSR1. Sin embargo, la forma de regulación del NCC es compleja y existen discrepancias en los diversos modelos construidos hasta ahora. Esta tesis presenta resultados que retan al modelo actual y proponen uno nuevo, el cual explica en forma más apropiada la regulación del NCC por las cinasas WNK. Además, ubica el punto de acción de la angiotensina II en la cascada de regulación del NCC por las WNK. Finalmente, también se obtuvieron resultados que muestran que la insulina es otra hormona importante que activa al NCC, lo que ayuda a explicar la hipertensión arterial observada en estados de hiperinsulinismo. El trabajo aquí presentado ofrece un mecanismo que permite un mejor entendimiento molecular de la regulación de la reabsorción de sal por el NCC. Además, sugiere la importancia de la vía de señalización por las WNK en el mantenimiento de la homeostasis ante retos fisiológicos como la depleción de volumen y en el desarrollo de fisiopatologías como el pseudohipoaldosteronismo tipo II y la hiperinsulinemia

Homeostasis is a fundamental property of life, which uses precise mechanisms to regulate and maintain physiological stability. In animals, the kidney is a central element in maintaining body homeostasis, as it modulates electrolyte and water balance, as well as the blood pressure. The thiazide sensitive sodium-chloride cotransporter, NCC, plays a major role in the regulation of these processes. The study of different monogenic diseases have led to the identification of genes involved in the regulation of electrolyte stability and blood pressure. Among these, the WNK1 y WNK4 kinases and the ubiquitin ligases KLHL3-CUL3 have been recognized as important elements in the regulation of renal solute reabsorption and blood pressure. All these proteins, located in the kidney's distal convoluted tubule, where the cotransporter NCC is also present, belong to a regulatory pathway that also includes the kinases WNK3, SPAK and OSR1, which regulates NCC activity. However, the mechanisms by which WNKs, SPAK and KLHL3-CUL3 regulate NCC are complex and the models proposed up to date fail to explain several observations. In this thesis, we present results that challenge the current model and propose a new one that offers a better explanation for the regulation of NCC by the WNK kinases, and integrates angiotensin II action in this regulatory cascade. In addition, we identified insulin as another important hormone that stimulates NCC activity, which might help to explain the observed links between hypertension, obesity, metabolic syndrome and hyperinsulinism. The work presented here increases the understanding of the NCC-mediated salt reabsorption mechanisms and points to the importance of the regulatory WNK pathway in maintaining physiological homeostasis in response to physiological challenges such as volume depletion and in the development of pathologies such as pseudohypoaldosteronism type II and hyperinsulinemia

Propuesta del plan

El título de esta tesis, en el inicio de mis estudios doctorales, fue *“La regulación del cotransportador de renal de sal (NCC) por la insulina”*. Este trabajo también surgió no sólo del interés por describir otro de los muchos mecanismos posibles que conllevan al desarrollo de hipertensión arterial, asociado a condiciones de hiperinsulinismo; sino de la necesidad de estudiar el universo celular y molecular y, de este modo, entender más del papel del NCC en los procesos del mantenimiento de la homeostasis.

Por ello, además de trabajar con los mecanismos de regulación del NCC por insulina, también realicé experimentos relacionados con la regulación del cotransportador por la cinasa WNK1, gracias a la identificación de distintas isoformas renales de esta última enzima (Vidal-Petiot et al., 2012). Los experimentos hechos con estas variantes permitieron realizar proyectos paralelos al de la insulina y llevaron a nuestra investigación hacia el estudio de otras vías. Entre otros elementos, a la cinasa WNK4 y a la angiotensina II. Asimismo, trabajé con genes identificados recientemente involucrados en el desarrollo del Pseudohipoaldosteronismo tipo II, gracias a la colaboración establecida con el Dr. Xavier Jenematiér y la Dra. Juliette Hadchouel, en el Hospital George Pompidou. Ellos encontraron que mutaciones aún no descritas en la cinasa WNK1 son causantes de hipertensión e hiperkalemia en algunas familias europeas. En nuestro laboratorio generamos las mutaciones y analizamos el posible efecto sobre el desarrollo de dicha enfermedad. Por esa razón, esta tesis cambió de título a uno más general que trata de integrar el camino que recorrimos. El título por tanto es *“Regulación del cotransportador renal de sal sensible a tiazidas por una cascada de cinasas modulada por la insulina y la angiotensina II”*.

Debido a que esta tesis presentan resultados heterogéneos provenientes de distintos proyectos, escogí una estructuración que facilita la exposición de mi trabajo y, además, muestra cómo abordamos los retos presentados en la resolución de las preguntas centrales de este trabajo.

Dado que el NCC, principal objeto de estudio de este tesis, tiene un papel fundamental tanto en la regulación de la concentración de electrolitos como en la modulación de la presión ar-

terial, comienzo con un breve *Prefacio* histórico acerca del concepto de homeostasis. La *Introducción* presenta el marco teórico que sitúa a mi trabajo. En esos capítulos abordo los conceptos básicos de la función renal y la regulación de la presión arterial a largo plazo. Asimismo, describo el papel de la reabsorción renal de sal en la modulación de la presión arterial que está, en cierta medida íntimamente relacionada con la actividad del NCC. Por último, en los capítulos finales de la *Introducción*, el lector encontrará una breve descripción de los mecanismos moleculares de regulación del NCC. Esta descripción utiliza la perspectiva bioquímica y molecular, que es, finalmente, el trabajo realizado en mis estudios.

Nuestro grupo y otros grupos involucrados en este campo de estudio construyeron el modelo actual de regulación del NCC a partir de evidencias reportadas. No obstante, este modelo presenta algunas discrepancias que este trabajo doctoral trata de resolver¹. La sección de *Justificación del Proyecto* plantea y discute dichas inconsistencias.

La sección de *Hipótesis* expone de manera puntual las suposiciones de esta tesis doctoral formuladas a partir de la integración de las evidencias reportadas hasta ahora.

La sección de *Métodos* precisa los materiales y métodos utilizados en los experimentos.

La sección de *Resultados* está dividida en 6 capítulos. Cada uno de estos capítulos representa, por así decirlo, un proyecto breve de investigación, elaborado de un modo independiente en el desarrollo experimental. Cada capítulo engloba, plantea y desarrolla una discusión particular, buscando al final una coherencia metodológica. Cada capítulo tiene un marco introductorio pertinente que ubica al lector en un contexto teórico mucho más preciso –a diferencia de la sección de *Introducción*. Seguido del marco introductorio de cada capítulo, el trabajo se enfoca en la descripción de los resultados obtenidos y discute cada uno de ellos;

¹ Distintas disciplinas, y particularmente las ciencias biológicas, utilizan modelos heurísticos que facilitan el entendimiento de un fenómeno; sin embargo, el reduccionismo de estos modelos temporales puede generar poca precisión y propicia representaciones no del todo fehacientes que van generando conocimiento operativo. Esto hace que la ciencia sea siempre “una historia sin fin” con una tendencia a perfeccionarse pero no una actividad perfecta –eso es atributo de las pseudociencias. De hecho, Thomas Kuhn propone {Kuhn, 2009 #5218} que cuando estos paradigmas presentan incógnitas –a la luz de nuevas evidencias– el paradigma cambia y crea otro, que será válido hasta que sea retado nuevamente.

este análisis, a su vez, desembocó en un razonamiento inductivo y determinó los experimentos subsecuentes².

La sección de *Discusión Final* integra todos los resultados aquí obtenidos y propone un modelo nuevo de regulación del NCC³.

El capítulo de *Conclusiones* enlista en forma de viñetas los aportes puntuales de este trabajo.

Por último, quiero dejar claro que los resultados aquí mostrados son parte de una interacción y colaboración de miembros de la Unidad de Fisiología Molecular. Particularmente de Norma Vázquez, Diana Pacheco, Erika Moreno, María Castañeda, Juan Pablo Arroyo y demás miembros del laboratorio, todos bajo la tutela del Dr. Gerardo Gamba.

² Las ciencias experimentales utilizan el razonamiento inductivo ya que parte de una serie de premisas que generan una probable conclusión. Lo que quiere decir que se genera un modelo abierto que se toma como general pero que a su vez genera nuevas preguntas:

³ Finalmente en este trabajo también se generan modelos temporales reduccionistas contruidos a la luz de los experimentos realizados; y, en mi opinión, creo que esto puede generar nuevas hipótesis con lo cual se cumple la característica Popperiana de falseabilidad.

Prefacio

La homeostasis

El universo, como explica la teoría del Big Bang, existe debido a la gran explosión de hace aproximadamente 14 billones de años. Nuestro sistema solar surgió hace 4.6 billones de años. Durante su formación, en la Tierra hubo distintos procesos de calentamiento y enfriamiento que originaron diversos tipos de moléculas, de las que al parecer no subsistió ninguna de ellas (Futuyma, 2005). Cuando la Tierra se enfrió, los gases en la atmósfera se condensaron y grandes cantidades de sales minerales se disolvieron hasta acumularse y formar los primeros océanos con un pH de 8 y temperaturas alrededor de los 90°C. A pesar de la diferencia de los océanos primitivos con los de ahora, esas condiciones fueron fundamentales en los procesos del desarrollo de la vida, ya que en ellas surgieron las primeras moléculas orgánicas básicas para la vida: aminoácidos, purinas, pirimidinas, carbohidratos, moléculas energéticas como el ATP, ente otros (Lazcano-Araujo, 1989).

De acuerdo con las evidencias, los primeros seres vivos unicelulares crecieron absorbiendo sustancias orgánicas del medio ambiente e incrementaban su tamaño al producir duplicados de sus ácidos nucleicos. Estas formas de vida simples dieron origen a formas más complejas. Los fósiles más antiguos registrados tienen una edad de 3200 millones de años aproximadamente, y a pesar de la gran diversidad de formas biológicas que han sucedido en la Tierra, existen una serie de procesos comunes a todas ellas (Futuyma, 2005). Comprender el origen de los seres vivos, así como las condiciones en las que se originaron, permite entender cuál es la naturaleza de la vida y los procesos comunes dentro de la gran diversidad de sus formas. La regulación del fenómeno que hoy conocemos como homeostasis es, en este sentido, un ejemplo del tipo de proceso básico que encontramos en la gran diversidad de formas de vida.

De manera más específica, el cuerpo humano está compuesto de alrededor de 100 trillones de células agregadas en tejidos y órganos que trabajan en armonía. A pesar de la gran diversidad de tipos celulares y tejidos que existen en nuestro cuerpo, todos tienen requerimientos más o menos similares: todos necesitan oxígeno, iones, carbohidratos y ácidos grasos para sobrevivir, multiplicarse, diferenciarse y mantener sus funciones. Esto, a su vez, genera productos de desecho que deben ser expulsados. Este ciclo es posible gracias a que las células están inmersas en un líquido que permite un intercambio entre su interior y el entorno. Cada estructura, a su vez, colabora en el mantenimiento de la homeostasis; es decir, en mantener un ambiente estable.

El fisiólogo y biólogo teórico, pionero de la medicina experimental, Claude Bernard llamó la atención acerca de la interacción bidireccional que existe entre los organismos vivos y la materia inerte, a través de la interacción fisicoquímica con el medio que les rodea. A este medio, Bernard le llamó el “milieu intérieur” o medio interno (Bernard, 1854; re-edición Bernard, 1974). Este concepto es fundamental en el área de la fisiología, ya que –como Bernard afirma– “el mantenimiento del medio interno es un prerrequisito para el desarrollo de vida compleja y de sistemas complejos como el sistema nervioso central”.

La tesis de Bernard acerca del mantenimiento del medio interno emergió alrededor de 1854 desde sus primeros experimentos en el laboratorio. Gracias a las observaciones hechas en la regulación de la temperatura de los animales, Bernard utilizó el término “milieu intérieur” para referirse a la sangre, de manera similar al término “humor” empleado por Hipócrates. Gracias a sus experimentos realizados con el centro vasomotor y el impacto de éste en la sed, consideró a todos los fluidos internos -no sólo a la sangre-, y principalmente al líquido extracelular como el “milieu intérieur”. En experimentos posteriores describió la función gluconeogénica del hígado y propuso que estos mecanismos hepáticos mantienen un equilibrio en los niveles de azúcar en la sangre. Bernard planteó que todos los mecanismos vitales, por muy variados que sean, tienen “el objetivo” de mantener la uniformidad de las condiciones

del ambiente interno⁴. Éste, al estar aislado del exterior, evita que las variaciones de los cambios externos lo afecten de manera directa y, al mismo tiempo, esta impenetrabilidad a las variaciones externas permite alcanzar una vida libre e independiente gracias, precisamente a esta constancia en el medio interno. La conclusión de Bernard es que el medio interno actúa como un amortiguador entre las células y las fluctuaciones en el ambiente.

Es interesante que las ideas de Bernard pasaron prácticamente desapercibidas durante la segunda mitad del siglo XIX, y que sólo el filósofo George Henry Lewes, uno de los principales promotores del Darwinismo y del positivismo en Inglaterra, hiciera mención al concepto de “milieu intérieur”. En el libro “The Physical Basis of Mind”, Lewes utiliza este concepto como sustento de la selección natural y las teorías Darwinistas basadas en el ancestro común al describir las similitudes en la composición del medio interno entre los diferentes organismos (Lewes, 1893). Ya iniciado el siglo XX, el concepto de “milieu de intérieur” es retomado por distintos científicos. Por ejemplo, el genetista y biólogo evolutivo J.B.S. Haldane lo menciona en sus tratados de evolución biológica y sintetiza el concepto de Bernard en la frase “todos los organismos vitales, por variados que sean, tienen un solo objeto: mantener la constancia de las condiciones de la vida en el medio interno”. Cabe mencionar que los organismos unicelulares también tienen mecanismos de regulación de la composición de su líquido intracelular, para amortiguar las condiciones del medio en el que se encuentran.

El fisiólogo Walter Cannon, en 1926, también usa el concepto de Bernard y en su libro “The Wisdom of the Body” introduce el término *homeostasis* para referirse a la capacidad del cuerpo de regular la composición y el volumen de los líquidos y, así, mantener al organismo en una estabilidad interior (Cannon, 1932). A diferencia de Claude Bernard, Cannon apoyaba las teorías evolutivas de Darwin y consideró al fenómeno de la homeostasis como un elemento clave en los procesos de adaptación evolutiva.

⁴ Algunas afirmaciones por parte de los autores aquí citados sugieren un concepto telológico. Sin embargo, se considera que no existe un fin último de estos mecanismos de regulación y son los procesos de evolución biológica –propuesta en la Teoría Evolutiva Moderna– lo que ha derivado en la diversidad de los procesos de adaptación de los organismos. De hecho, existen distintos tipos de adaptación a la baja, conocida como *alostasis negativa*.

En los animales, la composición del líquido extracelular -el medio interno en términos de Bernard- está dada por el funcionamiento de distintos sistemas corporales, a través de la síntesis y aporte de sustancias o a la remoción de compuestos de desecho de dicho medio. Por mencionar algunos ejemplos, el sistema respiratorio permite el balance del oxígeno; el tracto digestivo aporta carbohidratos, ácidos grasos, aminoácidos, minerales iones y vitaminas; el hígado y otros órganos permiten cambios químicos de las sustancias absorbidas por el cuerpo para su posterior almacenamiento o desecho; el riñón mantiene el balance de agua y electrolitos.

El fisiólogo Homer Smith destacó la importancia de los riñones en el mantenimiento de la composición del líquido extracelular. Sin contar con una educación médica, Smith realizó grandes contribuciones al entendimiento de diversas alteraciones funcionales en enfermedades renales y es considerado el padre de la fisiología renal, tanto, que el reconocimiento más importante otorgado por la *American Society of Nephrology* lleva su nombre. Su trabajo está basado en el concepto referente a la estabilidad del medio interno de Claude Bernard, a través del estudio comparativo de la fisiología de los riñones y su impacto en la composición de los fluidos corporales. Los aportes de Homer Smith no se limitan al entendimiento de la función renal, ya que sus aportaciones van desde el funcionamiento de las membranas celulares, la fisiología comparada basada en estudios paleontológicos, hasta aportes en el campo de la filosofía de la ciencia al abordar problemas de religión, de la conciencia humana y su papel en el universo (FISHMAN, 1962; Smith, 1939, 1943; Smith, 1953; Smith, 1962; Smith, 1964; Smith, 1965); e incluso, la publicación de una novela de ficción (Smith, 1932).

En su libro *"From Fish to Phylosopher"*, Homer Smith habla de la importancia de los riñones en el mantenimiento de la homeostasis de los fluidos corporales y los contrasta con la escasa contribución que en su opinión tenían otros órganos en este equilibrio (Smith, 1953):

"Los pulmones sirven para mantener la composición del fluido extracelular con respecto al oxígeno y al dióxido de carbono, y con esto terminan su función. La responsabilidad de mante-

ner la composición de este fluido con respecto a otros componentes recae en los riñones. No es una exageración afirmar que la composición de los fluidos corporales está determinada no por lo que la boca toma, sino por lo que el riñón mantiene: ellos son los principales reguladores químicos de nuestro ambiente interno, que por así decirlo, lo fabrican una quincena de veces al día. Además de otros deberes y funciones, excretan las cenizas de los fuegos de nuestro cuerpo, o remueven de la sangre la infinita variedad de sustancias ajenas que se absorben constantemente por nuestro indiscriminado tracto gastrointestinal, y estas operaciones excretoras inciden en la principal tarea de mantener nuestro ambiente interno en un estado balanceado ideal. A nuestros huesos, músculos y glándulas, e incluso a nuestros cerebros, solo se les requiere a hacer un sólo trabajo fisiológico, pero a nuestros riñones se les requiere hacer una innumerable variedad de operaciones fisiológicas. Los huesos se pueden romper, los músculos se pueden atrofiar, las glándulas pueden trabajar despacio, hasta el cerebro puede ir a dormir y arriesgar nuestra supervivencia; pero si los riñones fallan en sus deberes, ni los huesos, músculos, glándulas ni el cerebro podrían manejarlo”

Siguiendo a Homer Smith y sin menospreciar el papel de otros sistemas corporales, esta tesis considera a la función renal como un importante regulador de la homeostasis a través de la diversidad de funciones que desempeñan estos órganos. Particularmente, aquí se aborda el impacto y la regulación del cotransportador renal de sal sensible a tiazidas NCC ($\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ Co-transporter) en el mantenimiento del balance de los electrolitos, así como la función de este transportador en el control de la presión arterial, que es, sobra decirlo, una condición que altera la homeostasis del cuerpo.

Introducción

El riñón regula la concentración del líquido extracelular en el organismo

La importancia de los riñones en el mantenimiento de la homeostasis depende de distintos factores. De manera general, el riñón remueve los desechos propios del metabolismo y mantiene en un equilibrio relativo a los fluidos corporales. Por ellos, el riñón trabaja en contacto con el sistema sanguíneo, ajustando los niveles de azúcar, agua, sal, potasio y demás sustancias vitales.

De manera particular, el riñón tiene las siguientes funciones:

- Mantiene el balance del agua a través de regular la ingesta y la excreción de agua por la orina.
- Mantiene el balance ácido-base.
- Regula la excreción de sal y por lo tanto el volumen del líquido en el organismo.
- Regula la concentración de potasio en el líquido extracelular.
- Regula la concentración de calcio y fósforo.
- Regula la producción, el metabolismo y la excreción de algunas hormonas.
- Regula la presión arterial, y así la irrigación de los tejidos.
- Mantiene la concentración de glucosa en el cuerpo al hacer gluconeogénesis tras largos periodos de ayuno.
- Excreta los desechos del metabolismo.
- Excreta las sustancias tóxicas provenientes de la alimentación.

De manera anatómica se reconocen dos partes principales en el riñón: la corteza, que es la parte más externa; y la médula, la parte interna del riñón (figura 1). La corteza se proyecta hacia el hilo renal y forma unas columnas, llamadas de Bertin, que delimitan unas estructuras cónicas en el seno renal denominadas pirámides de Malpighi que son las que constituyen la médula renal.

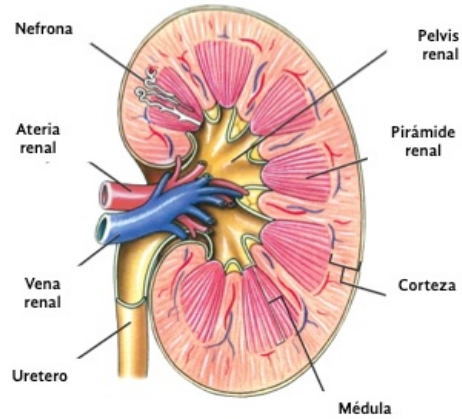


Figura 1. El riñón regula la homeostasis y su unidad funcional es la nefrona. Esquema de un corte transversal del riñón. Se observa la corteza y la médula, así como la arteria, vena y uretero

La nefrona es la unidad funcional del riñón (2). Cada riñón contiene aproximadamente un millón de estas unidades distribuidas a lo largo del parénquima renal. Una nefrona consta de un corpúsculo renal y un túbulo renal comunicados entre sí. El corpúsculo renal constituye la cápsula de Bowman y contiene una estructura formada por un capilar enrollado en sí misma, el glomérulo, que está ubicado en la corteza. La cápsula de Bowman es la región por la que ingresa la sangre al riñón. Ésta llega por la arteriola aferente, pasa a los capilares glomerulares y sale por la arteriola eferente (Figura 2 y 3).

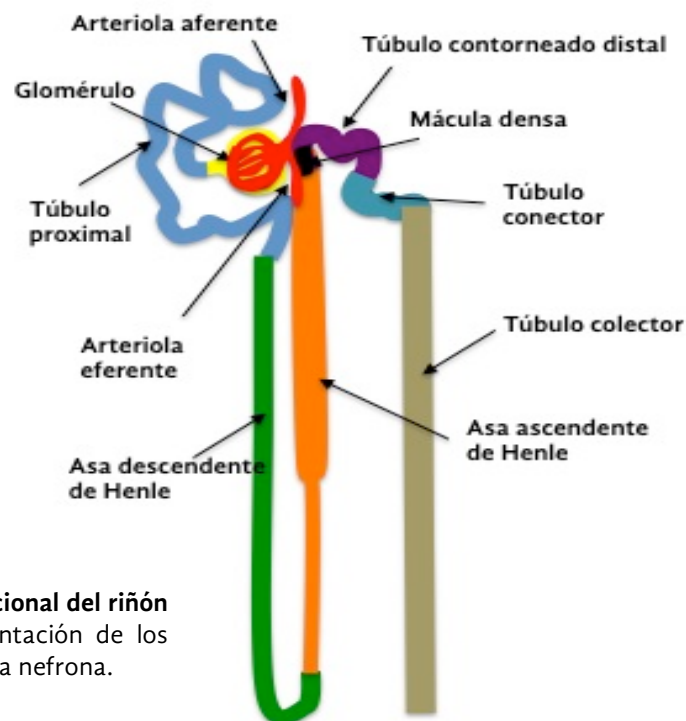


Figura 2. La unidad funcional del riñón es la nefrona. Representación de los distintos segmentos de la nefrona.

La modulación de la vasodilatación y vasoconstricción de las arteriolas determina la fuerza de filtración y, con ello, el flujo renal. La sangre infiltra los capilares glomerulares gracias a dos condiciones: primero, de acuerdo a las características histológicas, ya que los capilares glomerulares están fenestrados y esto aumenta de modo considerable su permeabilidad; y segundo, en concordancia con la presión hidrostática alta que la arteriola aferente y la eferente generan entre sí. Las fuerzas de Starling⁵ rigen esta condición (figura 3).

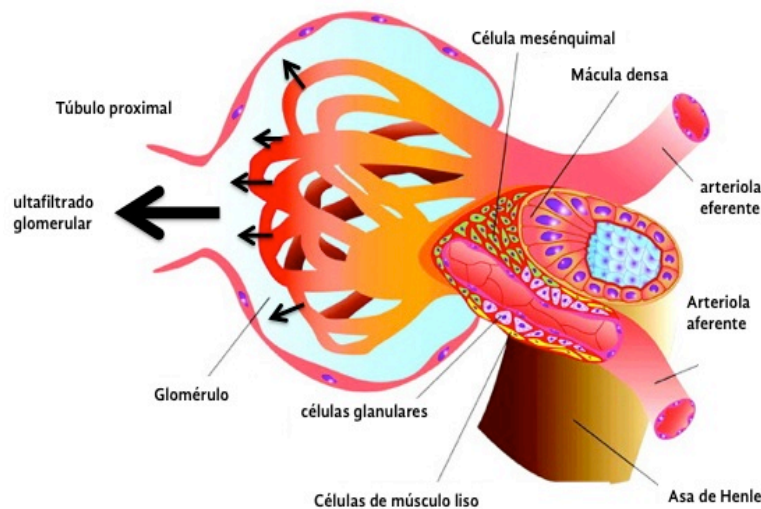


Figura 2. Esquema de la cápsula de Bowman. Las flechas indican la dirección del filtrado ultraglomerular. Modificado de Bell, 2003.

El líquido filtrado a través de los capilares, también llamado ultrafiltrado glomerular, pasa a los túbulos renales y su osmolaridad es idéntica a la del plasma, con excepción de las macromoléculas, pues no todos los componentes plasmáticos pueden ser filtrados. La filtración sólo ocurre en moléculas menores a 60 kDa y proteínas de carga positiva, ya que la membrana de los capilares es negativa. Esto permite que se filtren iones como Na^+ , Cl^- , K^+ , Mg^{2+} ,

⁵ Las fuerzas de Starling se refieren a las fuerzas oncóticas e hidrostática que determina el movimiento de un fluido a través de las membranas capilares y hacia el intersticio.

Ca^{2+} , HCO_3^- , NH_3^+ y solutos como la glucosa, creatinina, urea y proteínas muy pequeñas, y por supuesto el agua. De manera aproximada, los glomérulos reciben el 20% del gasto cardíaco y producen 125 mL/min de filtrado glomerular que llega a los túbulos renales. Representa el 20% del flujo plasmático renal: de alrededor de 660 mL/min (Boron, 2012).

Una vez que el filtrado glomerular llega a los túbulos renales viaja a lo largo de distintas segmentos de la nefrona. Estos segmentos se dividen en dos porciones generales: la porción proximal y la porción distal. La primera parte está formada por el túbulo proximal (TP), el asa descendente de Henle, el asa gruesa ascendente de Henle (THAL).

Por su parte, la nefrona distal está constituida por el túbulo contorneado distal (DCT), el túbulo conector (TCN) y los conductos colectores (CD) (figura 3). Estas dos porciones están divididos por una estructura de células especializadas de tejido epitelial llamada mácula densa (figura 3).

El túbulo proximal reabsorbe el 65% de los solutos en el filtrado glomerular, sin afectar la concentración de sodio; por consiguiente, la osmolaridad del líquido tubular se mantiene intacta en esta región debido a que la reabsorción en esta parte de la nefrona es isosmótica al reabsorberse sal y agua en la misma proporción debido a la permeabilidad de esta región.

La Na^+/K^+ -ATPasa se expresa en la membrana basolateral del túbulo proximal -membrana en contacto con el sistema vascular. La actividad de esta ATPasa genera un gradiente para el transporte de Na^+ desde la cara apical, cara por la que pasa el filtrado tubular, hasta la parte basolateral (figura 4). El movimiento del sodio permite la reabsorción de otros iones a distintas velocidades, por lo que modifica sus concentraciones en el filtrado glomerular y la de otros iones (Aronson y Giebisch, 1997).

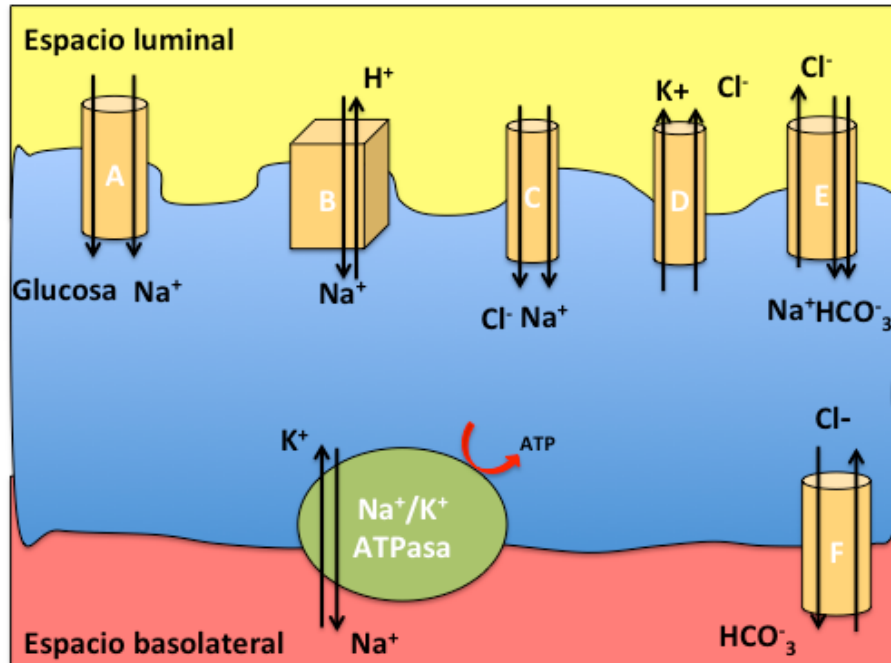


Figura 4. El transporte transepitelial de iones está orquestado por la actividad de la bomba Na^+/K^+ ATPasa. La bomba sodio/potasio ATPasa se ubica en la membrana basolateral y crea un gradiente de absorción de sodio que facilita el transporte de otros iones y solutos por otros transportadores. En esta imagen se muestran algunos ejemplos de estas proteínas ubicadas a lo largo de la nefrona: A) Transportador de Na^+ :Glucosa, B) Intercambiador de Na^+/H^+ , C) Cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ D) Cotransportadores de $\text{K}:\text{Cl}$, E) Intercambiador $\text{Cl}^-:\text{HCO}_3^-$ dependiente Na^+ , F) CIC-Kb, G) Intercambiador de Na^+/H^+ y F) Intercambiador $\text{Cl}^-:\text{HCO}_3^-$.

En el túbulo proximal, la reabsorción del cloruro es baja, por lo que se va concentrando a lo largo de esta región, a diferencia de la disminución de moléculas como el ion HCO_3^- , la glucosa y los aminoácidos, que su concentración va disminuyendo a lo largo de este segmento dada una tasa de reabsorción mucho mayor que la del cloro (Aronson y Giebisch, 1997). De hecho, la glucosa y los aminoácidos son reabsorbidos prácticamente en su totalidad en el túbulo contorneado proximal (Boron, 2012).

El siguiente recorrido del ultrafiltrado glomerular o líquido tubular es el asa ascendente de Henle, subdividida en un segmento delgado y otro grueso (figura 2 y 5). Ambos segmentos reabsorben del 15 al 20% del filtrado. La porción delgada es impermeable a la sal, pero permeable al agua, la cual pasa hacia el intersticio utilizando el gradiente dado por la hipertonicidad del líquido tubular. Éste llega al asa gruesa ascendente de Henle (THAL), que no es permeable al agua dada la nula expresión de acuaporinas (Verkman y Mitra, 2000); pero

sí es permeable a la sal, debido a la expresión en la cara apical del cotransportador electro-neutro de sodio, potasio y dos cloros, NKCC2 ($\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$ Cotransporter 2) (Gamba et al., 2008) y de un canal de potasio; y en la membrana basolateral se expresa el canal de cloro ClC-KB . El asa de ascendente de Henle tiene funciones fundamentales en la concentración o dilución de la orina debido a que se genera una tonicidad del doble del plasma al no reabsorberse agua, lo que aumenta aún más la tasa de reabsorción desde el ultrafiltrado hacia la sangre y, así, la dilución de la orina está modulada, y, por consecuencia, el volumen extracelular (Strange, 2004).

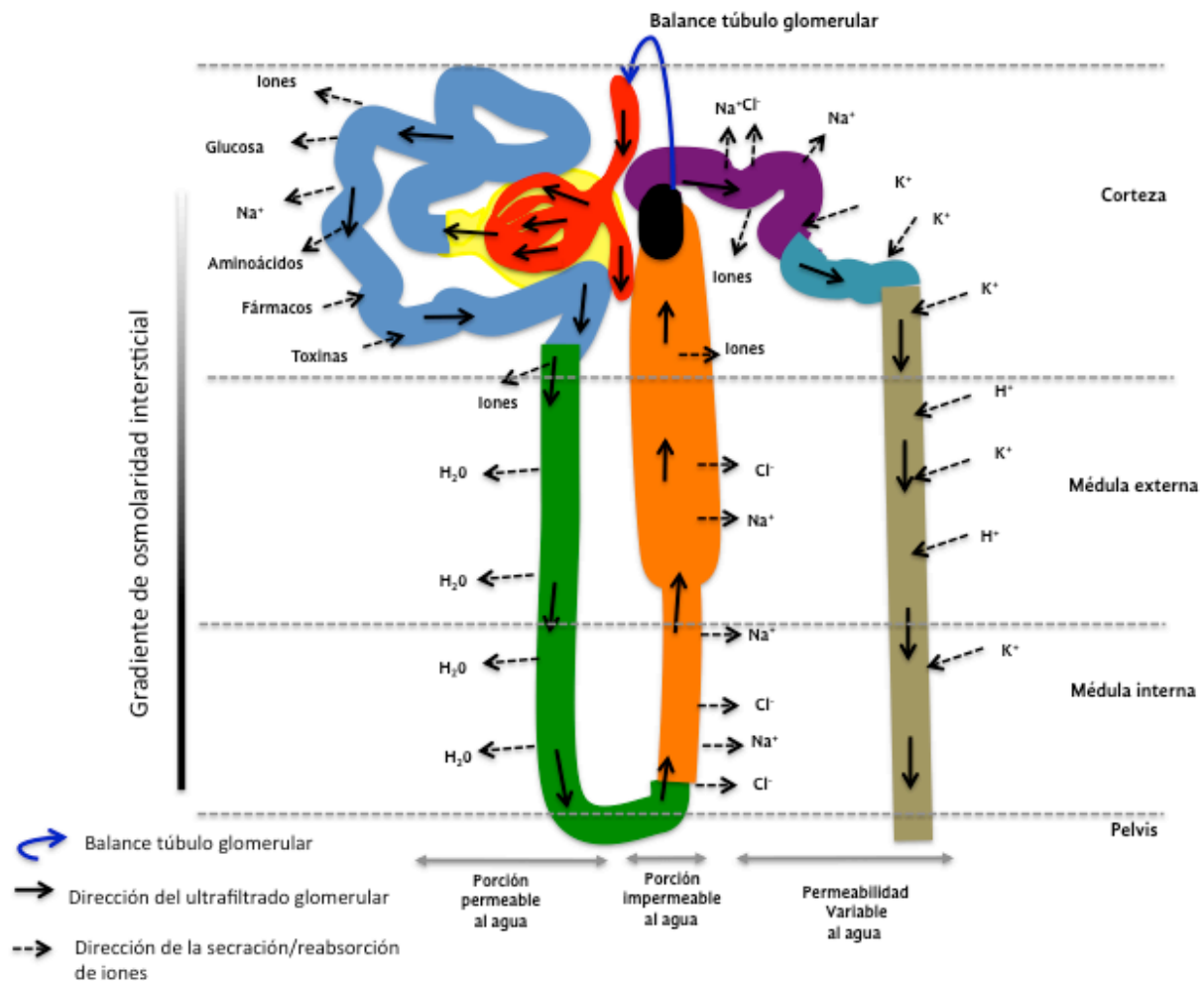


Figura 5. Representación general de la función renal de distintos segmentos de la nefrona. El ultrafiltrado glomerular recorre los distintos segmentos de la nefrona. La mayor parte de las moléculas filtradas en la cápsula de Bowman se reabsorben, como iones, aminoácidos, glucosa, pero otros son secretadas a la luz tubular, como ocurre con el potasio y los hidrogeniones. La permeabilidad al agua varía a lo largo de nefrona, lo que permite modular la concentración de orina. El balance túbulo-glomerular se debe a la interacción entre la mácula densa y el glomérulo.

En la parte final del asa de Henle existe una estructura llamada mácula densa que forma parte del aparato yuxtaglomerular y es fundamental en la regulación de la filtración glomerular (figura 4). Esta región, como se mencionó previamente, delimita a la nefrona proximal de la distal. El glomérulo está en contacto físico con la mácula densa, lo que permite la comunicación entre estos dos sitios. La mácula densa es el sensor de la concentración de sal que llega de la porción proximal gracias a la modificación de la concentración de sal generada por la actividad del NKCC2 (Castrop et al., 2005; Oppermann et al., 2006). Si las concentraciones de sal se modifican, la filtración glomerular se modificará en una proporción inversa; es decir si la llegada de sal a la mácula densa aumenta, disminuye la filtración glomerular. Estos mecanismos de regulación entre la mácula densa y el glomérulo se conocen como el balance túbulo glomerular. La mácula densa regula la secreción de renina en el aparato yuxtaglomerular ante cambios en las concentraciones del flujo que le llega (Schnermann, 1998). La presencia de renina modula el nivel de dilatación de las arteriolas aferentes y eferentes y, así, cambia la tasa de perfusión, y por ende la de reabsorción.

El líquido que cruza la mácula densa equivale al 5-10% del ultrafiltrado glomerular y su reabsorción ya no modifica la tasa de filtración glomerular. Debido a esta razón, la reabsorción de sal en las regiones posteriores a la mácula densa tienen un impacto directo sobre el volumen extracelular y, por consiguiente, sobre la presión arterial al modular la cantidad de sal y agua excretada en la orina.

Después de la mácula densa comienza la nefrona distal con la aparición del túbulo contorneado distal (DCT), que a su vez se subdivide en DCT1 y DCT2, de los túbulos conectores (CNT) y por último aparecen los colectores (CCD). La nefrona distal se encarga de la resorción del 5 al 10% del filtrado glomerular, que al llegar a este punto está en una condición hipotónica. La diferencia entre el DCT1 y el DCT2 radica en la expresión de distintas proteínas y transportadores (figura 6), que determinan el tipo de transporte iónico y en la sensibilidad a hormonas secretadas como respuesta a estímulos que retan la homeostasis (Arroyo et al., 2011b; Reilly y Ellison, 2000).

En el DCT1 la reabsorción de sodio está acoplada al transporte de cloro por el cotransportador de sal sensible a tiazidas (NCC, $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ Cotransporter), del que se hablará ampliamente en este trabajo. La actividad del NCC produce un transporte electroneutro al reabsorber el sodio y el cloro con una estequiometría de 1:1. El DCT1 es sensible a la angiotensina II y a la vasopresina dado que modulan el transporte de sal electroneutro mediado por el NCC (Arroyo et al., 2011b).

La región DCT2 parece ser una zona de transición entre DCT1 y túbulo conector (CNT) en la que se expresa el NCC aunque en menor proporción que en DCT1 y aparece el canal epitelial de sodio ENaC en la membrana apical (figura 6). Este canal genera un importante transporte electrogénico de sodio en DCT2 que modifica la carga eléctrica del líquido tubular.

Una de las principales características del DCT2 es su sensibilidad no sólo a la angiotensina II y a la vasopresina como en DCT1, sino también a la aldosterona. La expresión de la enzima deshidrogenasa-11- β -hidroxiesteroidea (11 β HSD) permite que el receptor de mineralocorticoides esté ocupado por la aldosterona, ya que convierte al cortisol en cortisona, de lo contrario el cortisol ocuparía al receptor debido a que la concentración de cortisol siempre es mayor (figura 6). La aldosterona se secreta ante condiciones de hipovolemia (disminución del volumen celular) y de hiperkalemia (aumentos séricos del potasio). La aldosterona, como veremos más adelante, tiene dos funciones. La primera es aumentar la presión arterial al incrementar la reabsorción de sodio distal mediada por ENaC y NCC; y la segunda es promover la secreción de potasio a la orina en condiciones de hiperkalemia. Esto se debe a que la secreción de potasio está acoplada con la reabsorción de sodio. Si la reabsorción de sodio en DCT1 y DCT2 aumenta, entonces la carga eléctrica del lumen es negativa. Este cambio en la carga del lumen se corrige rápidamente por la activación del canal rectificador del potasio ROMK (por sus siglas en inglés, Renal Outer Medullary K^+ Channel) que secreta potasio a la luz tubular (Boim et al., 1995; Lee y Hebert, 1995).

Después del DCT están los conductos conectores y los colectores e incluyen a las células

intercaladas (de los subtipos alfa, beta y no-alfa-no-beta). Estos segmentos son importantes para la reabsorción de sodio electrogénica mediada por el ENaC; la secreción de potasio mediada tanto por ROMK como por los canales de K^+ dependientes del flujo activados por Ca^{2+} (canales BK); y la regulación ácido-base mediada por las pendrinas (intercambiadores de Cl^- - Cl^-) y el intercambiador de Cl^- - HCO_3^- dependiente de sodio (Boron, 2012; Quentin et al., 2004).

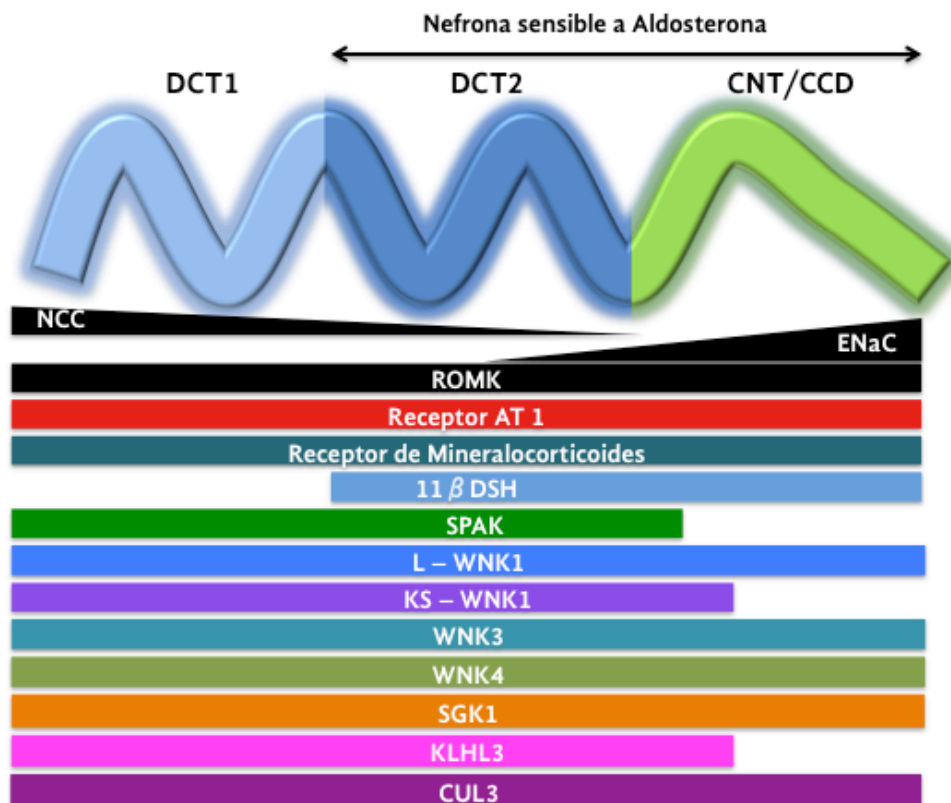


Figura 6. Expresión de proteínas a lo largo de la nefrona distal. La reabsorción de sodio en la nefrona distal depende de la actividad de NCC en DCT1 y DCT2, y de ENaC en DCT2 y en CNTy CCD. La presencia del Receptor AT1 a lo largo de estas regiones permite la sensibilidad a la angiotensina II. Mientras que la aldosterona sólo es percibida en DCT2, CNT y CC2 dada la presencia de la 11βHSD2. Este esquema muestra también la expresión de las WNK, de SGK y de las proteínas KLHL3 y CUL3. Modificado de Arroyo, 2011.

El riñón regula a largo plazo la presión arterial

Antes de abordar el papel del riñón en el manejo de la presión arterial, se describirán brevemente los mecanismos generales de la regulación de la presión arterial. Esta regulación está dividida en dos tipos: la rápida o aguda y la crónica o a largo plazo. La primera ocurre en condiciones en las que súbitamente hay una disminución en el volumen. En estas condiciones el sistema simpático juega un papel fundamental al activarse a través de la percepción en los cambios de la presión por los barorreceptores. La activación de este sistema actúa en periodos de tiempo muy cortos que van de segundos a minutos y desencadena cambios en la dilatación o constricción de los vasos que regulan las resistencias periféricas, lo que a su vez conlleva a la modificación del gasto cardiaco en pocos segundos. Esto ocurre gracias a la regulación neurohumoral en la que el sistema renina-angiotensina-aldosterona tiene una aportación fundamental al producir vasoconstricción arteriolar. Sin embargo, estos mecanismos neurológicos y hormonales no pueden sostener cambios de la presión a largo plazo ya que, además de ser regulados por ejes de retroalimentación negativa y de que los barorreceptores cambian su umbral de percepción, el riñón también compensa estos cambios al modificar el balance entre la excreción y la ingesta del agua y de la sal. Los mecanismos de natriuresis de presión y la propiedad de ganancia infinita de los riñones modifican este balance al cambiar el fluido corporal y la cantidad de sal. Estos procesos son posibles gracias a que la excreción urinaria de sal está íntimamente relacionada con los niveles de presión arterial por los mecanismos de natriuresis y diuresis de presión que se refieren a la modificación en la excreción del agua y de la sal, respectivamente, para ajustar cambios mínimos en la presión (Guyton, 2006).

Existe una correlación lineal entre la presión arterial y la excreción de sodio: al aumentar la presión arterial aumenta la excreción renal de sodio y rebasa a la ingesta de sal, como muestra la curva de función renal (figura 7). Al excretar más sodio y agua de los ingeridos, la correlación entre estas dos acciones es negativa. Esto disminuye el volumen circulante para lograr restablecer la presión arterial. De manera contraria, cuando la presión arterial disminuye, la reabsorción de agua y sal aumentan para compensar la pérdida de volumen por la

orina; y por ende la sal ingerida será mayor a la sal excretada. La consecuencia de esto es que al existir una baja en la presión arterial la orina está más concentrada. Esto quiere decir, que, en ambas situaciones en las que existe un cambio en la presión arterial, el riñón continúa filtrando la sangre y elimina las sustancias de desecho, pero ajusta el volumen en el que son excretadas. Así, continúa modificando el volumen excretado hasta alcanzar las condiciones de equilibrio en la presión arterial (Guyton, 2006). Dicho en otras palabras, cuando existe un aumento en la presión arterial, el riñón aumenta el volumen urinario; y de manera contraria cuando la presión arterial disminuye, el volumen urinario disminuye.

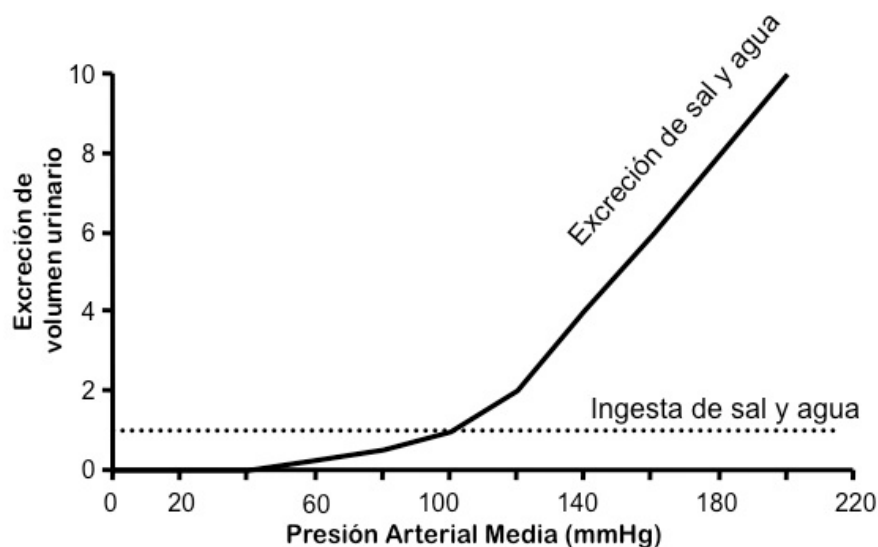


Figura 7. Curva de función renal. La relación entre la ingesta y la excreción de sodio se encuentra en equilibrio cuando se cruzan estas dos líneas y ocurre alrededor de los 100 mmHg de presión arterial media (Modificado de Guyton, 1990).

Es importante notar que en la curva de la función renal (figura 7), muestra el balance que existe entre la cantidad de sal y agua ingeridas (línea horizontal) y la curva de la excreción renal de sal y agua (figura 7). El punto de intersección de estas dos curvas es el punto de equilibrio en donde la cantidad de sal y agua, tanto ingeridas como excretadas, es la misma. Este punto de equilibrio se alcanza alrededor de los 100 mmHg. Cuando la presión arterial está por arriba del punto de equilibrio, la excreción es mayor a la ingesta de sal y agua (poliuria); y la excreción será menor a la excreción cuando la presión esté por debajo de los 100 mmHg (oliguria).

El ajuste de la presión arterial al punto de equilibrio se llama el principio de la ganancia infinita. Nótese en la gráfica de la figura 8 que la cantidad de sal y agua ingerida es la misma cantidad de sal y agua excretada sin que haya un cambio en la presión arterial. Es decir, si una persona ingiere el doble de sal o agua, excretará el doble de sal o agua sin que exista un cambio significativo en la presión arterial, ni de la cantidad de sodio o cloruro séricos. Sin embargo, existen condiciones fisiopatológicas que pueden modificar este punto de equilibrio, como ocurre en la hipertensión arterial. En este caso, sólo en dos condiciones puede ocurrir un cambio en el punto de equilibrio que modifique la presión. La primera condición (figura 8), ocurre al modificar la presión arterial para que la relación entre la ingesta y la excreción de sal sea la misma, lo que ocasiona que la curva de excreción renal se desplace a la izquierda (presión baja) o a la derecha (presión elevada). Sujetos diagnosticados con hipertensión arterial tienen la misma relación entre la excreción y la ingesta de sal que un sujeto normotenso, pero alcanzan el punto de equilibrio al recorrer la curva de presión a la derecha, es decir para lograr el balance entre la excreción/ingesta de sal y agua aumenta la presión arterial (figura 8).

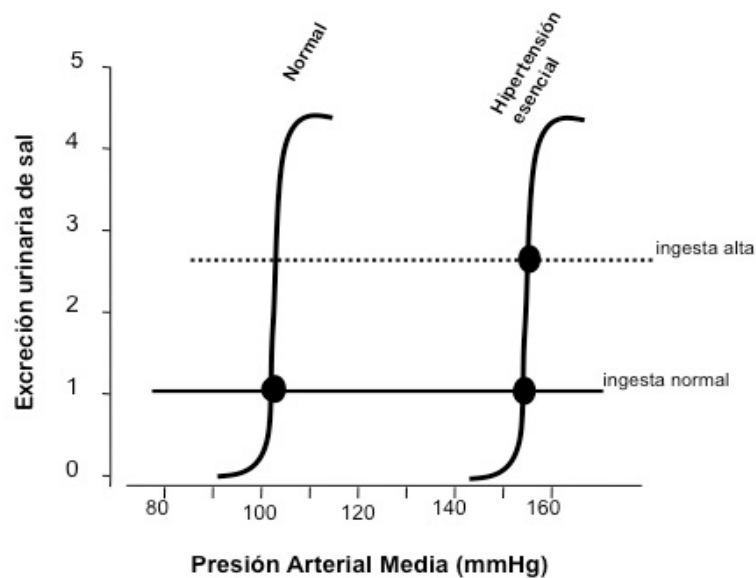


Figura 8. Modificación de la curva de natriuresis de presión en la hipertensión. En un individuo sano, la ingesta de sal es equivalente a la excreción de sal y ocurre alrededor de los 100mmHG. En un paciente con hipertensión arterial la curva de natriuresis de presión se recorre a la derecha para alcanzar el balance entre la ingesta y la excreción de sodio a costa de un incremento de la presión arterial. Los círculos gruesos representan el punto de balance.

La natriuresis de presión es un fenómeno intrarrenal, regulado de manera independiente de cualquier mecanismo que involucre hormonas o neurotransmisores pero que depende de la tasa de perfusión. Sin embargo, también es modulado por diversas hormonas y agentes vasoactivos cuya secreción depende de cambios en el volumen circulante; su presencia modifica la curva de natriuresis de presión y ajusta la presión arterial; y, así, se mantiene la homeostasis.

Los riñones están inervados por el sistema nervioso simpático, de tal manera que cambios en la actividad simpática modifican la excreción renal de agua y sodio. Cuando hay pérdida de sangre, el sistema nervioso simpático regula el volumen del líquido extracelular al modificar la natriuresis de presión (figura 9). En estas condiciones, la activación simpática produce vasoconstricción de las arteriolas renales, y provoca una disminución de la tasa de filtración glomerular, incrementa la reabsorción tubular de sodio y agua en el túbulo proximal, y además estimula la liberación de renina por el aparato yuxtaglomerular. Estos eventos, a su vez, incrementan la liberación y acción de la angiotensina II y de la aldosterona. Esta activación del sistema nervioso simpático es importante no sólo en condiciones de pérdida súbita de sangre sino sobre todo, en situaciones extremas de deshidratación. Ambas situaciones reflejan un estado de hipovolemia.

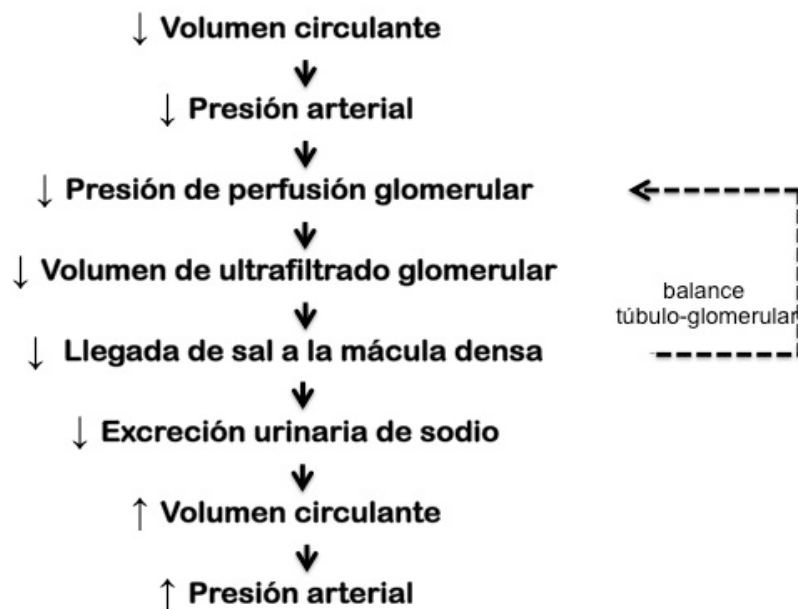


Figura 9. Pasos secuenciales de la natriuresis de presión ante una disminución del volumen circulante.

El aumento de la reabsorción renal de sal produce hipertensión arterial crónica

La presión arterial (PA) tiene una relación directa con el gasto cardiaco (GC) y las resistencias periféricas totales (RP): $PA = GC \times RP$. Por lo que el aumento en el volumen circulante modifica la presión arterial al modificarse estos dos factores. Por un lado, el aumento en el volumen extracelular aumenta el gasto cardiaco al aumentar el retorno venoso, dado por el mayor volumen de líquido corporal. Por otro lado, este incremento en el gasto cardiaco aumenta la perfusión de los tejidos y activa el mecanismo de autorregulación del flujo sanguíneo en dichos tejidos, y así disminuir su perfusión. Esta autorregulación, activada como respuesta al aumento en el volumen extracelular, resulta en aumentar las resistencias periféricas y por ende, la presión arterial. La autorregulación de los tejidos consiste en la vasoconstricción del esfínter precapilar, modulando el paso de la sangre de las arteriolas a los capilares tisulares. El estado de constricción o relajación del esfínter precapilar depende de los metabolitos producidos en el tejido ya que no está inervado por el sistema nervioso autónomo. La adenosina y el CO_2 son los metabolitos propuestos como elementos clave en esta regulación (Guyton, 2006).

En un sujeto hipertenso existe una desviación de la natriuresis de presión y la reabsorción de sal, el resultado es un aumento en el volumen circulante. Esto, a su vez, aumenta la presión de llenado circulatorio y del retorno venoso al corazón, con el consecuente aumento en el gasto cardiaco. El aumento sostenido del gasto cardiaco, induce vasoconstricción del esfínter precapilar, aumentando el volumen circulante y las resistencias vasculares periféricas, lo que lleva a un aumento de la presión arterial, y entonces se alcanza el balance de sal y agua pero a expensas del desarrollo de hipertensión arterial. Como se vio en la figura 8, la excreción y la ingesta de sal está en balance pero el punto de equilibrio se alcanza en valores altos de la presión arterial. Dicho de otra forma, en un sujeto sano, el aumento de la presión arterial induce natriuresis de presión y la presión regresa a niveles normales; mas en pacientes con hipertensión arterial, el aumento de la presión arterial parece ser necesario para mante-

ner la excreción apropiada de sal. Es decir, el riñón de estos enfermos requiere de mayor presión arterial para sostener la natriuresis y normal.

Los cambios secuenciales de distintos parámetros fisiológicos frente a un aumento en la carga del volumen extracelular se muestran en la figura 10 (Guyton, 2006). La perfusión constante de solución salina por dos semanas incrementa el volumen del fluido extracelular, y, por consecuencia, también aumenta el volumen sanguíneo. Este aumento en el volumen sanguíneo, aumenta el gasto cardíaco y por ende la presión arterial; lo que se percibe por los barorreceptores carotídeos. Estos, activan al centro vasomotor y las resistencias periféricas disminuyen. Sin embargo, como previamente se abordó, entre 2 y 4 días los barorreceptores se adaptan y cambian su umbral, y las resistencias periféricas ya no son reguladas negativamente. Las resistencias periféricas regresan a sus niveles basales y el gasto cardíaco elevado incrementa la presión arterial. En forma crónica, el aumento sostenido del gasto cardíaco induce un aumento de las resistencias periféricas, por efecto de remodelación vascular, secundario al mecanismo de autorregulación del flujo en los tejidos. El aumento de las resistencias periféricas activa el mecanismo de natriuresis de presión, con lo cual el gasto cardíaco regresa a lo normal, pero con un aumento en la presión arterial (figura 10). En esta figura, es importante resaltar que, al cabo de dos semanas, el volumen sanguíneo y el líquido extracelular están en niveles basales y que el gasto cardíaco disminuye, a pesar de que la perfusión de solución salina continúa. Esto se debe a dos razones: la primera, a que el incremento en las resistencias arteriolas disminuye la presión capilar y el fluido se absorbe hacia la sangre y la segunda, a que la presión arterial alta activa el mecanismo renal de natriuresis de presión. Es decir, el riñón excreta el excesivo volumen del fluido que inicialmente se acumuló en el organismo. Por estas razones, el volumen del líquido extracelular, el volumen sanguíneo y el gasto cardíaco regresan a niveles basales a costa del incremento en la presión arterial y en las resistencias periféricas.

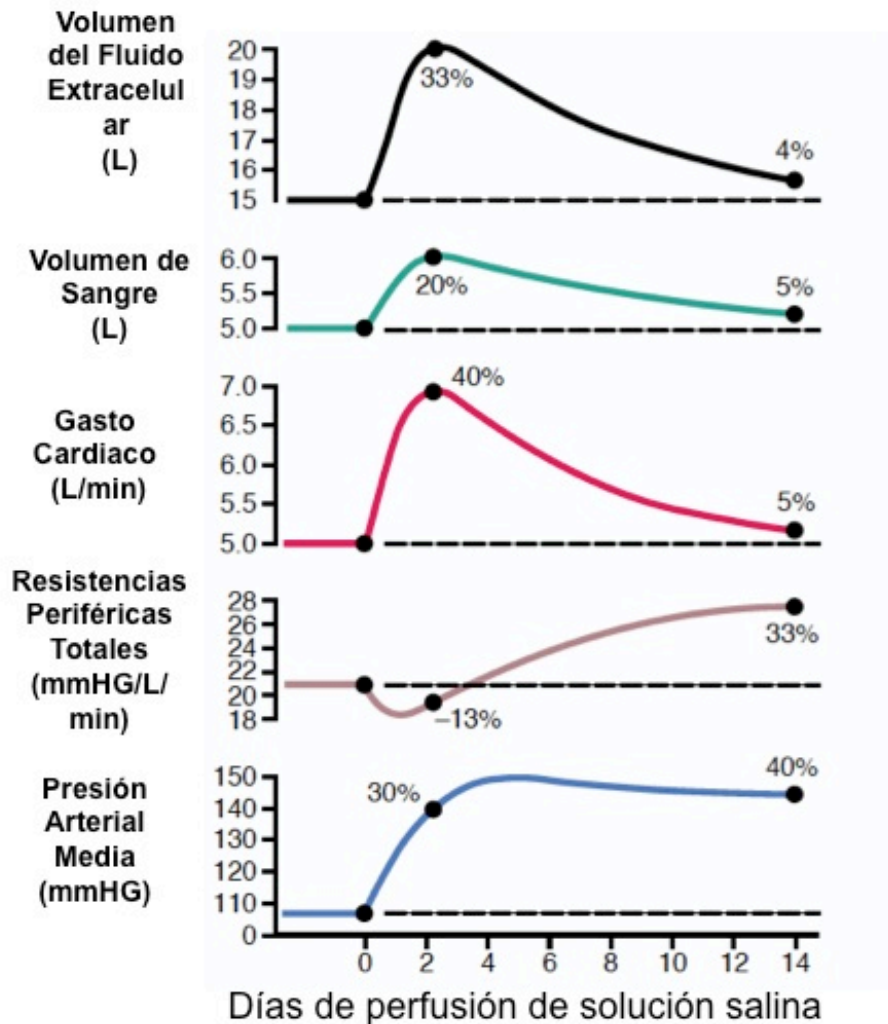


Figura 10. Cambios progresivos en distintas variables circulatorias al aumentar el volumen extracelular durante la infusión de salina por 14 días. Modificado de Guyton, 2006

El ejemplo anterior (figura 10) no sólo demuestra que el aumento en el volumen circulante produce hipertensión arterial, ya que este aumento incrementa a las resistencias periféricas; sino que también describe el desarrollo de hipertensión arterial crónica y sostenida que ocurre en los pacientes que desarrollan esta enfermedad. Esta patología es antecedida por un aumento en la reabsorción de sal; por lo que la ingesta de sal y agua es mayor a la excretada. Este desbalance produce un aumento en el volumen circulante, que disparará los mecanismos revisados anteriormente. Por estos motivos, los pacientes con hipertensión tienen los mismos niveles de volumen sanguíneo y los mismos parámetros electrolíticos que las perso-

nas normotensas, no así sus niveles de la presión arterial. Por estas razones, los fármacos de primera elección en el manejo de la presión arterial son los diuréticos que modifican el volumen circulante. Interesantemente, la administración de diuréticos tipo tiazidas⁶, los inhibidores específicos del NCC, es la primer recomendación por diversas guías clínicas (JAMA, 2013) para el tratamiento de la hipertensión arterial (Chobanian et al., 2003).; ya que disminuyen la presión al evitar la reabsorción distal renal; y esto a su vez, por mecanismos aún no definidos, disminuye las resistencias periféricas y la presión arterial se normaliza.

Según la teoría Guytoneana, la hipertensión arterial ocurre cuando se modifica la natriuresis de presión (Coffman y Crowley, 2008; Guyton, 1991; Hall y Granger, 1994). Esta teoría se apoya en diversas evidencias genéticas, (Gamba; Lifton et al., 2001, Gamba; Roskopf et al., 2007), experimentales (Coffman, 2011; Crowley et al., 2006; Crowley et al., 2011) y clínicas (Curtis et al., 1983; Guidi et al., 1996) que muestran que el afectar la reabsorción de sal por el riñón se modifica la presión arterial.

Las evidencias genéticas nos muestran que en las enfermedades hereditarias monogénicas que alteran crónicamente a la presión arterial, los genes afectados siempre inciden en los mecanismos de manejo renal de la sal (Lifton et al., 2001). Estos genes pueden modificar la reabsorción de sal, ya sea al afectar a proteínas involucradas en el manejo de sal como son los transportadores o a sus proteínas reguladoras o al afectar vías hormonales que cambian la función renal. Las enfermedades genéticas asociadas a hipertensión arterial se asocian con un aumento en la reabsorción de sal, y viceversa, cuando la reabsorción renal de iones disminuye se asocian con hipotensión arterial.

Referente a las evidencias experimentales, éstas muestran que cuando se intenta producir hipertensión arterial crónica en animales es necesario afectar la natriuresis de presión. En experimentos en los que se intercambian riñones entre cepas de ratas normales y cepas de

⁶ Las tiazidas son diuréticos ampliamente utilizados en el tratamiento de la presión arterial y son unos de los primeros fármacos sintetizados empíricamente, ya que se originaron a partir de la modificación química de la acetazolamida.

ratas genéticamente hipertensas, las ratas hipertensas a las cuales se les intercambiaron ambos riñones por uno proveniente de ratas normales, corrigen la hipertensión arterial. Sin embargo, las ratas normales nefrectomizadas que reciben un riñón de ratas con hipertensión genética, desarrollan hipertensión arterial (Kopf et al., 1993; Rettig et al., 1990a; Rettig et al., 1990b; Wadei y Textor, 2012). Estas evidencias muestran que el riñón es fundamental en la presión arterial, y que una vez desarrollada la hipertensión arterial, el riñón modifica la presión arterial incluso en un organismo que no tiene hipertensión.

Aunado a esto, observaciones recientes en la hipertensión inducida por angiotensina II muestran claramente el papel preponderante del riñón. En un trabajo muy claro y preciso, el grupo de Coffman (Crowley et al., 2006), la angiotensina II sólo causó hipertensión arterial sostenida en que expresan receptores AT1 en el riñón. Los ratones sin receptor AT1 en el riñón no desarrollaron hipertensión, sin importar la presencia éste en el resto de los órganos del animal (figura 11, paneles A y B). Esto quiere decir que la hipertensión sostenida como consecuencia de la administración de la angiotensina II se debe únicamente a los efectos renales de esta hormona.

En un trabajo más reciente, el grupo de McDonough (Gonzalez-Villalobos et al., 2013) generó un modelo murino condicional al que se le eliminó la enzima convertidora de angiotensina únicamente en el riñón ($ACE^{-/-}$). En este trabajo, la administración sistémica de angiotensina II no produjo hipertensión arterial en los ratones $ACE^{-/-}$, lo que indica que la angiotensina II administrada induce su propia producción intrarrenal, y esto a su vez, desvía la curva de natriuresis de presión, con el desarrollo de hipertensión arterial (figura 11C). Al no haber enzima convertidora de angiotensina en el riñón, no se activa este mecanismo y no se produce hipertensión, aunque el animal tiene receptores AT1 en todo el organismo.

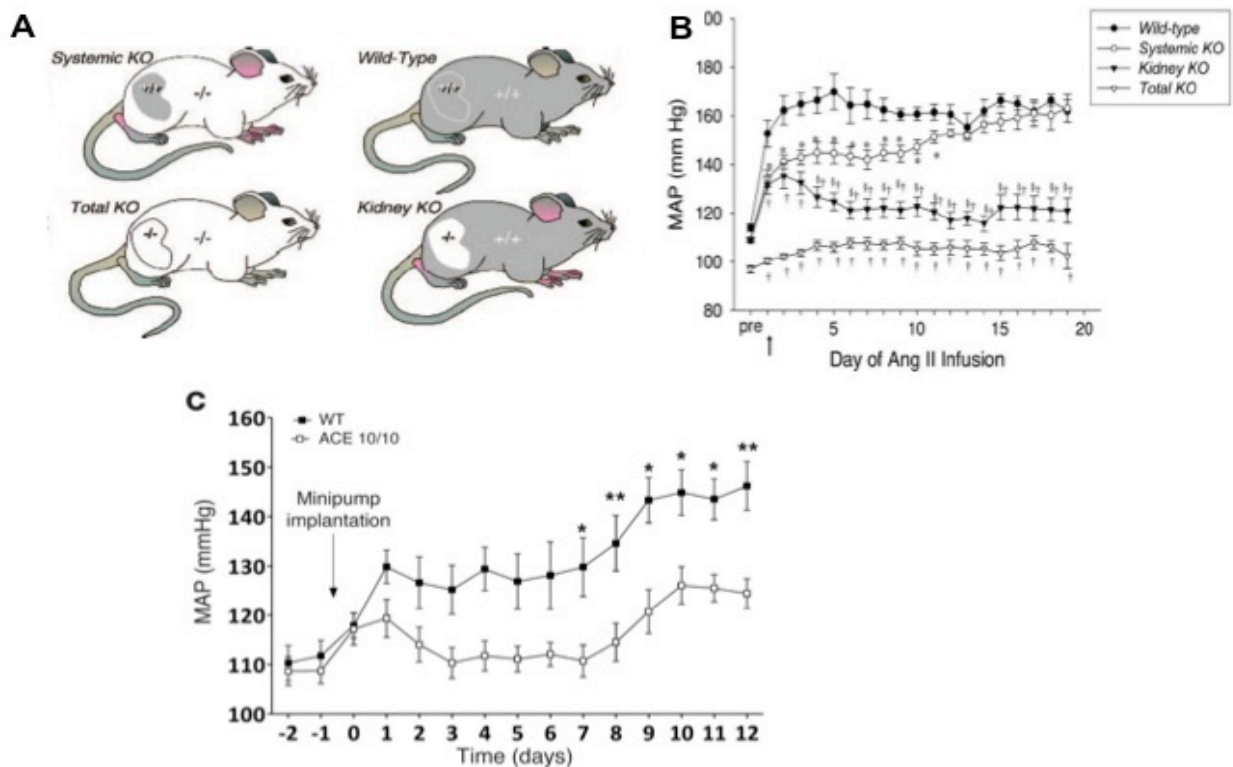


Figura 11. La angiotensina II induce un aumento en la hipertensión arterial debido a sus efectos en el riñón. A y B Experimento realizado por el grupo de Coffman en el que se muestra que la angiotensina sólo aumenta la presión en los ratones que expresan el receptor de angiotensina en el riñón (grupos Wild-type y Systemic KO). Tomado de Crowley, 2006. C) La eliminación condicional de la enzima convertidora de angiotensina II en el riñón previene la hipertensión arterial sostenida ante la perfusión de la angiotensina II. Tomado de González-Vilallobos, 2013.

La correlación entre la hipertensión y el riñón también se observa en seres humanos. En un grupo de seis pacientes con hipertensión arterial esencial, que desarrollaron insuficiencia renal crónica terminal como consecuencia de la hipertensión, al recibir un trasplante renal, no sólo corrigieron la insuficiencia renal, sino también la hipertensión (Curtis et al., 1983). Un análisis retrospectivo en extenso de pacientes con trasplante renal cadavérico, reportó otra evidencia clínica: los receptores provenientes de familias sin historia hipertensiva, al recibir un riñón de donador cadavérico de familias con antecedentes de hipertensión, desarrollaron con más frecuencia hipertensión arterial posterior al trasplante (Guidi et al., 1996). Estos datos también sugieren que en el ser humano la hipertensión arterial sigue al riñón enfermo y que la hipertensión arterial se debe a los efectos renales.

Finalmente, el análisis genómico que realizó el grupo de Lifton en más de tres mil personas de la cohorte de Framingham⁷ muestra otra evidencia del impacto de la reabsorción renal de sodio sobre la presión arterial a nivel poblacional se observa en (Ji et al., 2008). El análisis de la secuencia de los genes de los cotransportadores NCC sensible a tiazidas, del NKCC2 sensible a furosemide y del canal de potasio ROMK mostró que el 1.5% de los individuos presentan mutaciones en un sólo alelo de estos genes. La mayor parte de ellas no están descritas en el síndrome de Gitelman o de Bartter, pero reducen de manera considerable la actividad de los cotransportadores o del canal (Acuna et al., 2011; Fang et al., 2010; Monette et al., 2011). La presión arterial de estos sujetos fue significativamente menor que el resto de la población, cero prevalencia de hipertensión arterial (a pesar de que la evidencia epidemiológica reporta que la prevalencia de hipertensión en adultos es de al menos 30%) y cero mortalidad asociada a patologías cardiovasculares. Es decir, la disminución de la función de uno de los alelos de estas proteínas promueve la pérdida renal de sal y se previene por completo el desarrollo de hipertensión arterial y las complicaciones asociadas a ella. Esto equivaldría al efecto de la dieta baja en sal durante toda la vida.

⁷ Desde 1948 un grupo poblacional en la comunidad de Framingham, Massachusetts ha sido monitoreado a lo largo del tiempo en el proyecto llamado "Framingham Heart Study" para identificar y estudiar factores de riesgo tanto genéticos como ambientales asociados al desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

Efecto del eje renina angiotensina sobre la reabsorción de sal

El sistema Renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) regula la presión arterial así como la concentración y el volumen del líquido extracelular en dos condiciones: en hipovolemia o cuando hay cambios en la ingesta de sodio y potasio. La activación de este sistema en dichas condiciones ayuda a mantener el balance de sodio y potasio en el organismo. De hecho, los cambios en la ingesta de sal y agua se relacionan de manera inversa con la síntesis de angiotensina II. La estimulación del SRAA mantiene este balance a través de activar dos mecanismos distintos. Primero, al modificar la vasoconstricción arteriolar; y segundo, al modular la reabsorción renal de sal.

El primer paso en la activación el eje SRAA es la síntesis y la liberación de renina en las células granulares del aparato yuxtaglomerular ante una disminución en el volumen extracelular y en la presión arterial. En este primer paso existen tres estímulos que promueven la producción de renina: la disminución de llegada de sal a la mácula densa, el incremento en las catecolaminas y la disminución de la presión de las arterias renales. Una vez sintetizada y liberada, la renina cataliza la hidrólisis del angiotensinógeno producido por el hígado y genera un decapeptido llamado angiotensina I. La angiotensina I se convierte en angiotensina II por la enzima convertidora de angiotensina (ECA), presente en todo el endotelio vascular, pero mucho más abundantemente en el endotelio pulmonar. La angiotensina II, a su vez, estimula la secreción de aldosterona en la zona glomerulosa de la corteza suprarrenal. Otro efecto de la angiotensina II en la regulación del volumen es la estimulación de la sed y la liberación de la vasopresina (Guyton, 2006; Harrison-Bernard, 2009).

La angiotensina II actúa en receptores de membrana acoplados a proteínas G, conocidos como AT1 y AT2. Al activar la vía intracelular, la angiotensina II, de manera aguda promueve la vasoconstricción sistémica y renal y así, aumenta la presión arterial. A largo plazo, regula la vasoconstricción renal y disminuye la excreción renal de sal al modular la actividad o la expresión de distintas proteínas transportadoras de sal y agua (Castaneda-Bueno y Gamba, 2012; Coffman y Crowley, 2008).

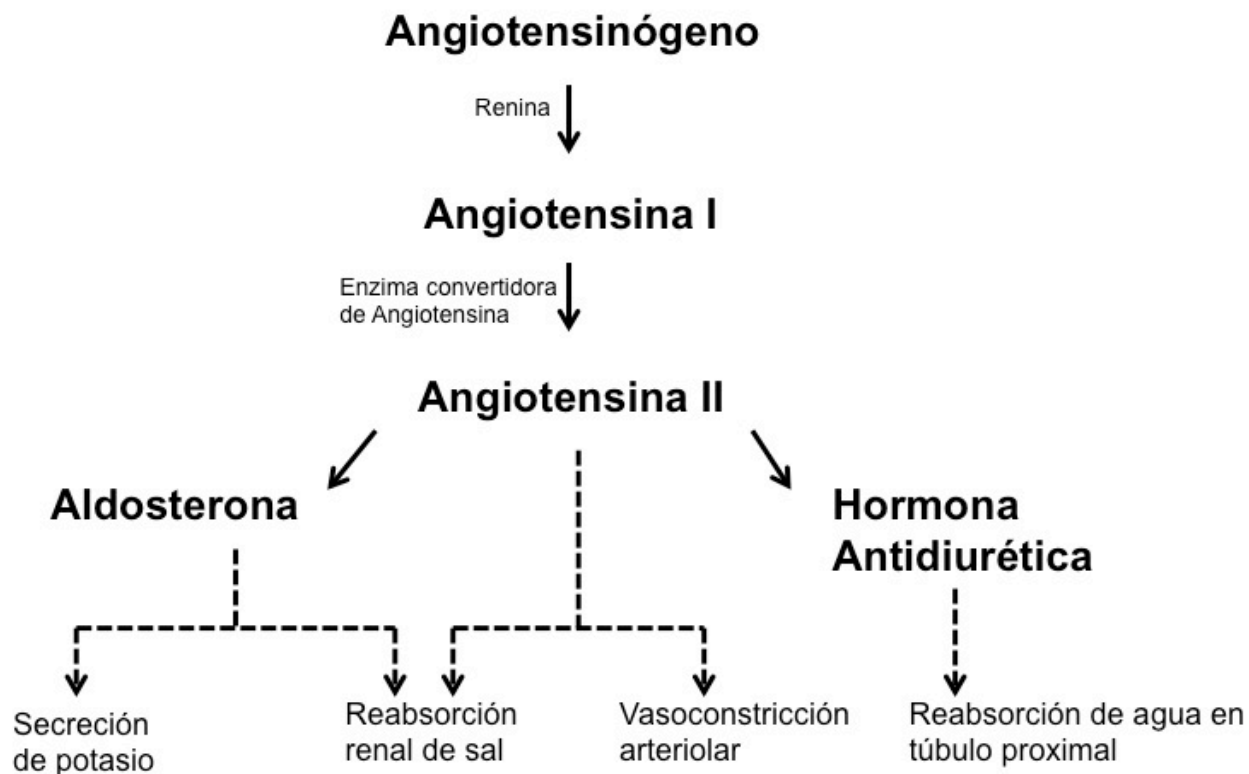


Figura 12. Esquema general del eje renina angiotensina aldosterona.

La aldosterona actúa en la nefrona distal sensible a aldosterona que, como se mencionó previamente, comprende al DCT2, CNT y a los túbulos colectores. Es una hormona esteroidea que actúa sobre los receptores intracelulares de mineralocorticoides y provoca la translocación al núcleo de dichos receptores. Además, promueve la síntesis de la cinasa regulada por el suero y los glucocorticoides, SGK-1, que a su vez modula la expresión de genes involucrados en la reabsorción de Na^+ , con lo que se ajusta el volumen extracelular. Específicamente, la SGK produce cambios postraduccionales que conllevan a un aumento en la expresión del NCC en el túbulo distal, del canal apical de sodio ENaC, y de la bomba de sodio y potasio en el túbulo distal y el conector {Arroyo, 2011 #4580}.

La función de la aldosterona se regula por el balance de sodio en forma similar a la angiotensina II, de modo que la reducción de la ingesta de sodio aumenta la secreción de aldosterona

y así se reduce el volumen urinario e incrementa la reabsorción tubular distal de sodio. Por el contrario, cuando hay una ingesta alta de sodio, la supresión de la secreción de aldosterona se promueve la eliminación de grandes cantidades de sodio y de agua. De esta forma, los cambios en la producción de aldosterona contribuyen también al mecanismo de natriuresis de presión y mantienen el balance de sodio y agua (Arroyo et al., 2011b; Castaneda-Bueno et al., 2012a; Castaneda-Bueno y Gamba, 2012).

El exceso de aldosterona, como ocurre en el aldosteronismo primario, produce hipertensión arterial. Contrario a esto, en los pacientes con disminución de la secreción de aldosterona, que puede ocurrir por una insuficiencia suprarrenal (síndrome de Addison), aumenta la excreción de sal y agua, y baja tanto el volumen de líquido extracelular como la presión arterial. En esta enfermedad, la depleción de volumen puede ser muy grave, y sólo se puede compensar si el paciente ingiere grandes cantidades de sal y agua debido a que, en este caso, el control no depende de la función renal sino de la ingesta de agua y sal (Guyton, 2006).

Es importante mencionar que la aldosterona no sólo se libera frente a la depleción de volumen sino también cuando hay un aumento en la concentración plasmática de K^+ . La liberación de aldosterona en ambas condiciones se conoce como la paradoja de la aldosterona ya que estos dos estímulos inducen respuestas diferentes. La aldosterona aumenta la actividad y expresión del canal ENaC y del cotransportador NCC sólo en DCT2 y no en DCT1. Esta acción promueve la secreción de potasio a nivel distal ya que el aumento en la actividad de estas dos proteínas es importante para la secreción de potasio vía el canal ROMK potasio (Arroyo et al., 2011b; Hoorn et al., 2011a).

A diferencia de lo que ocurre en la hiperkalemia, en hipovolemia está presente no sólo la aldosterona sino también la angiotensina II. La presencia de la angiotensina II logra una retención de sodio y agua y la aldosterona, por su parte, previene la pérdida de potasio. Estas acciones van a regular únicamente el volumen del líquido sin afectar la concentración de potasio. Esto ocurre gracias a que la angiotensina II aumenta la reabsorción de sal a nivel proximal, y así disminuye la llegada distal de sodio en la luz tubular y además aumenta la

reabsorción distal del sodio por el NCC haciendo negativa la luz tubular, pero evitando el intercambio de sodio y potasio en la parte distal de la nefrona por la actividad de ROMK. Así, se obtiene una retención en el volumen y se evita la pérdida de potasio (Arroyo et al., 2011b).

El papel del NCC en la homeostasis de la sal, el potasio y la presión arterial.

Como se abordó previamente, el movimiento transepitelial de iones a lo largo de la nefrona requiere transportadores específicos en la membrana que permitan el flujo hacia dentro y hacia fuera de la célula siguiendo un gradiente electroquímico, *e.g.* el gradiente electroquímico dado por la diferencia de concentraciones entre las células del organismo y el líquido extracelular promueve la entrada de Na^+ y la salida de K^+ . La Na^+/K^+ ATP-asa es el elemento líder en la generación de este gradiente, y está ubicada en la membrana basolateral de casi todos los epitelios, excepto en el epitelio pigmentario de la retina y el plexo coroideo (Alvarez-Leefmans, 2009). El gradiente de sodio y potasio generado por la Na^+/K^+ ATP-asa permite el movimiento de otros iones y solutos por el transporte secundario activo dependiente del sodio por otros transportadores (figura 5).

Dado que la reabsorción de sodio está acoplada con el transporte de otras moléculas como la glucosa, aminoácidos, fosfatos, bicarbonatos y cloruro usando el gradiente generado por la Na^+/K^+ ATP-asa, la reabsorción del sodio es determinante en la diferencia de voltaje transepitelial, que permite el movimiento de cationes como el Ca^{2+} , Mg^{2+} en el asa gruesa ascendente de Henle, o la secreción de K^+ o H^+ en los conductos conectores y colectores. Por estas razones resulta evidente que la modificación en la proporción de absorción de sodio altera de manera inmediata no sólo el balance de sodio y la presión arterial, sino también la concentración de varios electrolitos y solutos. Como se discutió anteriormente, la nefrona distal es particularmente importante en la regulación de la reabsorción de sodio dado que no está regulada por el mecanismo de retroalimentación túbulo-glomerular; esto se observa claramente en pacientes con Síndrome de Gitelman o con Pseudohipoaldosteronismo tipo II (PHAII) como se verá más adelante.

En la nefrona distal se han identificado dos tipos de transporte principales, el electrogénico dado por el canal epitelial de sodio, ENaC, y el electroneutro producto de la actividad del cotransportador de sal sensible a tiazidas, NCC (figura 4). Como ya fue mencionado, la absorción del sodio mediada por ENaC es fundamental para la secreción del potasio y de pro-

tones ya que la entrada de sodio por este canal genera un voltaje negativo (Verrey et al., 2008). La diferencia en el voltaje luminal favorece la secreción de potasio a través de tres principales proteínas: el canal ROMK, los canales BK y el cotransportador de K^+Cl^- (KCC, *potassium chloride cotransporter*). Además, favorece la secreción de protones en las células intercaladas y en los conductos colectores mediante los ácidos titulables (fosfatos) y el amonio (Boron, 2012; Palmer et al., 2012; Verrey et al., 2008).

Renfro y colaboradores reportaron la primera evidencia de un transportador electroneutro de Na^+ y Cl^- en un trabajo realizado en la vejiga urinaria del lenguado *Pseudopleuronectes americanus* (Renfro, 1975). Este grupo identificó que este transporte va del lado apical al lado seroso o basolateral de la vejiga urinaria, que no depende del voltaje transepitelial pero sí es dependiente de ambos iones (Renfro, 1975, 1977). Consecutivamente, Stokes mostró que el transporte es independiente del K^+ y que en preparaciones de vejiga urinaria de lenguado, la adición de hidroclorotiazida y metolazona⁸ prevenía completamente el transporte de sodio y de cloro (Stokes, 1988, 1989; Stokes et al., 1984).

Posteriormente, distintos grupos reportaron que el transporte de sodio y cloro electroneutro sensible a tiazidas ocurre en el túbulo contorneado distal (Costanzo, 1985; Ellison et al., 1987; Hansen et al., 1981; Kunau et al., 1975). La primera herramienta bioquímica que ayudó a la identificación del receptor de tiazidas la generaron Fenestill y colaboradores, al identificar que la unión de [³H]-metolazona a membranas de corteza renal ocurre en un sitio de alta afinidad localizado sólo en el DCT (Beaumont et al., 1988; Beaumont et al., 1989). La unión de esta molécula radioactiva cambió con distintos derivados de tiazidas (Beaumont et al., 1988) y disminuyó cuando se modificó la concentración extracelular del Cl^- (Tran et al., 1990). Además, la densidad de este receptor es regulada por cambios en las condiciones fisiológicas que afectan el transporte de $NaCl$, como los cambios en la ingesta de sodio o la administración crónica de diuréticos (Chen et al., 1990; Morsing et al., 1991).

⁸ La metolazona es un fármaco que también inhibe al NCC aunque no pertenece al grupo de las tiazidas.

El grupo de Ellison y colaboradores logró solubilizar y purificar el receptor de metolazona a partir de cortezas renales de conejo (Ellison, 1991) y generó un anticuerpo monoclonal que reconoció a una proteína de 125 KDa en lisados de cortezas renales (Ellison, 1993; Ellison et al., 1993).

A pesar de que las evidencias apuntaban la existencia de un receptor de tiazida o metolazona responsable de un transporte de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ en el DCT, aún no se reconocía a la proteína responsable. Un evento importante en el estudio del cotransportador fue la identificación molecular del cotransportador de sal sensible a tiazidas, NCC, realizada por Gamba y Hebert (Gamba et al., 1993). Clonaron la molécula a partir de RNA mensajero de la vejiga urinaria del lenguado de invierno *-Pseudopleuronectes americanus-* y utilizaron el sistema de expresión heteróloga de ovocitos de *Xenopus laevis* para medir actividad sensible a tiazida. Así, Gamba y colaboradores identificaron el cDNA que codifica al cotransportador de NaCl sensible a tiazidas. El fragmento resultante fue un cDNA de 3,069 bases llamado fITSC (flounder thiazide sensitive cotransporter) que codifica a una proteína de 1023 aminoácidos de aproximadamente 110 KDa. Al utilizar este cDNA como sonda, clonaron los cDNA de los cotransportadores NKCC2 y NKCC1 y al NCC de mamífero. Con esta información se definió a la familia SLC12 de transportadores electroneutros acoplados a cloro (Delpire et al., 1994; Gamba et al., 1994). Años más tarde, por clonación *in silico*, se identificaron cuatro genes de la misma familia que codifican para los cotransportadores de $\text{K}^+:\text{Cl}^-$ KCC1 (Gillen et al., 1996), KCC2 (Payne et al., 1996), KCC3 y KCC4 (Mount et al., 1999), que al seguir el gradiente del potasio, transportan del interior de la célula hacia el exterior (tabla 1).

Después de la identificación del NCC de lenguado, Gamba y colaboradores también obtuvieron la secuencia del NCC de rata (Gamba et al., 1994). En este trabajo reportaron que esta secuencia tiene una homología del 61% con respecto a la secuencia del NCC; y e identificaron dos secuencias generadas por procesos de empalme alternativo del extremo 3' no transcrito (Gamba et al., 1994). El cDNA de rata contiene 4,394 pares de bases con un marco de lectura abierta de 3,006 pares de bases que genera a una proteína de 1,002 aminoácidos. El NCC de ratón también está codificado en 3,006 pares de bases, identificadas por PCR

(Kunchaparty et al., 1999b), que generan a una proteína de 1,002 aminoácidos con identidad del 97% con respecto al de la rata. En relación a la secuencia del NCC humano, dos grupos simultáneamente identificaron dos transcritos codificados en el cromosoma 16q13, uno de 3,063 pares de bases que producen una proteína de 1,021 aminoácidos y otro de 1,090 aminoácidos en 3,090 pares de bases (Mastroianni et al., 1996; Simon et al., 1996).

Tabla 1. Miembros de la familia SLC12A

Gen	Proteína	Transporte	Localización	Polaridad celular
NCC	Cotransportador de sodio cloro	Transporta sodio y cloro del exterior al interior de la célula	Riñón (DCT)	Apical
NKCC1	Cotransportador 1 de sodio, potasio y dos cloros	Transporta sodio, potasio y cloro del exterior al interior de la célula	Ubicuo	Basolateral
NKCC2	Cotransportador 2 de sodio, potasio y dos cloros	Transporta sodio, potasio y cloro al interior de la célula	Asa gruesa ascendente de henle	Basolateral
KCC1	Cotransportador 1 potasio cloro	Transporta potasio y cloro del interior al exterior de la célula	Ubicuo	Apical
KCC2	Cotransportador 2 potasio cloro	Transporta potasio y cloro del interior al exterior de la célula	Cerebro	?
KCC3	Cotransportador 3 potasio cloro	Transporta potasio y cloro del interior al exterior de la célula	Cerebro, riñón, oído, músculo y corazón	Apical
KCC4	Cotransportador 4 potasio cloro	Transporta potasio y cloro del interior al exterior de la célula	Ubicuo. Principalmente en corazón, cerebro, y riñón	Apical

De manera general, los extremos amino y carboxilo terminal del NCC están en el lado intracelular, y entre ambos contiene 12 alfa hélices, identificadas por análisis de hidropatía (Gamba et al., 1993) y se ha propuesto que cada hélice constituye a un cruce transmembranal (figura 13). Esta topología ha sido confirmada en NKCC1, cuyo análisis de hidrofobicidad es similar al del NCC y con una identidad del 50% (Gerelsaikhan y Turner, 2000).

La proteína también tiene un asa hidrofílica con dos sitios potenciales de N-glicosilación, y en el extremo amino terminal presenta residuos de serina y treonina sensibles a fosforilación (T53, T55, T60 y S71). El grupo de Bindels identificó que el NCC forma homodímeros y propuso que ésta es la estructura funcional (De Jong et al., 2003). La relevancia fisiológica de este cotransportador es discutida ampliamente en esta tesis.

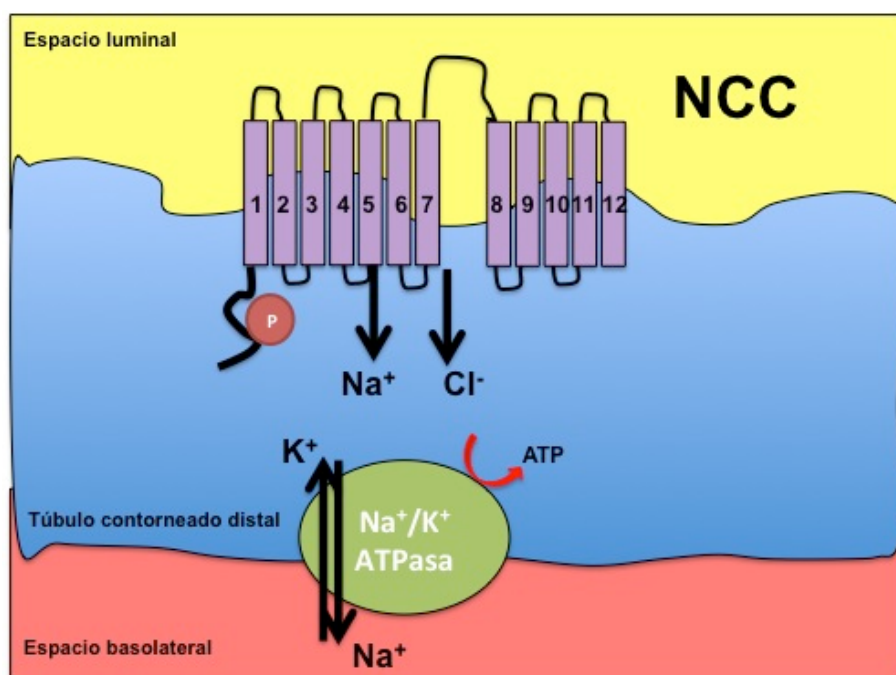


Figura 13. El NCC se expresa en el túbulo contorneado distal. El Cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ sensible a tiazidas se encuentra en la membrana apical y consta de 12 dominios transmembranales. Los extremos amino y carboxilo se encuentran en el espacio intracelular y en el amino se encuentran sitios sensibles a fosforilación. Entre los segmentos 7 y 8 hay sitios de glucosilación que divide a dos porciones hidrofóbicas. EL NCC utiliza el gradiente de sodio generado por la sodio/potasio ATPasa para reabsorber sodio y cloruro, y así genera un gradiente electroneuro.

La proteína del NCC es identificada únicamente en el DCT (Mastroianni et al., 1996) y en hueso (Dvorak et al., 2002). Evidencias clínicas han mostrado que las tiazidas disminuyen la excreción de Ca^{2+} y aumentan la mineralización ósea; tanto así, que es un tratamiento efectivo contra la osteoporosis (LaCroix et al., 2000; Ott et al., 2008; Potton y Dessimond, 1963; Wiens et al., 2006). Distintas evidencias demuestran que la hormona paratiroidea

también regula al NCC (Nicolet-Barousse et al., 2005; Pantanetti et al., 2002). Sin embargo, aún no está claro el papel del NCC sobre la reabsorción del calcio.

El NCC se ha asociado con el desarrollo de enfermedades que impactan la presión arterial y el balance de electrolitos en el organismo. En 1966, Gitelman describió un síndrome distinguido por el desarrollo de hipotensión arterial, hipokalemia e hipocalciuria (Gitelman et al., 1966). Veinte años más tarde, Gordon (Gordon, 1986), por su parte, identificó a pacientes justo con las manifestaciones clínicas contrarias al Síndrome de Gitelman: hipertensión arterial e hiperkalemia, acompañadas de hipercalciuria. La administración de tiazidas corrige todas estas manifestaciones clínicas. Esta enfermedad se conoce como el Síndrome de Gordon, Pseudohipoaldosteronismo tipo II (PHAII) o Hipertensión Hiperkalémica Familiar (FHHT) (Hadchouel et al., 2006). Gracias a las herramientas genéticas que generó la clonación del NCC, se ha identificado que alteraciones en la actividad del NCC explican la fisiopatología que subyace a estas dos enfermedades (Acuna et al., 2011; Riveira-Munoz et al., 2007). La tabla 2 muestra una comparación de estas dos patologías.

El síndrome de Gitelman es una enfermedad autosómica recesiva asociada con la hipotensión arterial, hipokalemia, hipomagnesemia, hipocalciuria y aumento en la densidad ósea (Gitelman et al., 1966). Los pacientes compensan este desbalance electrolítico con una mayor ingesta de sal, que ayuda al tratamiento de la enfermedad. Mutaciones inactivantes en el NCC son la causa de esta enfermedad, debido a que disminuyen la adecuada síntesis del NCC, su función, inserción en la membrana o modifican algún sitio del que depende su actividad (Acuna et al., 2011; De Jong et al., 2002; Kunchaparty et al., 1999a; Riveira-Munoz et al., 2007; Sabath et al., 2002; Simon y Lifton, 1996; Simon et al., 1996; Vargas-Poussou et al., 2011). Además de la enfermedad humana, la importancia de la integridad del NCC resalta en dos modelos murinos en los que la ausencia del NCC (Schultheis et al., 1998) o la presencia de una mutación puntual afectan el tráfico y la activación del NCC (Yang et al., 2010b) y producen un fenotipo similar al síndrome de Gitelman.

Tabla 2. Manifestaciones del Síndrome de Gitelman y el Síndrome de Gordon, también llamado Pseudohipoaldosteronismo tipo II (PHAI) o Hipertensión e Hiperkalemia Familiar (FHHT)

Síndrome de Gitelman	Síndrome de Gordon (PHAI o FHHT)
Autosómica recesiva	Autosómica dominante
Hipotensión arterial	Hipertensión arterial
Alcalosis metabólica	Acidosis metabólica
Hipokalemia	Hiperkalemia
Hipocalciuria	Hiper calciuria
Alta densidad mineral ósea	Baja densidad mineral ósea
Hipomagnesemia	hipermagnesemia
Aumento de aldosterona	Disminución de aldosterona
Debido a mutaciones inactivantes del NCC	Debido a mutaciones en CUL3, KLHL3, WNK1 y WNK4

El síndrome de Gordon es la representación opuesta al síndrome de Gitelman. Los primeros reportes de este síndrome describen las alteraciones de los pacientes y su manejo clínico, pero no la causa de la enfermedad (Gordon, 1986; Gordon y Hodsmán, 1986). Los pacientes, a pesar de presentar una tasa de filtración glomerular normal, desarrollan hipertensión arterial, hiperkalemia, acidosis metabólica e hiper calciuria, que la administración de dosis bajas de tiazidas corrige (Gordon, 1986; Gordon y Hodsmán, 1986; Mayan et al., 2002). La alta sensibilidad a las tiazidas y el genotipo contrario al síndrome de Gordon sugieren que el aumento en la actividad del NCC es el origen de esta enfermedad; sin embargo, no existen reportes de mutaciones activantes en la secuencia del NCC en pacientes con PHAI (Simon et al., 1995). En 2001 el grupo de Lifton identificó que la causa de la enfermedad en algunas familias son mutaciones en los genes que codifican para las cinasas WNK1 y WNK4 (Wilson

et al., 2001). La identificación de estas cinasas en la enfermedad PHAll ha llevado a su estudio exhaustivo y su impacto en la regulación de la reabsorción renal de sal. Recientemente se identificó que la causa de la enfermedad en familias con PHAll que no tienen mutaciones en WNK1 o en WNK4 yace en mutaciones en los genes KLHL3 y CUL3. Estos genes forman parte de un complejo de ubiquitinación, cuyo sustrato son justamente las WNK (Boyden et al., 2012; Louis-Dit-Picard et al., 2012; Ohta et al., 2013).

Regulación del NCC por las cascada de señalización WNK-SPAK

Los genes *wnk* codifican para unas cinasas de serina treonina que deben su nombre a la falta de una lisina en el sitio catalítico presente en el subdominio II de todas las demás cinasas de serina/treonina (With No K (lysine)), (Xu et al., 2000). Los genes *wnk1*, *wnk2*, *wnk3* y *wnk4* dan origen a los miembros de esta familia; L-WNK1, y su isoforma corta específica de riñón KS-WNK1 (Long-WNK1 y Kidney-Specific-WNK1), WNK2, WNK3 y WNK4.

Como más adelante se abordará, la proteína KS-WNK1 es el único miembro de esta familia, identificado hasta ahora, que no tiene actividad cinasa, ya que la proteína no incluye dicho dominio. Salvo este dominio faltante en la KS-WNK1, estas proteínas comparten una estructura común compuesta de un extremo amino terminal, seguido del dominio cinasa, y luego del carboxilo terminal que contiene las regiones autoinhibitoria, acídica y dos de tipo *coiled-coil* de interacción protéica (figura 14). Estas proteínas comparten otros dominios entre sí de los que dependen funciones más específicas. Presentan dominios de interacción con otras cinasas llamadas SPAK (Ste20-related proline-alanine rich Kinase) y OSR1 (Oxidative Stress Response 1) (Ushiro et al., 1998; Villa et al., 2007); sitios de fosforilación de SGK/AKT (Brazil et al., 2002); dominios HQ de interacción entre ellas (Thastrup et al., 2012); dominios susceptibles a fosforilación o transfosforilación que regulan su actividad (T-loop y S-motif) (Vitari et al., 2005) y un residuo de ácido aspártico (D) fundamental en su actividad cinasa (Xu et al., 2002), entre algunos otros elementos. En la figura 14 se muestra un esquema *grosso modo* de estas proteínas.

Las proteínas L-WNK1, KS-WNK1, WNK3 y WNK4 se expresan en riñón, a diferencia de WNK2 que no ha sido identificada en este órgano, y han acaparado la atención por sus implicaciones en el desarrollo de la enfermedad PHAI1 y en la regulación renal del transporte de diversos iones. Se remite al lector a algunas revisiones para mayor información (Arroyo y Gamba, 2012; Choe y Strange, 2007; Flatman, 2007, 2008; Hoorn y Ellison, 2012; Huang et al., 2008; Kahle et al., 2008; McCormick y Ellison, 2011; McCormick et al., 2008).

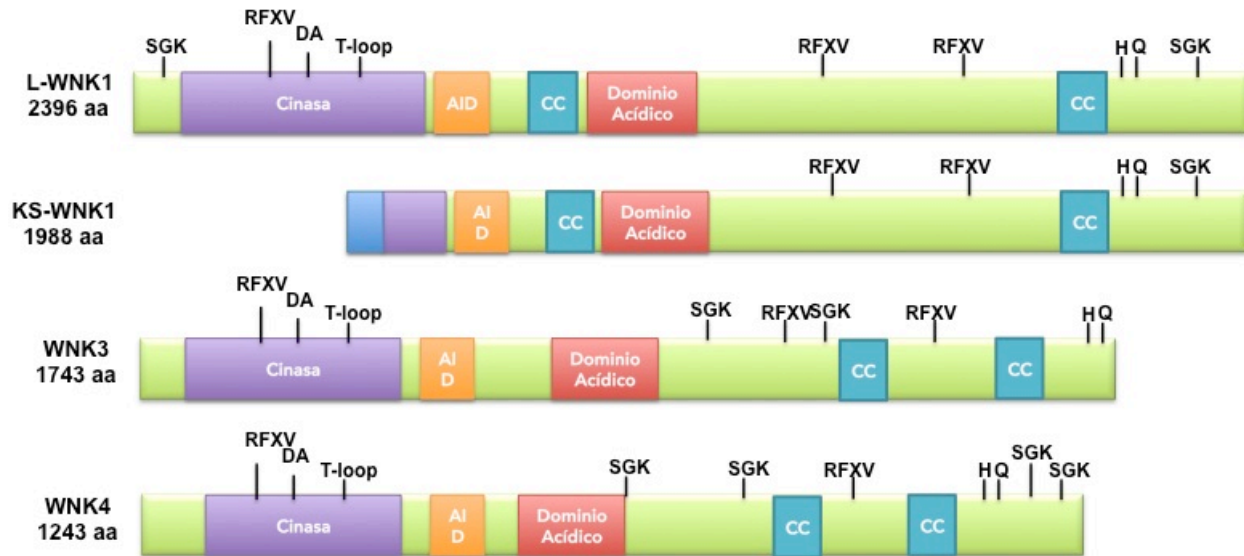


Figura 14. Diagrama que representa algunos sitios de las cinasas WNK expresadas en el riñón. Las proteínas WNK comparten un dominio de actividad cinasa (excepto la KS-WNK1), un dominio auto-inhibitorio (AID), dominios helice-helicoidal (CC) y un dominio ácido –en el que se encuentran mutaciones PHAII en WNK4 y WNK1. El dominio cinasa contiene un ácido aspártico, fundamental para la actividad cinasa (D) y un sitio sensible a fosforilación (T-loop). Estas proteínas también presentan sitios de unión a SPAK (RFXV), sitios sensibles a la fosforilación de SGK (SGK) y sitios de interacción entre ellas (HQ). En este diagrama se muestra el número de aminoácidos de cada uno a de ellas (aa)

Las mutaciones en la WNK1 producen la eliminación de al menos 22,000 bases del intrón 1, lo que conlleva a una sobreexpresión de la isoforma larga de esta cinasa, la L-WNK1 pero no de la isoforma corta KS-WNK1 (Delaloy et al., 2008; Wilson et al., 2001). Por otra parte, las mutaciones en WNK4 ocurren en la región codificante de la cinasa dentro del dominio ácido de la proteína (Wilson et al., 2001; Wilson et al., 2003). En ambos casos, estas mutaciones producen un aumento en la actividad del cotransportador.

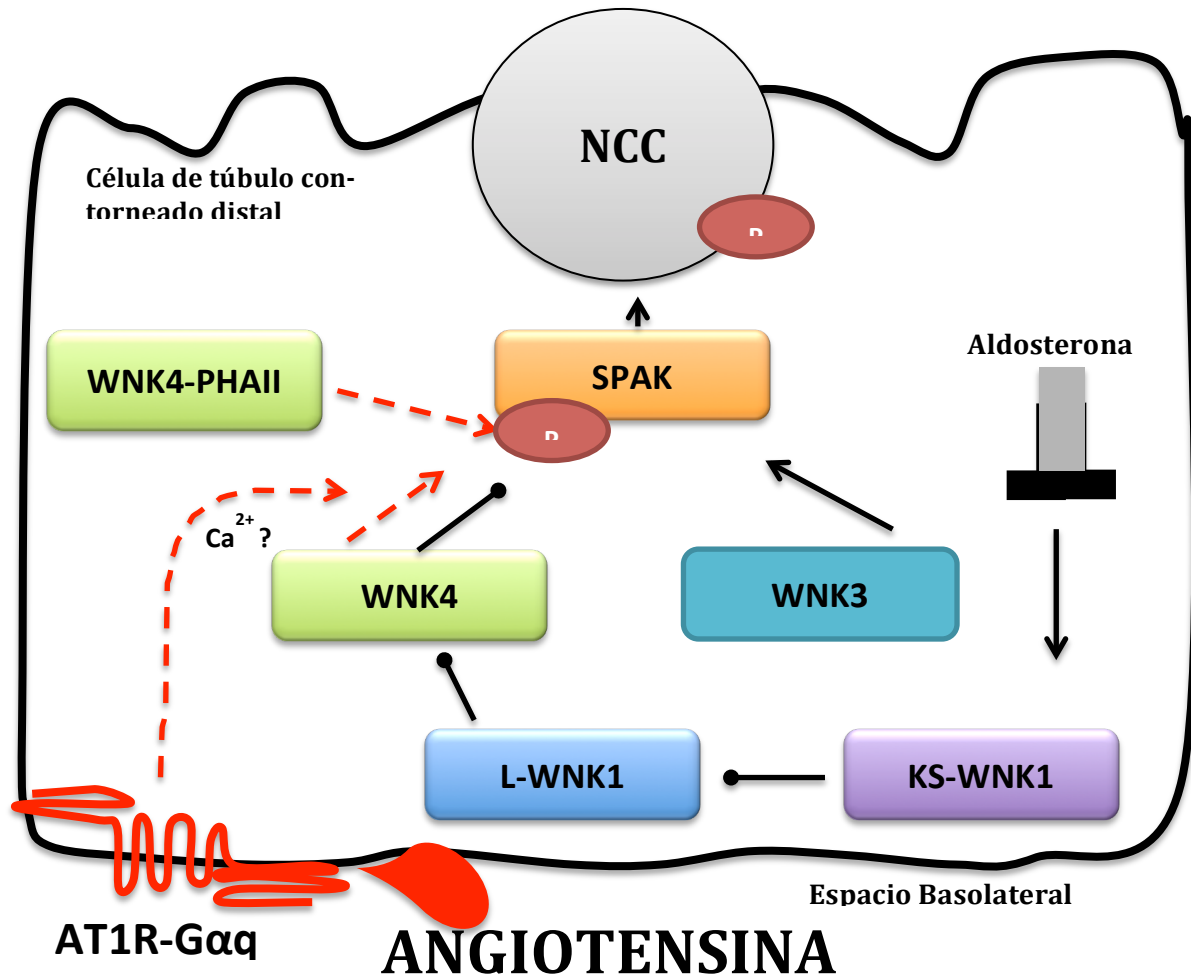


Figura 15. Modelo actual de la regulación del cotransportador renal de sal sensible a Tiazidas NCC. El NCC se expresa en las células del túbulo contorneado distal y su actividad está regulada de manera positiva por las cinasas L-WNK1, WNK3 y SPAK y negativamente por la cinasa WNK4 y la proteína KS-WNK1. La regulación hormonal del NCC está a cargo de la aldosterona y de la angiotensina II. Las flechas rojas representan la vía de la angiotensina II.

El modelo de la figura 15 muestra la regulación del NCC en el que se ubica a las cinasa L-WNK1, WNK3 y SPAK como sus activadores y a las cinasas WNK4, KS-WNK1 y al complejo KLHL3-CUL3 como los inhibidores de esta cascada de señalización. Este modelo se elaboró con base en distintas evidencias experimentales. Primero, el grupo de Richard Lifton (Wilson et al., 2001) identificó a la L-WNK1 y a la WNK4 como causantes de la enfermedad PHAII, como ya se mencionó anteriormente, debido a las mutaciones intrónicas en la cinasa L-WNK1 y a las mutaciones en la región ácida de la WNK4. Posteriormente, gracias a los ex-

perimentos de expresión funcional en ovocitos de *Xenopus laevis* nuestro grupo observó que la actividad del NCC disminuye cuando se coexpresa con la cinasa WNK4 y esta reducción se asocia con una disminución de la abundancia del cotransportador en la membrana (Wilson et al., 2003). Este efecto es dependiente de la actividad cinasa de la WNK4, ya que mutaciones que abaten dicha actividad previenen la inhibición (Wilson et al., 2003). Dichos resultados, reproducidos también por otros grupos, tanto en ovocitos como en otros modelos de expresión (Golbang et al., 2006; Yang et al., 2003). El mismo trabajo publicado por Wilson y colaboradores, mostró que a diferencia de la isoforma silvestre, las mutaciones PHAll en la WNK4 no afectan la actividad del cotransportador ni interfieren con su abundancia en la membrana, a pesar de que mantienen la interacción con el NCC, así como lo hace la isoforma silvestre (Wilson et al., 2003). Sin embargo, esta pérdida de la inhibición de las mutaciones WNK4-PHAll discrepa de los resultados obtenidos por el grupo de Ellison, ya que en sus resultados, la WNK4-PHAll no pierde el efecto inhibitorio sobre el NCC, es decir, se comporta como la WNK4 silvestre (Yang et al., 2003). Esta discordancia entre ambos trabajos aún no ha sido resuelta.

Trabajos posteriores han mostrado que la WNK4 inhibe al NCC, al menos en parte, a través de incrementar su degradación lisosomal al promover la asociación física entre el cotransportador y el complejo adaptador AP-3 de lisosomas (Subramanya et al., 2009) y no por endocitosis como puede ocurrir con otros transportadores (Golbang et al., 2006). De acuerdo al trabajo de Yang y colaboradores (Yang et al., 2003) la cinasa L-WNK1 es un inhibidor del efecto negativo de la WNK4 sobre el NCC, ya que la coexpresión de la L-WNK1 con WNK4 libera al NCC de la inhibición inducida por WNK4. Con base en estos resultados, los autores propusieron que las mutaciones intrónicas que conllevan a la sobreexpresión de la L-WNK1 producen la enfermedad PHAll por una ganancia de función sobre la inhibición de WNK4, con lo que aumentaría la actividad del NCC (Yang et al., 2003). Este mecanismo, sin embargo, no explica observaciones bioquímicas posteriores que serán discutidas más adelante –en los apartados de “Justificación del proyecto y de Resultados”– y tampoco resuelve el fenotipo de la enfermedad PHAll ocasionado por el incremento en la expresión de la L-WNK1, ni cómo es que esto puede activar al cotransportador.

Los estudios bioquímicos hechos por el grupo de Dario Alessi reconocieron a las cinasas SPAK y OSR1 como el vínculo entre las WNK y el NCC (Vitari et al., 2005). Estos resultados, obtenidos con la técnica MALDITOF-TOF por identificación de fosfopéptidos, mostraron que aumenta la fosforilación de las cinasas SPAK y OSR1 en sus dos dominios de activación (el T-loop y el S-motif) cuando están en presencia de la L-WNK1 o de la WNK4. Moriguchi y colaboradores reportaron el mismo fenómeno el mismo año (Moriguchi et al., 2005). Tanto los experimentos del grupo de Delpire (Piechotta et al., 2003; Piechotta et al., 2002) y los del grupo de Forbush (Dowd y Forbush, 2003) describen una interacción física entre SPAK y OSR con el NCC. Los resultados de ambos grupos mostraron que SPAK interactúa y activa a NKCC1, NKCC2 y a KCC3, miembros de la misma familia del NCC, e incluso a isoformas de estos cotransportadores provenientes de distintas especies (tiburón, humano o ratón) (Dowd y Forbush, 2003; Piechotta et al., 2003; Piechotta et al., 2002). Posteriormente, se identificó a SPAK como sustrato no solo de WNK1 y de WNK4, sino también de WNK3 y se encontró una asociación entre la activación del NCC y la presencia de WNK3 (Pacheco-Alvarez et al., 2012; Rinehart et al., 2005). La interacción de SPAK y OSR1 con otras proteínas se debe a la presencia de los motivos de interacción RFXI/V, donde la eliminación por mutagénesis sitio dirigida de la fenilalanina impide dicha interacción. De hecho, este sitio en WNK3 es fundamental en la activación del cotransportador por WNK3 (Pacheco-Alvarez et al., 2012). La presencia de una serina contigua a este motivo (RFXI/VS) permite la regulación de dicha interacción ya que cuando está fosforilada disminuye la afinidad entre las proteínas SPAK y OSR1 (Villa et al., 2007). Experimentos más recientes han identificado el papel *in vivo* de SPAK y OSR1 en la regulación no sólo del NCC, sino de otros miembros de la familia, incluso en otros tejidos distintos al riñón (Castaneda-Bueno et al., 2011; Gagnon et al., 2006; Geng et al., 2009; Grimm et al., 2012; Hossain Khan et al., 2012; Rafiqi et al., 2010; Susa et al., 2012a; Susa et al., 2012b; Vitari et al., 2006; Yang et al., 2010a). En el modelo actual, la WNK3 y la WNK4 tienen papeles antagónicos ya que la coexpresión de ambas proteínas previene tanto la inhibición por WNK4 como la activación del NCC por la WNK3 (Yang et al., 2007b).

Como previamente se mencionó, existen distintas evidencias que muestran que la WNK4 es un inhibidor del NCC en distintos sistemas de expresión. Sin embargo, también existen observaciones que muestran que la WNK4 activa al cotransportador, y que de hecho es imprescindible para la activación por la angiotensina II. Se ha demostrado que la activación del cotransportador en ovocitos por esta hormona depende de la WNK4 (San Cristobal et al., 2009); y que *in vivo* la fosforilación del NCC por la angiotensina II requiere de WNK4 ya que en ratones que no expresan WNK4 (WNK4-KO), su presencia no aumenta la fosforilación del NCC (Castaneda-Bueno et al., 2011). Recientemente, también se reconoció a la cinasa WNK4 como un regulador positivo en la activación del NCC mediado por la aldosterona (van der Lubbe et al., 2012b). A pesar de estas evidencias, el mecanismo por el que la WNK4 actúa como un inhibidor o un activador aún no está resuelto.

El modelo construido hasta ahora (figura 15) ubica a la isoforma KS-WNK1 como un regulador dominante negativo de la L-WNK1, ya que su sobreexpresión en ovocitos de *Xenopus laevis* inhibe a la isoforma larga L-WNK1; por consiguiente, permite la inhibición de WNK4 sobre el NCC (Subramanya et al., 2006). El efecto positivo por la WNK4 en presencia de la angiotensina II también se observa en dicho modelo. Evidencias más recientes muestran que la WNK4 modifica su expresión ante la presencia de la aldosterona y ante diferencias en la ingesta de potasio, y así regula al NCC en estas condiciones fisiológicas (Cheng et al., 2013; Cheng et al., 2012; Lazrak et al., 2006; Naray-Fejes-Toth et al., 2004; Wade et al., 2006).

Papel del NCC en la reabsorción de sal en condiciones de hiperinsulinismo

La obesidad, la diabetes mellitus y la hipertensión arterial son enfermedades crónicas que coexisten con una frecuencia mucho mayor a la esperada por el azar, lo que sugiere que están relacionadas desde el punto de vista fisiopatológico (Davy y Hall, 2004). Estas enfermedades son, a su vez, parte del síndrome metabólico en el que se incluye además la hiperlipidemia y la hiperuricemia.

En la población adulta mientras mayor es el índice de masa corporal, mayores son los niveles de presión arterial, por lo que la obesidad y la diabetes mellitus aumentan el riesgo de desarrollar hipertensión arterial (Bogaert y Linas, 2009; Hall et al., 1993). Una conexión entre estas enfermedades y el desarrollo de la hipertensión arterial puede ser la hiperinsulinemia que acompaña a la diabetes y a la obesidad, ya que la resistencia a la insulina genera a su vez, aumento en los niveles circulantes de esta hormona. Algunos autores sugieren que la resistencia a la insulina asociada con la obesidad ocurre por la desregulación de las vías de señalización en los órganos blancos como son el hígado, músculo y tejido adiposo (Aneja et al., 2004; Davy y Hall, 2004; Hall, 2003). No obstante, otros órganos pueden ser sensibles y responder a los niveles altos de insulina como el cerebro, los vasos sanguíneos o el riñón. Dado que este último recibe el 20% del gasto cardíaco es sin duda el órgano más perfundido del organismo, por lo que puede ser afectado por la hiperinsulinemia (Guyton, 2006).

La insulina es una hormona polipeptídica de 51 aminoácidos producida por las células beta de los islotes de Langerhans en el páncreas. Una vez sintetizada, en el aparato de Golgi se modifica al cortarse un fragmento intermedio, el péptido C, y se unen los dos fragmentos restantes por la formación de dos enlaces disulfuro entre ellos. La insulina es secretada a la sangre y viaja hacia el hígado en donde cerca de la mitad de la insulina se metaboliza y degrada. La insulina que queda libre en la sangre viaja por el torrente sanguíneo hacia sus tejidos blancos. En cada uno de estos tejidos la insulina se une a su receptor, el cual es de tipo cinasa de tirosina. Éste se transfosforila y fosforila otros residuos de tirosina presentes en otras proteínas intracelulares (Boron, 2012).

El receptor de insulina puede transmitir la señal por tres vías principales. La primera es reclutando proteínas que contienen un tipo de dominio llamado SH2 los cuáles se unen a los residuos de tirosina fosforilados en el receptor. La segunda, ocurre a través de la fosforilación de residuos de tirosinas de otras proteínas citosólicas. La tercer vía está dada por la fosforilación de tirosinas en una familia de proteínas conocidas como los sustratos del receptor de insulina (IRS) (Boron, 2012). Los IRS funcionan como adaptadores de otras proteínas con dominios SH2 y promueven la activación de otras vías. Una de estas vías es la vía de las MAPK, la cual comienza con la fosforilación de la proteína llamada SHC y la activación de la proteína GRB2, lo que desencadena la activación de la vía de RAS y RAF (Boron, 2012; Gomperts, 2009). Esta vía promueve la expresión génica y el crecimiento celular a través de la activación de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) MEK1 y MEK2, las cuales activan a su vez a las cinasas p38 y JNK. Otra de las vías desencadenada por los IRS comienza con la activación de la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K), que fosforilan anillos de inositol del fosfatidilinositol, implicado en la señalización celular. Esta molécula activa a la cinasa AKT (también llamada PKB) o a la cinasa mTOR para continuar la vía de señalización de la insulina que produce tanto efectos genómicos como postraduccionales (Gomperts, 2009). Se ha demostrado que la insulina tiene efectos renales, gracias a la presencia de su receptor y que su expresión se modifica en condiciones de hiperinsulinismo dada la desregulación de este receptor (Tiwari et al., 2007a).

Observaciones previas demuestran que la insulina promueve la reabsorción renal de sal (Sechi, 1999; Sechi et al., 1994; Tiwari et al., 2007b) en diferentes regiones del riñón (DeFronzo, 1981; DeFronzo et al., 1976; Riazi et al., 2009; Tiwari et al., 2007b). En experimentos realizados en ratas obesas se observó que condiciones de hiperinsulinismo están asociados con un incremento de los niveles de mRNA de proteínas involucradas en la reabsorción de sal como el NCC (Khan et al., 2005; Song et al., 2006), el canal epitelial de sodio ENaC (Bickel et al., 2001; Blazer-Yost et al., 2003; Song et al., 2006; Wang et al., 2001), el NKCC2 (Riazi et al., 2009; Zhao et al., 2004) y de la Na-K-ATPasa (Bickel et al., 2001). Según experimentos realizados por Song y colaboradores, la administración crónica de insulina

a ratas aumenta la presión arterial así como la respuesta natriurética a la clorotiazida (Song et al., 2006). Las evidencias anteriores sugieren que las condiciones de hiperinsulinismo regulan positivamente a proteínas fundamentales en el reabsorción de sodio y, por ende, en la presión arterial. De manera congruente a los trabajos previos, se observa que la disminución de los niveles de insulina, provocada por la administración de rosiglitazona⁹ a ratas obesas tipo Zucker disminuye la respuesta a tiazidas (Khan et al., 2005).

⁹ L rosiglitazona es una droga que se utiliza para producir Diabetes tipo II.

Justificación del proyecto

A pesar de que el NCC se ha identificado como una proteína fundamental en el mantenimiento de la homeostasis al regular la concentración de los electrolitos corporales y los niveles de presión arterial, los mecanismos que subyacen a su regulación por las cinasas WNK aún no están bien definidos y presentan varias discrepancias entre evidencias experimentales y clínicas (Gamba, 2009). Las discordancias que presenta el modelo actual (figura 15) son listadas a continuación:

- Los datos bioquímicos muestran que la L-WNK1 es cuando menos 10 veces más potente que la WNK4 para la activación de SPAK (Moriguchi et al., 2005; Vitari et al., 2005), por lo que no queda claro por qué, si la L-WNK1 es activadora de SPAK, esto no se traduce en la activación del NCC en experimentos funcionales.
- Si la L-WNK1 regula al NCC a través de anular la inhibición del NCC por la WNK4 pero sin producir un aumento en la actividad del cotransportador (Yang et al., 2003), no hay un mecanismo claro que explique la causa del pseudohipoaldosteronismo tipo II como consecuencia de las mutaciones intrónicas en el gen de *wnk1* que aumentan la expresión de la L-WNK1 (Vidal-Petiot et al., 2013; Wilson et al., 2001). La enfermedad tendría una explicación más clara si la L-WNK1 fuera un activador directo, a través de SPAK, del NCC.
- Si la WNK3 es la cinasa que produce la mayor activación del NCC en condiciones *in vitro*, no está claro por qué el ratón deficiente de este gen presenta un fenotipo tan discreto en el que la principal observación es el gran incremento en la expresión de la L-WNK1 (Mederle et al., 2013; Oi et al., 2012). Esta observación sugiere que la L-WNK1 y la WNK3 tienen un efecto redundante y de ahí, que la ausencia de WNK3 se compense por la sobre expresión de la L-WNK1. Sin embargo, esta hipótesis no se explica según el modelo actual (figura 15).
- La WNK4 puede actuar como un inhibidor de la actividad del NCC (Wilson et al., 2003; Yang et al., 2003) pero también interviene en la activación del NCC y al parecer esto puede ser mediado por la presencia de la angiotensina II (Castaneda-Bueno et al., 2012b; Wilson et al., 2001). No obstante, no existe un mecanismo claro que explique estas observaciones.

En estudios iniciales se observó que, además de la isoforma específica del riñón KS-WNK1 en la que están ausentes los dominios amino terminal y cinasa, el gen de *wnk1* genera diversas variantes por empalmes alternativos de los exones 9, 11, 12 y 26; es decir, que son variantes de WNK1 que sí tienen región cinasa, pero carecen de fragmentos específicos codificados en los exones 9, 11, 12 y 26 (Delaloy et al., 2003). Recientemente, el grupo de Juliette Hadchouel observó que las proteínas L-WNK1- Δ 11 y KS-WNK1- Δ 11 son las isoformas más abundantes de la WNK1 en el riñón (Vidal-Petiot et al., 2012). Estas isoformas surgen del empalme alternativo del gen WNK1 y no expresan el exón 11 (de ahí la nomenclatura Δ 11).

Los modelos previos de regulación del NCC se construyeron con las isoformas L-WNK1 Δ 11- Δ 12 y KS-WNK1- Δ 11-12 de rata. Sin embargo, Hadchouel y colaboradores reportaron que la L-WNK1- Δ 11- Δ 12 representa sólo el 20% del total de las isoformas de L-WNK1 presentes en el riñón y la KS-WNK1- Δ 11-12 ni siquiera existe, ya que sólo se expresan las combinaciones KS-WNK1- Δ 11 y KS-WNK1- Δ 9-11 en el DCT -lugar en el que se expresa el NCC (Vidal-Petiot et al., 2013). Este hallazgo, en conjunto con los puntos anteriores son, desde nuestro punto de vista, justificaciones razonables para explorar el efecto de los productos del gen *wnk1* (L-WNK1 y KS-WNK1) sobre la actividad del NCC, así como su contribución en la vía de señalización del NCC que involucra a las proteínas L-WNK1, KS-WNK1, WNK3, WNK4, KLHL3 y CUL3.

Como se discutió previamente, distintas señales hormonales pueden regular la actividad del NCC. En este trabajo doctoral se explora el efecto de la angiotensina II y de la insulina en la regulación del NCC y su impacto en la vía conducida por las WNK. Por un lado, la angiotensina II –secretada en condiciones de hipovolemia- regula al cotransportador a través de la vía de WNK4 (Castaneda-Bueno et al., 2012b). Sin embargo, aún no está clara esta vía de regulación del NCC debido a los efectos contradictorios de la WNK4. Por el otro lado, la obesidad, el síndrome metabólico y la diabetes mellitus correlacionan con la hipertensión arterial y, sin embargo, al inicio de este trabajo doctoral ningún grupo había analizado la posible regulación del NCC por la insulina –causa común a dichas patologías. En esta tesis se

utilizaron diversas estrategias experimentales para estudiar el efecto de esta hormona sobre la actividad del NCC.

Hipótesis

- Las isoformas de WNK1 más abundantes en el riñón, las variantes L-WNK1- Δ 11 y KS-WNK1- Δ 11 regulan al NCC mediante un proceso que requiere de SPAK, pero no de WNK4, mientras que el complejo de ubiquitinación KLHL3-CUL3 regula la actividad del NCC a través de la regulación de la vía WNK-SPAK.
- La actividad del NCC está regulada por señales hormonales que modulan a las proteínas WNK. Tanto la angiotensina II como la insulina aumentan la actividad del NCC por una vía que depende de las cinasas WNK.

Objetivos

- Analizar el efecto de la cinasa L-WNK1- Δ 11 sobre la actividad, fosforilación y expresión membranal del cotransportador de sal sensible a tiazidas (NCC), en el sistema de expresión heteróloga de ovocitos de *X. laevis* y en células renales HEK293.
- Analizar el efecto de la cinasa L-WNK1- Δ 11 sobre la inhibición del NCC por la WNK4.
- Determinar el efecto de la angiotensina II sobre la vía de regulación WNK-SPAK-NCC.
- Evaluar el papel de la KS-WNK1- Δ 11 sobre la actividad del NCC en un sistema de expresión heteróloga de ovocitos de *X. laevis*.
- Analizar el efecto del complejo de ubiquitinación compuesto por KLHL3 y CUL3 sobre la L-WNK1 proveniente de pacientes con hiperkalemia familiar.
- Determinar si la insulina aumenta la actividad del cotransportador de manera directa y, en su caso, elucidar el mecanismo involucrado.

Métodos

Clonas utilizadas

En el apéndice 3 se muestran todas las clonas utilizadas en este trabajo, así como las mutantes generadas durante este trabajo. En esta tabla se muestra el vector en el que se encuentra cada cDNA, la especie a la que pertenece dicho cDNA, la etiqueta fusionada que se utiliza para inmunodetección y el origen experimental de la clona. En los apéndices 4 y 5 se muestran los oligonucleótidos o primers utilizados para la generación de las mutantes o para la secuenciación de ellas.

Mutagénesis sitio dirigida

Para la obtención de todas las mutantes generadas durante este periodo, se utilizó el QuikChange® Site Directed Mutagenesis Kit de Stratagene® según las recomendaciones del proveedor. Todas las mutaciones puntuales realizadas se subclonaron en la clona original para evitar mutaciones no deseadas que se pudieron generar por la polimerasa que provee el kit. La(s) mutación(es) se comprobó al analizar la secuencia y corroborar el cambio de codón generado. Para esto, se utilizó el servicio de secuenciación automatizada del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Para la síntesis química de oligonucleótidos, ya sea para secuencias o para producir las mutaciones puntuales, se utilizó el servicio de síntesis de la empresa SIGMA.

Expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis*

El sistema de expresión en ovocitos de *Xenopus laevis* consiste en la inyección de uno o más RNA complementarios sintetizados *in vitro*, ya que dicho sistema es un modelo ampliamente utilizado para la expresión de proteínas de membrana y sus reguladores (Gamba, 1993; Gamba et al., 1992; Goldin, 1992; Gurdon y Wickens, 1983; Kusano et al., 1982; Sigel, 1990; Wang et al., 1991). Este sistema permite medir la actividad de proteínas de membrana, así como su estado bioquímico y sus modificaciones traduccionales que van desde la fosforila-

ción, la ubiquitinación hasta sus cambios en el transporte a la membrana. En este trabajo, esta metodología permitió el análisis de la actividad, del estado de fosforilación y de los cambios en la abundancia de la membrana del cotransportador de sal, NCC (figura 16).

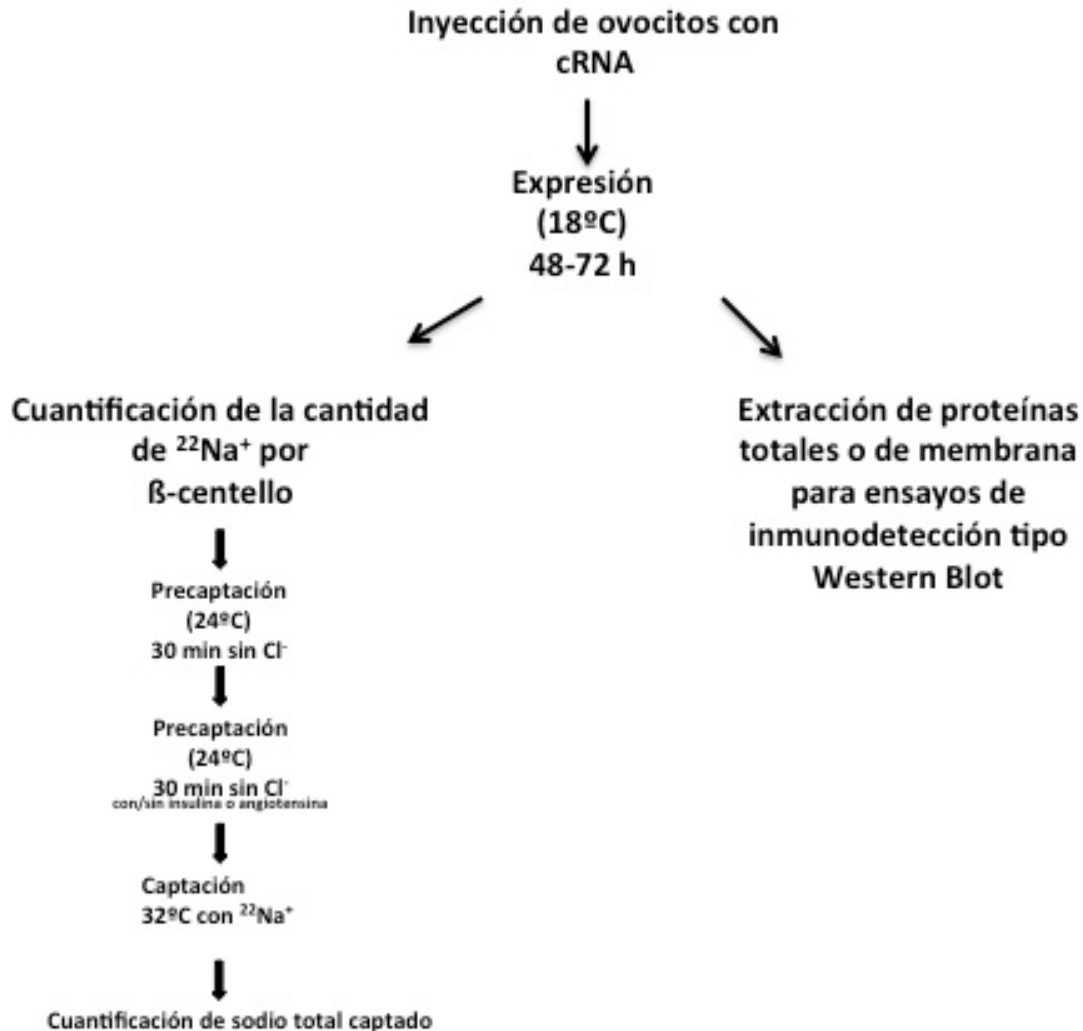


Figura 16. Diagrama de flujo de los experimentos funcionales en ovocitos de *X. laevis*

La síntesis de cRNA se realizó al utilizar como molde el cDNA de cada una de las proteínas sobre-expresadas. Cada una de estas clonas se linearizó en el extremo 3' del gen al cortar con una endonucleasa y se utilizó el sistema de transcripción mMACHINE de Ambion. Tanto el DNA como el RNA obtenidos después de la digestión o de la síntesis respectivamente se purificaron con la técnica de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (45:45:1). La integridad y la cuantificación de cada uno de los cRNA se corroboró en geles

desnaturalizantes de agarosa al 1% en MOPS-Formaldehído y por la lectura en el espectrofotómetro en la absorbancia a 260nm.

Los ovocitos del sapo africano *Xenopus laevis* se extrajeron de hembras adultas anestesiadas con triclaína al 0.17%. Para quitar el folículo de los ovocitos se realizaron dos lavados de 1.5 h cada uno en una solución de colagenasa tipo II (SIGMA) a 3 mg/mL disuelta en ND96 sin calcio. Al cabo de las tres horas de incubación en la colagenasa, se lavaron en ND96 tres veces. Los ovocitos obtenidos se inyectaron con 50 nL de RNAc con un micromanipulador y un microinyector. La concentración de cRNA inyectada a cada ovocito dependió de cada una de las clonas, e. g. el cRNA de NCC se inyectó a una concentración de 0.4 mg/mL mientras que el cRNA de WNK3 se inyectó a 0.1 mg/mL. Los ovocitos inyectados se incubaron por 48-72 horas a 18°C en ND96 con Gentamicina (Sigma) 5mg/mL de medio.

La actividad del NCC se determinó al medir la captación del isótopo radiactivo $^{22}\text{Na}^+$ de los ovocitos en diversas condiciones. Este ensayo de captación consiste de dos fases: un periodo de precaptación de 30 o 45 minutos en medio sin cloro y un periodo de captación de 60 minutos en una solución sin potasio y con 1mCi/mL de $^{22}\text{Na}^+$ a 32°C. Con el objetivo de minimizar la captación de sodio radioactivo por otras proteínas que no fueran el NCC sobreexpresado, en ambos periodos los ovocitos estuvieron expuestos a un inhibidor de la bomba de sodio potasio (Ouabaina 1 mM), un inhibidor del ENaC (Amilorida a 0.1 mM) y al inhibidor del NKCC (Bumetanida 0.1 mM). A pesar de estas medidas, todos los grupos se compararon con la captación de ovocitos inyectados con agua y se hizo un ajuste de la captación dependiente del NCC al comparar cada actividad con grupos control que se expusieron a tiazida (Metolazona o Hidroclorotiazida 0.1mM) durante los periodos de precaptación y captación. Las incubaciones con insulina o angiotensina II se realizaron al final del periodo de precaptación, en los minutos previos a la captación. La exposición a inhibidores, e.g. la wortmanina o el inhibidor IV de AKT, se realizó durante los periodos de precaptación y captación de sodio radioactivo. El efecto de cada una de las condiciones experimentales se corroboró al menos en tres ensayos diferentes y se tomaron 8-15 ovocitos de cada experimento para el análisis estadístico. En este trabajo, la captación de cada grupo se expresa ya sea

en términos de sodio total captado, en sodio captado por el NCC –la captación sensible a tiazida- o en porcentajes de sodio captado ajustados con respecto a la actividad del grupo control. Se utilizó la corrección de Bonferroni y se realizaron las comparaciones entre los grupos con la prueba t de Student o análisis ANOVA para comparaciones múltiples. Los valores de *p* menores a 0.05 se tomaron como diferencias estadísticas significativas.

Para la obtención de las proteínas, los ovocitos se tomaron directamente del medio para lisarse posteriormente, y, en los casos correspondientes, se incubaron en una solución isotónica con insulina en distintos tiempos para la extracción de proteínas totales. Los ovocitos fueron lisados con una solución de lisis que contiene inhibidores de proteasas y fosfatasas, así como de β-mercapto etanol como agente reductor. Se utilizó 5 mL de la solución de lisis por cada ovocito. Cada uno de los lisados se centrifugó a 4000 g por 10 minutos. El procedimiento de centrifugación generó 3 fases: un botón de color oscuro, un sobrenadante líquido de color claro y una capa superficial de color blancuzco. Se tomaron las dos capas superiores y se descartó el botón. El extracto obtenido se guardó a -20°C o -80°C para su posterior cuantificación por el método de Bradford o por el de Lowry (Sambrook, 1989). Cada una de las muestras fue analizada con ensayos de tipo Western Blot.

Purificación de proteínas de membrana de ovocitos

Para analizar si alguna condición experimental, *e. g.* la insulina o la co-expresión de WNK1, llevan al aumento del NCC en membrana, los ovocitos se incubaron 1 hora en ND96 TEA pH 8.8 a 4°C con Biotina (0.5 mg/mL) (Sigma). Estos ovocitos expuestos a la Biotina se lavaron tres veces con ND96 TEA pH8.8. Posteriormente se lisaron y se obtuvieron las proteínas como previamente se mencionó. Se incubaron toda la noche 200 µg de proteínas con perlas de estreptavidina-agarosa (Millipore) a 4°C y en rotación. La mezcla se centrifugó por 2 minutos a 4000 g y se lavó con solución de Tris-EDTA-NaCl. Se repitió este proceso tres veces. Las perlas obtenidas se incubaron en buffer Laemmli con β-mercapto etanol y se calentaron a 65°C por 15 minutos. Las perlas se cargaron en un gel de acrilamida-SDS 7.5% y se continuó con el protocolo de Western blot para el análisis de cada muestra.

Perfusión de riñones *ex vivo*

La perfusión de riñones *ex vivo* (figura 17) con insulina se hizo en colaboración con la Dra. Rocío Bautista perteneciente al Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. Este método consiste en canular riñones de rata por la arteria renal y perfundirlos con una solución isotónica con o sin insulina durante 20 minutos en un equipo de perfusión de tipo Langendorff. Al cabo de este tiempo, se separa la médula de la corteza renal y se congela en nitrógeno líquido para evitar la degradación y deterioro del tejido. La corteza renal se analizó al extraer las proteínas al moler dicha corteza con la solución de lisis -mencionada previamente- que contiene inhibidores de proteasas y de fosfatasas y β -mercapto etanol como agente reductor. Cada uno de los lisados se centrifugó a 14,520 g por 10 minutos. El sobrenadante obtenido se guardó para su posterior cuantificación por los métodos de Bradford o Lowry. Cada una de las muestras se analizó con ensayos de tipo Western Blot.

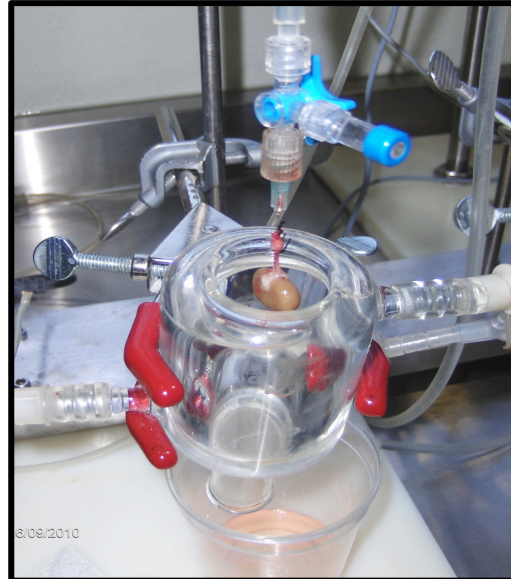


Figura 17. Perfusión de riñones de rata en un sistema de tipo Langendorff. Se utilizó este sistema de perfusión para evaluar los efectos de la insulina sobre la fosforilación del NCC.

Ensayos de tipo Western Blot

Una vez cuantificadas las proteínas provenientes de los ovocitos o de los riñones de rata o ratón, se cargó 50 µg de proteína de cada muestra en geles de poliacrilamida-SDS 7.5% y se corrieron a 90 V hasta lograr la separación de bandas deseada. Posteriormente, se transfirió cada gel a una membrana de PVDF (Inmobilon, Milipore) a 10 V por 1.5 h y se bloqueó con leche al 10% diluida en TBS-tween 0.2% por 1.5 h a temperatura ambiente. Al cabo de ese tiempo, la membrana se incubó toda la noche con el anticuerpo primario deseado en agitación suave y a 4°C. De requerirse, se hizo una segunda incubación con un anticuerpo secundario por 1.5 h a temperatura ambiente y en agitación suave. Para esta segunda incubación se realizaron 4 lavados de 10 minutos a temperatura ambiente en agitación moderada, previos a la incubación con el anticuerpo secundario. Después de la incubación con los anticuerpos, se realizaron 10 lavados de 10 minutos cada uno a temperatura ambiente y en agitación moderada con TBS-tween 0.2%. La detección de las bandas se hizo al utilizar el sistema de quimioluminiscencia ECL-Plus de Amersham o el sistema Chem-Forte de Milipore. Las bandas se detectaron y cuantificaron con los programas Kodak 1D Scientific Image Systems o el programa de acceso libre Image Studio Lite de LI-COR Inc.

Transfección de células HEK-293

Las células HEK-293 se mantuvieron en medio DMEM suplementado con L-Glutamina 4mM y 10% de suero fetal bovino. Las células se crecieron a 37°C con 5% de CO₂. El día previo a la transfección, las células son tripsinizadas, contadas y puestas en una concentración de 0.5-1.25 X10⁵ células por pozo en 0.5 mL de medio de crecimiento. Las células se transfectaron usando LipofectaminaTM 2000 (Ambion, Invitrogen) de acuerdo a las recomendaciones del proveedor. El cDNA de las clonas utilizadas: NCC, h-WNK1, h-WNK1-Δ11, r-WNK1-Δ11-12-S2120, WNK3 y WNK4 están en el vector de expresión de mamíferos pcDNA-3.1 (Hoorn et al., 2011b). Para hacer los ensayos de knockdown de las WNK1 y SPAK, las células se transfectaron utilizando Lipofectamina^{TMj} con siRNA de SPAK (5'->3' GUGUAGCAAUAAACG-

GAUtt) y de WNK1 (5'->3'GGAUGAUAUCGAAGAGCUGtt). Ambos siRNA se utilizaron a 20-40 nM. Los grupos controles se transfectaron con plásmido vacío. Después de 48 horas de la transfección, las células se lisaron para su posterior análisis.

Generación de modelos animales

Los ratones transgénicos WNK1^{+/^{FHHt} que se utilizaron en este trabajo se obtuvieron del laboratorio de la Dra. Juliette Hadchouel en el INSERM U970 y al Paris Cardiovascular Research Center, en Paris Francia. La generación de los ratones transgénicos WNK1^{+/^{FHHt} y WNK4^{-/-} se describe en Vidal-Petiot et al. (2013) y Castañeda-Bueno et al. (2012), respectivamente.}}

Para obtener los con fenotipo WNK1^{+/^{FHHt}:WNK4^{-/-}, los ratones WNK4^{-/-} se cruzaron con el ratón WNK1^{+/^{FHHt}. La misma estrategia se realizó para obtener al ratón WNK1^{+/^{i1lox}:WNK4^{+/⁺ que se utilizó como control. Los genotipos siguieron los patrones de herencia Mendeliana y se corroboraron por PCR y secuenciación antes de ser expuestos a los retos fisiológicos. Las muestras de sangre se obtuvieron del seno retro-orbital de ratones conscientes o de ratones anestesiados con isoflurano al 1.5%. Los gases en sangre y los electrolitos se analizaron en el equipo ABL80-Flex. Al final de cada condición experimental, los animales fueron sacrificados con ketamina y xilazona (al 0.1 y 0.01 mg/g de peso corporal, respectivamente) y se colectaron los tejidos. Los riñones se disectaron para separar la corteza de la médula y se congelaron en nitrógeno líquido para evitar su degradación y deterioro. Posteriormente se lisaron los tejidos utilizando el mismo método que se utilizó para el análisis de los riñones de rata.}}}}

Perfusión de angiotensina II

La angiotensina II se administró con el uso de bombas miliosmóticas Bombas miliosmóticas, modelo ALZET 1002. Estas bombas se llenaron con en solución salina para una difusión de

1.5µg/kg de peso/min y se equilibraron por 24 h en solución salina y a 37°C. Las bombas ya equilibradas y llenadas con solución salina como control o con angiotensina II se implantaron subcutáneamente en el dorso de ratones anestesiados con isofluorano al 2%. Después de 14 días de infusión, los animales se sacrificaron con ketamina y xilazona para obtener los riñones y disectarlos.

Medición de la presión arterial.

La presión arterial sistólica se midió al utilizar el sistema computarizado de tipo tail-cuff (Visitech BP-2000). Se tomaron al menos 10 mediciones cada día por 3 días previos a la implantación de la bomba y se tomó diariamente después de dicha implantación.

Resultados y discusión

Las cinasa L-WNK1 es una activador del NCC

La proteína WNK1 humana está codificada por un gen de aproximadamente 160 kb que contiene 28 exones que está en el cromosoma 12. En el riñón se han encontrado promotores alternativos que permiten la expresión de dos isoformas renales de WNK1, una isoforma larga con actividad cinasa, la L-WNK1, y una isoforma corta, llamada KS-WNK1 (de las siglas del inglés *kidney specific*). En el riñón, la isoforma larga, la L-WNK1, comienza a partir de la transcripción del exón 1 y está bajo el control de promotores proximales. La isoforma corta inicia su transcripción en el exón 4a, lo que conlleva a la eliminación de los primeros 4 exones en los que está codificada la mayor parte del dominio cinasa (Delaloy et al., 2003). En este mismo órgano se han identificado variantes de L-WNK1 con distintas combinaciones de los exones 11 y 12 debido a procesos alternativos de empalme (Delaloy et al., 2003; O'Reilly et al., 2003; Verissimo y Jordan, 2001).

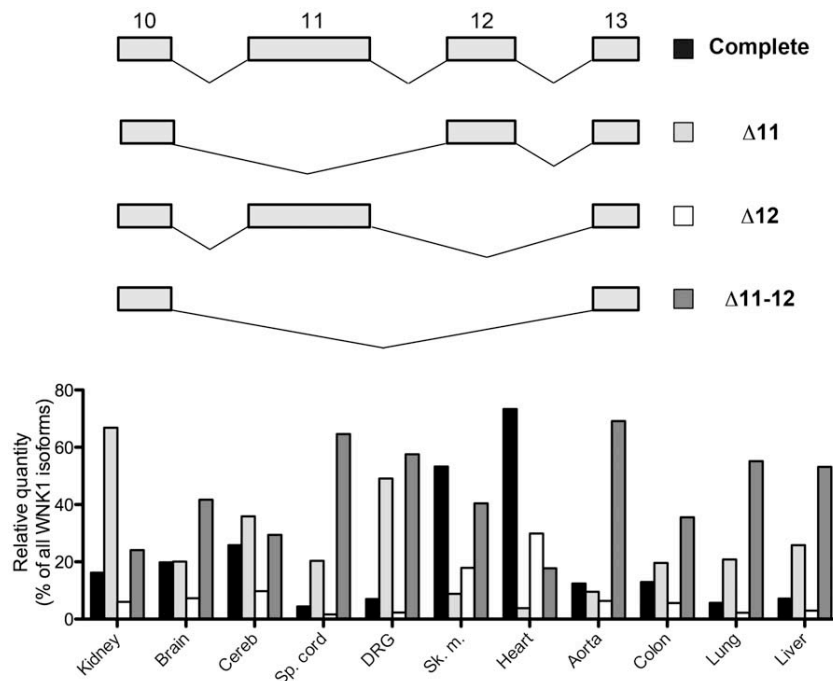


Figura 18. La WNK1-Δ11 es la isoforma de WNK1 más abundante en el riñón. El gen de *wnk1* genera distintas variantes de WNK1 con distintos patrones de expresión, y en el riñón la isoforma más abundante es la L-WNK1-Δ11. Tomado de Vidal-Petiot, 2012

Recientemente, Vidal-Petiot y colaboradores cuantificaron en diversos tejidos la expresión de distintas isoformas de WNK1 generadas a partir de estos empalmes alternativos (Vidal-Petiot et al., 2012). Ello permitió la identificación de isoformas con distintas combinaciones de los exones 9, 11, 12, y 26. En este mismo trabajo se reconoció a la isoforma KS-WNK1 como la variante de WNK1 más abundante en el DCT, ya que en este sitio se expresa 80 veces más que la isoforma L-WNK1 (figura 18). Además se detectó que la variante de L-WNK1 que carece del exón 11 (L-WNK1- Δ 11) es la isoforma de L-WNK1 más abundante en el riñón. Esta isoforma representa al 70% del total de las isoformas de L-WNK1 tanto en riñones humanos como murinos. Sin embargo, como se mencionó previamente, la isoforma de L-WNK1 utilizada hasta ahora para evaluar sus efectos sobre los transportadores renales, incluido el NCC, es la identificada por Melanie Cobb y colaboradores a partir de RNA mensajero de cerebro de rata (Xu et al., 2000) y que fue amablemente donada a diversos laboratorios, incluyendo el nuestro. Esta isoforma de rata carece de los exones 11 y 12 (Xu et al., 2000) y representa sólo al 20% de todas las isoformas de L-WNK1 renales (Vidal-Petiot et al., 2012), en contraste con el 70% ya mencionado de la isoforma L-WNK1- Δ 11. Dada esta discrepancia en la cantidad de expresión detectada por Vidal-Petiot, se decidió analizar el efecto de esta isoforma de L-WNK1 enriquecida en el riñón sobre la actividad del NCC en los ovocitos de *X. laevis*, así como de las demás isoformas identificadas por este grupo. Estas isoformas se clonaron a partir de RNA mensajero humano.

En la figura 19 se observa el porcentaje de la actividad del NCC obtenido a partir de la captación de $^{22}\text{Na}^+$ sensible a tiazida en presencia de las distintas isoformas de la L-WNK1. En esta figura cada barra representa al menos a tres experimentos independientes con 8-15 ovocitos cada uno, como se describe en la sección de Métodos. La co-inyección del RNA complementario de la L-WNK1- Δ 11 junto con el de NCC aumenta la actividad al 325% con respecto al grupo control en que sólo se inyectó el cRNA del NCC. Las demás isoformas de L-WNK1 también aumentan significativamente la actividad del cotransportador, excepto la isoforma L-WNK1- Δ 9. Nótese que de todas las isoformas probadas, la L-WNK1- Δ 11 induce el mayor nivel de activación del NCC.

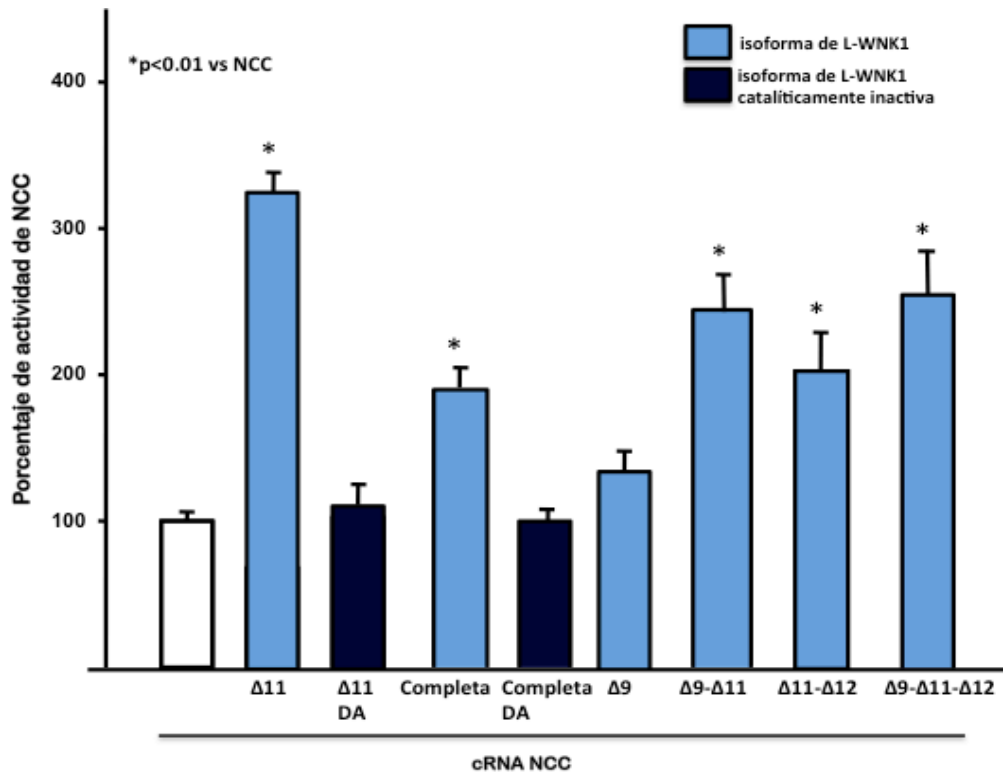


Figura 19. La isoforma L-WNK1-Δ11 activa al NCC en los ovocitos de *X. laevis*. Efecto sobre la captación de $^{22}\text{Na}^+$ mediada por el NCC de las distintas isoformas de L-WNK1 generadas por empalmes alternativos. Estas variantes aumentan la actividad del NCC y este efecto positivo se previene con la isoforma catalíticamente inactiva (DA) que abate la actividad cinasa en las isoformas L-WNK1-Δ11 y L-WNK1. La barra blanca representa la actividad del NCC contra la que se compararon los demás grupos.

El efecto positivo de las variantes L-WNK1 completa o la L-WNK1-Δ11 depende de su actividad cinasa, ya que al abatirla con la mutación D368A (L-WNK1-Δ11-DA) se previene el efecto activador de la L-WNK1 (figura 19). La activación del NCC se asocia con el aumento en la fosforilación de ciertos residuos de treonina en el extremo amino terminal, de los cuales el más importante es la T58 en el NCC de rata o T60 en el de humano (Pacheco-Alvarez et al., 2006). Este sitio puede ser detectado con fosfoanticuerpos específicos (Richardson et al., 2008). Por este motivo y dado que la activación por la L-WNK1 depende de su actividad cinasa, se analizó si la activación del NCC por la L-WNK1 está asociada con un incremento en la fosforilación del sitio T58/T60. De acuerdo con lo esperado, el incremento en la activi-

dad del NCC por la L-WNK1- Δ 11 está asociado con un aumento en la fosforilación del sitio T60 en el NCC en lisados totales de los ovocitos (figura 20A). En proteínas membranales se observa que la coexpresión de la L-WNK1 aumenta la abundancia del NCC total y del NCC fosforilado en este mismo sitio (figura 20B). El aumento en la actividad, la fosforilación y la abundancia en membrana del NCC mediadas por la L-WNK1 es similar al efecto reportado previamente para la WNK3 (Pacheco-Alvarez et al., 2012; Rinehart et al., 2005) y muestra que, como se propuso en nuestra hipótesis, la L-WNK1 es un activador del NCC.

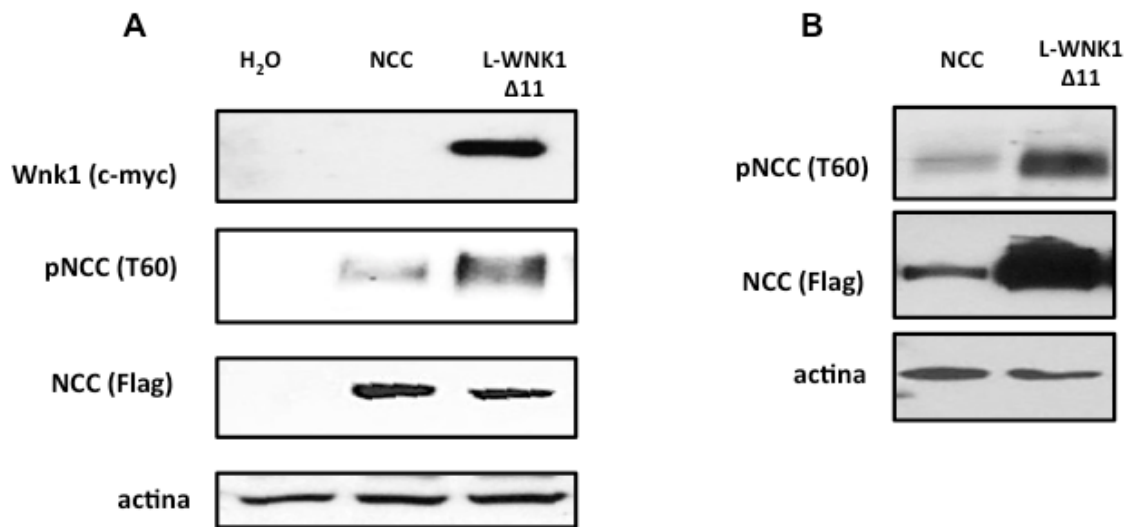


Figura 20. La L-WNK1- Δ 11 aumenta la fosforilación del NCC y su abundancia en la membrana. Inmunodetección tipo Western blot representativos en los que se detecta la abundancia de NCC total (Anti-Flag), WNK1 (anti-myc), pNCC (anti-T60) o actina hechos con extractos de proteínas totales (A) o con proteínas purificadas de la membrana (B)

Es importante resaltar que incluso la isoforma de humano carente de los exones 11 y 12, la L-WNK1- Δ 11- Δ 12, aumentó significativamente la actividad del cotransportador (figura 19), efecto que no había sido detectado en estudios previos con la clona obtenida de la rata. Esta discrepancia pudo deberse a diferencias entre la secuencia de la rata o del humano o quizás a mutaciones no deseadas adquiridas en alguna de las dos secuencias. Tanto el cDNA de la rata clonado por Melanie Cobb como el del humano se encuentran en el vector de expresión específico de *X. laevis*, el pGH19, por lo que se descartó la hipótesis de que la discrepancia entre los efectos de ambas clonas sea consecuencia de la expresión heteróloga o de la esta-

bilidad del RNAc. Para analizar el origen de dicha discrepancia, las secuencias de rata y de humano se compararon de acuerdo con la información en las bases de datos correspondientes. En dicha comparación no se encontró ninguna diferencia obvia que explique la incongruencia entre los resultados. Por ello secuenciamos nuevamente el cDNA de la clona proveniente del laboratorio de Cobb (Xu et al., 2000). La secuenciación arrojó dos mutaciones que modifican a dos aminoácidos. La primer mutación produce un cambio en la isoleucina ubicada en la posición 1950 por una valina; la segunda mutación cae en el aminoácido 2120 y produce el cambio de una glicina por una serina (figura 21A). Los dos sitios están conservados en todas las secuencias de WNK1 de los mamíferos y también en la secuencia de WNK1 obtenida de *X. laevis*. En la figura 21B se observa la comparación de las secuencias

Figura 21. La variante r-L-WNK1-Δ11 presenta dos mutaciones no deseadas. A. Alineamiento de la secuencia correspondiente al cDNA clonado en el laboratorio de Melanie Cobb (AAF74258) (Xu et al., 2000) contra la secuencia obtenida de en el NCBI (NM053794). Se identificaron las mutaciones V1951I y G2120S en la clona proveniente del laboratorio de Cobb. B. Alineamiento entre un fragmento del C-terminal de la WNK1 de distintas especies. La glicina en la posición 2120 está conservada en todas estas secuencias.

entre algunas especies del sitio G2120.

A

AAF74258 1 NP446246 1	MSDTEAEKQSGT P G F L S P P A P V P K N G S S D S S V G E K L G A A V A D S G I R T E E Y R R R R H T M D	AAF74258 1081 NP446246 1081	PFLTSIAGVQTVAASTPPSVSPITSSPLNDISTVMQSEGALPTDKIGGVTTSTGVVAS
AAF74258 61 NP446246 61	KDSRGAATTTPTHEFRFRSVCDSNATALEPLPLSIPQSPVAVVPGSAPPEPHRE	AAF74258 1201 NP446246 1201	GTTVSSVAVFNAPFTVLQQVAGNTAGVAIVTSVSTTTPPFAMASQSPPLGSSSTSAFT
AAF74258 121 NP446246 121	ETLTATVASVQSQPSAAASPGQAVVGSATATVPSSTSKDRPVSQPSLVGSKKEPPSPR	AAF74258 1261 NP446246 1261	LAETVVVSAHSLDKASHSSTAGLGLSFCAPSSSSSSSGTAVSSSVQPGIVHPLVISSAIA
AAF74258 181 NP446246 181	SGSGGGASAKFQPERNQDDIEELKRAVGMNDGRFLKFDIEIGRGSFKTVYKGLD	AAF74258 1321 NP446246 1321	STPVLQPAVPTSTPLLPQVFNIPPLVQVAVNPAVQQTLLHSQPALLPQPHHTHPE
AAF74258 241 NP446246 241	TETTVEVAVCELQDRKLTSEQRQRFKEEAEMKLGQHPNIVRFYDSWESTVKGKCIIVLV	AAF74258 1381 NP446246 1381	MDATQSKAPGIDDIKLEKLRSLFSESSSSGTQHASVLSLETPLVETVTPGIFTTAVA
AAF74258 301 NP446246 301	TELMSTGLTKYLKRFKVMKIKVLRWCQQLKGLQFLHTRTPPIIHRDLKCDNIFITGP	AAF74258 1441 NP446246 1441	PSKLMSTTSTCLPPTNPLGTAGMPVMPVGTGQVSTPGTHASAPASTATGAKPGTTFP
AAF74258 361 NP446246 361	TGSVKIGDLGLATLKRASFAKSVIGTFEPMAPEMYEKEYDESVDVYAFGMCMLEMATSEY	AAF74258 1501 NP446246 1501	KPSLTKTVVFPVGTLSAGTVPCQLPPFPGPSLIQTQQPLEDLDAQLRRLTLPSPETIPVT
AAF74258 421 NP446246 421	PYSECQAAQIVRRVTSVGVKPAFDFKVAIPEVKEIIEGCIQNKNDERSYIKDLLNHAFQ	AAF74258 1561 NP446246 1561	PAVGPLSTMSSTAVTEAGSQPKDGTVEHVTAASSGAGVVMGRFQVSVTMDDAQKERKN
AAF74258 481 NP446246 481	EETGVRVLAEDDGEKIAIKLNLRIEDIKKLGKGYKNEAIEFSFLDRDVPEDVAQEM	AAF74258 1621 NP446246 1621	RSEDTKSVHFESSTSESVLSSSSPESTLVKPEPNGITVSGILSDVPDTHRTPTPEAKS
AAF74258 541 NP446246 541	VESGYVCEGDHKTAKAIKDRVSLIKRREQRQLVREEQEKRRQEESSFKQNEQQAASVS	AAF74258 1681 NP446246 1681	ETGQPTKVGRFQVTTANKVGRFVSRTEDKVELKKEGVPVTSFRDSEQTVIPAAIPKK
AAF74258 601 NP446246 601	QAGIQPLSVASGTIPATPTTSASVSTQVEPEPEADQHQQLQYQQPSISVLSDGTVDSSGQ	AAF74258 1741 NP446246 1741	EKPELAEPSHLGPNSSDLEAAFLSRGGEDGSGSPHSPHLCSSKSLPIQTLQSLQNSFN
AAF74258 661 NP446246 661	GSSVFTESRVSSQTVSYGSQHEQHSIGTAPGHTVSSIQAQSQPHGVYPPSSMAQQNQ	AAF74258 1801 NP446246 1801	SYMSSDNESDIEEDLRLRLRRLREKHLKEIQDLQRKHIEISLYTKLGVPPAVIIPP
AAF74258 721 NP446246 721	GQPSLLAGVLSQPQHPQOQGIQTPVPPQAVQYSLPQAASSSEGTVPVSPQVQVQVAG	AAF74258 1861 NP446246 1861	AAPLSGRRRPTKSKGSKSRSSSLGNKSPQLSGNLSGQSGTSLVNLPPQTLHPGNTPET
AAF74258 781 NP446246 781	TQSSTQGVSAAPPEQTFITQSQPTQVFLVSSVDSAHSDVASGMSDGNENAPSSGRHE	AAF74258 1921 NP446246 1921	GHNQLLPLKPSPSDNLYSAFTSDGAIIPSLSAPGQGTSSNTVGGTVSSQAQAQPP
AAF74258 841 NP446246 841	GRTTKHRYKSVRSRSHKTSRPKLRLINVSNGKDRVVECCLETHNRKMVTFKFDLDGD	AAF74258 1981 NP446246 1981	AMTSSRKGTFDDLHLKLVNDWARDAMNLSGRRGSKGHMVEYEGPMARKFSAAPQLCISMT
AAF74258 901 NP446246 901	NPEEIIATVMNDFILAIERESFVAQVREIEKAEMLSEEDVSVVEPEGGQGLSLQKQDD	AAF74258 2041 NP446246 2041	SNMGGSTPIISAASATSLGHFTKSMCPQYGFPAAPFGTQWSGTGGPAQPPLGQFPQVGT
AAF74258 961 NP446246 961	YGFPGSQLEGEFKQPIAVSMPQIGVPTSSLTQVHVSAGRFRFVSPVPSRLRESKIF	AAF74258 2101 NP446246 2101	TSLQNFNISNLKQISINPISNLRT 2126 G 2126
AAF74258 1021 NP446246 1021	TSEIPDVAASTSGGPMNLSHSASSLSLQQAFAFSELKHGQMTGENTAPPNFHFGPTFS		

B

Rat WNK1 AAF74258.1	2104 QNFNISNLQKSISNPP	S	SNLRTT
Rat WNK1 NP446246.2	2104 QNFNISNLQKSISNPP	G	SNLRTT
Human WNK1 NP061852.3	2360 QNFNISNLQKSISNPP	G	SNLRTT
Mouse WNK1 NP941992.2	2355 QNFNISNLQKSISNPP	G	SNLRTT
Xenopus WNK1 NP001090703.1	2080 QNFGISSLQKSISNPQ	G	SNLRTT
Zebrafish WNK1 XP689656.	2392 QTFHISTLQKSVSHPG	G	PNLKST
		*	* * * * * * * * * * * * * * *

Dado que el cambio de una isoleucina por una valina representa una modificación menor, se decidió analizar los efectos del cambio S2120. Para analizar si la mutación S2120 afecta la actividad de la L-WNK, se revirtió esta mutación en el cDNA de la rata para evaluar si la presencia de esta mutación abatía los efectos de la L-WNK1-Δ11-Δ12 de rata sobre el NCC. En la figura 22 se observa que la clona revertida de rata, la r-L-WNK1-Δ11-Δ12-G2120 aumenta la actividad del cotransportador en los ovocitos (figura 22A). De manera contraria, la generación de la mutación S2120 en la clona humana pierde su efecto sobre el NCC (figura 22B) Estos experimentos funcionales muestran que la clona proveniente de la rata contiene una mutación no deseada e inesperada que interfiere con la activación del NCC por la L-WNK1. Dados estos hallazgos, en este trabajo se propone que en los experimentos previos, en los que se utilizó la WNK1 de rata donada por Melanie Cobb, no observaron el efecto directo entre la L-WNK1 y la actividad del NCC debido a la mutación S2120.

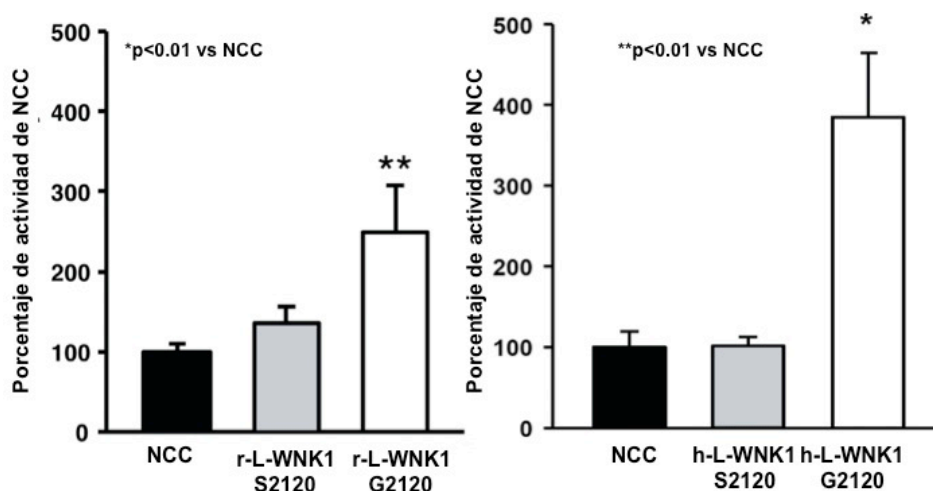


Figura 22. La mutación S2120 afecta la actividad de la r-L-WNK1. A) La actividad del NCC no cambia con la variante r-L-WNK1 S2120. La coexpresión del cDNA al que se le revirtió la mutación aumenta la actividad del al NCC en ovocitos *X. laevis*. **B)** La variante h-L-WNK1-S2120 pierde el efecto positivo de la isoforma silvestre h-L-WNK1 G2120

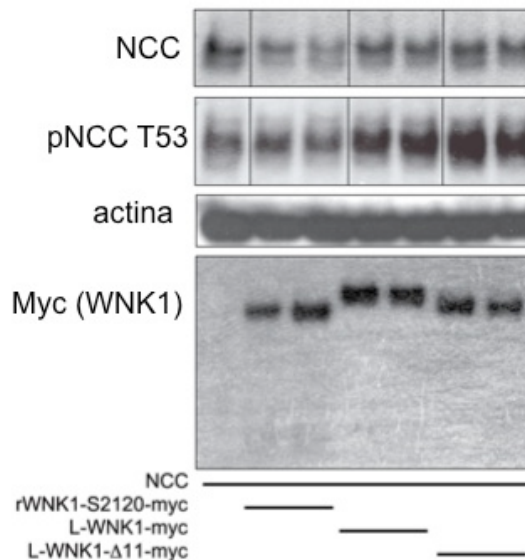


Figura 23. Las isoformas L-WNK1 y L-WNK Δ 11 pero no la r-LWNK1-S2120 aumentan la fosforilación del NCC en las células HEK293. Tanto la isoforma L-WNK1 como la L-WNK1- Δ 11 aumentan la fosforilación del NCC en la Treonina 53, contrario a la r-L-WNK1 S2120 que no tienen efecto sobre la fosforilación del NCC.

El efecto de la L-WNK1 Δ 11 y la L-WNK1 así como el de la isoforma r-L-WNK1-S2120 sobre la fosforilación del NCC se corroboró en las células de riñón HEK293 transfectadas con el NCC y estas cinasas, como lo muestra la figura 23. En esta figura se observa que las isoformas de humano L-WNK1 y L-WNK1 Δ 11 aumentan la fosforilación del sitio T53 del NCC, no así la isoforma de rata L-WNK1-S2120. Es de llamar la atención que en experimentos *in vitro* esta isoforma sí permite la fosforilación de algunos de sus sustratos como SPAK (Vitari et al., 2005), ERK (Xu et al., 2004) o la Synaptotragmina 2 (Lee et al., 2004), lo que sugiere que su actividad cinasa no está abolida. También sobresalta la ausencia de un efecto sobre la actividad del NCC, pero no sobre la regulación de otros transportadores, como ROMK (Cheng y Huang, 2011a; Cope et al., 2006; He et al., 2007; Lazrak et al., 2006; Liu et al., 2009; Wang et al., 2008); ENaC (Fu et al., 2006; Xu et al., 2005); TRPV4 (Fu et al., 2006); por mencionar algunos ejemplos. Esto sugiere que quizás existen diferentes mecanismos de regulación por la L-WNK1 y sólo respecto al mecanismo de regulación del NCC se anula co-

mo consecuencia de la mutación S2120 en la isoforma de rata. De hecho, este sitio se encuentra a sólo 8 aminoácidos de distancia de un sitio susceptible a la fosforilación por AKT/SGK, el sitio T2128 (figura 24). Nuestros resultados sugieren la necesidad de hacer un análisis mucho más detallado en cada uno de los trabajos arriba mencionados y, de requerirse, rectificar las conclusiones obtenidas.

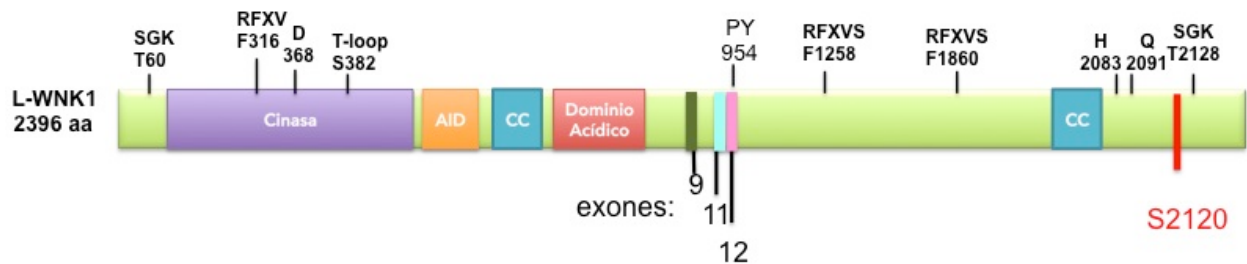


Figura 24. Diagrama que representa algunos dominios de la L-WNK1 y la KS-WNK1. La L-WNK1 tiene un dominio de actividad cinasa que contiene un ácido aspártico (D) fundamental para la actividad cinasa, un sitio de transfosforilación (T-loop) y un dominio de unión a SPAK (RFXI/V). Además presenta un dominio autoinhibitorio (AID), dominios helice-helicoidal (CC) y un dominio ácido. Además, tiene sitios probables fosforilables por SGK/AKT. La proteína tiene otros dos dominios de unión a SPAK, y sitios de interacción con otras WNK (HQ). En este esquema se muestra la ubicación de los exones y un sitio de interacción PY contenido en el exón 12. Además se refiere el número de aminoácido de cada sitio. El sitio S2128 (en rojo) es el sitio equivalente al mutado en la clona de rata

Como previamente se mencionó, los datos bioquímicos muestran que la L-WNK1 activa a SPAK a través de aumentar su fosforilación (Moriguchi et al., 2005; Vitari et al., 2005), y que la activación de SPAK aumenta la actividad del NCC (Rafiqi et al., 2010; Richardson et al., 2008). Sin embargo, no ha sido posible identificar la relación directa WNK1-SPAK-NCC debido al uso de una clona no funcional. Para analizar si existe esta relación lineal -como se ha reportado respecto a la activación del NCC por la WNK3 (Pacheco-Alvarez et al., 2012)-, se eliminó uno de los sitios de unión a SPAK en la L-WNK1 Δ 11: el sitio F316 al generar la mutante L-WNK1- Δ 11-F316A. Estudios previos han reportado que la eliminación del sitio equivalente en la WNK3 anula su efecto positivo sobre el NCC (Pacheco-Alvarez et al., 2012). La expresión de la L-WNK1- Δ 11-F316A no sólo previno la activación del cotransportador, sino que además mostró una inhibición significativa sobre su actividad (figura 25). Este efecto

puede deberse a que la L-WNK1- Δ 11-F316A interaccione con la WNK1 endógena presente en los ovocitos (San Cristobal et al., 2008a) debido a la oligomerización entre la isoforma endógena y la exógena (Lenertz et al., 2005). Se ha reportado que las WNKs pueden interactuar a través de sus dominios amino y carboxilo terminal (Yang y Ellison, 2003; Yang et al., 2007a) y que, al menos desde el punto de vista bioquímico, esta interacción requiere de un motivo conservado de una histidina y una glutamina (motivo HQ) presente en el carboxilo terminal de las WNK (Thastrup et al., 2012).

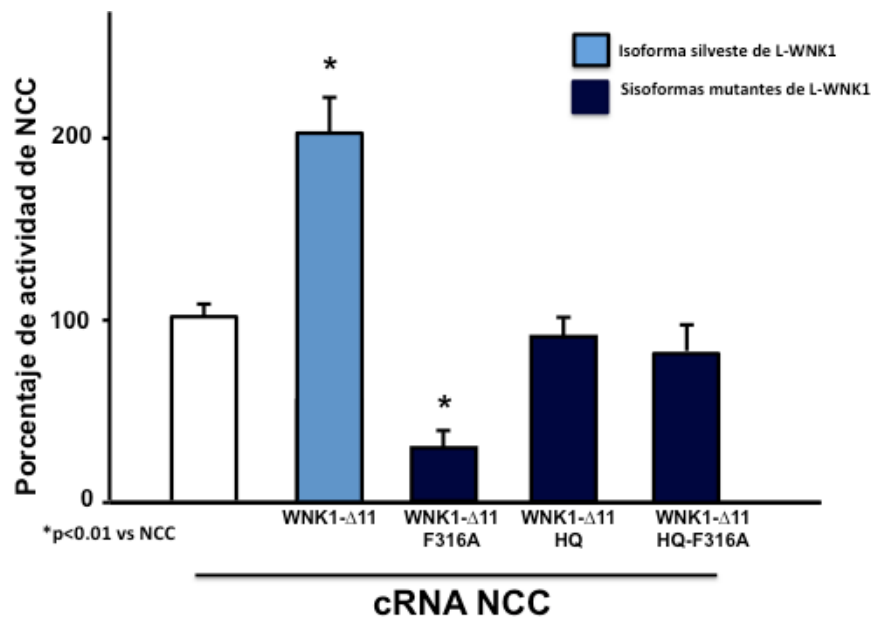


Figura 25. La L-WNK1- Δ 11 requiere de SPAK y de la formación de dímeros para activar al NCC. En ovocitos de *X. laevis*, la coexpresión de la isoforma L-WNK1- Δ 11-F316A, que tiene una mutación puntual que evita la unión a SPAK, produce un efecto dominante negativo al disminuir la actividad del NCC. La eliminación del motivo de interacción entre las WNK, el motivo HQ previene tanto la activación por la L-WNK1- Δ 11 como la inhibición por la L-WNK1- Δ 11-F316A.

Para probar si el efecto negativo de la L-WNK1-F316A se debe a la interacción con la WNK1 endógena, por mutagénesis sitio dirigida, se interrumpió el motivo HQ al sustituir la secuencia HIQEVVSLQT por la secuencia AIQEVVSLAT en las clonas L-WNK1- Δ 11 y L-WNK1- Δ 11-F316A. La coexpresión de la mutante L-WNK1- Δ 11-HQ previno tanto el efecto positivo en la WNK1- Δ 11, como el efecto inhibitorio de la WNK1- Δ 11-F316A (figura 25). Estos resulta-

dos muestran que la interacción entre monómeros de WNK1 a través del dominio HQ es necesaria para la activación del NCC y sugieren que la mutación WNK1- Δ 11-F316A actúa como una isoforma dominante negativa que secuestra físicamente a la variante endógena; por lo que la actividad del NCC en los ovocitos depende de la actividad de la WNK1 endógena del ovocito.

Dado que los resultados obtenidos en ovocitos muestran que la actividad basal del NCC se debe a los efectos de la WNK1 endógena y que se requiere a SPAK para la activación del NCC, se analizó el papel de la WNK1 endógena en las células HEK293 sobre la fosforilación del NCC. Para ello, se hizo un *knock-down* de WNK1 con un siRNA específico para la L-WNK1 (figura 26). La transfección de este siRNA disminuyó la abundancia de la L-WNK1 endógena además de reducir la abundancia del NCC fosforilado.

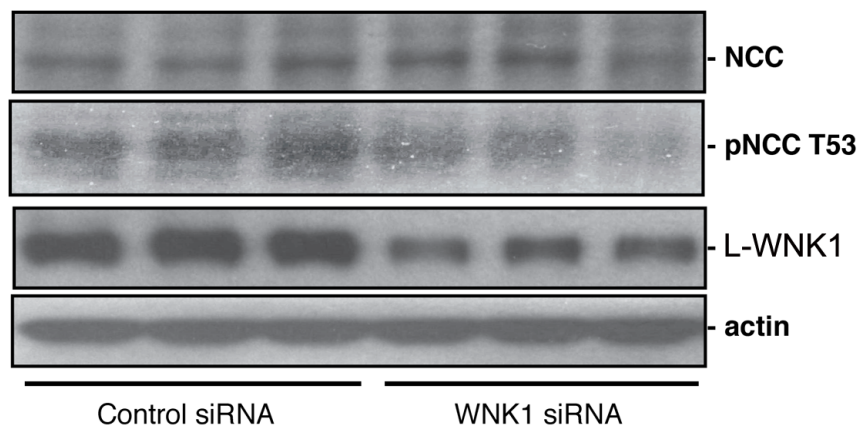


Figura 26. La L-WNK1 endógena se requiere para la fosforilación del NCC en células HEK293. Ensayos de inmunodetección tipo Western Blot de células HEK293 transfectadas con siRNA control o específico de WNK1 para disminuir su expresión. La disminución de la L-WNK1 endógena previene la fosforilación del NCC.

Los resultados aquí presentados muestran que la L-WNK1 es un regulador positivo del NCC ya que produce un aumento en la activación, la fosforilación y en la abundancia del cotransportador de manera dependiente de SPAK (figura 27). La isoforma más abundante en el riñón, la L-WNK1- Δ 11, que coexiste con el NCC, produjo el mayor aumento en la actividad

del cotransportador. Hasta la fecha, en trabajos previos no había podido observarse este efecto positivo sobre la actividad del cotransportador debido al uso de una isoforma que contiene una mutación no deseada que afecta su efecto sobre él. Este efecto positivo de WNK1 sobre NCC es similar al que se ha observado previamente con la WNK3 (Pacheco-Alvarez y Gamba, 2011; Pacheco-Alvarez et al., 2012; Rinehart et al., 2005) Estos resultados apuntan la convergencia de las vías de señalización de estas dos proteínas y sugieren que en el ratón carente de WNK3 (Mederle et al., 2013; Oi et al., 2012), la WNK1 compensa la pérdida de la otra cinasa, y de ahí su fenotipo sutil.

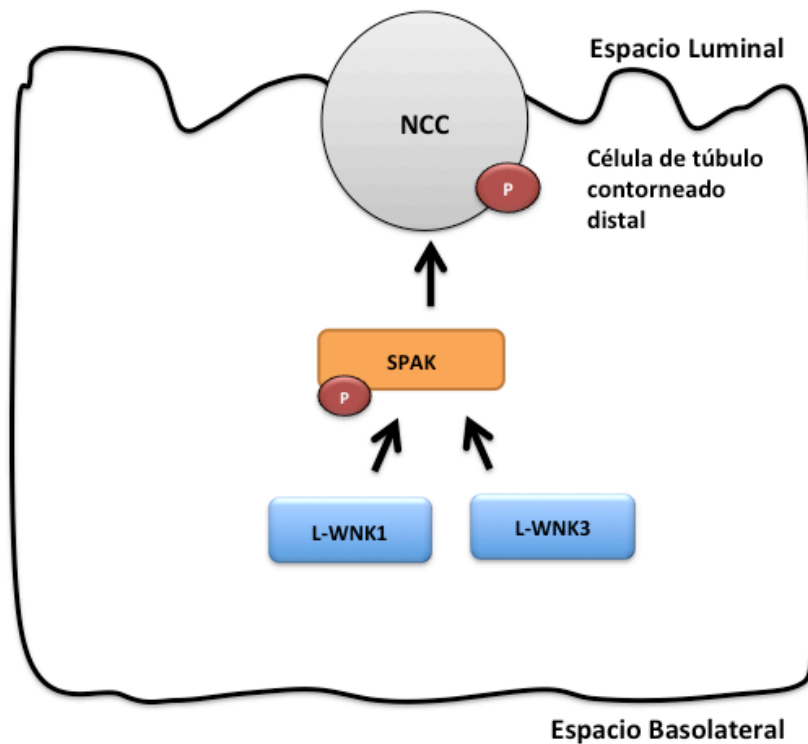


Figura 27. La L-WNK1 es un activador del NCC a través de la interacción con SPAK, así como lo es la WNK3 (Pacheco, 2011)

La cinasa WNK4 inhibe al NCC al inhibir a las cinasas L-WNK1 y WNK3

Como se ha hablado a lo largo de este trabajo, las cinasas L-WNK1 y WNK4 parecen ser claves en la regulación del NCC al ser la causa de la enfermedad PHAll; y por consiguiente, junto con el NCC, tienen un papel importante en la modulación del balance de electrolitos y en la presión arterial. La evidencia hasta el momento muestra que existe una interacción compleja entre las WNK, SPAK y el NCC, pero aún no están claros los mecanismos de esta interacción. Como se ha expuesto a lo largo de este trabajo y sólo para recordarle al lector, la cinasa WNK4 produce una inhibición del NCC en ovocitos de *X. laevis* (Glover et al., 2010; Wilson et al., 2003; Yang et al., 2003) y en ratones (Castaneda-Bueno et al., 2012b; Lalioti et al., 2006); los efectos positivos de WNK3 y los negativos de WNK4 sobre el NCC compiten entre sí (Yang et al., 2003); y WNK1 y WNK3 tienen una mayor afinidad por SPAK que la WNK4 (Vitari et al., 2005). Como también se mencionó en apartados anteriores, parte de este modelo está basado en las observaciones de Yang y colaboradores que utilizaron la clona de rata mutada, la rL-WNK1- Δ 11- Δ 12-S2120 (Yang y Ellison, 2003).

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que la L-WNK1 tiene un efecto positivo sobre la actividad del NCC y que lo hace a través de SPAK, como ocurre con la regulación del cotransportador por la WNK3 (Pacheco-Alvarez et al., 2012). Por esta razón, se decidió probar el efecto de la coexpresión de la WNK4 y la L-WNK1- Δ 11 sobre la actividad del NCC y compararlo con el efecto de la WNK4 sobre la WNK3 previamente sugerido por Yang y colaboradores (Yang et al., 2003).

En la figura 28 se observa que, como se ha reportado en trabajos anteriores (Wilson et al., 2003; Yang et al., 2003), la coexpresión de WNK4 con el NCC disminuye la actividad del cotransportador. Nótese que además la presencia de la WNK4 previene en forma significativa el efecto positivo de la L-WNK1 y de la WNK3 sobre el NCC al ser coexpresadas. Cabe mencionar que la sobreexpresión de la L-WNK1 y la WNK3 no produce un efecto sinérgico o aditivo sobre la captación de sodio dado que ambas cinasas activan al cotransportador a través de la activación de SPAK, ya que convergen en la misma vía de activación del NCC.

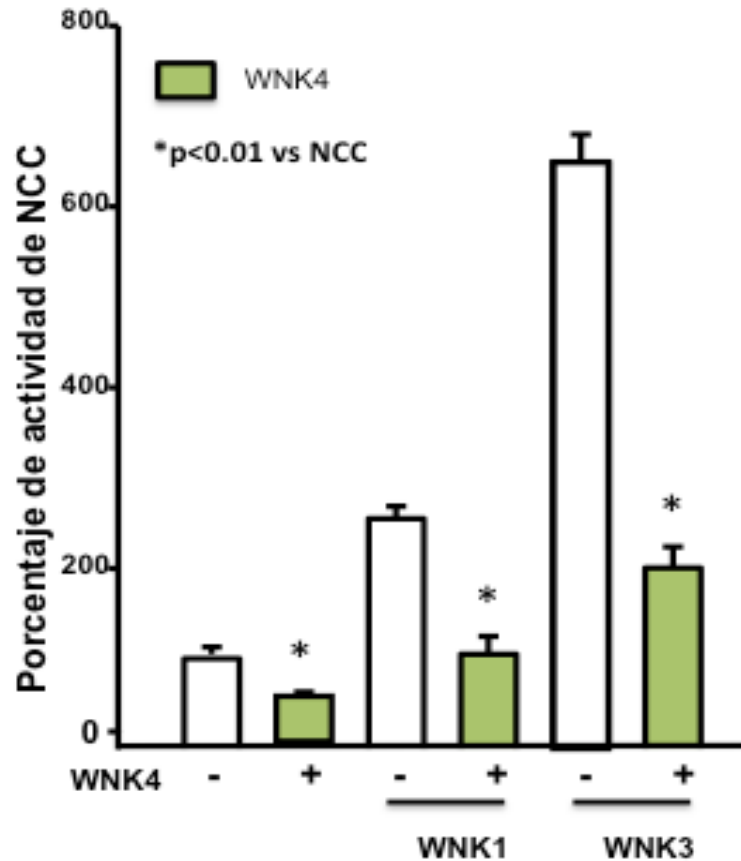


Figura 28. La WNK4 inhibe la actividad del NCC, y previene el efecto positivo tanto de la L-WNK1 como de la WNK3. La actividad del NCC se midió en ovocitos de *X. laevis* en presencia de las cinasas L-WNK1 o WNK3 con o sin WNK4.

Dada la inhibición de la actividad del NCC en los ovocitos *X. laevis* por la WNK4, se evaluó el efecto de la coexpresión de las cinasas WNK4 y L-WNK1 sobre la fosforilación del cotransportador en células HEK293. En la figura 29 se muestra que la fosforilación del NCC por la L-WNK1 disminuye cuando se coexpresa la WNK4.

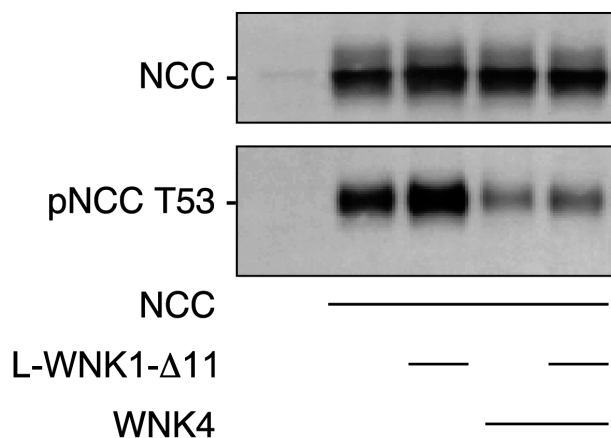


Figura 29. La fosforilación del NCC por la L-WNK1-Δ11 se previene por la WNK4. Inmuno-detección tipo Western Blot de células HEK293 transfectadas con la L-WNK1-Δ11 y con la WNK4. La presencia de la WNK4 previene la fosforilación del NCC inducida por la L-WNK1-Δ11 .

La inhibición de la WNK4 sobre la L-WNK1 y la WNK3 puede deberse a la interacción física entre ellas a través de los dominios HQ de interacción entre las WNK (Thastrup et al., 2012). Para evaluar esta hipótesis, se generó la mutante WNK4-HQ en la que se sustituyó el motivo HIQEVVSLQT por AIQEVVSLAT y, así, prevenir la interacción entre las WNKs (Thastrup et al., 2012). Como se observa en la figura 30, el efecto inhibitorio de la WNK4 sobre el NCC se pierde cuando se coexpresa la mutante WNK4-HQ con el NCC, quizás al prevenirse la inhibición sobre la WNK1 endógena. En dicha figura se observa que la eliminación del motivo HQ en WNK4 (WNK4-HQ) también previno la inhibición sobre las cinasas L-WNK1 y WNK3. Nuestros resultados revelan que la WNK4 inhibe a la L-WNK1 y a la WNK3 debido a la interacción física entre ellas a través de los motivos HQ. Estos resultados son la primera evidencia funcional reportada hasta ahora que demuestra la relevancia biológica de estos sitios de interacción entre las WNK identificados previamente en estudios *in vitro* (Thastrup et al., 2012).

Los efectos obtenidos en ovocitos y en células renales ubican a la cinasa WNK4 río arriba de las cinasas L-WNK1 y WNK3 y no río abajo de la L-WNK1 como el modelo anterior (figura 11) sugería. Esta vía de señalización no se había identificado dado el uso de la clona de L-WNK1 proveniente de la rata con la mutación S2120. Los resultados obtenidos por Yang y colaboradores (Yang et al., 2003), e la sobreexpresión de la L-WNK1 impide la inhibición del

NCC mediada por la WNK4 debido a que estas proteínas están interaccionando entre sí, mientras se libera la inhibición de la WNK4 sobre la WNK1 endógena y, así, la actividad del NCC regresa a sus niveles basales.

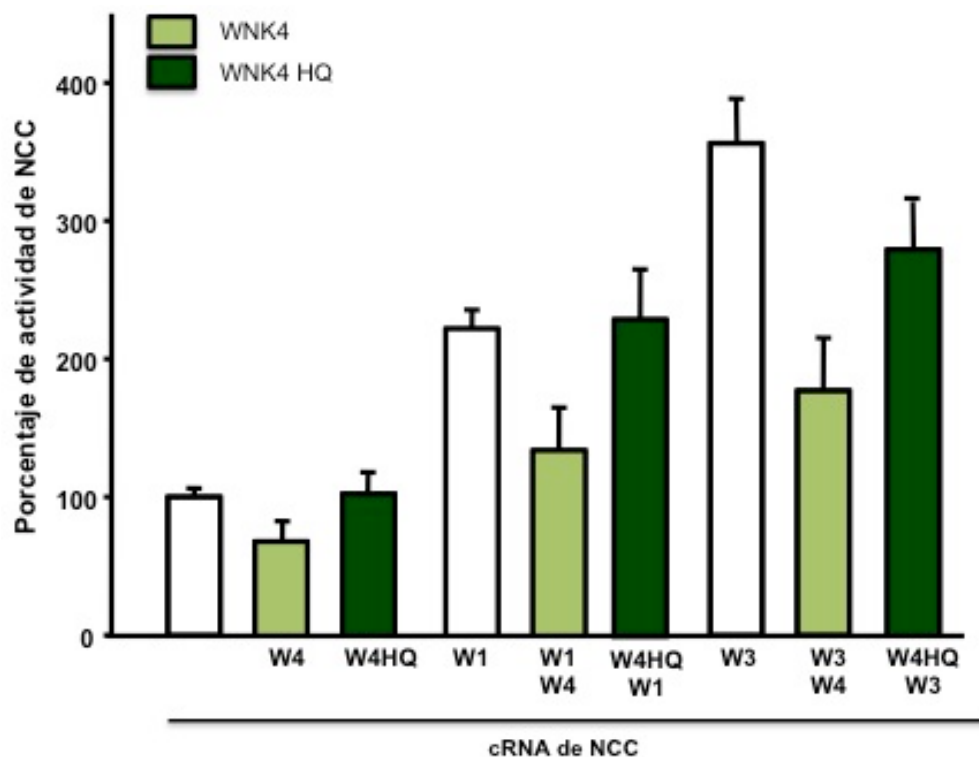


Figura 30. La WNK4 interactúa con las cinasas L-WNK1 y WNK3 a través de los dominios HQ. La coexpresión de la isoforma de WNK4 que tiene eliminado el sitio de interacción entre las WNK (dominio HQ) previene la inhibición de la actividad del NCC por la WNK4.

Los resultados en ovocitos sugieren que la WNK4 se encuentran río arriba de las cinasas WNK1 y WNK3 y no viceversa, como previamente se había sugerido. Para determinar en un modelo *in vivo* la relación que hay entre las cinasas WNK4 y L-WNK1, así como el papel de la mutación intrónica en el gen de la *wnk1* en el desarrollo de la enfermedad PHAII, se generó una cruce entre el ratón $WNK1^{FHHT/+}$ (Vidal-Petiot et al., 2013) y el ratón $WNK4^{-/-}$ (Castaneda-Bueno et al., 2012b). El ratón $WNK1^{FHHT/+}$ reproduce la mutación encontrada en los pacientes con PHAII al estar eliminado un fragmento del primer intrón de la L-WNK1 (Vidal-Petiot et al., 2013). Esta mutación conlleva un aumento en la cantidad renal de la L-

WNK1 y se reproducen la manifestaciones clínicas de la enfermedad; ya que el ratón $WNK1^{FHHT/+}$ presenta hipertensión arterial, alcalosis metabólica e hiperkalemia. El ratón $WNK4^{-/-}$, por su parte, presenta un fenotipo Gitelman como consecuencia de niveles bajos de NCC fosforilado debido a la eliminación homocigótica de la WNK4. La hipótesis de este experimento es que si la cinasa WNK4, se encuentra río arriba de la L-WNK1, el fenotipo PHaII de los ratones $WNK1^{FHHT/+}$ persistirá a pesar del fenotipo Gitelman de los ratones $WNK4^{-/-}$. De manera contraria, si la L-WNK1 está río arriba de la WNK4 (como en el modelo de la figura 15), entonces la ausencia de la WNK4 será suficiente para revertir el fenotipo PHaII de los ratones $WNK1^{FHHT/+}$. Como muestra la figura 31 los ratones resultantes con genotipo $WNK1^{FHHT/+};WNK4^{-/-}$ mantienen el fenotipo PHaII de los ratones $WNK1^{FHHT/+}$ al retener tanto los desequilibrios metabólicos (tabla 3), como la hipertensión arterial (figura 31A) presente en los ratones $WNK1^{FHHT/+}$. Además, se observa que en los ratones $WNK1^{FHHT/+};WNK4^{-/-}$ la fosforilación del NCC está significativamente aumentada con respecto a los ratones silvestres, pero igual que en los ratones $WNK1^{FHHT/+}$ (figura 31B). La persistencia del fenotipo PHaII en el ratón $WNK1^{FHHT/+};WNK4^{-/-}$ confirma la ubicación de la cinasa WNK4 río arriba de la L-WNK1 y muestra que las mutaciones $WNK1^{FHHT/+}$ activan al NCC de manera independiente a la WNK4.

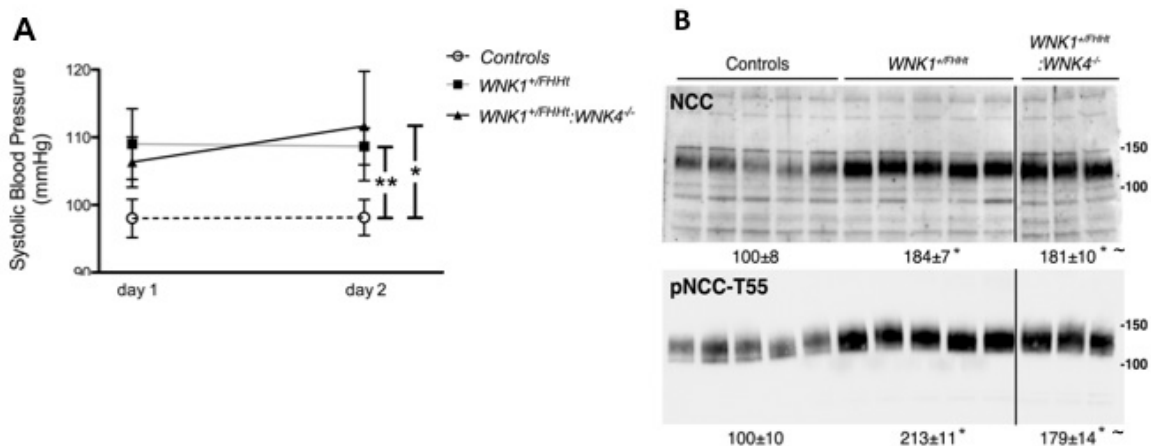


Figura 31. La L-WNK1 produce PHaII de manera independiente de WNK4. A) la presión arterial sistólica aumenta en los ratones $WNK^{+/FHHT}$ y en los $WNK^{+/FHHT};WNK4^{-/-}$. Cada carril representa a un individuo. $p < 0.05$ vs controles y $**p < 0.01$ vs controles. B) Inmunoblots de riñones de ratones contra NCC total y fosforilado. * $p < 0.05$ vs controles y N.S vs $WNK1^{+/FHHT}$.

La figura 32 muestra el resumen de los resultados mostrados en esta sección. La cinasa WNK4 modula a las cinasas L-WNK1 y WNK3 a través de la interacción física con ellas por los sitios HQ (panel A). Esto mantiene una actividad basal del cotransportador, la cual está aumentada en la enfermedad PHAII (figura 32B), quizás debido a que la sobreexpresión de la L-WNK1 sobrepasa a la inhibición por la WNK4. Esto también puede explicar por qué los ratones knockout de WNK3 no tienen fenotipo, a excepción del incremento en la expresión de la L-WNK1 (Mederle et al., 2013; Oi et al., 2012). Dado que las L-WNK1 y WNK3 tienen efecto similar sobre el NCC, el incremento en la L-WNK1 en estos ratones es probable que compense la pérdida de la activación del cotransportador por la WNK3, como se sugirió en el capítulo anterior.

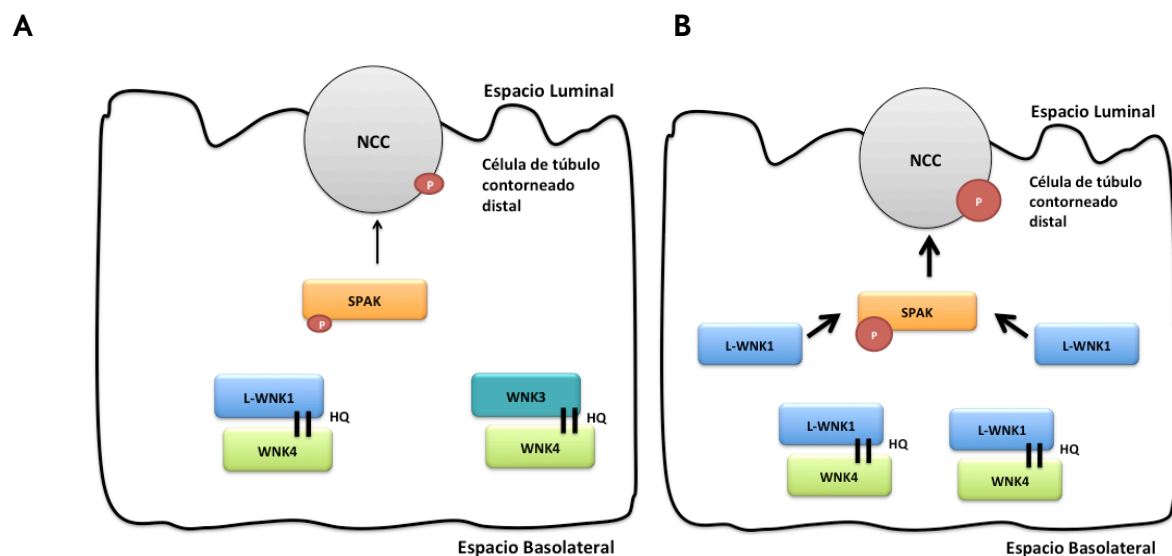


Figura 32. Esquema de regulación del NCC por WNK4. A) La WNK4 está río arriba de la L-WNK1 y de la WNK3 e interactúa con ellas a través de los dominios HQ para prevenir la activación de SPAK y de NCC. B) Hipótesis del fenotipo PHAII por la delección intrónica en el gen *wnk1*: las mutaciones intrónicas en WNK1 identificadas en el PHAII aumentan la abundancia de la L-WNK1 Δ 11, y sobrepasa a la inhibición de la WNK4.

La angiotensina II activa al NCC al prevenir la inhibición de WNK4 sobre L-WNK1 y WNK3

Hace algunos años, en nuestro laboratorio se mostró que la inhibición del NCC por la WNK4 puede prevenirse por la angiotensina II (San Cristobal et al., 2009), por lo que se propuso que la vía WNK4-SPAK es necesaria para que la angiotensina II pueda activar al NCC. Esto se corroboró posteriormente en modelos *in vivo* (Castaneda-Bueno et al., 2011).

Tomando en cuenta estas evidencias y los resultados previos mostrados en este trabajo, se propuso la hipótesis de que la inhibición de la WNK4 sobre la L-WNK1 y la WNK3 puede ser regulada por la angiotensina II. Para probar esto, se midió la captación de sodio en ovocitos inyectados con distintas combinaciones de las WNK en presencia o ausencia de la angiotensina II, como muestra la figura 33. En el panel A, la captación de sodio del grupo que expresa sólo al NCC se tomó como el 100% y los demás grupos se normalizaron con respecto a éste. En dicha figura se observa que la angiotensina II no modifica la captación de sodio en los ovocitos que expresan al NCC solo o con la L-WNK1, la WNK3 o con la combinación de ambas. Estos grupos muestran una inhibición significativa de la captación de sodio cuando WNK4 está presente. Sin embargo, esta inhibición mediada por la WNK4 se previene significativamente si estos mismos grupos se incuban en presencia de la angiotensina II. En el panel B de la figura 33, la captación de sodio sensible a tiazidas de cada uno de los grupos en ausencia de la angiotensina se tomó como el 100% y se ajustó la condición experimental en presencia de la hormona. En este panel se observa más claramente que sólo los grupos que expresan a la cinasa WNK4 responden a la angiotensina II.

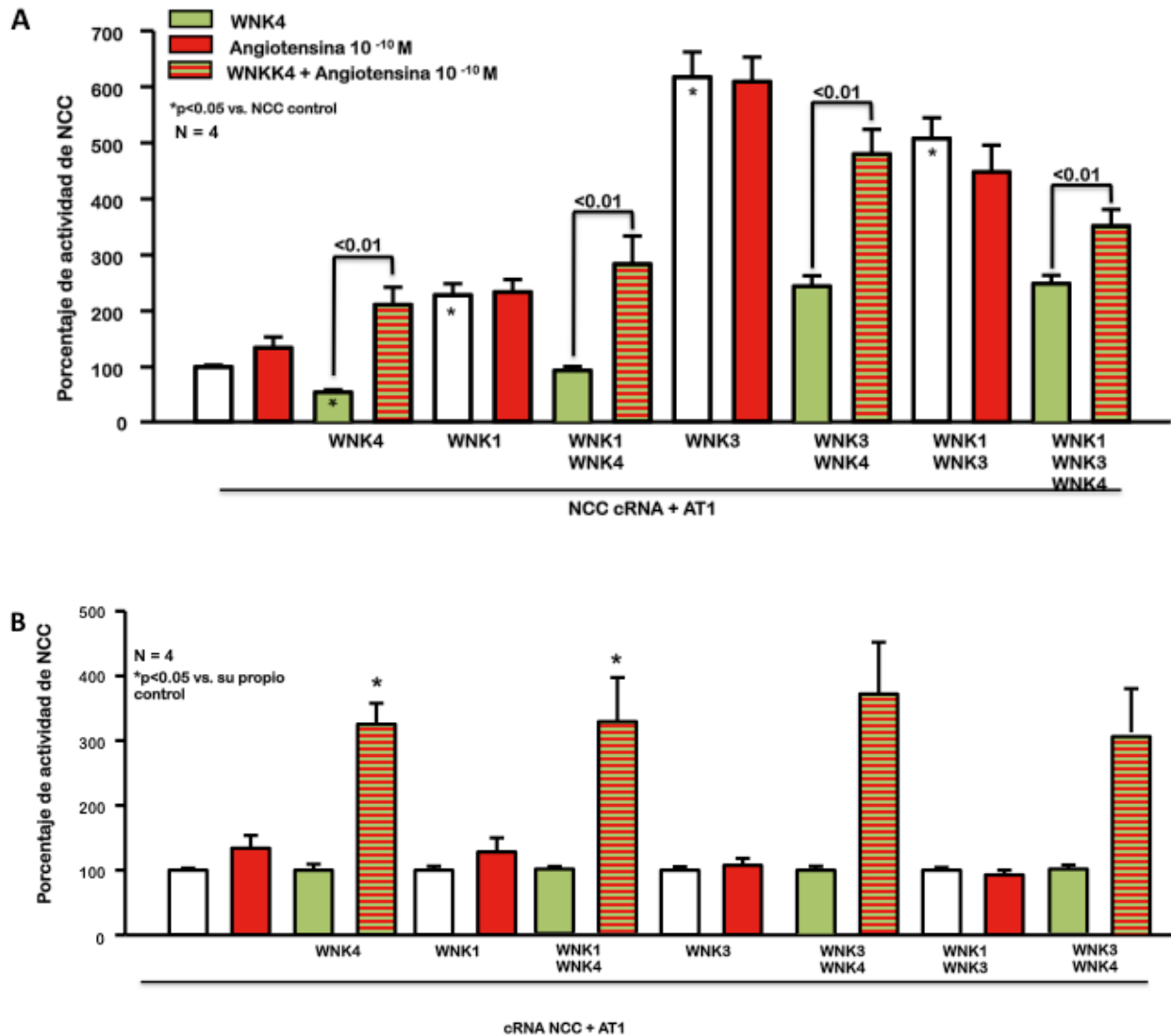


Figura 33. La WNK4 se requiere para la activación del NCC por la angiotensina. Se midió la captación sensible a tiazidas en ovocitos de *X. laevis* inyectados con distintas combinaciones de WNK en ausencia o presencia de la angiotensina (100pM). Todos los grupos se inyectaron con cRNA del NCC y del receptor AT1. En A, se ajustó la captación de sodio del grupo de NCC sólo y los demás grupos se compararon con éste. B) La captación de sodio de cada combinación de WNK en ausencia de la angiotensina se tomó como el 100Porcentaje y los grupos con angiotensina II se normalizaron de acuerdo con su control.

De acuerdo con estos resultados, la WNK4 actúa como un inhibidor de la actividad del co-transportador NCC al inhibir a las cinasas L-WNK1 y WNK3 a través de la interacción física entre ellas (figura 30), pero también actúa como un activador (figura 33) en condiciones en las que está presente la angiotensina II -como ocurre en la hipovolemia o ante restricciones

en la ingesta de sal-. El mecanismo por el que la angiotensina II activa al NCC a través de prevenir la inhibición por la WNK4 aún no está definido y se requieren más estudios al respecto. Sin embargo, nosotros proponemos dos hipótesis que pueden explicar este mecanismo. La primera es que la angiotensina II activa a las moléculas de WNK4 libres en la célula, es decir las que no están unidas a la L-WNK1 o a la WNK3; y la WNK4 activada por la angiotensina II, ahora es capaz de activar directamente a SPAK y, éste al NCC (figura 34A). La segunda, que consideramos la más factible dados los resultados de la figura 33B, es que la angiotensina II puede liberar la interacción física de la WNK4 con la L-WNK1 y la WNK3, y estas dos cinasas, ahora libres, aumentan la fosforilación de SPAK y por consiguiente se activa el NCC (figura 34B). En un trabajo publicado recientemente por Na y colaboradores, se observa que la WNK4 fosforila a OSR1 cuando aumenta el calcio intracelular (Na et al., 2012), y de hecho, la unión de la angiotensina II a su receptor AT1 de tipo Gαq produce un incremento en los niveles del calcio intracelular. Aunque el mecanismo por el que la WNK4 responde a los cambios en el calcio intracelular aún no está bien definido, se han reconocido dominios de unión a calcio en el extremo amino terminal de WNK4, que posiblemente pueden percibir cambios en las concentraciones de este ion. Este mecanismo produciría un cambio conformacional en la WNK4 que libere la interacción con las cinasas L-WNK1 y WNK3, y así, se libera la inhibición de éstas. Sin embargo, se requieren estudios más detallados en los que se evalúe la interacción de la WNK4 con la L-WNK1 o la WNK3 en ausencia y presencia de la angiotensina II por ensayos de inmunoprecipitación.

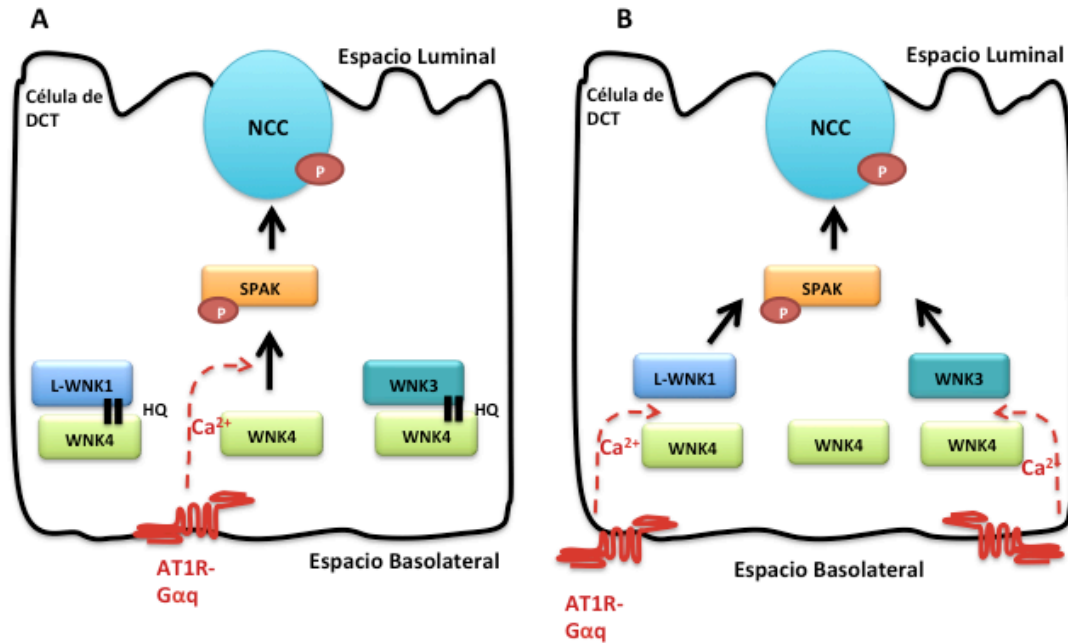


Figura 34. La angiotensina requiere de WNK4 para activar al NCC. Se muestran dos mecanismos posibles de los efectos de la angiotensina sobre la WNK4. En A, la angiotensina induce la fosforilación de SPAK y de NCC al activar a las moléculas libres de WNK4. En la segunda hipótesis, B, la angiotensina libera la inhibición de WNK4 sobre la L-WNK1 y la WNK3 y permite la activación de SPAK y del NCC

La proteína KS-WNK1 es un regulador positivo del NCC

Como se mencionó previamente, el gen que codifica a la WNK1 genera dos isoformas en el riñón (figura 14). Una isoforma larga, la L-WNK1, que según nuestros resultados aumenta la actividad del NCC de manera dependiente de SPAK y que se regula negativamente por la interacción con WNK4. La segunda isoforma se genera a partir de un promotor alternativo de este gen que comienza la transcripción en el exón 4 y da origen a una variante corta específica del riñón que no contiene al dominio cinasa (fig. 35). Los resultados obtenidos en este trabajo cambian el paradigma de regulación del NCC ya que ubican a la cinasa L-WNK1 como un activador directo del NCC. Como el modelo de la figura 15 muestra, Subramanya y colaboradores (Subramanya et al., 2006) proponen a la variante KS-WNK1 como un regulador negativo de la L-WNK1. Este modelo proviene de las observaciones reportadas por este grupo, en las que la coinyección de la KS-WNK1 no modifica la captación de sodio por NCC y tampoco modifica la inhibición del NCC por WNK4, pero sí inhibe los efectos de la L-WNK1 sobre la inhibición de la WNK4 (Subramanya et al., 2006); es decir la KS-WNK1 previene el efecto de la L-WNK1 sobre la WNK4 y actúa como un inhibidor indirecto del NCC.

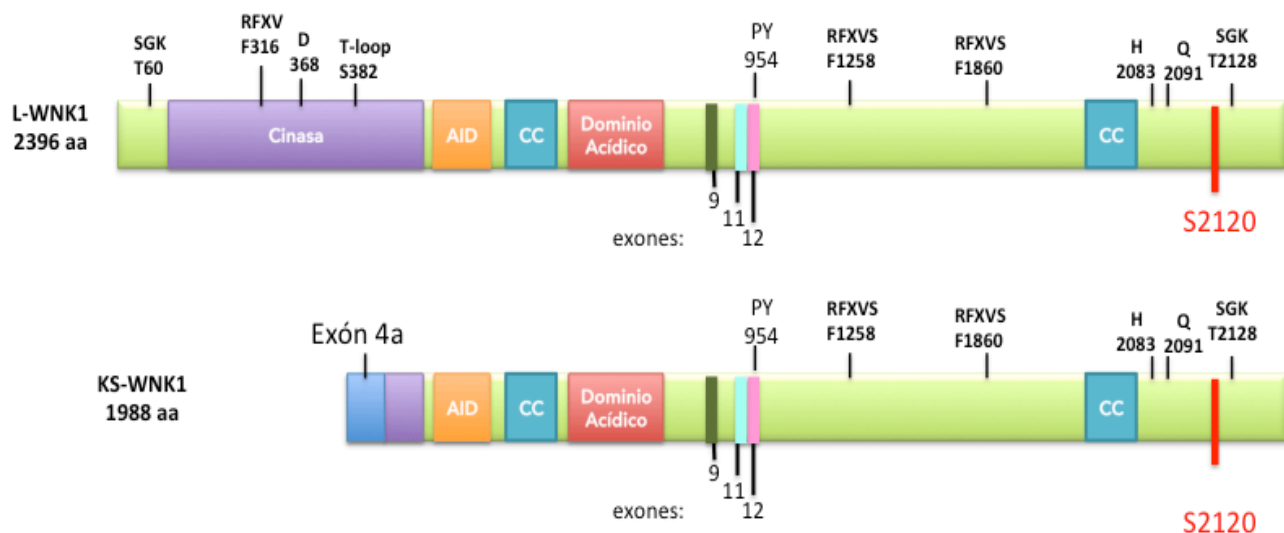


Figura 35. Comparación entre los dominios de la L-WNK1 y la KS-WNK1. La variante específica de riñón KS-WNK1 no tiene dominio cinasa, a diferencia de la L-WNK1. Sin embargo, sí presenta todos los demás dominios de unión a SPAK y de regulación por otras proteínas. En este esquema se muestra la ubicación de los exones identificados por Vidal-Petiot (2012). Con rojo se señala el S2128 identificado en la clona proveniente de la rata (Xu, 2000).

Sin embargo, cabe mencionar que los experimentos de Subramanya se realizaron con una versión de la KS-WNK1 generada a partir de la clona de Melanie Cobb, la r-L-WNK1- Δ 11- Δ 12-S2120 (Subramanya et al., 2006). Por lo que el modelo de regulación del NCC por la KS-WNK1 (fig. 12) se basa en las observaciones hechas con una isoforma de esta proteína que contiene una mutación no deseada, de la que se ha discutido a lo largo de este trabajo. Por esta razón, resulta de sumo interés reevaluar los efectos de la isoforma KS-WNK1 sobre la actividad del NCC.

Las primeras observaciones de la presencia de la KS-WNK1 en el riñón, surgen de estudios de tipo Northern Blot, en los que se detecta que el mRNA de la KS-WNK1 representa el 91% del todas las WNK1 de la rata (Lazrak et al., 2006). El grupo de O'Reilly y colaboradores también detectó gran abundancia del RNAm de la KS-WNK1, ya que reportó niveles “cerca-nos al ruido de fondo” de la L-WNK1 (O'Reilly et al., 2003). La proteína KS-WNK1 también ha sido observada en inmunoreplicas tipo WB por el grupo de Paul Welling (Wade et al., 2006). Sin embargo, fue en la descripción exhaustiva de las isoformas de WNK1, publicada por Vidal Petiot y colaboradores, que se reconoce a la KS-WNK1 como la isoforma renal de WNK1 más abundante en el riñón y se identifican dos variantes de ella (Vidal-Petiot et al., 2012). Las variantes identificadas son la que carece del exón 11, la KS-WNK1- Δ 11; y la variante sin los exones 9 y 11, la KS-WNK1- Δ 9- Δ 11. De éstas, la variante KS-WNK1- Δ 11 es la isoforma de mayor abundancia en el riñón. Aunado a la presencia de la mutación no deseada, los experimentos de Subramanya (Subramanya et al., 2006), que como se mencionó previamente colocan a la isoforma KS-WNK1 como un inhibidor de la L-WNK1, se realizaron con la variante KS-WNK1 Δ 11- Δ 12 que no existe en el riñón.

Los patrones de expresión de la KS-WNK1- Δ 11 limitan su ubicación a cTAL, DCT y CNT. La abundancia de la KS-WNK1 en el DCT representa el 90% del total de las isoformas de WNK presentes y se expresa 80 veces más que la L-WNK1; en el CNT la KS-WNK1 representa el 64% del total, pero su expresión es seis veces menor que en DCT; y en cTAL corresponde al 64% de todas las WNK1 y está 16 veces menos que en el DCT. En mTAL y CCD también se

detectó KS-WNK1 y representa al 35-40 % del total de las isoformas de WNK1 pero está 50-60 veces menos que en DCT.

Distintos efectos de la KS-WNK1 se han observado sobre la actividad de otros transportadores, como ENaC y ROMK y que impactan el balance de sodio y potasio (Cheng et al., 2013; Cheng, 2012; Hadchouel et al., 2010; Lazrak et al., 2006; Liu et al., 2009; Naray-Fejes-Toth et al., 2004). Como ya se mencionó respecto a la regulación del NCC, estos experimentos también fueron realizados con la isoforma de KS-WNK1 que no se expresa en el riñón, KS-WNK1 Δ 11- Δ 12 y que tiene una mutación no deseada, la S2120. Por esta razón, se decidió analizar los efectos de la KS-WNK1 sobre la actividad del cotransportador utilizando la variante humana KS-WNK1- Δ 11 que no contiene la mutación previa.

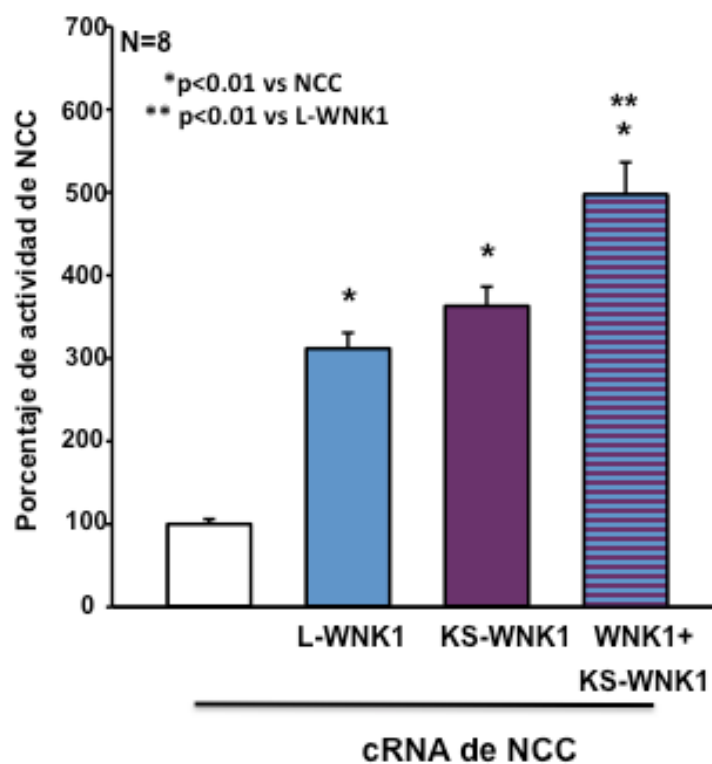


Figura 36. La KS-WNK1 activa al cotransportador NCC en ovocitos e *X. laevis*. La coexpresión de la cinasa KS-WNK1 aumenta la actividad del NCC así como lo hace la L-WNK1. La coexpresión de tanto la L-WNK1 como la KS-WNK1 producen un efecto aditivo. Todas las isoformas de este panel equivalen a las isoformas carentes del exon Δ 11

La coinyección de ovocitos de *X. laevis* con el cRNA de KS-WNK1 mostró un aumento significativo de la actividad del cotransportador (figura 36). Esta activación es similar a la producida por la L-WNK1. Es de notar que la coinyección de ambas isoformas, L-WNK1- Δ 11 y KS-WNK1- Δ 11 mostró un efecto aditivo sobre la captación de sodio, lo que sugiere que la activación del NCC por ambas proteínas puede ocurrir por dos mecanismos distintos. Esto llama la atención dada la falta del dominio cinasa de la KS-WNK1. Sin embargo, en la figura 37 se observa que el aumento en la actividad del cotransportador por la KS-WNK1 está asociado a un incremento en su fosforilación (panel A) así como de su abundancia en la membrana (panel B) de la misma manera que lo hace la L-WNK1- Δ 11. Por lo que el mecanismo de regulación del NCC por la KS-WNK1 requiere mayor investigación al respecto.

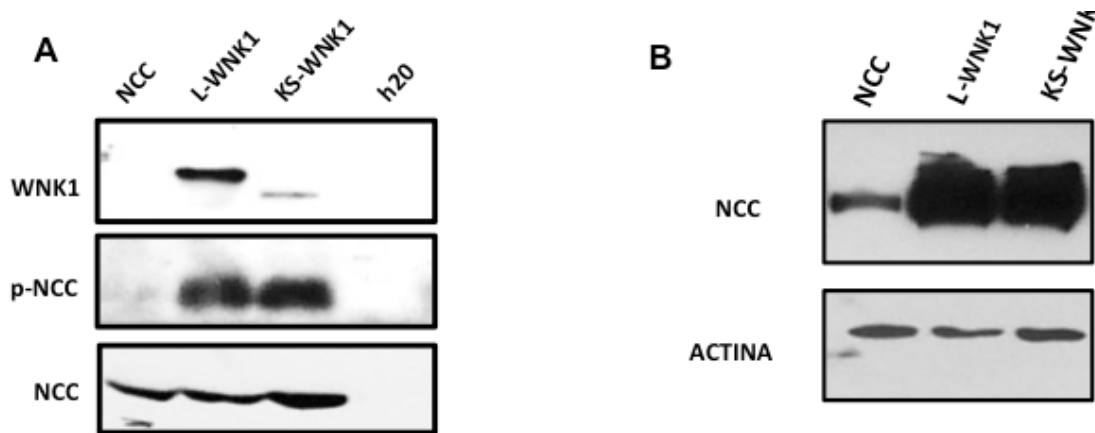


Figura 37. La KS-WNK1 aumenta la fosforilación del NCC y su abundancia en la membrana en ovocitos *X. laevis*. A) Detección de la fosforilación del NCC en lisados de proteína total por ensayos de tipo Western Blot (B) y en la fracción membranal.

Dado que la cinasa WNK4 inhibe a la L-WNK1 inhibe, como previamente se mostró (figura 28), se decidió evaluar si esta inhibición también se produce sobre la KS-WNK1. Para ello, se coexpresó a esta proteína en presencia de la WNK4 y se midió la captación de sodio sensible a tiazida. En la figura 38 se observa que la WNK4 no inhibe el efecto positivo de la KS-WNK1. Esto sugiere que la KS-WNK1, al no ser regulada por la WNK4, no es sensible a los efectos de la angiotensina II. Estos resultados indican que la interacción entre WNKs, se debe tanto a los dominios HQ (Thastrup et al., 2012) como a los extremos amino terminal, como se ha reportado previamente (Yang et al., 2007b).

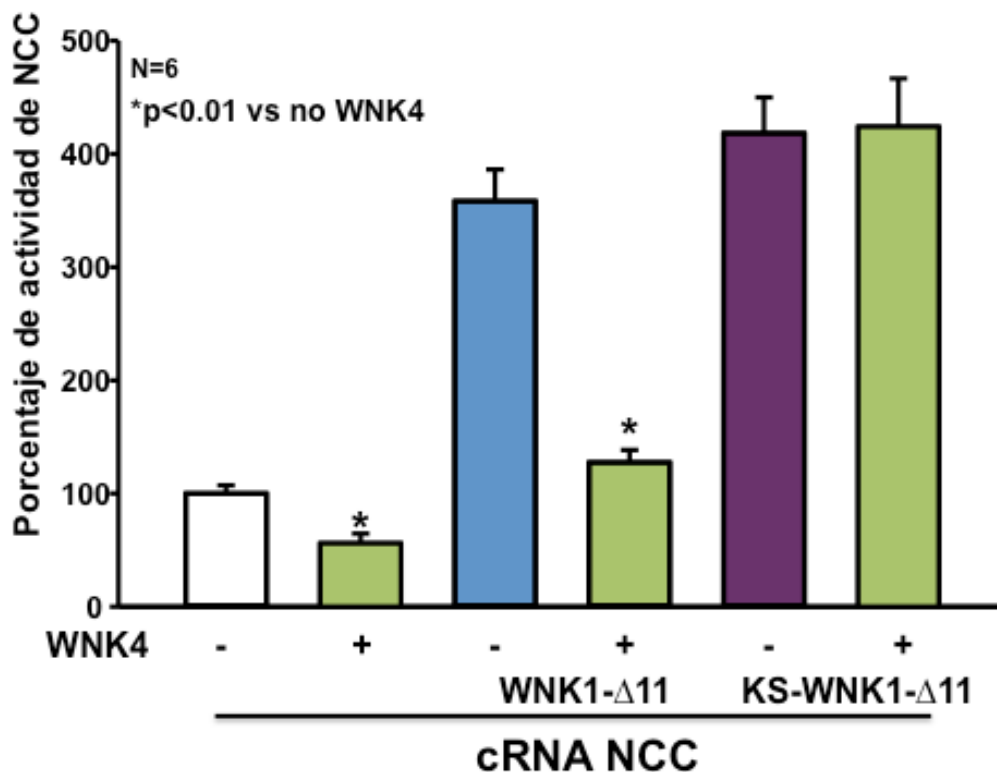


Figura 38. La KS-WNK1 no es regulada por la WNK4. La actividad del cotransportador aumenta por la KS-WNK1 similar a la activación producida por la L-WNK1, pero se inhibe por la WNK4

Nuestros resultados se oponen a los obtenidos en trabajos previos realizados por otros autores en los que se ha observado que la KS-WNK1 inhibe al NCC a través de la inhibición de la L-WNK1. En esta tesis se concluye que en el sistema de expresión de *X. laevis* la KS-WNK1 es un activador importante del NCC, y que a pesar de no tener actividad cinasa es capaz de aumentar la fosforilación del NCC y su llegada a la membrana (figura 39). Además, los resultados aquí mostrados sugieren que la activación del cotransportador ocurre por una vía distinta a la de la cinasa L-WNK1, ya que la coexpresión de ambas produce un efecto aditivo y la KS-WNK1 no se regula por la cinasa WNK4. Se requiere mayor investigación respecto al mecanismo que subyace a estas observaciones, por ejemplo es importante analizar si la KS-WNK1 produce un aumento de la fosforilación de SPAK, al ser éste el activador directo del NCC y el blanco de la L-WNK1 para activar al NCC. También es importante evaluar los efec-

tos de la KS-WNK1 sobre el efecto positivo de la WNK3 en el NCC, para determinar si la coexpresión de ambas proteínas produce un efecto aditivo, como ocurre con L-WNK1.

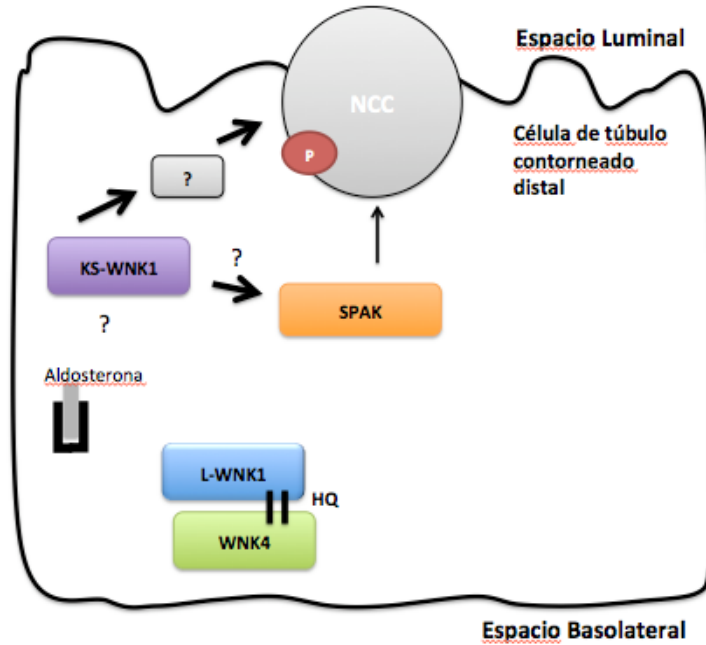


Figura 39. La KS-WNK1 es un activador del NCC independiente de la WNK4.

La cinasa L-WNNK1 es sustrato del complejo de ubiquitilación KLHL3-CUL3.

Recientemente dos grupos distintos identificaron a dos nuevos genes involucrados en el desarrollo de la enfermedad PHAI: KLHL3 (Kelch-like 3) y CUL3 (Cullin3) (Boyden et al., 2012; Louis-Dit-Picard et al., 2012). Estos genes codifican a dos proteínas que interactúan entre si y forman un tetrámero compuesto de un homodímero de CUL3 y un homodímero de KLHL3 (figura 40). Este complejo tiene actividad de ubiquitin ligasa tipo E3, que se encarga de la ubiquitinación de otras proteínas blanco. CUL3 es el elemento de andamiaje de dicho complejo y une a una ligasa de ubiquitina del grupo de las ligasas Culling-Ring E3 (CRL) (Bosu y Kipreos, 2008). Al igual que todas las ubiquitin ligasas de tipo E3, las CRL

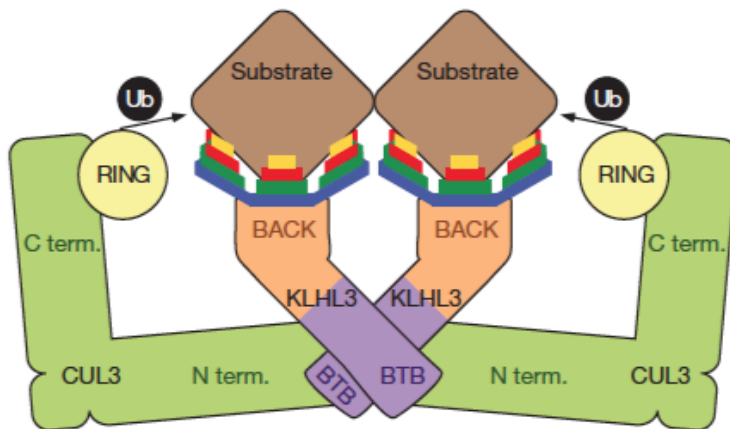


Figura 40. Esquema del complejo de ubiquitinación formado por KLHL3, CUL3 y la proteína de transferencia de la ubiquitina RING. El sustrato de este complejo se une gracias a los repetidos KLHL en la proteína KLHL3. EL complejo interactúa por los dominios BTB en KLHL3 y se forma un dímero de dímeros. Tomado de Boyden, 2012.

unen covalentemente una ubiquitina desde una enzima E2 hacia las proteínas sustrato para su posterior reconocimiento por el proteasoma 26S y su degradación proteolítica (Hershko y Ciechanover). CUL3 tiene un dominio BTB que le permite la interacción con KLHL3. Por su parte, KLHL3 es una proteína adaptadora que en su extremo amino terminal tiene un dominio BTB que le permite la unión a CUL3, y en su extremo carboxilo terminal tiene 4 dominios llamados kelch, que se repiten uno seguido del otro para formar una estructura de β -barril. La formación de esta estructura permite el reconocimiento y la unión de sus sustratos, para su posterior ubiquitinación por el complejo. La proteína CUL3 tiene una expresión ubicua, a diferencia de KLHL3 que parece estar restringida al riñón (Boyden et al., 2012; Louis-Dit-Picard et al., 2012).

unen covalentemente una ubiquitina desde una enzima E2 hacia las proteínas sustrato para su posterior reconocimiento por el proteasoma 26S y su degradación proteolítica (Hershko y Ciechanover). CUL3 tiene un dominio BTB que le permite la interacción con KLHL3. Por su parte, KLHL3 es una proteína adaptadora que en su extremo amino terminal tiene un dominio BTB que le permi-

En el trabajo publicado por Boyden y colaboradores se identificó que las mutaciones en CUL3 afectan el splicing del exón 9 y provocan su eliminación del transcrito final (Boyden et al., 2012). Este exón codifica a un fragmento de 57 aminoácidos que aún no se sabe cual es su papel en el complejo de ubiquitinación de CUL3-KLHL3, aunque los datos genéticos sugieren que la mutación CUL3 Δ 9 produce una ganancia de función (Boyden et al., 2012). Tanto en el trabajo de Boyden como en el de Lous-dit-Picard se han reconocido mutaciones dominantes y recesivas en los genes de KLHL3 (Boyden et al., 2012; Louis-Dit-Picard et al., 2012). Las mutaciones en este gen pueden caer en el dominio BTB, que es el dominio de unión a CUL3, o en alguno de los motivos repetidos de kelch, que unen al sustrato. No obstante, en ninguno de estos trabajos se analiza el papel fisiológico de este complejo.

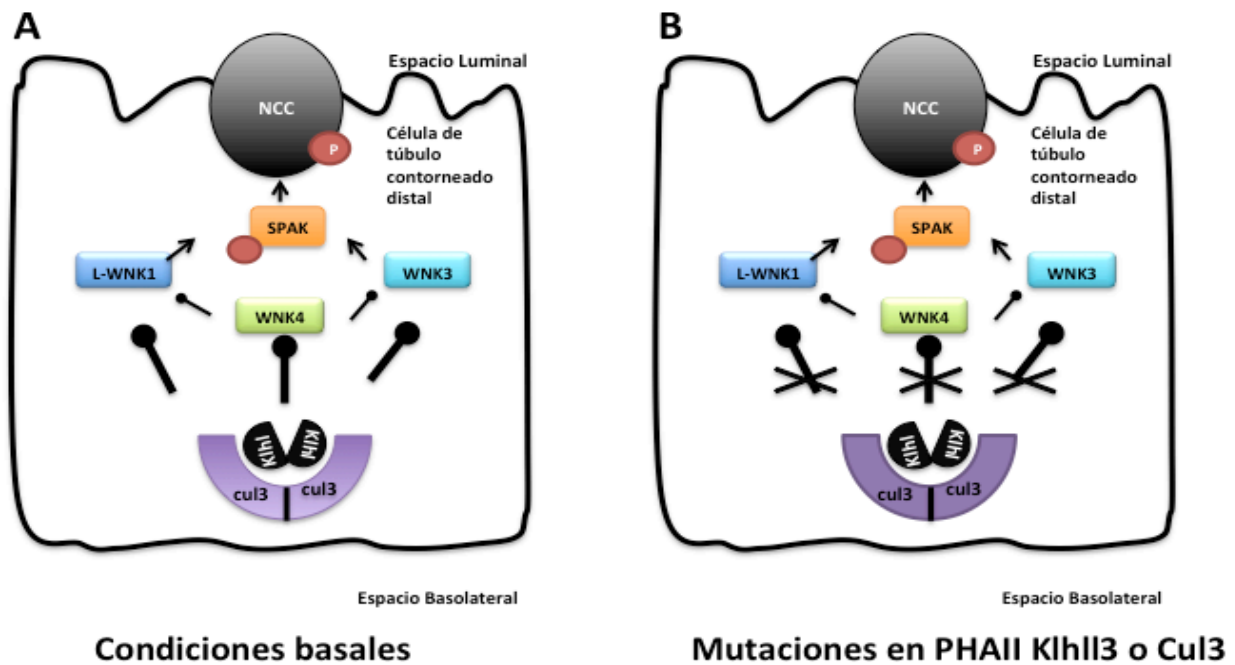


Figura 41. Modelo de regulación de las WNK por el complejo de ubiquitinación KLHL3/CUL3. Las cinasas WNK son los sustrato de este complejo. Las mutaciones tipo PHAII en alguno de los elementos de este complejo alteran la vía de regulación del NCC.

Fue hasta que Ohta y colaboradores demostraron que los blancos de este complejo de ubiquitinación son las cinasas WNK1, WNK3 y WNK4, que se propuso un mecanismo fisiopatológico que explica el desarrollo de PHAII por las mutaciones en KLHL3 y CUL3, como se muestra en la figura 41 (Ohta et al., 2013). En dicho trabajo se demuestra que el dominio

ácido en las WNK es el dominio de interacción con KLHL3, y por consiguiente con la unión al complejo de ubiquitinación. Cabe señalar que las mutaciones en WNK4 asociadas a la enfermedad PHAI se ubican en esta región (Wilson et al., 2001). Trabajos posteriores han confirmado la interacción de la WNK1 y la WNK4 con el complejo CUL-3-KLHL3 a través de los dominios Kelch en KLHL3 y el dominio ácido en las WNK (Shibata et al., 2013; Wakabayashi et al., 2013; Wu y Peng, 2013).

Recientemente, el grupo de Xavier Jenematiour en el hospital George Pompidou identificó mutaciones en el dominio ácido de la L-WNK1 en pacientes con hiperkalemia, (Louis-dit-Piccard, Chávez-Canales, *et al.* datos sin publicar) (figura 42). Estas mutaciones son similares a las encontradas en el dominio ácido de la WNK4, pero a diferencia de los pacientes con estas mutaciones equivalentes en WNK4, los pacientes no desarrollan hipertensión arterial.

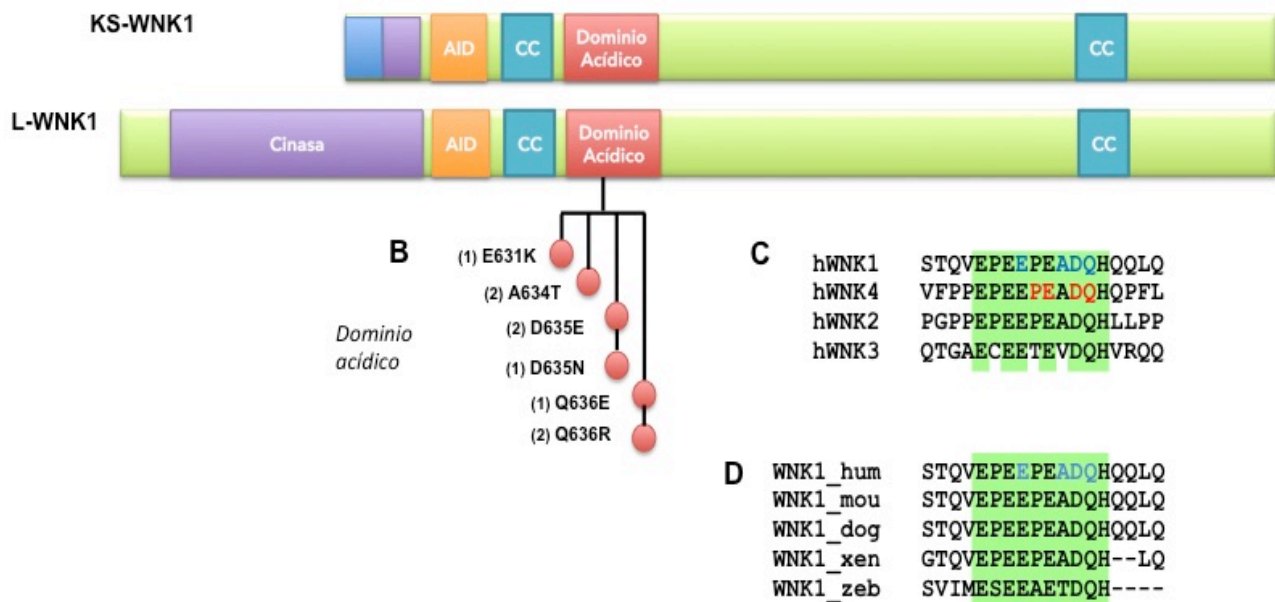


Figura 42. Identificación de mutaciones en el dominio ácido de la L-WNK1 en pacientes con Hiperkalemia. A) Esquema de la estructura de las isoformas de WNK1. B) Mutaciones encontradas por el grupo de Xavier Jenematiour en pacientes con hiperkalemia. C) Alineamiento entre secuencias de cinasas WNK que muestra que el dominio ácido en las WNK está altamente conservado entre las demás WNK. D) Comparación del dominio ácido de WNK1 de distintas especies.

Dado que la cinasa L-WNK1 es sustrato del complejo KLHL3-CUL3 través de la interacción del dominio ácido y los dominos Kelch, y que la enfermedad PHAI1 produce un aumento en la actividad del NCC, se probó el efecto del complejo KLHL3-CUL3 sobre la actividad del NCC en presencia y ausencia de la L-WNK1-Δ11. Al coinyectar KLHL3-CUL3 con el NCC no se observa una diferencia en la captación de sodio por el NCC. Sin embargo, la coexpresión de KLHL3-CUL3 disminuye el aumento en la actividad del cotransportador como consecuencia de la presencia de la L-WNK1-Δ11 (figura 43). La sobreexpresión de la mutante PHAI1 L-WNK1-Δ11 (D635E) aumenta la actividad del cotransportador de la misma manera que lo hace la L-WNK1-Δ11 silvestre pero la presencia de KLHL3-CUL3 ya no previene esta activación como sí ocurre con la forma silvestre.

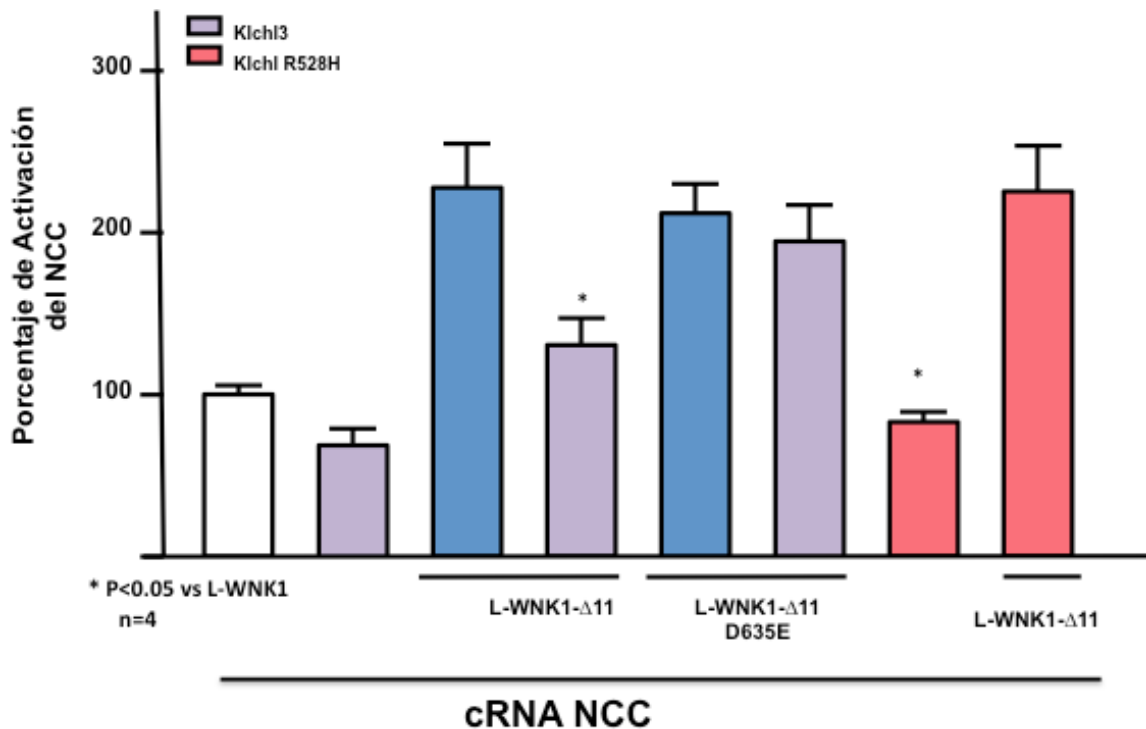
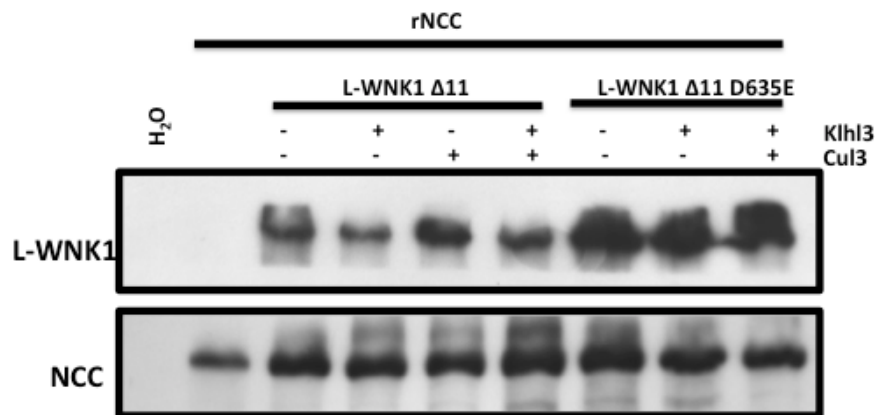


Figura 43. Las mutaciones PHAI1 en WNK1 impiden su degradación. La activación del NCC por la L-WNK1 se previene por el complejo KLHL3-CUL3. Esta inhibición se anula si se inyecta la isoforma PHAI1 de L-WNK1 (D635E) o la de KLHL (R528H).

Para corroborar el efecto específico del complejo KLHL3-CUL3 sobre la L-WNK1 se coexpresó la mutante KLHL3-R528H, identificada en pacientes con PHAI1 (Boyden et al., 2012;

Louis-Dit-Picard et al., 2012). Esta mutación cae en uno de los dominios kelch en KLHL3 y se ha propuesto que previene el reconocimiento y la interacción del complejo con su sustrato, en este caso la L-WNK1 (Ohta et al., 2013). En la figura 43 se observa que la coexpresión de esta mutante con el NCC no produce ninguna diferencia sobre la actividad del cotransportador. Sin embargo, se previene la inhibición del complejo KLHL3-CUL3 sobre el efecto de la L-WNK1 en la actividad del NCC. La actividad funcional observada en la figura 43 se correlaciona con los datos bioquímicos mostrados en la figura 44 en donde la cantidad de L-WNK1- $\Delta 11$ disminuye con la presencia de KLHL3 o KLHL3 más CUL-3, no así cuando sólo se expresa CUL3. Esto sugiere que la L-WNK1 es regulada negativamente por el complejo KLHL3 y CUL3; el hecho de que la KLHL3 pueda inhibir el efecto y la abundancia de la L-WNK1- $\Delta 11$ sugiere que en los ovocitos KLHL3 interactúa con alguna forma de CUL. Además, a disminución en la abundancia de la proteína L-WNK1- $\Delta 11$ se previene cuando se sobreexpresa la KLHL3-R528H, previamente identificada como la causante de PHAII (figura 44). En este mismo experimento se observa que la proteína L-WNK1 $\Delta 11$ -D635E no se



inhibe por KLHL3 como ocurre con la versión silvestre de la cinasa.

Figura 44. Las mutaciones en el dominio ácido de la L-WNK1 previenen su degradación por KLHL3. Inmunoblot de ovocitos inyectados con cRNA de la L-WNK1 silvestre o mutada (D635E) coexpresada con KLHL3 o CUL3.

Las mutaciones en el dominio ácido de L-WNK1 pueden ser causantes de la enfermedad PHAll al activar al NCC por dos mecanismos diferentes. El primero se basa en los datos observados por Wilson y colaboradores en los que se sugiere que la pérdida de la función inhibitoria de la WNK4-PHAll sobre el NCC es la causa del desarrollo de la enfermedad (Wilson et al., 2003). Sin embargo, los ensayos de actividad funcional en los ovocitos muestran que la L-WNK1-Δ11-D635 activa al NCC de manera muy similar a su versión silvestre, por lo que esta hipótesis parece poco viable. El segundo mecanismo posible y en concordancia con los resultados obtenidos por el grupo de Ohta (Ohta et al., 2013), puede ser que la mutante L-WNK1-Δ11-D635E produce la enfermedad al no poder ser inhibida por el complejo KLHL3-CUL3 al estar interrumpida la interacción con KLHL3. Nuestros resultados sugieren que la mutación en el dominio ácido de la L-WNK1-Δ11 produce la enfermedad en estos pacientes al prevenir la inhibición por el complejo KLHL3-CUL3 (figura 45), esto conlleva a una sobre-expresión de la L-WNK1.

Llama la atención que si estos pacientes tienen un incremento en la cantidad de la proteína L-WNK1 no recapitulen todas las manifestaciones clínicas de los pacientes PHAll y sólo desarrollen hiperkalemia. Recordemos, que las mutaciones intrónicas en *wnk1* aumentan la cantidad de la L-WNK1 y sí producen PHAll. La respuesta a esta discrepancia en el fenotipo quizás esté en el sitio de regulación de la L-WNK1 por el complejo KLHL3-CUL3. Si la interacción entre la L-WNK1 y KLHL3-CUL3 se da sólo en DCT2, la sobreexpresión de la proteína sólo ocurrirá en esta región y los principales efectos se verán en la secreción de potasio y no en la hipertensión arterial. Una hipótesis es que la interacción entre la L-WNK1 y el complejo de ubiquitinación esté mediada por modificaciones postraduccionales en L-WNK-1. Un tipo de modificación postraducciona l posible puede ser la fosforilación en sitios blanco de la vía de la aldosterona y SGK, que de hecho ocurrirá en DCT2. Se requiere mucha más investigación al respecto para discernir en estos efectos. Por ejemplo, resulta interesante saber si en los pacientes con estas mutaciones está sobreexpresada la L-WNK1, como ocurre con los pacientes que presentan la delección intrónica. Técnicas desarrolladas recientemente han permitido el análisis de proteínas urinarias en exosomas (Gonzales et al., 2009; Hoorn et al., 2005; Pisitkun et al., 2004; van der Lubbe et al., 2012a; Zhou et al., 2006) y se puede utilizar

esta técnica para analizar los exosomas de pacientes con la mutación L-WNK1- D635E y determinar si existe este aumento previsto. Por otro lado, así como se exploró el efecto del complejo KLHL3-Cul-3 sobre la acción de la L-WNK1, también deben explorarse sus efectos sobre la KS-WNK1, debido a la gran abundancia de la KS-WNK1 en DCT a su respuesta ante el potasio y a sus efectos positivos sobre la actividad del NCC reportados en este trabajo. Todo esto ubica a la KS-WNK como un blanco potencial del complejo KLHL3-CUL3.

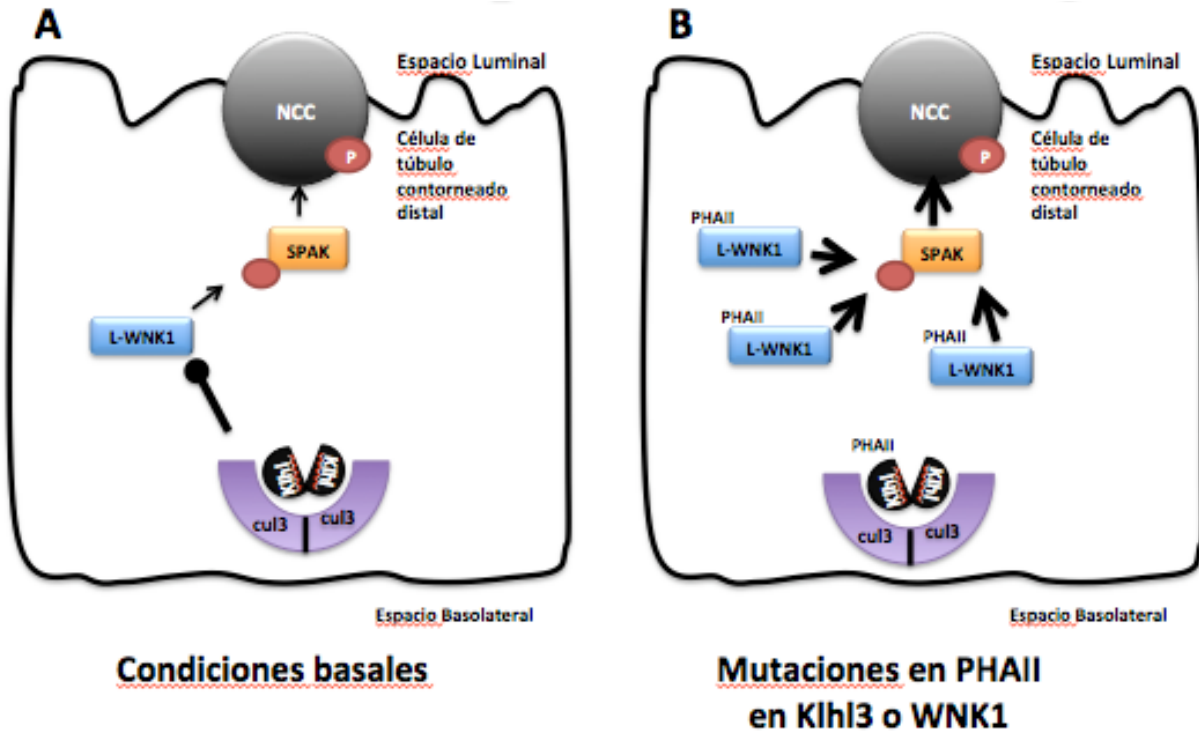


Figura 45. Modelo de regulación de las WNK por el complejo de ubiquitinación Klh3/CUL3 en condiciones basales o cuando ocurren mutaciones PHAII en la L-WNK1 o en el complejo KLHL3-CUL3.

La insulina activa al NCC de manera dependiente de WNK3

En este capítulo se abordarán los efectos de la insulina sobre la actividad del cotransportador NCC y los mecanismos que subyacen a esta regulación. Los resultados de este apartado están publicados en la revista *Journal of Hypertension*.

Como se mencionó en la sección de Introducción, distintas evidencias asocian a la insulina con la hipertensión y el NCC, pero no se han identificado efectos directos de la insulina sobre la actividad del cotransportador. Para revisar el efecto que pueda tener la insulina sobre la actividad del NCC, se utilizó el sistema de expresión funcional en ovocitos de *X. laevis* que ha sido utilizado ampliamente en este trabajo y gracias a la presencia endógena del receptor de insulina (Scavo et al., 1991), por lo que este modelo permite medir el efecto de la insulina sobre el NCC.

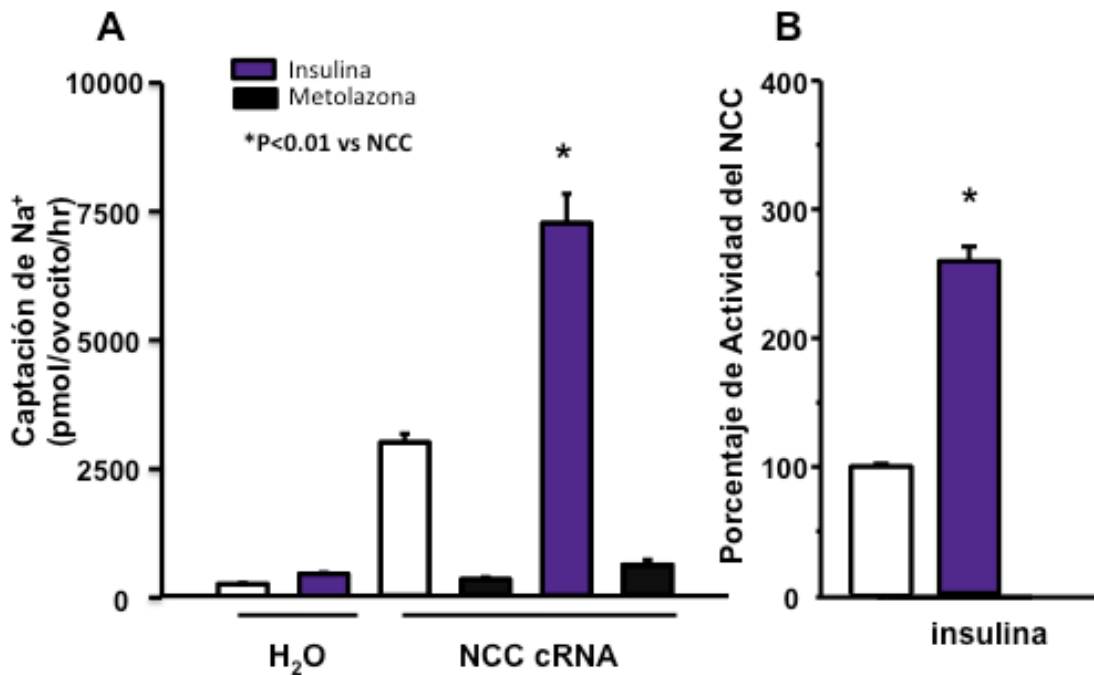


Figura 46. La insulina aumenta la actividad del NCC. Se midió la captación de $^{22}Na^+$ en ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con agua o con cRNA de NCC. A) La insulina sólo

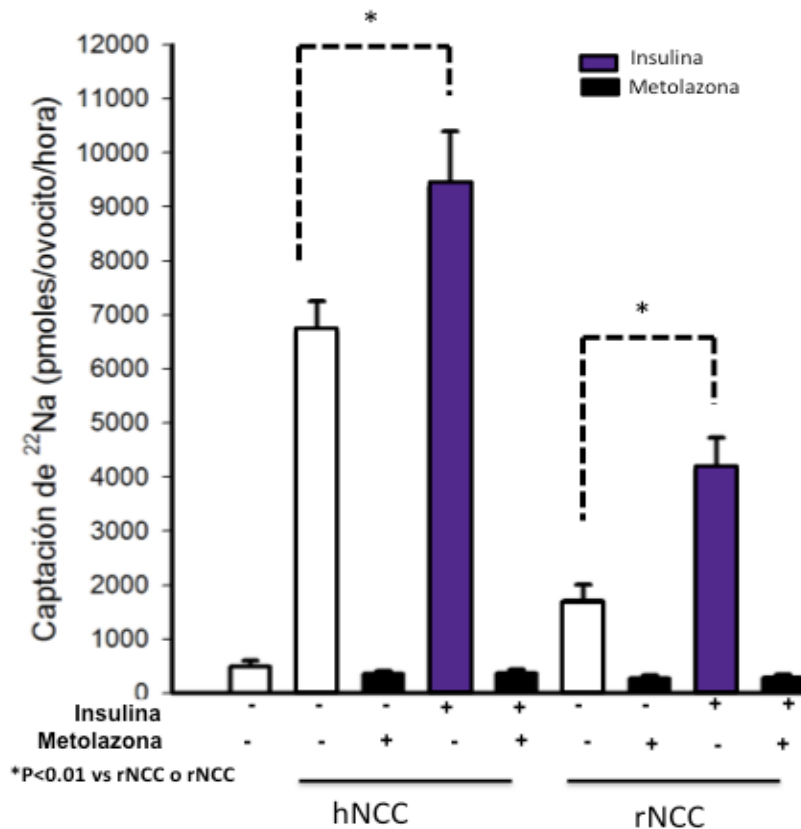


Figura 47. La insulina aumenta la actividad del NCC humano y del de rata. Captación de sodio de ovocitos inyectado con el NCC de rata (rNCC) y de humano (hNCC) en ausencia o presencia de la insulina.

En la Figura 46A se observa que los ovocitos inyectados con agua no tienen captación de sodio sensible a tiazida al utilizar metolazona, la cual solo se observa en los grupos inyectados con cRNA de NCC. De igual forma, se observa que la insulina no tiene ningún efecto en la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en los ovocitos inyectados con agua. En cambio, la actividad del NCC en presencia de la insulina aumentó 260% más que en la ausencia de esta hormona, como se ve en la figura 46B. Los datos previos se corroboraron en ovocitos inyectados con el cRNA del NCC humano y del de la rata (figura 47) y al utilizar insulina bovina o humana (datos no mostrados).

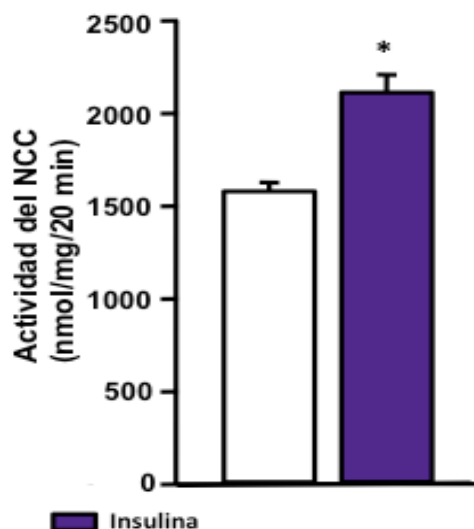


Figura 48. La insulina aumenta la actividad del NCC en células de túbulo controneado distal mDCT15.

Este efecto positivo de la insulina sobre la actividad del cotransportador también se observó en células de tubo contorneado distal en las que se ha reportado captación de sodio sensible a tiazida (Ko et al., 2012). En estas células, la actividad del cotransportador aumentó de 1556 ± 68 nmol/mg/20 min a 2037 ± 68 mmol/mg/20min en presencia de la insulina ($p < 0.05$) (figura 48).

La activación del NCC está asociada con la fosforilación de distintos sitios de treonina o de serinas (Pacheco-Alvarez et al., 2006; Richardson et al., 2008), por lo que resulta probable que el efecto de la insulina vaya a través de la fosforilación del NCC por una cinasa de residuos serina/treonina en la vía río abajo de la activación del receptor de la insulina, y no por la fosforilación dada por proteínas cinasas de tirosinas. Si este es el caso, la activación por la insulina puede ocurrir a través de la vía de PI3K o por la vía de las MAP cinasas (MAPK). De acuerdo con nuestros resultados, la activación del NCC por la insulina ocurre por la vía de la serina/threonina cinasa PI3K ya que dicha activación fue sensible a la wortmannina, un inhibidor específico de la PI3K (figura 49A) y no así a bloqueadores de las MAP cinasas como el UO126 (el inhibidor de MEK1 y de MEK2) el SB203580 (el inhibidor de p38) (figura 49B). Una vez que la PI3K se activa, puede activar a la cinasa Akt (también llamada PKB) o a la

cinasa blanco de la rapamicina, mTOR. Para elucidar la vía de transducción de señales de la insulina, se probó el inhibidor IV de AKT, y el inhibidor de mTOR, la rapamicina (figura 49 paneles C y D). Nuestros resultados muestran que la activación del NCC en respuesta a la insulina es inhibida por el inhibidor IV de AKT (Figura 49C) y no por la rapamicina (figura 49D), lo que sugiere que en efecto se lleva a cabo a través de la AKT. Esta vía de transducción activada por la insulina se recapituló en las células mDCT15, ya que la activación del cotransportador por la insulina se previno al inhibir a PI3K y a AKT con sus respectivos inhibidores (figura 50). Estos resultados muestran que el efecto de la insulina sobre el transportador depende de la vía de PI3K-AKT.

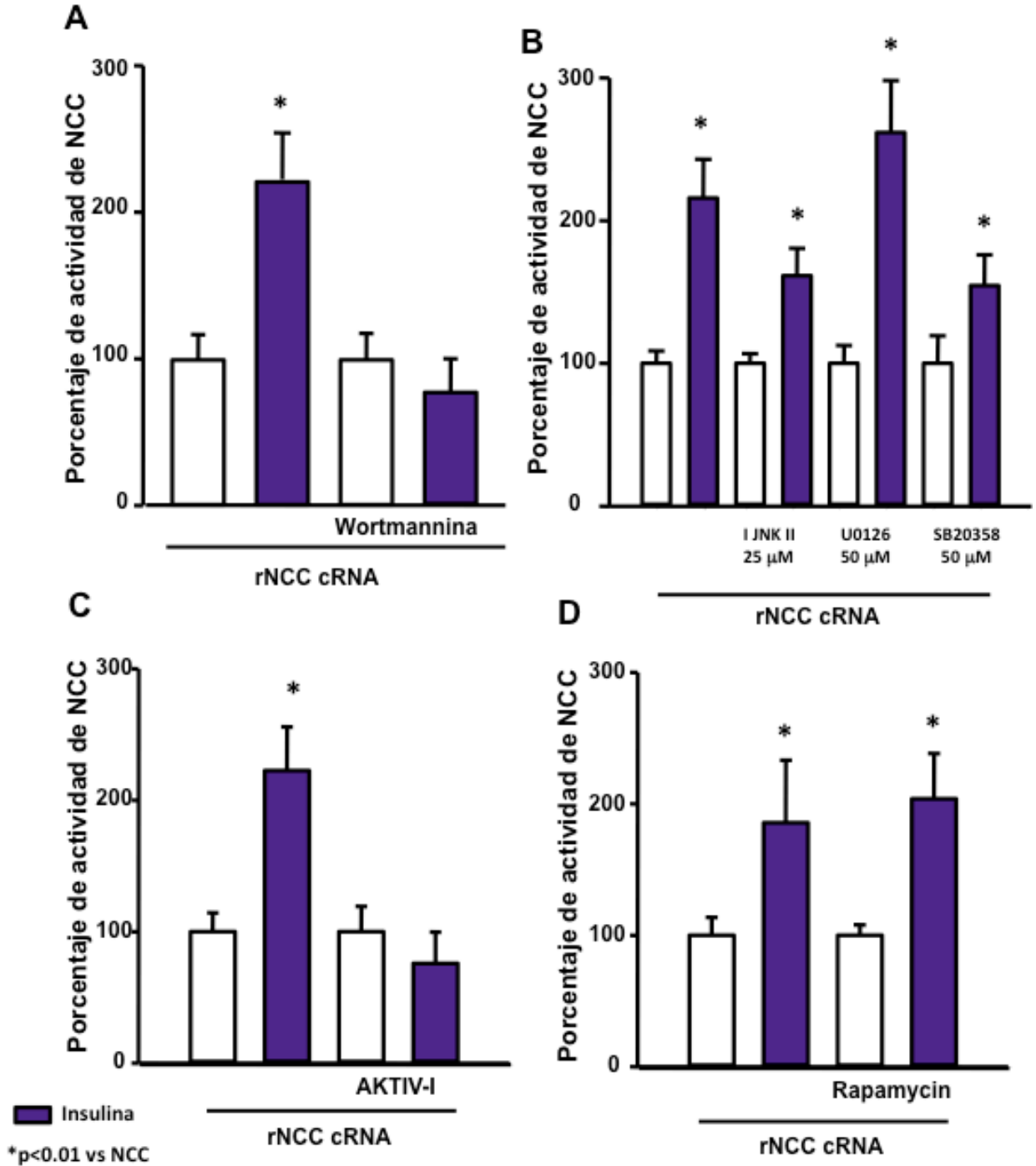


Figura 49. La insulina activa al NCC por la vía de PI3K-AKT. La inhibición farmacológica en ovocitos de *X. laevis* de (A) la vía de PI3K con su inhibidor específico, la wortmanina o (B) con inhibidores específicos de la vía de las MAPK. C) Inhibición farmacológica de la vía de AKT con el inhibidor IV de AKT o D) de mTORC1 con la rapamicina en ovocitos de *X.laevis*. p<0.01 vs su propio control sin insulina.

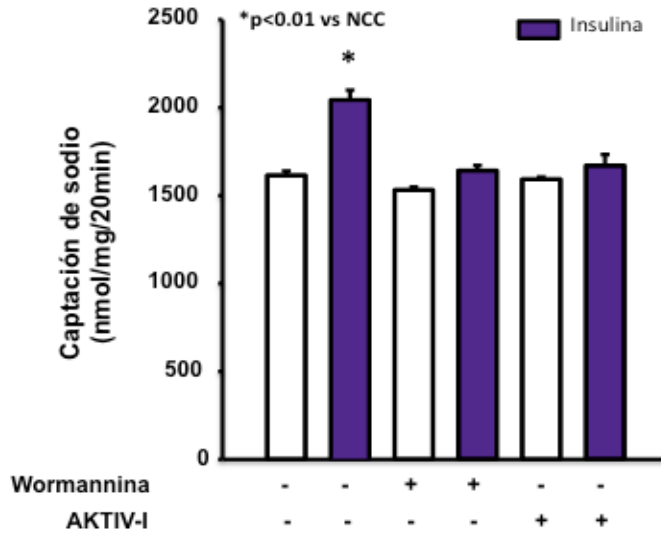
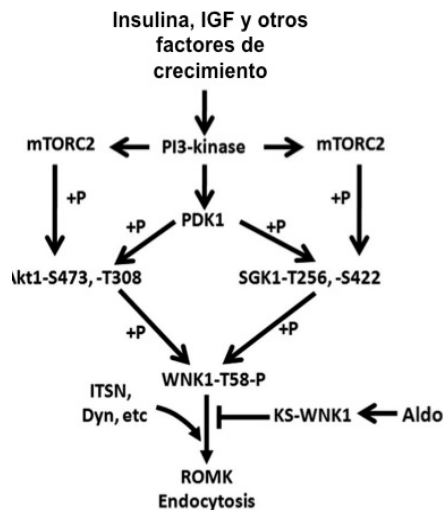


Figura 50. La insulina activa al NCC en las células mDCT15 por la vía de PI3K y AKT. Inhibición farmacológica de la vía de PI3K con wortmanina y de AKT con el inhibidor IV de AKT en células de mDCT15.

En un trabajo reportado por Cheng y colaboradores en el 2011 (Cheng y Huang, 2011a), se observó que la insulina inhibe al canal renal de potasio ROMK a través de la vía de PI3K-mTORC2-AKT-SGK-WNK1 (figura 51). Dado que nuestros resultados sugieren que la insulina activa al NCC por la vía de PI3K-AKT, decidimos probar al inhibidor específico de mTORC2, el AZD8055. La adición de este compuesto previno el efecto positivo de la insulina sobre la actividad del NCC por la insulina (figura 52). Estos datos son similares a la regulación de ROMK por la insulina (Cheng y Huang, 2011a).

Figura 51. Modelo de señalización de ROMK. Modificado de Cheng 2012.



Simultáneamente, otros laboratorios también estudiaron el efecto de la insulina sobre el NCC y exploraron diversas vías de regulación, en particular la SGK y la WNK4 (Komers et al., 2012; Sohara et al., 2011). Para revisar el papel de estas cinasas en la vía de activación del NCC, se probó el efecto de la WNK4 y SGK en la activación del cotransportador. Estudios previos muestran que la inyección de ovocitos *X. laevis* con cRNA de WNK4 disminuye la actividad del cotransportador (San Cristobal et al., 2008b; Yang et al., 2003). Nuestros resultados muestran que la coexpresión de la WNK4 no modifica la respuesta del NCC a la insulina (figura 53) y que la inyección de las versiones dominantes negativas, tanto de la

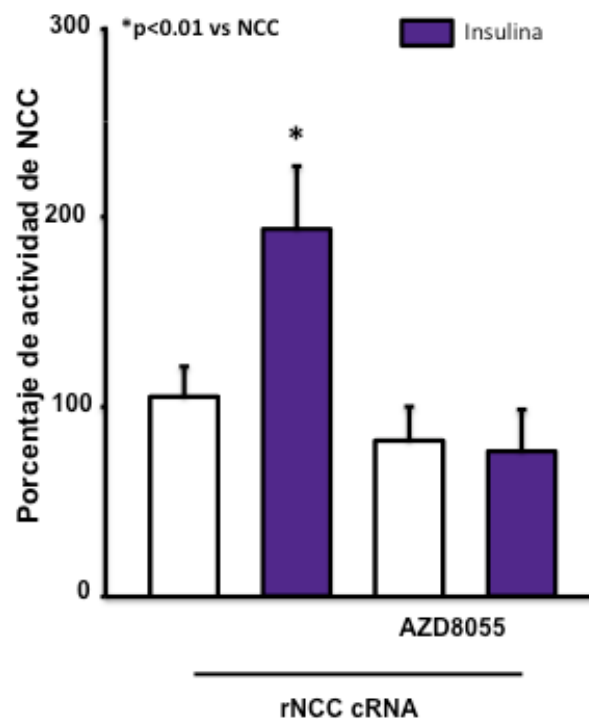


Figura 52. La proteína mTORC2 se requiere para activar al NCC con la insulina. Inhibición de mTORC2 con su inhibidor específico, el compuesto AZD8055 por la insulina en ovocitos de *X. laevis*.

WNK4 (WNK4-D318A) como de la SGK (SGK K104M), tampoco afectan la activación del NCC por la insulina. Esta observación fue corroborada en las células mDCT15, ya que al disminuir la cantidad de WNK4 endógena mediante la expresión de un siRNA específico de WNK4, la actividad del cotransportador disminuye (Ko et al., 2012), y la insulina tiene efec-

tos positivos sobre el cotransportador (figura 54). Así, el efecto positivo de la insulina sobre la actividad del NCC tanto en células como en ovocitos, no requiere la presencia de WNK4.

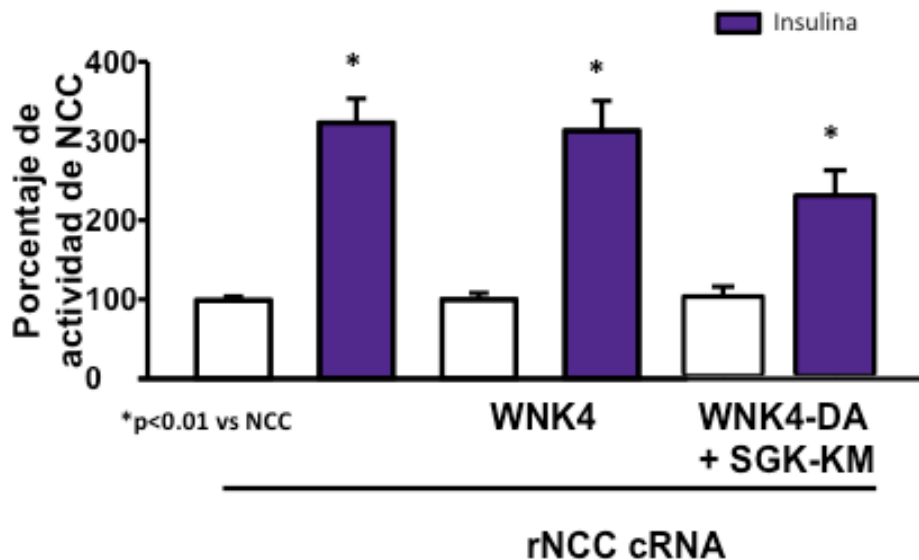


Figura 53. La insulina activa al NCC de manera independiente de la WNK4. Efecto de la vía de WNK4 y SGK sobre la activación del NCC por la insulina en ovocitos de *X. laevis*. Se coexpresaron las versiones dominantes negativas de la WNK4 y de la SGK

Contrario a estos resultados, Sohara y colaboradores sugieren que la insulina aumenta la fosforilación del NCC de manera dependiente de la cinasa WNK4 tanto en células mpkDCT como en ratones (Sohara et al., 2011). No obstante, la metodología utilizada por los autores presenta ciertos inconvenientes. En dicho trabajo, ratones silvestres y ratones transgénicos que expresan una WNK4 truncada son tratados con una dosis única intraperitoneal de insulina y se evalúa la fosforilación del NCC. Sus resultados muestran que la fosforilación mediada por la insulina en los ratones silvestres se previene en los ratones transgénicos (Sohara et al., 2011). Esta inyección de insulina tiene efectos hipoglicemiantes que activan al sistema adrenérgico, y con esto se activa el sistema renina-angiotensina-aldosterona. Como lo hemos comentado, la angiotensina II es un activador del NCC a través de la WNK4, y si la insulina induce la síntesis de angiotensina II, por lo que esta metodología no es capaz de diferenciar las acciones directas de la insulina sobre el NCC de los efectos sistémicos que produce la insulina (Castaneda-Bueno et al., 2012b; San Cristobal et al., 2009). Por esta razón, los resultados del grupo de Sohara deben ser reconsiderados.

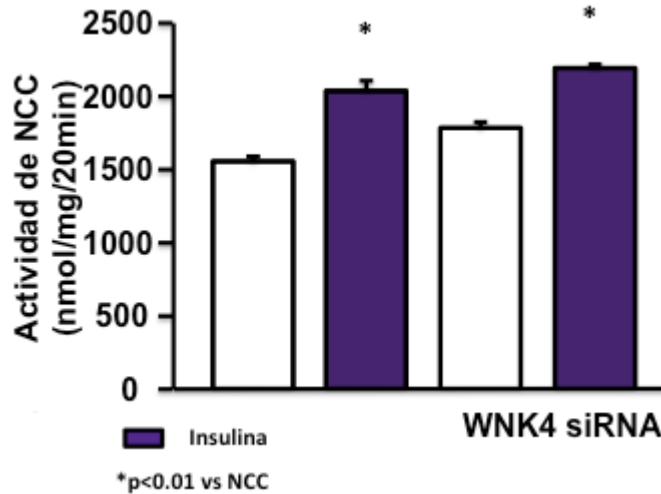


Figura 54. La insulina activa al NCC de manera independiente de la WNK4 en células mDCT15. Efecto de la insulina en células mDCT15 transfectadas con un siRNA que disminuye la abundancia de WNK4

Las cinasas WNK3 y SPAK son cinasas que activan al NCC en condiciones de disminución de volumen o de depleción de cloro intracelular tanto en ovocitos de *X. laevis* como en células de mamífero (Pacheco-Alvarez et al., 2012; Rinehart et al., 2005). Dado que la insulina aumenta la actividad de NCC de manera similar a la WNK3, la activación del NCC por la insulina puede ocurrir a través de la vía de WNK3. Para probar esta hipótesis, se coinyectaron a los ovocitos con la cinasa WNK3 silvestre o catalíticamente inactiva, al anularse su actividad cinasa por la mutación D294A. En la figura 55A se ajustó al 100% la captación de sodio sensible a tiazida observada en los ovocitos inyectados con NCC y las demás condiciones se ajustaron de acuerdo este grupo. En esta figura se observa el incremento esperado en la actividad del NCC por la WNK3 (Pacheco-Alvarez et al., 2012) y que la exposición a la insulina ya no tiene efecto positivo adicional (figura 55B). Por otro lado, como fue descrito previamente en el laboratorio, (Rinehart et al., 2005), la coexpresión de la cinasa catalíticamente inactiva, WNK3-D294A, tiene un efecto dominante negativo sobre la actividad del cotransportador, por lo que en presencia de esta cinasa disminuye la actividad del cotransportador a $64\% \pm 6\%$ con respecto a la WNK3 silvestre (Figura 55A). Nuestro razonamiento fue que si la insulina requiere de la cinasa WNK3 para lograr la activación del NCC, la coexpresión de esta mutante prevendría el efecto positivo de la insulina. Como muestran las figura 55 A y B

la sobreexpresión de la WNK3-D294A previene la activación por la insulina. En la figura 55B, la captación de sodio de cada grupo control en ausencia de la insulina es tomado como el 100% y se compara la captación en presencia de la insulina de acuerdo a su propio grupo. Este análisis muestra que la insulina ya no aumenta la actividad del cotransportador en presencia de la cinasa WNK3 silvestre o catalíticamente inactiva. Estos resultados sugieren que se requiere la cinasa WNK3 para lograr la activación del NCC por la insulina. En apoyo a estas observaciones, un estudio reciente realizado en células de glioblastoma demostró que el cotransportador NKCC1 aumenta su actividad ante el factor de crecimiento epidermal por un mecanismo dependiente de PI3K y WNK3 (Garzon-Muvdi et al., 2012).

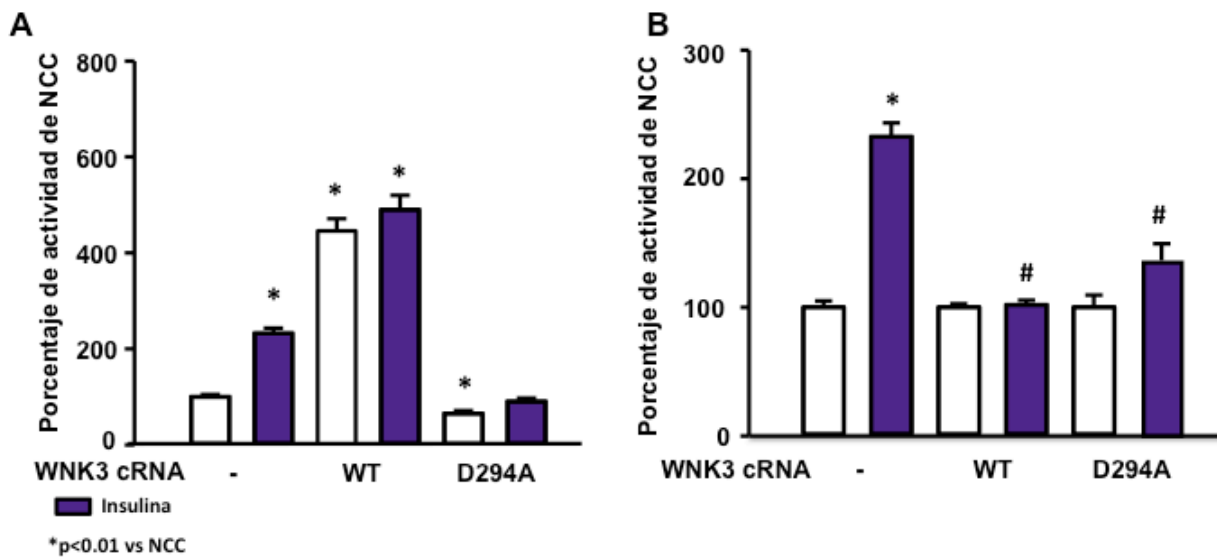


Figura 55. La insulina activa al NCC a través de la vía de WNK3. Efecto de la insulina en presencia de la cinasa WNK3 silvestre (WT) o la versión catalíticamente inactiva (D294) en ovocitos de *X. laevis*. A) El grupo del NCC está tomado como uno y los demás grupos se ajustan respecto a este. B) Cada grupo control se toma como uno y se compara el grupo expuesto a la insulina. *p<0.01 vs el grupo control en ausencia de la insulina. # no significatvo.

Se ha visto que el sitio más importante para la fosforilación del NCC es la Treonina 60 y esto conlleva a su activación (Pacheco-Alvarez et al., 2006; Richardson et al., 2008). Evidencias experimentales muestran que la actividad del NCC depende de la integridad de este sitio ya que no sólo es completamente abatida por la mutación T60A; sino que tampoco es posible

activar al cotransportador con las cinasas WNK3 y SPAK (Pacheco-Alvarez et al., 2012; Richardson et al., 2008). Dado que el efecto positivo, ya conocido de WNK3 sobre el NCC y el de la insulina fueron similares en magnitud y no sinérgicos, decidimos probar si la activación de la insulina se debe a la fosforilación de la treonina 60. Como se muestra en la figura 56A, la fosforilación de dicha treonina aumenta con el tiempo de exposición a la insulina ya que mientras mayor es el tiempo de exposición, mayor es la fosforilación en este sitio. Dicha fosforilación disminuye con la presencia de wortmanina cuando se incuban los ovocitos en presencia de insulina y del inhibidor (Figura 56). Estos resultados comprueban que la activación del NCC por la insulina está asociada con su fosforilación y que depende de la vía de PI3K-AKT, como mostraron los resultados en la actividad.

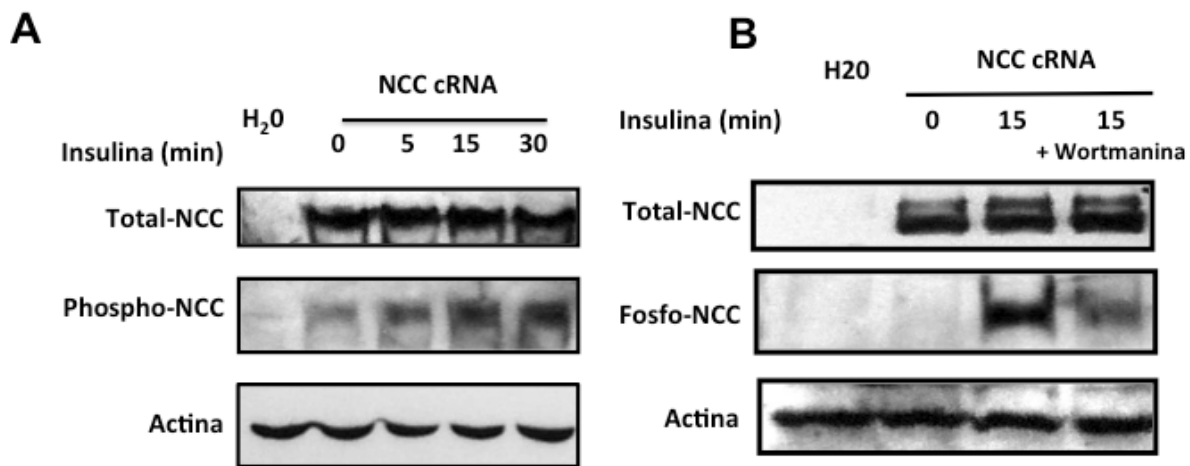


Figura 56. La insulina induce la fosforilación del NCC en los ovocitos de *X. laevis*.
 A) Western Blot en el que se observa el aumento en la fosforilación del NCC de acuerdo con el tiempo de exposición a la insulina. B) La wortmanina previene la fosforilación del NCC inducida por la insulina

Para observar el papel de la insulina *in vivo*, se utilizaron riñones perfundidos *ex vivo* (Bautista et al., 2001; Sanchez-Mendoza et al., 1998) con insulina en un sistema de perfusión Langerdorf (figura 57) y se determinó la abundancia el NCC fosforilado en la T60. Este sistema de perfusión permite analizar el efecto de la insulina sin que se afecten vías no renales que puedan modularse por los efectos propios de la insulina, como puede ser la hipoglucemia que activa al sistema nervioso simpático y éste regula la fosforilación del NCC. En este

sistema de perfusión, los riñones de ratas macho adultas se perfundieron con insulina a distintas concentraciones y se observó un aumento en la fosforilación de la T60 (figura 57). Es importante mencionar que la perfusión de la insulina a estas concentraciones no tuvo un efecto sobre la presión de la arteria renal, ya que cambios en la presión de perfusión renal pueden alterar el estado de fosforilación de NCC por otros mecanismos que nada tienen que ver con la insulina.

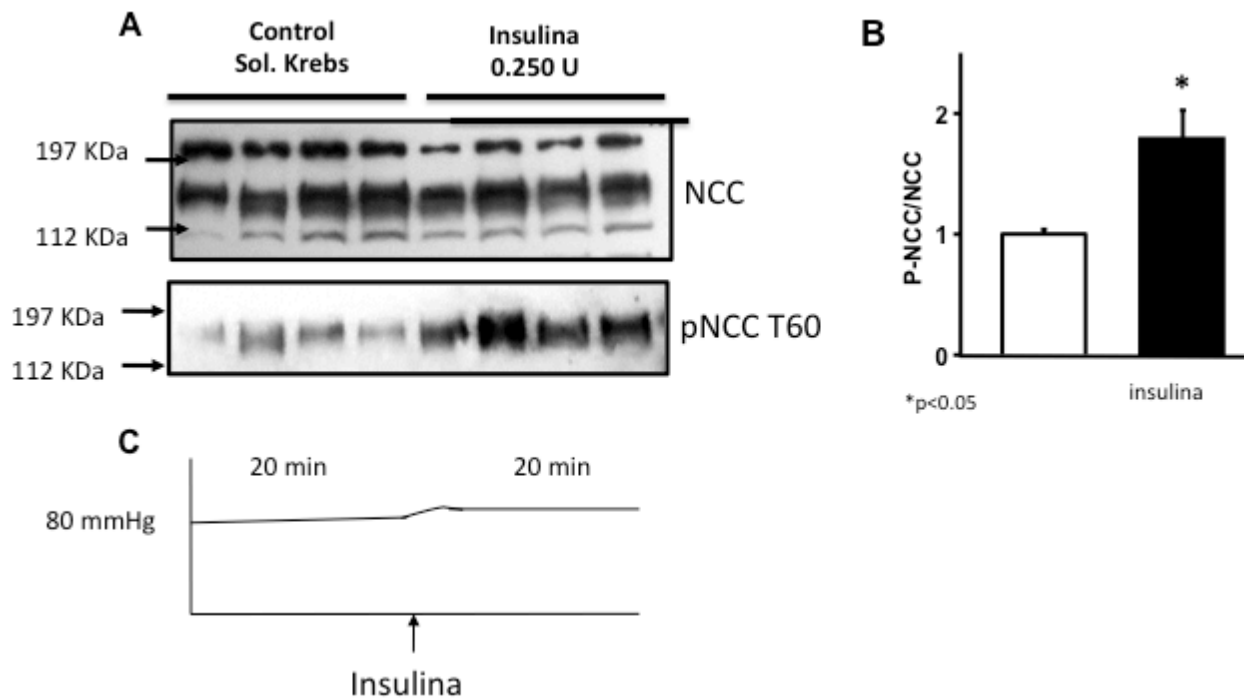


Figura 57. La insulina aumenta la fosforilación del NCC en riñones perfundidos *ex vivo* con la insulina. A. Ensayo de tipo Western Blot para detectar el NCC total y el fosforilado en cortezas de riñones. Cada carril representa a un individuo. B) Cuantificación densitométrica de las bandas del blot del panel A C) La presión del riñón no cambia durante perfusión de la insulina.

Dadas estas observaciones, podemos concluir que la insulina es un activador importante de la actividad del NCC que se asocia con un incremento en la fosforilación de la T60 del NCC. Esto se corroboró al utilizar distintos modelos experimentales que van desde la expresión en un sistema heterólogo, el uso de células del DCT con actividad endógena del cotransportador y en riñones de rata perfundidos *ex-vivo*. Esta activación del NCC por la insulina ocurre

de una manera dependiente de PI3K- mTORC2-AKT (figura 58) y no a través de la vía de la cinasa MAP o de mTORC1.

Distintas evidencias muestran que la regulación de otros cotransportadores por la insulina es dependiente de SGK. Por ejemplo, la activación de ENaC por la insulina requiere a SGK, ya que la coexpresión de versiones dominantes negativas de SGK previenen la estimulación del canal por dicha hormona (Wang et al., 2001). Otro ejemplo, es ROMK que requiere a SGK para su endocitosis y así se regula negativamente (Cheng y Huang, 2011a). Los resultados aquí presentados muestran que NCC no requiere de la SGK para ser activado por la insulina. A diferencia de ENaC y ROMK, que se expresan a lo largo de la nefrona distal, la mayor abundancia del NCC se encuentra en DCT1, lugar que no es sensible a la aldosterona por la falta de la deshidrogenada 11-β hidroxioesteroide. Esto puede ser una razón plausible de la independencia de SGK en la regulación del NCC, a diferencia de otros tipos de regulación del NCC que si requieren a SGK, como la vía aldosterona-SGK-Nedd4-2 (Arroyo et al., 2011a) Esto sugiere que a pesar de las convergencias en las vías de activación entre NCC, ENaC y ROMK, existe una regulación diferencial y única en cada uno de los transportadores.

La cinasa WNK3, que se expresa a lo largo del riñón (Holden et al., 2004), regula de manera positiva a NCC al modular su fosforilación y su tráfico a la membrana (Pacheco-Alvarez et al., 2012; Rinehart et al., 2005). Nuestros resultados muestran que la WNK3 además se requiere para activar al NCC por la insulina, siendo un mecanismo que promueve la reabsorción de sal en condiciones de hiperinsulinismo y que produce hipertensión arterial (Chavez-Canales et al., 2013). A pesar de las asociaciones directas de la WNK3 sobre la regulación del NCC, la ausencia de esta cinasa en el modelo murino $WNK3^{-/-}$ sugiere que su actividad no es fundamental como lo pueden ser otros reguladores del NCC, como la L-WNK1 y WNK4. En condiciones basales, la ausencia de la WNK3 en el ratón $WNK3^{-/-}$ se compensa por la sobreexpresión de otros reguladores positivos como la L-WNK1 (Mederle et al., 2013; Oi et al., 2012), quizás por ser de mucho menor abundancia en el DCT y porque, como se comprobó en este trabajo, la vía de activación de la L-WNK1 y la WNK3 convergen en SPAK. Esto puede explicar nuestras observaciones respecto a la activación del NCC por la insulina y los da-

tos observados en los pacientes con hiperinsulinemia crónica que desarrollan hipertensión arterial. Si la cinasa WNK3 es de mucho menor expresión que otros activadores del NCC y la activación de la insulina ocurre por la WNK3, la reabsorción de sodio ocurriría poco a poco y sólo a largo plazo se modificaría la curva de natriuresis de presión. Por esta razón, con los cambios en la presión arterial no se vería súbitamente, sino paulatinamente como, de hecho ocurre en la hipertensión arterial asociada a la hiperinsulinemia crónica presente en la diabetes, la obesidad y el síndrome metabólico.

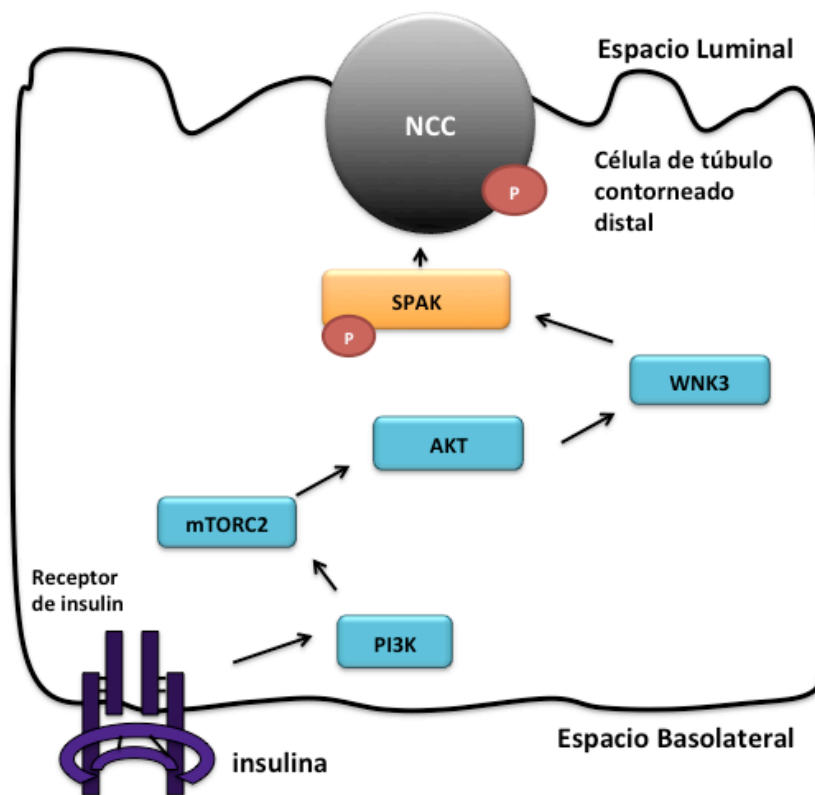


Figura 58. La insulina activa al NCC por la vía de PI3K-mTORC2-AKT-SGK

En resumen, la activación del NCC por la insulina ocurre a través de la vía PI3K-mTORC2-AKT-WNK3, y esto se refleja en un aumento en la reabsorción de sal en la nefrona distal. Como previamente se mencionó, la insulina activa distintos mecanismos para regular el balance de sal y de potasio en el cuerpo (DeFronzo, 1981), y esto lo hace a través de aumentar la reabsorción de sal en la nefrona distal (DeFronzo, 1981; DeFronzo et al., 1976). Existen al

menos tres hipótesis que pueden explicar los impactos fisiológicos de este efecto de la insulina sobre el NCC, y que además estas hipótesis no son excluyentes entre sí ya que todas tienen en común el mantenimiento de la homeostasis en los fluidos corporales. La primera llama a las necesidades de líquido y electrolitos generadas por los efectos de la insulina sobre el crecimiento, diferenciación y proliferación celular. La segunda hipótesis es que la insulina, al ser secretada después de la ingesta, puede regular el incremento en la reabsorción de sodio cuando los riñones perciben un aumento en la carga del filtrado de sodio por el bolo de la dieta, y así la estimulación de la actividad del NCC puede ayudar a modular la excreción de sal durante y después del consumo de los alimentos. El aumento tanto en NCC como en ENaC promueve este efecto. La segunda explicación plausible se refiere a la reducción en la excreción del potasio al inducirse la inhibición de ROMK por la insulina. Se sabe que la insulina induce hipokalemia al promover la captura celular del potasio sérico acompañado de la captura de la glucosa. Para prevenir la hipokalemia generada por la secreción postprandial de la insulina se requiere aumentar la actividad del NCC y de ENaC y al mismo tiempo se requiere la inhibición de ROMK. De hecho, existe evidencia que muestra que la insulina previene la pérdida de potasio al inhibir a ROMK (Cheng y Huang, 2011b) y existe distinta evidencia que muestra que la dieta baja en potasio incrementa la fosforilación de NCC y ENaC.

Discusión general

Existen evidencias clínicas, experimentales y genéticas que revelan la importancia de la regulación del cotransportador renal de sal sensible a tiazidas, NCC, sobre el mantenimiento del balance de los electrolitos y de la presión arterial; y por ende en la homeostasis. El papel fundamental de las cinasas WNK en la regulación del NCC ha quedado claro desde su identificación como causantes del síndrome de Gordon o PHAI (Wilson et al., 2001), mientras que la reducción de la actividad del cotransportador produce la enfermedad de Gitelman, en la que se presentan justo las manifestaciones clínicas contrarias a las del PHAI (Berkman et al., 1999; Gitelman et al., 1966; Kunchaparty et al., 1999b; Melander et al., 2000).

En el modelo que nosotros proponemos se reconoce a la cinasa L-WNK1 como un potente activador del NCC, como previamente se había reportado para WNK3 (Pacheco-Alvarez et al., 2012; Rinehart et al., 2005). Proponemos que la L-WNK1 y la WNK3 activan al NCC por la misma vía y que esta vía es dependiente de la cinasa SPAK (figura 58). Estudios previos (Yang et al., 2003) no habían podido demostrar esto debido el uso de una clona de L-WNK1 en la que encontramos que presenta una mutación no deseada la cual impide su correcto funcionamiento. Además, este modelo ubica a la cinasa WNK4 como el regulador de las cinasas L-WNK1 y WNK3, al ser un intermediario esencial en la modulación de la actividad del NCC frente a los efectos que la dieta o los cambios en el volumen celular puedan tener. Proponemos que en ausencia de la angiotensina II, WNK4 interactúa con WNK1 y WNK3, gracias a los motivos HQ ubicados en su extremo carboxilo terminal, y así se impide la activación del NCC (figura 58). De manera contraria, la angiotensina II induce un cambio en la forma de acción de la WNK4 que libera a la L-WNK1 y a la WNK3 para activar a SPAK y por consiguiente al NCC. El mecanismo molecular por el cual la angiotensina II produce este cambio no está definido aún y se requiere mayor investigación al respecto.

Además, nuestros resultados muestran que la isoforma de WNK1 específica de riñón, la KS-WNK1 es un poderoso activador del NCC que induce su fosforilación y abundancia en la membrana y que quizás tiene funciones en la preservación del potasio (figura 58). Esto tampoco había sido posible demostrar debido a la mutación S2120 en esta variante. No obs-

tante, se requiere mayor investigación al respecto para determinar la importancia y los mecanismos que subyacen a estas observaciones

Nuestro modelo (figura 58) resuelve varias observaciones hasta ahora confusas. Primero, ubica a la L-WNK1 como un importante activador del NCC y propone un mecanismo fisiopatológico de la enfermedad PHAII dada por las mutaciones que aumentan su expresión; ya sea por las intrónicas o por las que ocurren en su dominio ácido que impiden la interacción con el complejo de ubiquitinación KLH3-CUL3 y por consiguiente su regulación negativa. Segundo, integra las observaciones bioquímicas previas en las que se observa que la L-WNK1 es un activador de SPAK mucho más potente que la WNK4 y que esto conlleva a la activación del NCC. Tercero, este modelo ofrece una respuesta al por qué si la WNK3 es un poderoso activador del NCC en experimentos *in vitro*, el ratón deficiente de este gen presenta un fenotipo discreto; ya que el incremento de la L-WNK1 en este ratón compensa la pérdida de la WNK3 debido a que están en la misma vía de activación del cotransportador. Cuarto, propone un mecanismo potencial de regulación en el que la WNK4 puede transitar entre ser un inhibidor de la actividad del NCC, dadas las interacciones físicas con la L-WNK1 y la WNK3 por los dominios HQ o ser un activador en presencia de la angiotensina II al prevenir la inhibición de estas cinasas y así, activar al cotransportador.

También proponemos un mecanismo de regulación de la cinasa L-WNK1 por el complejo de ubiquitinación KLHL3-CUL3 (figura 58), previamente identificado como partícipe de la regulación del NCC y determinante en el desarrollo de PHAII (Boyden et al., 2012; Louis-Dit-Picard et al., 2012; Ohta et al., 2013).

Adicionalmente, nuestro modelo ubica a la insulina como una hormona importante en la regulación del NCC que incrementa su actividad, fosforilación y abundancia en la membrana y propone un mecanismo molecular que subyace a dicha regulación (figura 58). Estos experimentos se demostraron en ovocitos de *X. laevis*, en células de túbulo contorneado distal y en riñones perfundidos *ex vivo* con la insulina. Se encontró que la cinasa WNK3 es un importante regulador de los efectos de la insulina y que depende de la vía PI3K-mTORC2-AKT

(figura 58). Nuestros resultados sugieren un mecanismo que puede explicar el desarrollo de la hipertensión arterial asociada a condiciones de hiperinsulinismo.

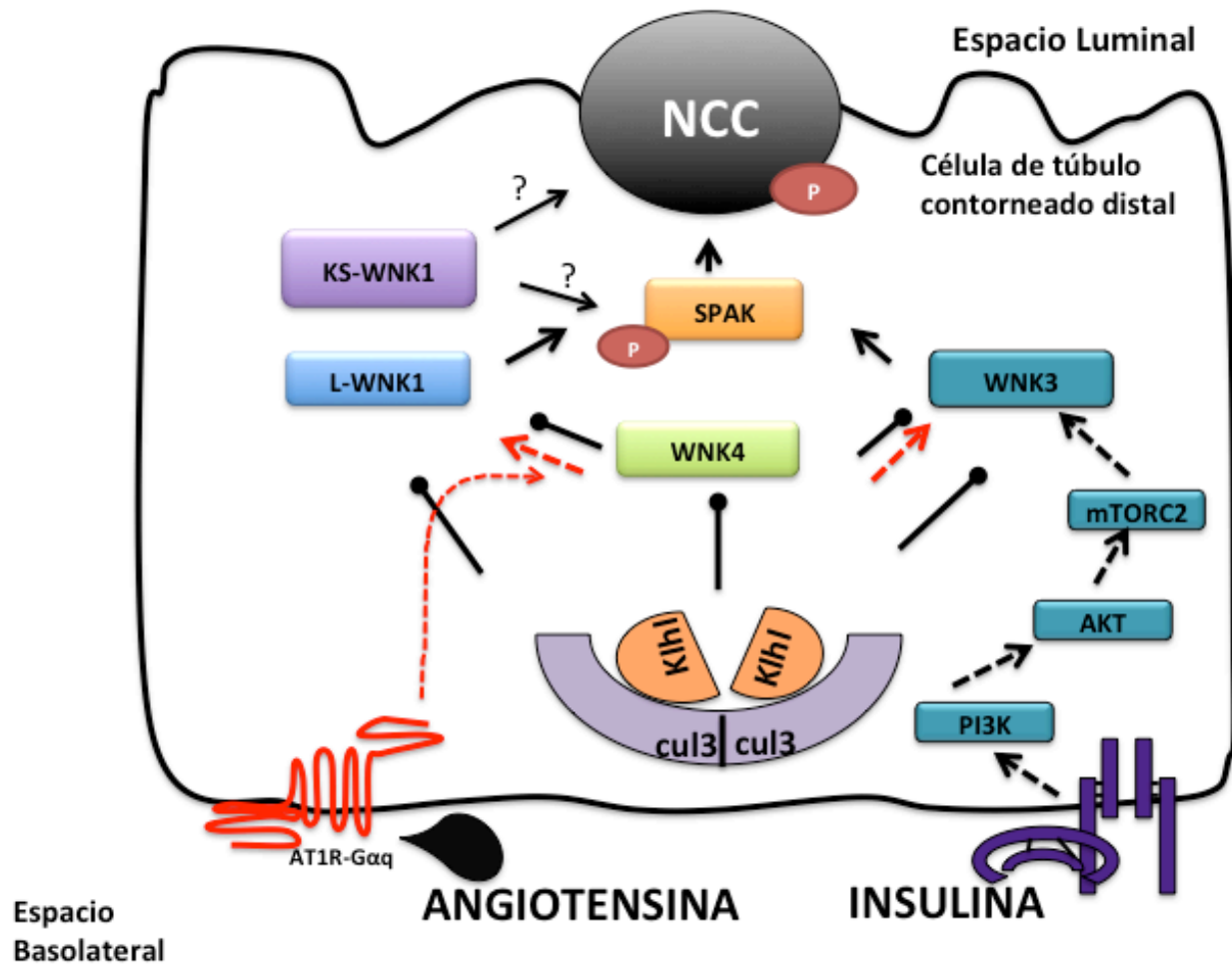


Figura 58. Modelo de regulación del NCC. La insulina y la angiotensina son las señales hormonales que activan al cotransportador y modulan su actividad.

Conclusiones

- La cinasa WNK1, particularmente la isoforma renal L-WNK1- Δ 11, es un regulador positivo del NCC que aumenta la actividad del cotransportador asociada con un incremento en la fosforilación y la abundancia en la membrana del NCC.
- La cinasa WNK4 actúa como un inhibidor del NCC al modular el efecto WNK3 y WNK4 debido a la interacción entre ellas por los sitios HQ.
- La angiotensina II regula la actividad del NCC al prevenir el efecto de la WNK4 sobre la vía de WNK1/WNK3 y SPAK.
- La isoforma KS-WNK1 aumenta la actividad, fosforilación y cantidad en la membrana del NCC y no es regulada por la cinasa WNK4.
- La insulina aumenta la actividad del NCC al incrementar su fosforilación por la vía que depende de PI3K-mTORC2-AKT y a la cinasa WNK3.

Publicaciones

El trabajo realizado durante mis estudios doctorales generó las siguientes publicaciones.

- Chávez-Canales M, Arroyo JP, Ko B, Vázquez N, Bautista R, Castañeda-Bueno M, Bobadilla NA, Hoover RS, Gamba G. *Insulin increases the functional activity of the renal NaCl cotransporter*. Journal of Hypertension. (2013) 31(2), 303-311.
- Chávez-Canales M, Soukaseum C, Chao-Ling Y, Moreno E, Pacheco-Alvarez D, Vidal-Petiot E, Castañeda-Bueno, Vázquez N. Rojas-Vega L, Jeunemaitre X, Ellison DH, Gamba G, Hadchouel J. *WNK-SPAK-NCC cascade revisited: WNK4 regulates WNK1-mediated activation of the NaCl cotransporter*. Proceedings of the National Academy of Sciences (2014) en prensa
- Lagnaz, D, Arroyo JP, Chávez-Canales M, Vázquez N, Debonneville, A, Staub O, y GG. *WNK3 abrogates the NEDD4-2-mediated inhibition of the renal Na⁺:Cl⁻ Cotransporter*, American Journal of Physiology, 2014 en prensa

Artículo para obtención de grado

Insulin increases the functional activity of the renal NaCl cotransporter

María Chávez-Canales^a, Juan Pablo Arroyo^a, Benajmin Ko^b, Norma Vázquez^a, Rocio Bautista^c,
María Castañeda-Bueno^a, Norma A. Bobadilla^a, Robert S. Hoover^d, and Gerardo Gamba^{a,c}

Objectives: Insulin is recognized to increase renal salt reabsorption in the distal nephron and hyperinsulinemic states have been shown to be associated with increased expression of the renal NaCl cotransporter (NCC). However, the effect of insulin on NCC functional activity has not been reported.

Methods: Using a heterologous expression system of *Xenopus laevis* oocytes, a mouse distal convoluted cell line, mDCT15 cells, endogenously expressing NCC, and an ex-vivo kidney perfusion technique, we assessed the effect of insulin on the activity and phosphorylation of NCC. The signaling pathway involved was analyzed.

Results: In *Xenopus* oocytes insulin increases the activity of NCC together with its phosphorylation at threonine residue 58. Activation of NCC by insulin was also observed in mDCT15 cells. Additionally, insulin increased the NCC phosphorylation in kidney under the ex-vivo perfusion technique. In oocytes and mDCT15 cells, insulin effect on NCC was prevented with inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), mTORC2, and AKT1 kinases, but not by inhibitors of MAP or mTORC1 kinases, suggesting that PI3K-mTORC2-AKT1 is the intracellular pathway required. Additionally, activation of NCC by insulin was not affected by wild-type or mutant versions of with no lysine kinase 1, with no lysine kinase 4, or serum glucocorticoid kinase 1, but it was no longer observed in the presence of wild-type or the dominant negative, catalytically inactive with no lysine kinase 3, implicating this kinase in the process.

Conclusion: Insulin induces activation and phosphorylation of NCC. This effect could play an important role in arterial hypertension associated with hyperinsulinemic states, such as obesity, metabolic syndrome, or type 2 diabetes mellitus.

Keywords: distal convoluted tubule, hypertension, obesity, salt transport, thiazide, with no lysine kinase 3

Abbreviations: DCT, distal convoluted tubule; ENaC, epithelial Na⁺ channel; MAPK, mitogen-activated protein kinase; mTOR, mammalian target of rapamycin; NCC, Na⁺Cl⁻ cotransporter; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; ROMK, renal outer medulla potassium channel; SGK1, serum glucocorticoid kinase 1; WNK1, with no lysine kinase 1; WNK3, with no lysine kinase 3; WNK4, with no lysine kinase 4

INTRODUCTION

Metabolic syndrome, obesity, and type 2 diabetes mellitus are associated with arterial hypertension. The higher the BMI, the greater the hypertension prevalence, and several lines of evidence strongly suggest that obesity plays a causative role in hypertension and that connection could be explained, at least in part, by hyperinsulinemia [1–3]. Insulin resistance in the classical target organs for this hormone (liver, muscle, and adipose tissue) leads to increase circulating levels of insulin, which would then have amplified effects on other tissues, with the kidney being particularly sensitive, as it is by far the most perfused organ of the body.

Insulin is known to promote salt reabsorption in the kidney [3], particularly via its actions in the distal nephron [3–5]. Insulin receptors are expressed all along the nephron [3]. In obese Zucker rats or db/db mice, the increased salt reabsorption is associated with overexpression at the mRNA or protein levels of distal nephron NaCl transport proteins, such as the renal specific bumetanide-sensitive Na⁺:K⁺:2Cl⁻ cotransporter, NKCC2, the thiazide-sensitive Na⁺:Cl⁻ cotransporter, NCC [6–8], the α -subunit of the Na⁺:K⁺-ATPase, and the β -subunit of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel (ENaC) [9]. In addition, insulin increases the activity of ENaC by a phosphatidylinositol kinase 3 (PI3K)-serum glucocorticoid kinase 1 (SGK1) dependent mechanism [10].

The NCC plays a key role in the regulation of arterial blood pressure. On the one hand, inactivating mutations of NCC lead to Gitelman's disease, which features arterial

Journal of Hypertension 2013, 31:303–311

^aMolecular Physiology Unit, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México and Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Tlalpan, Mexico City, Mexico, ^bDepartment of Medicine, University of Chicago, Chicago, Illinois, ^cDepartment of Nephrology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Tlalpan, Mexico City, Mexico and ^dDivision of Nephrology, Department of Medicine, Emory University, and Veteran's Administration Medical Center, Atlanta, Georgia, USA

Correspondence to Gerardo Gamba, Molecular Physiology Unit, Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan 14000, Mexico City, Mexico. Tel: +52 55 5513 3868; e-mail: gamba@biomedicas.unam.mx

Part of this work was presented during the 2010 Annual Meeting of the American Society of Nephrology in Denver, CO and published as an abstract (J Am Soc Nephrol 2010; 21:64A).

Received 19 July 2012 Revised 3 October 2012 Accepted 20 October 2012

J Hypertens 31:303–311 © 2013 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

DOI:10.1097/HJH.0b013e32835bbb83

hypotension and hypokalemia [11]. Moreover, in the Framingham study, patients with a missense mutation in one allele of NCC, which decreased its activity [12], were protected against the development of hypertension [13]. On the contrary, mutations in the with-no-lysine kinases 1 (WNK1) and with no lysine kinases 4 (WNK4), respectively, cause pseudohypoaldosteronism type II (PHAII) in which arterial hypertension seems to be due to the disturbance of the physiological WNK-mediated regulation of NCC, thus increasing the co-transporter activity and arterial blood pressure. Additionally, inhibition of NCC by thiazide-type diuretics has been a cornerstone in the treatment of hypertension over the last 50 years [14].

Increasing the activity of NCC could be one of the mechanisms through which hyperinsulinism leads to arterial hypertension. This assumption is supported by the observation that hyperinsulinism is associated with increased expression of NCC [9]; chronic insulin infusion to normal rats increased the natriuretic response to hydrochlorothiazide, a specific inhibitor of NCC [8]; and that rosiglitazone (antidiabetic drug) administration to obese Zucker rats reduces insulin blood levels and the sensibility to thiazides [6]. However, it is not known from these models if in addition to the expression, insulin up-regulates the functional activity of NCC. In the present study, we thus analyzed the effect of insulin on NCC activity and phosphorylation.

METHODS

Clones and antibodies

The previously characterized clones and antibodies used were: rat Flag-NCC (rNCC) [15], human c-Myc-tagged WNK3 [16], mutant c-Myc-tagged WNK3-D294A [17], mouse wild-type hemagglutinin (HA)-tagged WNK4 and mutant HA-tagged WNK4-D318A [18], wild-type SGK1 and mutant SGK1-K104M [19]. Monoclonal anti-Flag antibody and polyclonal antiactin (Sigma). Polyclonal antibodies against total NCC or phospho-antibodies Thr 58-NCC (kindly provided by Dario Alessi, Dundee University) [20].

Preparation of *Xenopus laevis* oocytes

As previously described in detail [21–23], under anesthesia induced by 0.17% tricaine immersion, oocytes were surgically collected from adult female *Xenopus laevis* frogs. One hour after incubation in a Ca^{2+} -free ND96 medium supplemented with 2 mg/ml collagenase A (mmol/l: 96 NaCl, 2 KCl, 1 MgCl₂, and 5 HEPES/Tris, pH 7.4), oocytes were manually defolliculated and incubated overnight in ND96 at 16°C. The next day, mature oocytes were injected with cRNA transcribed *in vitro* from one or various constructs at a concentration of 0.2–0.4 μg/μl. The control oocytes were injected with water. For 2 days oocytes were incubated at 16°C in ND96 supplemented with sodium pyruvate (2.5 mmol/l) and gentamicin (5 mg/100 ml). cRNA for microinjection was synthesized *in vitro* with T7 RNA polymerase from linearized cDNAs at the 3' end. The cRNAs were analyzed for integrity, quantified and stored in aliquots at –80°C until use.

Functional assays

After 2 days of incubation, the activity of NCC was assessed following our standard procedures [22,23]. Briefly, a 30-min incubation in a Cl[–]-free ND96 medium containing 1 mmol/l ouabain, 0.1 mmol/l amiloride, and 0.1 mmol/l bumetanide was followed by a 60-min uptake period in a K⁺-free, NaCl medium (40 mmol/l NaCl, 56 mmol/l Na-gluconate, 4.0 mmol/l CaCl₂, 1.0 mmol/l MgCl₂, and 5.0 mmol/l Hepes/Tris, pH 7.4) containing ouabain, amiloride, bumetanide and 2 μCi of ²²Na⁺ per ml. Insulin alone or in the presence of inhibitors of the insulin transduction pathways: Wortmannin (Sigma), Rapamycin, UO126 (Callbiochem) [24], SB203580 (Callbiochem), AKT IV Inhibitor (Callbiochem), AZD8055 (Selleck) [25] were dissolved at 10 mmol/l dimethylsulfoxide (DMSO) as stock solutions and preserved at –20°C. All compounds were added before the uptake period for 1–15 min. All uptake experiments were performed at least three times and included at least 10 oocytes in each experimental group; statistical significance was $P < 0.05$ and results were reported as means ± standard error. The uptake observed in control groups was taken as 100% (fold-1), and experimental groups were normalized accordingly. The significance of the differences between groups was tested by Student's *t*-test or one-way analysis of variance with multiple comparisons using Bonferroni corrections.

Western blotting

The expression and phosphorylation of NCC at T58 was assessed with proteins extracted from oocytes as previously described [17]. Briefly, groups of 10 oocytes exposed to each condition were homogenized in 4 μl/oocyte of lysis buffer (50 mmol/l Tris/HCl, pH 7.5, 1 mmol/l ethylene glycol tetraacetic acid, 1 mmol/l EDTA, 50 mmol/l sodium fluoride, 5 mmol/l sodium pyrophosphate, 1 mmol/l sodium orthovanadate, 1% (w/v) Nonidet P-40, 0.27 mol/l sucrose, 0.1% [v/v] 2-mercaptoethanol, and protease inhibitors (complete tablets, Roche, 1 tablet per 50 ml)] and centrifuged at 10 000g to collect the supernatants. Fifty micrograms of total protein was resolved by 7.5% SDS-PAGE and electroblotted onto polyvinylidenedifluoride membranes (PVDF; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, New Jersey, USA). Membranes were blocked for 2 h at room temperature in tris base-sodium chloride buffer –0.02% Tween-20 and 5% nonfat milk and exposed to either the mouse anti-Flag peroxidase-conjugated antibody (Sigma), 1:5000, or the phospho-antibodies Thr 58-NCC.

Cell culture and treatments

Mouse distal convoluted tubule 15 (mCDT15) cells, which endogenously express NCC [19,26,27], were plated on cell culture dishes and grown in growth medium containing a 50:50 mix of DMEM/F12, 5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin/neomycin (P/S/N), at 37°C. Experiments were conducted when the cells reached 90–95% confluence [19].

Assessment of NaCl cotransporter function in mDCT15 cells

mDCT15 cells were seeded in 12-well plates and prepared as described [27]. The cells were then incubated in a serum-free growth media (Opti-Mem) for 24 h prior to being assayed. Cells were then treated with insulin for the indicated times. Thirty minutes before uptake, 0.1 mmol/l metolazone was added to the media. The medium was then changed to a $^{22}\text{Na}^+$ -containing medium (140 mmol/l NaCl, 1 mmol/l CaCl₂, 1 mmol/l MgCl₂, 5 mmol/l HEPES/Tris pH 7.4, 1 mmol/l amiloride, 0.1 mmol/l bumetanide, 0.1 mmol/l benzamil, 1 mmol/l ouabain, and 1 microCi/ml of $^{22}\text{Na}^+$) with or without thiazide (0.1 mmol/l metolazone) and incubated for 20 min. Tracer uptake was then stopped via washes with ice-cold wash buffer. Cells were subsequently lysed with 0.1% SDS (sodium dodecyl sulfate). Radioactivity was measured via liquid scintillation and protein concentrations of the lysates were determined [Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay, Pierce]. Uptakes were normalized to nmol/mg. Thiazide-sensitive uptake was determined by calculating the difference of the uptakes with and without thiazide.

NaCl cotransporter response to insulin in ex-vivo perfused rat kidney

NCC phosphorylation was analyzed after insulin administration using the 'ex vivo' perfusion system mounted in Langendorff preparation as previously described [28,29]. In brief, we used male Wistar rats of 250 g. Rats were anesthetized with 63 mg/kg sodium pentobarbital intraperitoneally. By laparotomy, the right kidney was exposed and the mesenteric and right renal arteries were cleared of surrounding tissue. The right renal artery was then cannulated. The right ureter was also cut and the animal was euthanized with sodium pentobarbital. The removed kidney was suspended in a water-jacketed bath at 37°C and perfused at constant flow with Krebs' solution at 37°C and gassed with O₂-CO₂ (95: 5%). The flow was adjusted to obtain a basal perfusion pressure of 75–90 mmHg. The perfusion pressure was measured by a blood pressure

transducer (Model PT300; Grass Instruments, West Warwick, Rhode island, USA) and was recorded using a polygraph (Model 7D; Grass Instruments, Quincy, Massachusetts, USA). Insulin was administered in the perfusate at a rate of 0.06–0.125 U/ml, which had no effect in the perfusion pressure. After 30 min of perfusion, the kidney was manually separated into cortex and medulla and corresponding fragments were frozen in liquid nitrogen for protein extraction to analyze NCC expression and phosphorylation by Western blot.

All procedures in the present study were approved by our institutional review committee.

RESULTS

Insulin is a powerful activator of NaCl cotransporter

The heterologous expression system of *Xenopus laevis* oocytes has shown to be the one exhibiting the most robust and reproducible expression of transfected NCC. In addition, oocytes are able to respond to insulin owing to the expression of its receptor in the membrane [30]. As previously shown [23], oocytes microinjected with NCC cRNA induced the appearance of thiazide-sensitive Na⁺ uptake that was not present in water-injected oocytes (Fig. 1a), demonstrating the functional expression of the cotransporter. Exposing the oocytes to human recombinant insulin for 15 min in the preuptake solution at a concentration of 20 U/ml significantly increased the rNCC-induced Na⁺ uptake (Fig. 1a). On an average of 22 different experiments, insulin induced a 2.6 ± 0.1 -fold increase in the rNCC activity (Fig. 1b). The thiazide-sensitive Na⁺ uptake in mDCT15 also increased by insulin from 1556 ± 32 nmol/mg per 20 min in its absence to 2037 ± 68 nmol/mg per 20 min in its presence ($P < 0.05$) (Fig. 1c). Thus, the positive effect of insulin on NCC was observed in both, *Xenopus laevis* oocytes and mDCT15 cells.

The effect of insulin on NCC was both dose and time dependent. We observed a significant effect of insulin on NCC-induced Na⁺ uptake with a little as 1 min

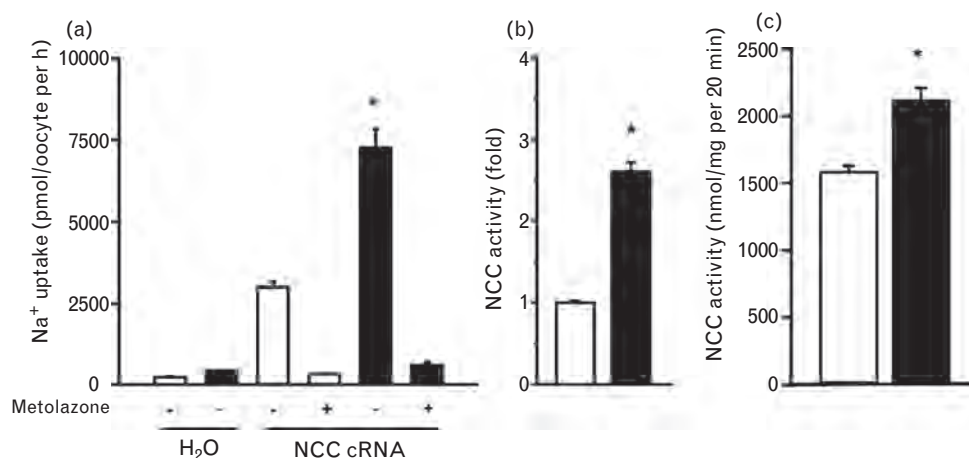


FIGURE 1 Insulin activates the renal thiazide-sensitive Na⁺:Cl⁻ cotransporter (NCC), in *X. laevis* oocytes and in mDCT15 cells. (a) Na⁺ uptake was determined in the absence (white bars) or presence of 20 U/ml insulin (black bars) in microinjected oocytes with water or with rat Flag-NCC (rNCC) cRNA and in the absence or presence of metolazone, as stated. ($P < 0.001$ vs. all other groups). (b) The thiazide-sensitive Na⁺ uptake observed in rNCC control in the absence of insulin was taken as 1, and the effect of insulin was normalized accordingly. ($N = 22$; * $P < 0.001$ vs. control). (c) NCC activity was analyzed in mDCT15 cells endogenously expressing NCC in the absence (white bar) or presence (black bar) of insulin. ($N = 5$; * $P < 0.001$).

of exposure before the uptake period using 20 U/ml or with a concentration as low as 1 U/ml for 15 min before the uptake (data not shown). Stimulation of rNCC in oocytes was also observed using bovine insulin (Sigma). rNCC basal activity of 3359 ± 56 pmol/oocyte per h increased to 5135 ± 58 pmol/oocyte per h when exposed to bovine insulin ($P < 0.01$). Activation of NCC was also observed using the human NCC cRNA. Microinjection of *Xenopus* oocytes with human NCC cRNA induced a Na^+ uptake that was 6416 ± 275 pmol/oocyte per h in the absence and 9641 ± 325 pmol/oocyte per h in the presence of insulin ($P < 0.001$).

Insulin increases phosphorylation of NaCl cotransporter

Activation of NCC is associated with increased phosphorylation of two threonine and one serine residues located in the amino terminal domain [15]: T53, T58, and S71, respectively in the rat NCC (T55, T60, and S73 in human NCC). Of these residues, T58 is the most important one, because preventing phosphorylation of T58, abrogates the phosphorylation in the other two sites [20] and the activity of the cotransporter [15]. As shown in Fig. 2a, using a specific phosphoantibody against threonine 58, NCC phosphorylation in basal conditions was slightly detected. However, the signal increased after exposing oocytes to insulin. Note also that NCC phosphorylation induced by insulin was prevented by incubation of oocytes with the known PI3K inhibitor wortmannin (Fig. 2b).

In order to define if the effect of insulin occurs *in vivo*, we used the ex-vivo perfused rat kidney preparation, which

allows analysis of hormonal effects on the kidney without the intervention of the central nervous system and/or extra renal hormonal networks. For this purpose, the right kidney from normal adult male Wistar rats was perfused with saline solution alone or containing insulin, at a concentration that did not change the perfusion pressure. As shown in Fig. 2c and 2d the level of T-58-NCC phosphorylation was significantly higher in the kidneys exposed to insulin than in controls. Thus, insulin induces NCC phosphorylation in the rat kidney.

Insulin activation of NaCl cotransporter occurs via phosphatidylinositol 3-kinase-mTORC2-AKT

The known pathways through which insulin induces phosphorylation of threonine and serine residues were analyzed. Exposing oocytes to 50 nmol/l wortmannin had no significant effect on the basal activity of NCC, but completely prevented the positive effect by insulin (Fig. 3a). This is consistent with results on Fig. 2b in which the insulin-induced increase in NCC phosphorylation at T58 was completely prevented in the presence of wortmannin. In contrast, inhibitors of the MAP kinases did not affect basal activity of NCC or prevent the positive effect of insulin (Fig S1, <http://links.lww.com/HJH/A218>). Thus, the pathway implicated in insulin-induced NCC activation is via PI3K.

We then assessed the effect of specific inhibitors of the mammalian target of rapamycin complex 1 and 2 (mTORC1 and mTORC2), and AKT enzymes. Rapamycin, an inhibitor of mTORC1, had no effect on the insulin-induced activation of NCC (Fig. S1, <http://links.lww.com/HJH/>

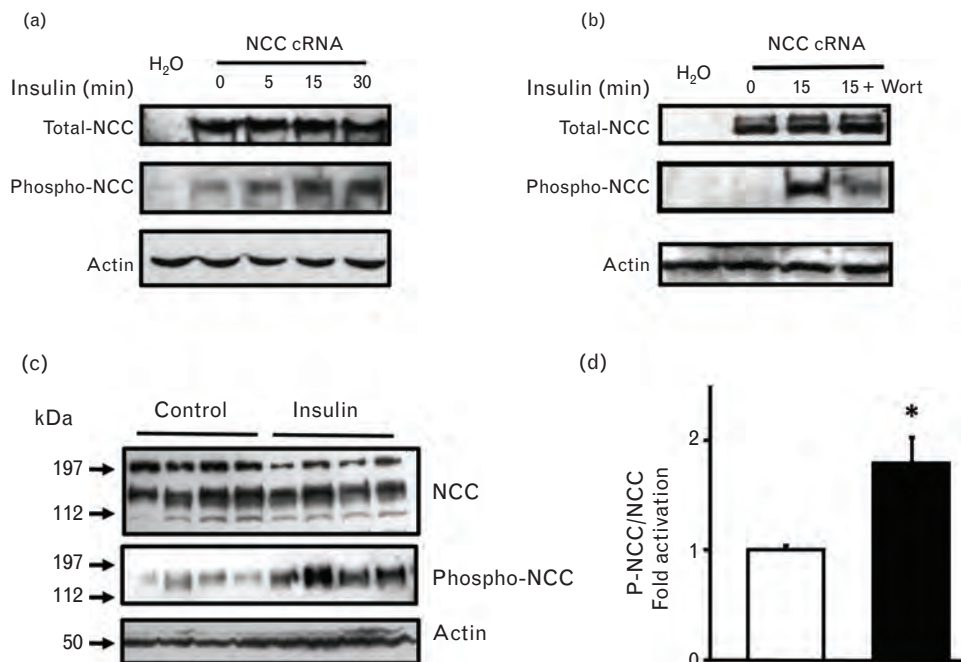


FIGURE 2 Insulin induces phosphorylation of rat Flag-NCC (rNCC) at threonine 58. (a and b) Representative Western blot assays performed using antiFlag monoclonal antibody, the NCC-T58 phosphoantibody, and β -actin antibody, as stated. Total proteins were extracted from *Xenopus laevis* oocytes injected with water or rNCC cRNA and exposed to insulin for 0, 5, 15 and 30 min (a), or to 15 min in the absence or presence of wortmannin (b). (c) A representative western blot analysis of protein extracts from ex-vivo perfused rat-kidneys. The kidneys were perfused with isotonic control solution or with isotonic solution containing 0.250 U/ml of insulin. (d) Densitometry analysis of phosphor- $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ cotransporter (NCC) over total rNCC from three different western blot analyses compiling a total of 10 controls and 16 insulin perfused kidneys. ($*P < 0.01$ vs. control).

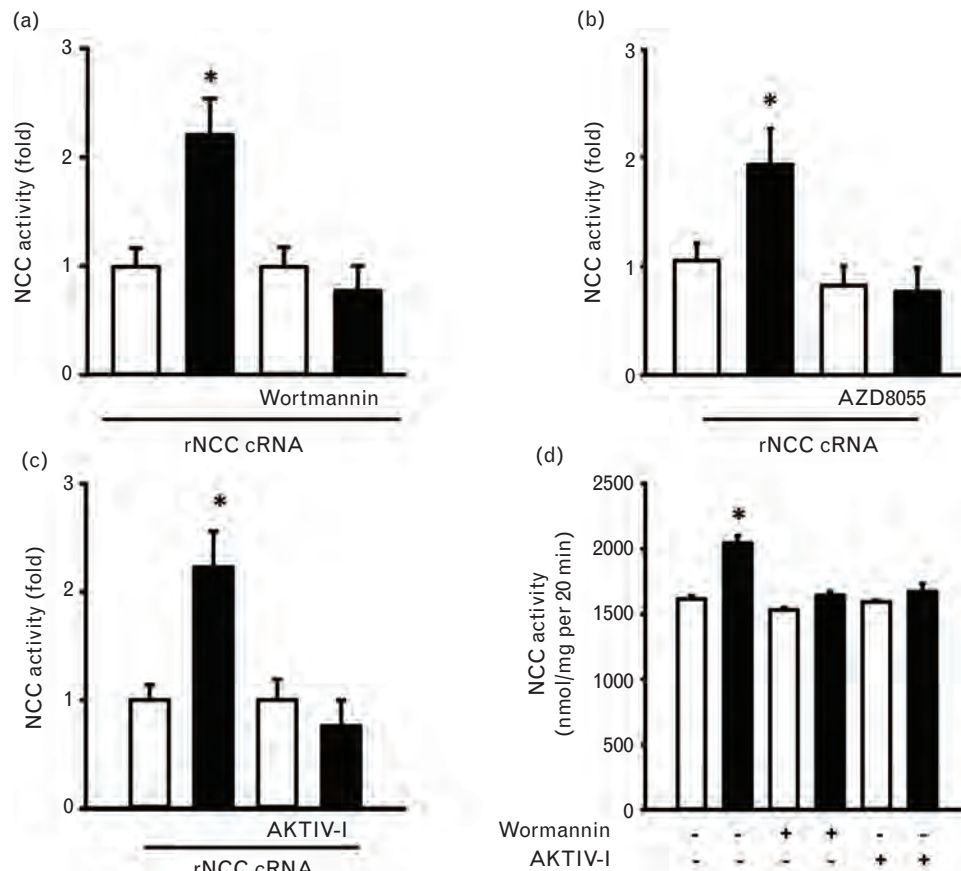


FIGURE 3 Insulin activates $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ cotransporter (NCC) through a PI3K-mTORC2-AKT pathway. *Xenopus laevis* oocytes were injected with rNCC cRNA and 3 days later Na^+ uptake was assessed by incubating the oocytes in the absence (white bars) or presence (black bars) of insulin, in the absence or presence of the PI3K inhibitor wortmannin (a), the specific inhibitor of mTORC2, AZD8055 (b); or in the presence of the AKT inhibitor, AKT IV-I (c). The mean value of the cotransporter without insulin was taken as 1 and the effect of insulin was normalized to that value (* $P < 0.0001$ vs. own control in the absence of insulin). (d) NCC activity was analyzed in mDCT15 cells in the absence (white bars) or presence of 20 U/ml insulin (black bars) with or without wortmannin or the AKT inhibitor (* $P < 0.01$ vs. control).

A218). In contrast, the compound AZD8055, an inhibitor of mTORC2, was effective in preventing the NCC stimulating effect of insulin (Fig. 3b). Similarly, as was observed with wortmannin, the specific inhibitor of the AKT kinase (AKTIV inhibitor) had no effect on basal activity of NCC, but completely prevented the activation by insulin (Fig. 3c). Thus, insulin promotes NCC activation via PI3K-mTORC2-AKT. This conclusion is supported by the observation in mDCT15 cells in which wortmannin and the AKTIV inhibitor also prevented the positive effect of insulin on NCC activity (Fig. 3d).

The kinases with no lysine kinases 1, with no lysine kinases 4, and serum glucocorticoid kinase 1 does not appear to be required for insulin effect on NaCl cotransporter

As previously reported [31] co-injection of oocytes with NCC and WNK4 cRNA resulted in a significant decrease of NCC activity. However, the level of NCC activation by insulin was similar in the NCC vs. the NCC+WNK4 group ($P < 0.01$; Fig. S2, <http://links.lww.com/HJH/A218>). We next tested if the overexpression of the dominant negative version of WNK4 and/or SGK1 had any effect.

Our data shows that even having both dominant negative WNK4-D318A and SGK1-K104M at the same time, the fold activation of NCC by insulin was similar to that seen in oocytes injected with NCC cRNA alone (Fig. S2, <http://links.lww.com/HJH/A218>). These observations are supported by results in mDCT15 cells in which WNK4 expression was reduced by knocking down WNK4 with specific RNAi. Although this treatment successfully reduced the WNK4 expression [32], exposure to insulin was still associated with an increased activity of NCC (Fig. S2, <http://links.lww.com/HJH/A218>). Thus, insulin positive effect on NCC in *Xenopus laevis* oocytes and mDCT15 cells does not appear to require the presence or activity of WNK4.

The WNK1 kinase has been shown to be required for the negative effect of PI3K on the potassium channel ROMK in a pathway in which phosphorylation of an AKT1-site located in the WNK1 threonine residue 58 is required [33]. To assess if this is also occurring for NCC, in a series of experiments ($N=8$), we tested the effect of insulin in oocytes injected with NCC cRNA alone or co-injected with NCC and a mutant WNK1-T58A, in which the AKT1 site was eliminated. Pooling eight different experiments together we observed that the effect of insulin on NCC was similar in the absence or the presence of in the presence of

WNK1-T58A (2.48 ± 0.35 vs. 2.7 ± 0.4 -fold, respectively ($P=NS$). Thus, it is unlikely that insulin signal pathway leading to NCC activation requires the WNK1 kinase.

NaCl cotransporter activation by insulin and WNK3 share the same pathway

Since it is known that oocytes endogenously express the WNK isoforms and NCC activation by insulin or by WNK3 [17] results in phosphorylation of the same threonine (T-58), we tested the hypothesis that WNK3 and insulin could share a common pathway for NCC activation. To further explore this possibility, we assessed the effect of insulin on Na^+ uptake in the presence of wild-type or mutant versions of WNK3. In the upper panel of Fig. 4, the thiazide-sensitive Na^+ uptake observed in control oocytes injected with NCC alone in the absence of insulin was taken as 100% (1-fold) and all other groups, were normalized accordingly, whereas in the lower panel (Fig. 4b), for each group of injected oocytes, the uptake observed in the absence of insulin was taken as 100% (1-fold), and in the presence of insulin was normalized accordingly.

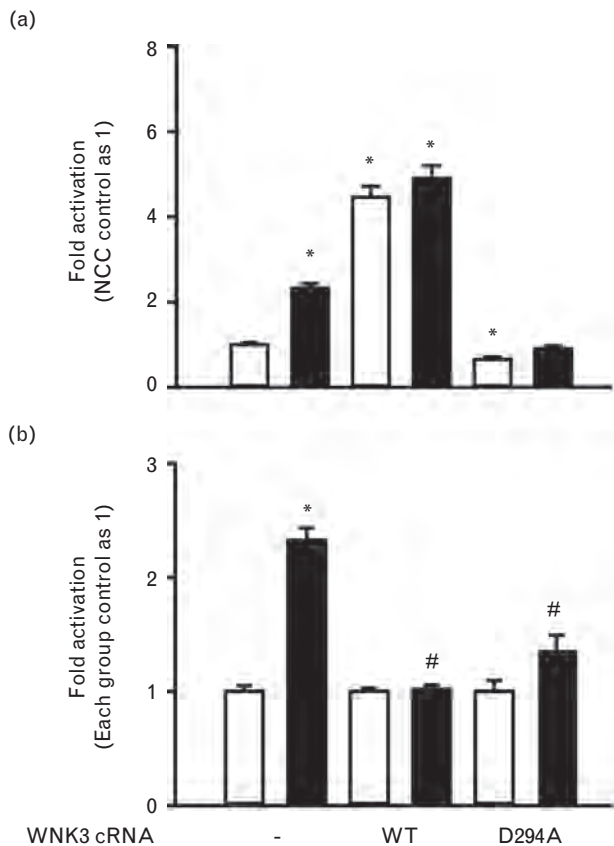


FIGURE 4 Effect of wild-type and mutant WNK3 on the $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ cotransporter (NCC) basal activity and response to insulin. *Xenopus laevis* oocytes were injected with rat Flag-NCC (rNCC) cRNA alone or together with wild-type WNK3 or the dominant negative WNK3-D294A, as stated. Three days later tracer Na^+ uptake was assessed in the absence (white bar) or presence (black bar) of insulin. (a) The Na^+ uptake observed in oocytes injected with rNCC alone in the absence of insulin was taken as 1 and all other groups were normalized accordingly. * $P < 0.01$ vs. rNCC control. (b) The Na^+ uptake observed for each group in the absence of insulin was taken as 1 and in the presence of insulin was normalized to its own control group. * $P < 0.0001$ to control group. # $P < 0.0001$ vs. rNCC alone in the presence of insulin. Figures show compiled results from at least five different experiments of each group.

As previously shown [17], wild-type WNK3 induced a significant increase in NCC activity (Fig. 4a). Addition of insulin, however, had no further effect on NCC activity. As also shown before [16], the catalytically inactive WNK3-D294A induced a dominant negative effect, reducing NCC activity to $64 \pm 6\%$ of the control group (Fig. 4a). In the presence of this mutant, the effect of insulin on NCC was dramatically reduced (Fig. 4b).

DISCUSSION

In the present study, we show that insulin is a powerful activator of NCC and that increased activity of the cotransporter is associated with augmented phosphorylation of threonine 58 that has been previously shown to be associated with activation of NCC [15,17,20,34]. The increased activity and/or phosphorylation were observed in several models including: *Xenopus laevis* oocytes, mDCT15 cells, and in ex-vivo perfused rat kidneys.

Our data suggest that insulin activation of NCC occurs via PI3K-mTORC2-AKT1, but not through the MAP kinases or mTORC1 (Fig. 2 and Fig. S1, <http://links.lww.com/HJH/A218>). In contrast, our data does not support that SGK1 is implicated, as occurs with ENaC [33,35], because over-expression of wild-type or dominant negative version of SGK1 together with NCC did not change the level of response to insulin. Because distal convoluted tubule (DCT)1 is not considered to be part of the aldosterone sensitive distal nephron owing to the absence of 11- β -hydroxysteroid dehydrogenase (type II) [36], it is believed that modulation of NCC in this region does not occur through SGK1, in contrast to DCT2, in which the aldosterone-SGK1-Nedd4-2 pathway is proposed to regulate NCC [19]. Thus, SGK1-independent modulation of NCC would provide an interesting pathway for differential regulation between NCC and ENaC.

In a recent study, Sohara *et al.* [37] suggested that insulin increases NCC phosphorylation in a WNK4-dependent manner in mice and mpkDCT cells. Mice were treated with a single intraperitoneal dose of insulin and NCC phosphorylation at threonine residues 53 and 58, and serine residue 71, was studied. They observed that NCC phosphorylation increased in the wild-type, but not in a hypomorphic WNK4 mouse. This approach, however, is not useful to discriminate between a direct action of insulin versus the consequences of systemic effects of the hormone. For instance, if the mice had experienced some degree of hypoglycemia, this could have activated the adrenergic system, which in turn would have stimulated renin release, increasing the production of angiotensin II that is known to induce NCC phosphorylation by a WNK4-dependent mechanism [31,38]. Our study does not support that kinase WNK4 is implicated in NCC activation by insulin because we observed that co-expression in oocytes of NCC with wild-type WNK4 or kinase inactive WNK4 did not affect the insulin-induced activation of NCC (Fig. S2, <http://links.lww.com/HJH/A218>). Additionally, reducing WNK4 expression in mDCT15 cells with a WNK4 knockdown strategy [26], did not prevent the insulin activation of NCC.

Our data suggest that WNK3, another with no lysine kinase with known activating effects on NCC [16,17] is

implicated in the insulin activation of NCC (Fig. 4). Increased activity of NCC by WNK3 or by insulin is associated with phosphorylation of the same threonine residue [17]. In oocytes co-injected with NCC and WNK3, no further effect of insulin was observed, supporting the possibility that insulin and WNK3 stimulate NCC by a similar mechanism. Furthermore, knocking down WNK3 activity by co-injecting oocytes with the dominant negative, catalytically inactive WNK3 precluded the positive effect of insulin on NCC. Supporting this conclusion, a recent study shows that activity of the $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ cotransporter NKCC1 in glioblastoma cells is increased by epidermal growth factor by a PI3K-WNK3-dependent mechanism [39]. Taken together, these observations implicate WNK3 in insulin activation of NCC, but we do not yet know the catalytically active sites or the mechanisms mediating insulin's action via WNK3. Further investigation will be necessary to clarify them.

In this study, most of the experiments were done using a concentration of insulin around 20 U/ml, which is higher than regular concentration in plasma, even during hyperinsulinism. However, we observed in oocytes a significant effect with as low as 1 U/ml. It is possible that affinity of human insulin for the insulin receptor in oocytes or mDCT15 cells is lower than in human cells *in vivo*. In addition, the experiments on the kidney ex-vivo perfusion system were done using much lower concentrations (0.06–0.125 U/ml). Being the kidney the most perfused organ of the body, it is quite sensitive to small changes in hormone concentrations in plasma owing to the amount of plasma passing per minute. In addition, although it is known that insulin receptors are expressed in the kidney, all along the nephron, most studies show an intracellular location [3,40,41]. Thus, although it is known that DCT expresses insulin receptor, it is not clear if it is present in the basolateral side, a location at which it will be affected only by plasma concentration of the hormone, or if it is also expressed in the apical side and thus, could be affected by insulin molecules in tubular fluid. It is worth mentioning that during insulin-resistant states it has been suggested that insulin receptor expression is also decreased in the kidney [41]. Therefore, the role of NCC activation on the developing of hypertension in animal models with hyperinsulinism requires further studies. In this regard, however, supporting this possibility, a recent study in hyperinsulinemic rats suggest that indeed NCC phosphorylation is increased [42].

One of the many actions of insulin is to modulate the renal handling of salt and potassium [4]. Initial studies demonstrated that insulin-induced salt retention is due to the effect of this hormone in the distal nephron [4,5]. It is now known that insulin activates the epithelial sodium channel ENaC in the collecting duct, through a mechanism involving SGK1 and AKT1 [9,10,33,35]. On the contrary, it has been observed that insulin induces an increase in expression of NCC [6,8,9] and that hyperinsulinemic states are associated with increased response to thiazide diuretics [6]. We now provide evidence for a direct effect of insulin on NCC activity.

There are at least two physiological reasons for insulin to activate NCC in the distal convoluted tubule. One is the fact

that insulin promotes growth and this needs to be accompanied by salt and water retention. Additionally, increased sodium reabsorption at a time when the kidney is experiencing a higher filtered load of sodium from the dietary bolus, would help to modulate salt excretion during and after meal ingestion. Increasing activity of both, NCC and ENaC help to accomplish this goal. The second reason is the reduction of potassium excretion. Insulin induces hypokalemia due to its systemic effect of promoting cellular K^+ uptake, together with glucose [43]. In consequence, to avoid hypokalemia due to the systemic effect of insulin after a meal, it has been suggested that insulin simultaneously prevents potassium excretion by the kidney [44]. One condition required to reduce potassium excretion is to decrease the delivery of salt to the collecting duct. This is achieved by increasing the activity of NCC in the early portion of DCT [36]. It is known, for instance, that low potassium diet increases phosphorylation and surface expression of NCC in DCT1 [45,46].

Our data supports that insulin activates NCC. This effect of insulin could be one of the mechanisms to explain the strong association between obesity, diabetes, and metabolic syndrome with arterial hypertension. Hyperinsulinism is a common feature of these syndromes due to peripheral resistance to insulin. Increased circulating levels of insulin could amplify the hormone's effects in nonclassical target organs for the hormone. Because the kidney is the most perfused organ of the body, it is expected to be highly sensitive to the increased circulating levels of insulin. Thus, stimulation of both, expression [3,6,8] and activity (this study) of NCC by insulin could be an important mechanism linking obesity to arterial hypertension.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dario Alessi from the MRC phosphorylation unit, Dundee University for providing us with the phosphor-T58-NCC antibody.

M.C-C. was supported by a scholarship from CONACYT-Mexico and is a graduate student in the Biomedical Science PhD program of the Universidad Nacional Autónoma de México.

Supported in part by the Leducq Foundation Transatlantic Network on Hypertension and CONACYT Grant 165815 (to G.G.), the NIH K08 DK081728 (to B.K.) and R01 DK-085097 (to R.S.H.), and the Research Service, Atlanta VA Medical Center (R.S.H.).

Disclosures: None.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Bogaert YE, Linas S. The role of obesity in the pathogenesis of hypertension. *Nat Clin Pract Nephrol* 2009; 5:101–111.
2. Davy KP, Hall JE. Obesity and hypertension: two epidemics or one? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 286:R803–R813.
3. Tiwari S, Riazi S, Ecelbarger CA. Insulin's impact on renal sodium transport and blood pressure in health, obesity, and diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 293:F974–F984.
4. DeFronzo RA. The effect of insulin on renal sodium metabolism: a review with clinical implications. *Diabetologia* 1981; 21:165–171.

5. DeFronzo RA, Goldberg M, Agus ZS. The effects of glucose and insulin on renal electrolyte transport. *J Clin Invest* 1976; 58:83–90.
6. Khan O, Riazzi S, Hu X, Song J, Wade JB, Ecelbarger CA. Regulation of the renal thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter, blood pressure, and natriuresis in obese Zucker rats treated with rosiglitazone. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289:F442–F450.
7. Riazzi S, Tiwari S, Sharma N, Rash A, Ecelbarger CM. Abundance of the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2 is increased by high-fat feeding in Fischer 344 X Brown Norway (F1) rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 296:F762–F770.
8. Song J, Hu X, Riazzi S, Tiwari S, Wade JB, Ecelbarger CA. Regulation of blood pressure, the epithelial sodium channel (ENaC), and other key renal sodium transporters by chronic insulin infusion in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 290:F1055–F1064.
9. Bickel CA, Verbalis JG, Knepper MA, Ecelbarger CA. Increased renal Na-K-ATPase, NCC, and beta-ENaC abundance in obese Zucker rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 281:F639–F648.
10. Blazer-Yost BL, Esterman MA, Vlahos CJ. Insulin-stimulated trafficking of ENaC in renal cells requires PI 3-kinase activity. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 284:C1645–C1653.
11. Simon DB, Nelson-Williams C, Johnson-Bia M, Ellison D, Karet FE, Morey-Molina A, et al. Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Nat Genet* 1996; 12:24–30.
12. Acuna R, Martinez-de-la-Maza L, Ponce-Coria J, Vazquez N, Ortal-Vite P, Pacheco-Alvarez D, et al. Rare mutations in SLC12A1 and SLC12A3 protect against hypertension by reducing the activity of renal salt cotransporters. *J Hypertens* 2011; 29:475–483.
13. Ji W, Foo JN, O'Roak BJ, Zhao H, Larson MG, Simon DB, et al. Rare independent mutations in renal salt handling genes contribute to blood pressure variation. *Nat Genet* 2008; 40:592–599.
14. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA* 2003; 289:2560–2571.
15. Pacheco-Alvarez D, San Cristobal P, Meade P, Moreno E, Vazquez N, Munoz E, et al. The Na-Cl cotransporter is activated and phosphorylated at the amino terminal domain upon intracellular chloride depletion. *J Biol Chem* 2006; 281:28755–28763.
16. Rinehart J, Kahle KT, De Los Heros P, Vazquez N, Meade P, Wilson FH, et al. WNK3 kinase is a positive regulator of NKCC2 and NCC, renal cation-Cl⁻ cotransporters required for normal blood pressure homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:16777–16782.
17. Pacheco-Alvarez D, Vazquez N, Castaneda-Bueno M, los Heros P, Cortes-Gonzalez C, Moreno E, et al. WNK3-SPAK interaction is required for the modulation of NCC and other members of the SLC12 family. *Cell Physiol Biochem* 2012; 29:291–302.
18. Wilson FH, Kahle KT, Sabath E, Lalioti MD, Rapson AK, Hoover RS, et al. 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* 2003; 100:680–684.
19. Arroyo JP, Lagnaz D, Ronzaud C, Vazquez N, Ko BS, Moddes L, et al. Nedd4-2 Modulates Renal Na⁺-Cl⁻ Cotransporter via the Aldosterone-SGK1-Nedd4-2 Pathway. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22:1707–1719.
20. Richardson C, Rafiqi FH, Karlsson HK, Moleleki N, Vandewalle A, Campbell DG, et al. Activation of the thiazide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter by the WNK-regulated kinases SPAK and OSR1. *J Cell Sci* 2008; 121:675–684.
21. Castaneda-Bueno M, Vazquez N, Bustos-Jaimes I, Hernandez D, Rodriguez-Lobato E, Pacheco-Alvarez D, et al. A single residue in transmembrane domain 11 defines the different affinity for thiazides between mammalian and flounder NaCl transporter. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 299:F1111–F1119.
22. Moreno E, San Cristobal P, Rivera M, Vazquez N, Bobadilla NA, Gamba G. Affinity defining domains in the Na-Cl cotransporter: different location for Cl⁻ and thiazide binding. *J Biol Chem* 2006; 281:17266–17275.
23. Monroy A, Plata C, Hebert SC, Gamba G. Characterization of the thiazide-sensitive Na⁽⁺⁾-Cl⁽⁻⁾ cotransporter: a new model for ions and diuretics interaction. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279:F161–F169.
24. Guertin DA, Sabatini DM. The pharmacology of mTOR inhibition. *Sci Signal* 2009; 2:e24.
25. Chresta CM, Davies BR, Hickson I, Harding T, Cosulich S, Critchlow SE, et al. AZD8055 is a potent, selective, and orally bioavailable ATP-competitive mammalian target of rapamycin kinase inhibitor with in vitro and in vivo antitumor activity. *Cancer Res* 2010; 70:288–298.
26. Ko B, Hansen L, Mistry A, Mallick R, Hoover R. Acute angiotensin II effects on NCC are dependent on WNK4. *FASEB J* 2012; 26:1152.1.
27. Ko B, Kamsteeg EJ, Cooke LL, Moddes LN, Deen PM, Hoover RS. RasGRP1 stimulation enhances ubiquitination and endocytosis of the sodium-chloride cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 299:F300–F309.
28. Bautista R, Sanchez A, Hernandez J, Oyekan A, Escalante B. Angiotensin II type AT(2) receptor mRNA expression and renal vasodilatation are increased in renal failure. *Hypertension* 2001; 38:669–673.
29. Sanchez-Mendoza A, Hong E, Escalante B. The role of nitric oxide in angiotensin II-induced renal vasoconstriction in renovascular hypertension. *J Hypertens* 1998; 16:697–703.
30. Scavo L, Shuldiner AR, Serrano J, Dashner R, Roth J, de Pablo F. Genes encoding receptors for insulin and insulin-like growth factor I are expressed in Xenopus oocytes and embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:6214–6218.
31. San Cristobal P, Pacheco-Alvarez D, Richardson C, Ring AM, Vazquez N, Rafiqi FH, et al. Angiotensin II signaling increases activity of the renal Na-Cl cotransporter through a WNK4-SPAK-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106:4384–4389.
32. Ko B, Mistry AC, Hanson LN, Mallick R, Cooke LL, Hack BK, et al. A new model of the distal convoluted tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012; 303:F700–F710.
33. Cheng CJ, Huang CL. Activation of PI3-kinase stimulates endocytosis of ROMK via Akt1/SKG1-dependent phosphorylation of WNK1. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22:460–471.
34. Van der Lubbe N, Lim CH, Fenton RA, Meima ME, Jan Danser AH, Zietse R, et al. Angiotensin II induces phosphorylation of the thiazide-sensitive sodium chloride cotransporter independent of aldosterone. *Kidney Int* 2011; 79:66–76.
35. Wang J, Barbry P, Maiyar AC, Rozansky DJ, Bhargava A, Leong M, et al. SGK integrates insulin and mineralocorticoid regulation of epithelial sodium transport. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280:F303–F313.
36. Arroyo JP, Ronzaud C, Lagnaz D, Staub O, Gamba G. Aldosterone paradox: differential regulation of ion transport in distal nephron. *Physiology (Bethesda)* 2011; 26:115–123.
37. Sahara E, Rai T, Yang SS, Ohta A, Naito S, Chiga M, et al. Acute insulin stimulation induces phosphorylation of the Na-Cl cotransporter in cultured distal mpkDCT cells and mouse kidney. *PLoS One* 2011; 6:e24277.
38. Castaneda-Bueno M, Cervantes-Perez IG, Vazquez N, Uribe N, Kantesaria S, Morla L, et al. Activation of the renal Na⁺-Cl⁻ cotransporter by angiotensin II is a WNK4-dependent process. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109:7929–7934.
39. Garzon-Muvdi T, Schiapparelli P, Ap Rhys C, Guerrero-Cazares H, Smith C, Kim DH, et al. Regulation of brain tumor dispersal by NKCC1 through a novel role in focal adhesion regulation. *PLoS Biol* 2012; 10:e1001320.
40. Tiwari S, Sharma N, Gill PS, Igarashi P, Kahn CR, Wade JB, et al. Impaired sodium excretion and increased blood pressure in mice with targeted deletion of renal epithelial insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:6469–6474.
41. Tiwari S, Halagappa VK, Riazzi S, Hu X, Ecelbarger CA. Reduced expression of insulin receptors in the kidneys of insulin-resistant rats. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18:2661–2671.
42. Komers R, Rogers S, Oyama TT, Xu B, Yang CL, McCormick J, et al. Enhanced phosphorylation of Na-Cl cotransporter in experimental metabolic syndrome: role of insulin. *Clin Sci (Lond)* 2012; 123:635–647.
43. Faletti CJ, Perrotti N, Taylor SI, Blazer-Yost BL. sgk: an essential convergence point for peptide and steroid hormone regulation of ENaC-mediated Na⁺ transport. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282:C494–C500.
44. DeFronzo RA, Cooke CR, Andres R, Faloona GR, Davis PJ. The effect of insulin on renal handling of sodium, potassium, calcium, and phosphate in man. *J Clin Invest* 1975; 55:845–855.
45. Frindt G, Palmer LG. Effects of dietary K on cell-surface expression of renal ion channels and transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 299:F890–F897.
46. Vallon V, Schroth J, Lang F, Kuhl D, Uchida S. Expression and phosphorylation of the Na-Cl-cotransporter NCC in vivo is regulated by dietary salt, potassium and SGK1. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 297:F704–F712.

Reviewers' Summary Evaluations

Referee 1

Strengths: Different approaches to evaluate effect of insulin on activation of NCC-transporter Evaluation of signalling pathways involved Linking insulin-resistance to renal sodium retention and development of hypertension
Weaknesses: Only in-vitro and ex-vivo animal studies Concentrations of insulin applied are high Clinical relevance remains speculative

Referee 2

The NaCl transporter (NCC) plays a key role in renal NaCl transport and long-term regulation of arterial blood pressure. The current study clearly demonstrated that insulin activated NCC via PI3K-mTORC2-AKT1 pathway. More importantly, this signal pathway was further proven to be WNK3 dependent instead of WNK4-SPAK. This work advanced our exploration regarding the regulation of NCC by insulin, which will yield long-term benefits, both in term of understanding the development of hypertension associated with hyperinsulinemia and better treatments for hyperinsulinemic states.

Bibliografía

Acuna, R., Martinez-de-la-Maza, L., Ponce-Coria, J., Vazquez, N., Ortal-Vite, P., Pacheco-Alvarez, D., Bobadilla, N.A., y Gamba, G. (2011). Rare mutations in SLC12A1 y SLC12A3 protect against hypertension by reducing the activity of renal salt cotransporters. *JHypertens* 29, 475-483.

Alvarez-Leefmans, F.J. (2009). *Physiology y pathology of chloride transporters y channels in the nervous system : from molecules to diseases* (London: Elsevier).

Aneja, A., El-Atat, F., McFarlane, S.I., y Sowers, J.R. (2004). Hypertension y obesity. *Recent progress in hormone research* 59, 169-205.

Aronson, P.S., y Giebisch, G. (1997). Mechanisms of chloride transport in the proximal tubule. *American Journal of Physiology (Renal Fluid Electrolyte Physiology)* 273, F179-F192.

Arroyo, J.P., y Gamba, G. (2012). Advances in WNK Signaling of Salt y Potassium Metabolism: Clinical Implications. *American journal of nephrology* 35, 379-386.

Arroyo, J.P., Lagnaz, D., Ronzaud, C., Vazquez, N., Ko, B.S., Moddes, L., Ruffieux-Daidie, D., Hausel, P., Koesters, R., Yang, B., et al. (2011a). Nedd4-2 Modulates Renal Na⁺-Cl⁻ Cotransporter via the Aldosterone-SGK1-Nedd4-2 Pathway. *Journal of the American Society of Nephrology* 22, 1707-1719.

Arroyo, J.P., Ronzaud, C., Lagnaz, D., Staub, O., y Gamba, G. (2011b). Aldosterone paradox: differential regulation of ion transport in distal nephron. *Physiology (Bethesda)* 26, 115-123.

Bautista, R., Sanchez, A., Hernandez, J., Oyekan, A., y Escalante, B. (2001). Angiotensin II type AT(2) receptor mRNA expression y renal vasodilatation are increased in renal failure. *Hypertension* 38, 669-673.

Beaumont, K., Vaughn, D.A., y Fanestil, D.D. (1988). Thiazide diuretic receptors in rat kidney: Identification with [³H]metolazone. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 85, 2311-2314.

Beaumont, K., Vaughn, D.A., Maciejewski, A.R., y Fanestil, D.D. (1989). Reversible downregulation of thiazide diuretic receptor by acute renal ischemia. *American Journal of Physiology (Renal Fluid Electrolyte Physiology)* 256, F329-F334.

Berkman, J., Reilly, R.F., y Ellison, D.H. (1999). Mechanisms of thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter dysfunction in Gitelman's syndrome. *J Am SocNephrol* 10, 1261.

Bernard, C. (1974). *Lectures on the phenomena of life common to animals y plants* (Springfield, Ill.: Thomas).

Bickel, C.A., Verbalis, J.G., Knepper, M.A., y Ecelbarger, C.A. (2001). Increased renal Na-K-ATPase, NCC, y beta-ENaC abundance in obese Zucker rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 281, F639-F648.

Blazer-Yost, B.L., Esterman, M.A., y Vlahos, C.J. (2003). Insulin-stimulated trafficking of ENaC in renal cells requires PI 3-kinase activity. *Am J Physiol Cell Physiol* 284, C1645-1653.

Bogaert, Y.E., y Linas, S. (2009). The role of obesity in the pathogenesis of hypertension. *NatClinPractNephrol* 5, 101-111.

Boim, M.A., Ho, K., Shuck, M.E., Bienkowski, M.J., Block, J.H., Slightom, J.L., Yang, Y., Brenner, B.M., y Hebert, S.C. (1995). ROMK inwardly rectifying ATP-sensitive K⁺ channel. II. Cloning y distribution of alternative forms. *American Journal of Physiology (Renal Fluid Electrolyte Physiology)* 268, F1132-F1140.

Boron, W.F.B.E.L. (2012). *Medical physiology* (Philadelphia, Pa.; London: Saunders).

Bosu, D., y Kipreos, E. (2008). Cullin-RING ubiquitin ligases: global regulation y activation cycles. *Cell Division* 3, 7.

Boyden, L.M., Choi, M., Choate, K.A., Nelson-Williams, C.J., Farhi, A., Toka, H.R., Tikhonova, I.R., Bjornson, R., Mane, S.M., Colussi, G., et al. (2012). Mutations in kelch-like 3 y cullin 3 cause hypertension y electrolyte abnormalities. *Nature* 482, 98-102.

Brazil, D.P., Park, J., y Hemmings, B.A. (2002). PKB binding proteins. Getting in on the Akt. *Cell* 111, 293-303.

Cannon, W.B. (1932). *The wisdom of the body* (New York: W. W. Norton & company, inc.).

Castaneda-Bueno, M., Arroyo, J.P., y Gamba, G. (2012a). Independent regulation of Na⁽⁺⁾ y K⁽⁺⁾ balance by the kidney. *Medical principles y practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre* 21, 101-114.

Castaneda-Bueno, M., Cervantes, L.G., Vazquez, N., Bobadilla, N.A., Uribe, N., Alessi, D., y Gamba, G. (2011). In vivo activation of NCC by angiotensin II requires integrity of the WNK4-SPAK pathway. *J Am Soc Nephrol* 22 102A.

Castaneda-Bueno, M., Cervantes-Perez, L.G., Vazquez, N., Uribe, N., Kantesaria, S., Morla, L., Bobadilla, N.A., Doucet, A., Alessi, D.R., y Gamba, G. (2012b). Activation of the renal Na⁺:Cl⁻ cotransporter by angiotensin II is a WNK4-dependent process. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 7929-7934.

Castaneda-Bueno, M., y Gamba, G. (2012). Mechanisms of sodium-chloride cotransporter modulation by angiotensin II. *Current opinion in nephrology y hypertension* 21, 516-522.

Castrop, H., Lorenz, J.N., Hansen, P., Friis, U., Mizel, D., Oppermann, M., Jensen, B., Briggs, J., Skott, O., y Schnermann, J. (2005). Contribution of the basolateral isoform of the Na,K,2Cl-cotransporter (NKCC1/BSC2) to renin secretion. *AmJPhysiol Renal Physiol* 289, F1185-F1192.

Chavez-Canales, M., Arroyo, J.P., Ko, B., Vazquez, N., Bautista, R., Castaneda-Bueno, M., Bobadilla, N.A., Hoover, R.S., y Gamba, G. (2013). Insulin increases the functional activity of the renal NaCl cotransporter. *J Hypertens* 31, 303-311.

Chen, Z., Vaughn, D.A., Beaumont, K., y Fanestil, D.D. (1990). Effects of diuretic treatment y of dietary sodium on renal binding of ³H-metolazone. *Journal of the American Society of Nephrology* 1, 91-98.

Cheng, C.J., Baum, M., y Huang, C.L. (2013). Kidney-specific WNK1 regulates sodium reabsorption y potassium secretion in mouse cortical collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 304, F397-402.

Cheng, C.J., y Huang, C.L. (2011a). Activation of PI3-kinase stimulates endocytosis of ROMK via Akt1/SGK1-dependent phosphorylation of WNK1. *JAm SocNephrol* 22, 460-471.

Cheng, C.J., y Huang, C.L. (2011b). Activation of PI3-kinase stimulates endocytosis of ROMK via Akt1/SGK1-dependent phosphorylation of WNK1. *Journal of the American Society of Nephrology* 22, 460-471.

Cheng, C.J., Truong, T., Baum, M., y Huang, C.L. (2012). Kidney-Specific WNK1 Inhibits Sodium Reabsorption in Cortical Thick Ascending Limb. *Am J Physiol Renal Physiol* 303, F667-F673.

Cheng, S.X. (2012). Calcium-sensing receptor inhibits secretagogue-induced electrolyte secretion by intestine via the enteric nervous system. *American journal of physiology Gastrointestinal y liver physiology* 303, G60-70.

Chobanian, A.V., Bakris, G.L., Black, H.R., Cushman, W.C., Green, L.A., Izzo, J.L., Jr., Jones, D.W., Materson, B.J., Oparil, S., Wright, J.T., Jr., et al. (2003). The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, y Treatment of High Blood Pressure: The JNC 7 Report. *Journal of the American Medical Association* 289, 2560-2571.

Choe, K.P., y Strange, K. (2007). Evolutionarily conserved WNK y Ste20 kinases are essential for acute volume recovery y survival after hypertonic shrinkage in *Caenorhabditis elegans*. *Am J Physiol Cell Physiol* 293, C915-C927.

Coffman, T.M. (2011). Under pressure: the search for the essential mechanisms of hypertension. *NatMed* 17, 1402-1409.

Coffman, T.M., y Crowley, S.D. (2008). Kidney in hypertension: guyton redux. *Hypertension* 51, 811-816.

Cope, G., Murthy, M., Golbang, A.P., Hamad, A., Liu, C.H., Cuthbert, A.W., y O'Shaughnessy, K.M. (2006). WNK1 Affects Surface Expression of the ROMK Potassium Channel Independent of WNK4. *Journal of the American Society of Nephrology* 17, 1867-1874.

Costanzo, L.S. (1985). Localization of diuretic action in microperfused rat distal tubules: Ca y Na transport. *American Journal of Physiology (Renal Fluid Electrolyte Physiology)* 248, F527-F535.

Crowley, S.D., Gurley, S.B., Herrera, M.J., Ruiz, P., Griffiths, R., Kumar, A.P., Kim, H.S., Smithies, O., Le, T.H., y Coffman, T.M. (2006). Angiotensin II causes hypertension y cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney. *ProcNatlAcadSciUS A* 103, 17985-17990.

Crowley, S.D., Zhang, J., Herrera, M., Griffiths, R., Ruiz, P., y Coffman, T.M. (2011). Role of AT receptor-mediated salt retention in angiotensin II-dependent hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 301, F1124-F1130.

Curtis, J.J., Luke, R.G., y Dustan, H.P. (1983). Remission of essential hypertension after renal transplantation. *New England Journal of Medicine* 309, 1009-1015.

Davy, K.P., y Hall, J.E. (2004). Obesity y hypertension: two epidemics or one? *Am J Physiol RegulIntegrComp Physiol* 286, R803-R813.

De Jong, J.C., Van Der Vliet, W.A., van den Heuvel, L.P., Willems, P.H., Knoers, N.V., y Bindels, R.J. (2002). Functional Expression of Mutations in the Human NaCl Cotransporter: Evidence for Impaired Routing Mechanisms in Gitelman's Syndrome. *J Am SocNephrol* 13, 1442-1448.

De Jong, J.C., Willems, P.H., Mooren, F.J., van den Heuvel, L.P., Knoers, N.V., y Bindels, R.J. (2003). The structural unit of the thiazide-sensitive NaCl cotransporter is a homodimer. *Journal of Biological Chemistry* 278, 24302-24307.

DeFronzo, R.A. (1981). The effect of insulin on renal sodium metabolism. A review with clinical implications. *Diabetologia* 21, 165-171.

DeFronzo, R.A., Goldberg, M., y Agus, Z.S. (1976). The effects of glucose y insulin on renal electrolyte transport. *J Clin Invest* 58, 83-90.

Delaloy, C., Elvira-Matelot, E., Clemessy, M., Zhou, X.O., Imbert-Teboul, M., Houot, A.M., Jeunemaitre, X., y Hadchouel, J. (2008). Deletion of WNK1 First Intron Results in Misregulation of Both Isoforms in Renal y Extrarenal Tissues. *Hypertension* 52, 1149-1159.

Delaloy, C., Lu, J., Houot, A.M., Disse-Nicodeme, S., Gasc, J.M., Corvol, P., y Jeunemaitre, X. (2003). Multiple promoters in the WNK1 gene: one controls expression of a kidney-specific kinase-defective isoform. *MolCell Biol* 23, 9208-9221.

Delpire, E., Rauchman, M.I., Beier, D.R., Hebert, S.C., y Gullans, S.R. (1994). Molecular cloning y chromosome localization of a putative basolateral Na + -K + -2Cl - cotransporter from mouse inner medullary collecting duct (mIMCD-3) cells. *Journal of Biological Chemistry* 269, 25677-25683.

Dowd, B.F., y Forbush, B. (2003). PASK (proline-alanine-rich STE20-related kinase), a regulatory kinase of the Na-K-Cl cotransporter (NKCC1). *Journal of Biological Chemistry* 278, 27347-27353.

Dvorak, M.M., Carter, H., y Riccardi, D. (2002). Thiazide-sensitive sodium chloride co-transporter (NCC) in cryosections of rat y human bone. *JBone MinerRes* 17, S246.

Ellison, D.H. (1991). The physiologic basis of diuretic synergism: Its role in treating diuretic resistance. *Annals Internal Medicine* 114, 886-894.

Ellison, D.H. (1993). Monoclonal antibodies against the mammalian thiazide-sensitive Na-Cl transporter. In *Diuretics IV:Chemistry, Pharmacology y Clinical Applications*, J.B. Puschett, y A. Greenberg, eds. (New York: Elsevier Scientific Publications), pp. 311-317.

Ellison, D.H., Biemesderfer, D., Morrissey, J., Luring, J., y Desir, G.V. (1993). Immunocytochemical characterization of the high-affinity thiazide diuretic receptor in rabbit renal cortex. *American Journal of Physiology (Renal Fluid Electrolyte Physiology)* 264, F141-F148.

Ellison, D.H., Velazquez, H., y Wright, F.S. (1987). Thiazide-sensitive sodium chloride cotransport in early distal tubule. *American Journal of Physiology (Renal Fluid Electrolyte Physiology)* 253, F546-F554.

Fang, L., Li, D., y Welling, P.A. (2010). Hypertension resistance polymorphisms in ROMK (Kir1.1) alter channel function by different mechanisms. *Am JPhysiol Renal Physiol* 299, F1359-F1364.

FISHMAN, A.P. (1962). Homer W. Smith (1895-1962). *Circulation* 26, 984-985.

Flatman, P.W. (2007). Cotransporters, WNKs y hypertension: important leads from the study of monogenetic disorders of blood pressure regulation. *Clin Sci(Lond)* 112, 203-216.

Flatman, P.W. (2008). Cotransporters, WNKs y hypertension: an update. *CurOpinNephrolHypertens* 17, 186-192.

Fu, Y., Subramanya, A., Rozansky, D., y Cohen, D.M. (2006). WNK kinases influence TRPV4 channel function y localization. *AmJPhysiol Renal Physiol* 290, F1305-F1314.

- Futuyma, D.J. (2005). *Evolution* (Sunderland, Mass.: Sinauer Associates).
- Gagnon, K.B., England, R., y Delpire, E. (2006). Volume sensitivity of cation-Cl⁻ cotransporters is modulated by the interaction of two kinases: Ste20-related proline-alanine-rich kinase y WNK4. *AmJPhysiol Cell Physiol* 290, C134-C142.
- Gamba, G. (1993). Clonacion de proteínas de membrana y los ovocitos de *Xenopus laevis* *Ciencia y Desarrollo* 113, 44-49.
- Gamba, G. (2002). La medicina genética y la fisiopatología de la hipertensión arterial. *RevInvest Clin* 54, 68-76.
- Gamba, G. (2009). The thiazide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter: molecular biology, functional properties, y regulation by WNKs. *AmJPhysiol Renal Physiol* 297, F838-F848.
- Gamba, G., Miyanoshita, A., Lombardi, M., y Hebert, S.C. (1992). Cloning, functional characterization, y tissue distribution of the thiazide-sensitive Na⁺ :Cl⁻ cotransporter of the winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) urinary bladder. *Journal of General Physiology* 100, 8a.
- Gamba, G., Miyanoshita, A., Lombardi, M., Lytton, J., Lee, W.S., Hediger, M.A., y Hebert, S.C. (1994). Molecular cloning, primary structure y characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney. *Journal of Biological Chemistry* 269, 17713-17722.
- Gamba, G., Saltzberg, S.N., Lombardi, M., Miyanoshita, A., Lytton, J., Hediger, M.A., Brenner, B.M., y Hebert, S.C. (1993). Primary structure y functional expression of a cDNA encoding the thiazide-sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 90, 2749-2753.
- Gamba, G., Wang, W., y Schild, L. (2008). Sodium Chloride Transport in the Loop of Henle, Distal Convuluted Tubule, y Collecting Duct. In *Seldin y Giebisch's the kidney physiology & pathophysiology*, R.J.H.S.C.S.D.W.G.G.H. Alpern, ed. (Amsterdam; Boston: Elsevier Academic Press).
- Garzon-Muvdi, T., Schiapparelli, P., Ap Rhys, C., Guerrero-Cazares, H., Smith, C., Kim, D.H., Kone, L., Farber, H., Lee, D.Y., An, S.S., et al. (2012). Regulation of Brain Tumor Dispersal by NKCC1 Through a Novel Role in Focal Adhesion Regulation. *PLoS biology* 10, e1001320.
- Geng, Y., Hoke, A., y Delpire, E. (2009). The Ste20 kinases Ste20-related proline-alanine-rich kinase y oxidative-stress response 1 regulate NKCC1 function in sensory neurons. *Journal of Biological Chemistry* 284, 14020-14028.
- Gerelsaikhan, T., y Turner, R.J. (2000). Transmembrane topology of the secretory Na⁺ -K⁺ -2Cl⁻ cotransporter (NKCC1) studied by in vitro translation. *J BiolChem* 275, 40471-40477.
- Gillen, C.M., Brill, S., Payne, J.A., y Forbush, I.B. (1996). Molecular cloning y functional expression of the K-Cl cotransporter from rabbit, rat y human. A new member of the cation-chloride cotransporter family. *Journal of Biological Chemistry* 271, 16237-16244.
- Gitelman, H.J., Graham, J.B., y Welt, L.G. (1966). A new family disorder characterized by hypokalemia y hypomagnesemia. *TransAssocAmPhysicians* 79, 221-235.
- Glover, M., Mercier, Z.A., Figg, N., y O'Shaughnessy, K.M. (2010). The activity of the thiazide-sensitive Na⁽⁺⁾-Cl cotransporter is regulated by protein phosphatase PP4. *CanJPhysiol Pharmacol* 88, 986-995.

Golbang, A.P., Cope, G., Hamad, A., Murthy, M., Liu, C.H., Cuthbert, A.W., y O'Shaughnessy, K.M. (2006). Regulation of the Expression of the Na/Cl cotransporter (NCCT) by WNK4 y WNK1: evidence that accelerated dynamin-dependent endocytosis is not involved. *AmJPhysiol Renal Physiol* 291, F1369-F1376.

Goldin, A.L. (1992). Maintenance of *Xenopus laevis* y oocyte injection. *Methods in Enzymology* 207, 266-277.

Gomperts, B.D.T.P.E.R.K.I.M. (2009). *Signal transduction* (Amsterdam; Boston: Elsevier/Academic Press).

Gonzales, P.A., Pisitkun, T., Hoffert, J.D., Tchapyjnikov, D., Star, R.A., Kleta, R., Wang, N.S., y Knepper, M.A. (2009). Large-scale proteomics y phosphoproteomics of urinary exosomes. *Journal of the American Society of Nephrology* 20, 363-379.

Gonzalez-Villalobos, R.A., Janjoulia, T., Fletcher, N.K., Giani, J.F., Nguyen, M.T., Riquier-Brisson, A.D., Seth, D.M., Fuchs, S., Eladari, D., Picard, N., et al. (2013). The absence of intrarenal ACE protects against hypertension. *J Clin Invest* 123, 2011-2023.

Gordon, R.D. (1986). Syndrome of hypertension y hyperkalemia with normal glomerular filtration rate. *Hypertension* 8, 93-102.

Gordon, R.D., y Hodsman, G.P. (1986). The syndrome of hypertension y hyperkalemia without renal failure: long term correction by thiazide diuretic. *ScottMedJ* 31, 43-44.

Grimm, P.R., Taneja, T.K., Liu, J., Coleman, R., Chen, Y.Y., Delpire, E., Wade, J.B., y Welling, P.A. (2012). SPAK isoforms y OSR1 regulate sodium-chloride co-transporters in a nephron-specific manner. *J Biol Chem* 287, 37673-37690.

Guidi, E., Menghetti, D., Milani, S., Montagnino, G., Palazzi, P., y Bianchi, G. (1996). Hypertension may be transplanted with the kidney in humans: a long-term historical prospective follow-up of recipients grafted with kidney coming from donors with or without hypertension in their families. *Journal of the American Society of Nephrology* 7, 1131-1138.

Gurdon, J.B., y Wickens, M.P. (1983). The use of *Xenopus* oocytes for the expression of cloned genes. *Methods in Enzymology* 101, 370-386.

Guyton, A.C. (1991). Blood pressure control--special role of the kidneys y body fluids. *Science* 252, 1813-1816.

Guyton, A.C.H.J.E. (2006). *Textbook of medical physiology* (Philadelphia: Elsevier Saunders).

Hadchouel, J., Delaloy, C., Faure, S., Achard, J.M., y Jeunemaitre, X. (2006). Familial hyperkalemic hypertension. *J Am Soc Nephrol* 17, 208-217.

Hadchouel, J., Soukaseum, C., Busst, C., Zhou, X.O., Baudrie, V., Zurrer, T., Cambillau, M., Elghozi, J.L., Lifton, R.P., Loffing, J., et al. (2010). Decreased ENaC expression compensates the increased NCC activity following inactivation of the kidney-specific isoform of WNK1 y prevents hypertension. *ProcNatlAcadSciUSA* 107, 18109-18114.

Hall, J.E. (2003). The kidney, hypertension, y obesity. *Hypertension* 41, 625-633.

Hall, J.E., Brands, M.W., Dixon, W.N., y Smith, M.J., Jr. (1993). Obesity induced hypertension. Renal function y systemic hemodynamics. *Hypertension* 22, 292-299.

Hall, J.E., y Granger, J.P. (1994). Role of sodium y fluid excretion in hypertension. In *Textbook of hypertension*, J.D. Swales, ed. (Oxford: Blackwell Scientific Publications), pp. 360-387.

Hansen, L.L., Schilling, A.R., y Wiederholt, M. (1981). Effect of calcium, furosemide y chlorothiazide on net volume reabsorption y basolateral membrane potential of the distal tubule. *Pflugers Archives* 389, 121-126.

Harrison-Bernard, L. (2009). The renal renin-angiotensin system. *Advances in physiology education* 33, 270-274.

He, G., Wang, H.R., Huang, S.K., y Huang, C.L. (2007). Intersectin links WNK kinases to endocytosis of ROMK1. *J Clin Invest* 117, 1078-1087.

Hershko, A., y Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *AnnuRevBiochem* 67, 425-479.

Holden, S., Cox, J., y Raymond, F.L. (2004). Cloning, genomic organization, alternative splicing y expression analysis of the human gene WNK3 (PRKWNK3). *Gene* 335, 109-119.

Hoorn, E.J., y Ellison, D.H. (2012). WNK kinases y the kidney. *Experimental cell research* 318, 1020-1026.

Hoorn, E.J., Nelson, J.H., McCormick, J.A., y Ellison, D.H. (2011a). The WNK Kinase Network Regulating Sodium, Potassium, y Blood Pressure. *JAm SocNephrol* 22, 605-614.

Hoorn, E.J., Pisitkun, T., Zietse, R., Gross, P., Frokiaer, J., Wang, N.S., Gonzales, P.A., Star, R.A., y Knepper, M.A. (2005). Prospects for urinary proteomics: exosomes as a source of urinary biomarkers. *Nephrology(Carlton)* 10, 283-290.

Hoorn, E.J., Walsh, S.B., McCormick, J.A., Furstenberg, A., Yang, C.L., Roeschel, T., Paliege, A., Howie, A.J., Conley, J., Bachmann, S., et al. (2011b). The calcineurin inhibitor tacrolimus activates the renal sodium chloride cotransporter to cause hypertension. *Nat-Med* 17, 1304-1309.

Hossain Khan, M.Z., Sohara, E., Ohta, A., Chiga, M., Inoue, Y., Isobe, K., Wakabayashi, M., Oi, K., Rai, T., Sasaki, S., et al. (2012). Phosphorylation of Na-Cl cotransporter by OSR1 y SPAK kinases regulates its ubiquitination. *Biochemical y biophysical research communications* 425, 456-461.

Huang, C.L., Kuo, E., y Toto, R.D. (2008). WNK kinases y essential hypertension. *CurrOpinNephrolHypertens* 17, 133-137.

Ji, W., Foo, J.N., O'Roak, B.J., Zhao, H., Larson, M.G., Simon, D.B., Newton-Cheh, C., State, M.W., Levy, D., y Lifton, R.P. (2008). Rare independent mutations in renal salt handling genes contribute to blood pressure variation. *NatGenet* 40, 592-599.

Kahle, K.T., Ring, A.M., y Lifton, R.P. (2008). Molecular physiology of the WNK kinases. *AnnuRevPhysiol* 70, 329-355.

Khan, O., Riazi, S., Hu, X., Song, J., Wade, J.B., y Ecelbarger, C.A. (2005). Regulation of the Renal Thiazide-Sensitive Na-Cl Cotransporter, Blood Pressure, y Natriuresis in Obese Zucker Rats Treated with Rosiglitazone. *AmJPhysiol Renal Physiol* 289, F442-F450.

Ko, B., Mistry, A.C., Hanson, L.N., Mallick, R., Cooke, L.L., Hack, B.K., Cunningham, P.N., y Hoover, R.S. (2012). A New Model of the Distal Convuluted Tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 303, F700-F710.

Komers, R., Rogers, S., Oyama, T.T., Xu, B., Yang, C.L., McCormick, J., y Ellison, D.H. (2012). Enhanced phosphorylation of Na-Cl cotransporter in experimental metabolic syndrome - role of insulin. *Clin Sci (Lond)* 123, 635-647.

Kopf, D., Waldherr, R., y Rettig, R. (1993). Source of kidney determines blood pressure in young renal transplanted rats. *American Journal of Physiology (Renal Fluid Electrolyte Physiology)* 265, F104-F111.

Kunau, R.T., Weller, D.R., y Webb, H.L. (1975). Clarification of the site of action of chlorothiazide in the rat nephron. *Journal of Clinical Investigation* 56, 401-407.

Kunchaparty, S., Palcso, M., Berkman, J., Velazquez, H., Desir, G.V., Bernstein, P., Reilly, R.F., y Ellison, D.H. (1999a). Defective processing y expression of thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter as a cause of Gitelman's syndrome. *Am J Physiol* 277, F643-F649.

Kunchaparty, S., Palcso, M., Berkman, J., zquez, H., Desir, G.V., Bernstein, P., Reilly, R.F., y Ellison, D.H. (1999b). Defective processing y expression of thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter as a cause of Gitelman's syndrome. *American Journal of Physiology* 277, F643-F649.

Kusano, K., Miledi, R., y Stinnakre, J. (1982). Cholinergic y catecholamine receptors in the *Xenopus* oocyte membrane. *Journal of Physiology* 328, 143-170.

LaCroix, A.Z., Ott, S.M., Ichikawa, L., Scholes, D., y Barlow, W.E. (2000). Low-dose hydrochlorothiazide y preservation of bone mineral density in older adults. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 133, 516-526.

Lalioi, M.D., Zhang, J., Volkman, H.M., Kahle, K.T., Hoffmann, K.E., Toka, H.R., Nelson-Williams, C., Ellison, D.H., Flavell, R., Booth, C.J., et al. (2006). Wnk4 controls blood pressure y potassium homeostasis via regulation of mass y activity of the distal convoluted tubule. *NatGenet* 38, 1124-1132.

Lazcano-Araujo, A. (1989). El origen de la vida : evolución química y evolución biológica (México, D.F.: Trillas).

Lazrak, A., Liu, Z., y Huang, C.L. (2006). Antagonistic regulation of ROMK by long y kidney-specific WNK1 isoforms. *ProcNatlAcadSciUSA* 103, 1615-1620.

Lee, B.H., Min, X., Heise, C.J., Xu, B.E., Chen, S., Shu, H., Luby-Phelps, K., Goldsmith, E.J., y Cobb, M.H. (2004). WNK1 phosphorylates synaptotagmin 2 y modulates its membrane binding. *MolCell* 15, 741-751.

Lee, W.S., y Hebert, S.C. (1995). ROMK inwardly rectifying ATP-sensitive K⁺ channel. I. Expression in rat distal nephron segments. *American Journal of Physiology (Renal Fluid Electrolyte Physiology)* 268, F1124-F1131.

Lenertz, L.Y., Lee, B.H., Min, X., Xu, B.E., Wedin, K., Earnest, S., Goldsmith, E.J., y Cobb, M.H. (2005). Properties of WNK1 y implications for other family members. *Journal of Biological Chemistry* 280, 26653-26658.

Lewes, G.H. (1893). *The physical basis of mind* (London: Kegan Paul, Trench, Trubner).

Lifton, R.P., Gharavi, A.G., y Geller, D.S. (2001). Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell* 104, 545-556.

Liu, Z., Wang, H.R., y Huang, C.L. (2009). Regulation of ROMK channel y K⁺ homeostasis by kidney-specific WNK1 kinase. *Journal of Biological Chemistry* 284, 12198-12206.

Louis-Dit-Picard, H., Barc, J., Trujillano, D., Miserey-Lenkei, S., Bouatia-Naji, N., Pylpenko, O., Beaurain, G., Bonnefond, A., Sand, O., Simian, C., et al. (2012). KLHL3 mutations cause familial hyperkalemic hypertension by impairing ion transport in the distal nephron. *NatGenet* 44, 456-460.

Mastroianni, N., DeFusco, M., Zollo, M., Arrigo, G., Zuffardi, O., Bettinelli, A., Ballabio, A., y Casari, G. (1996). Molecular cloning, expression pattern, y chromosomal localization of the human Na-Cl thiazide-sensitive cotransporter (SLC12A3). *Genomics* 35, 486-493.

Mayan, H., Vered, I., Mouallem, M., Tzadok-Witkon, M., Pauzner, R., y Farfel, Z. (2002). Pseudohypoaldosteronism type II: marked sensitivity to thiazides, hypercalciuria, normomagnesemia, y low bone mineral density. *JClinEndocrinolMetab* 87, 3248-3254.

McCormick, J.A., y Ellison, D.H. (2011). The WNKs: atypical protein kinases with pleiotropic actions. *Physiol Rev* 91, 177-219.

McCormick, J.A., Yang, C.L., y Ellison, D.H. (2008). WNK Kinases y Renal Sodium Transport in Health y Disease. An Integrated View. *Hypertension* 51, 588-596.

Mederle, K., Mutig, K., Paliege, A., Carota, I., Bachmann, S., Castrop, H., y Oppermann, M. (2013). Loss of Wnk3 is compensated for by ks-Wnk1 in the kidney of the mouse. *Am J Physiol Renal Physiol* 304, F1198-F1209.

Melander, O., Orho-Melander, M., Bengtsson, K., Lindblad, U., Rastam, L., Groop, L., y Hulthen, U.L. (2000). Genetic variants of thiazide-sensitive NaCl-cotransporter in Gitelman's syndrome y primary hypertension. *Hypertension* 36, 389-394.

Monette, M.Y., Rinehart, J., Lifton, R.P., y Forbush, B. (2011). Rare mutations in the human Na-K-Cl cotransporter (NKCC2) associated with lower blood pressure exhibit impaired processing y transport function. *Am J Physiol Renal Physiol* 300, F840-F847.

Moriguchi, T., Urushiyama, S., Hisamoto, N., Iemura, S., Uchida, S., Natsume, T., Matsumoto, K., y Shibuya, H. (2005). WNK1 Regulates Phosphorylation of Cation-Chloride-coupled Cotransporters via the STE20-related Kinases, SPAK y OSR1. *Journal of Biological Chemistry* 280, 42685-42693.

Morsing, P., Velazquez, H., Wright, F.S., y Ellison, D.H. (1991). Adaptation of distal convoluted tubule of rats. II. Effects of chronic thiazide infusion. *American Journal of Physiology (Renal Fluid Electrolyte Physiology)* 261, F137-F143.

Mount, D.B., Mercado, A., Song, L., Xu, J., George, Jr., Delpire, E., y Gamba, G. (1999). Cloning y characterization of KCC3 y KCC4, new members of the cation-chloride cotransporter gene family. *Journal of Biological Chemistry* 274, 16355-16362.

Na, T., Wu, G., y Peng, J.B. (2012). Disease-causing mutations in the acidic motif of WNK4 impair the sensitivity of WNK4 kinase to calcium ions. *Biochemical Biophysical Research Communications* 419, 293-298.

Naray-Fejes-Toth, A., Snyder, P.M., y Fejes-Toth, G. (2004). The kidney-specific WNK1 isoform is induced by aldosterone y stimulates epithelial sodium channel-mediated Na⁺ transport. *Proc Natl Acad Sci US A* 101, 17434-17439.

Nicolet-Barousse, L., Blanchard, A., Roux, C., Pietri, L., Bloch-Faure, M., Kolta, S., Chappard, C., Geoffroy, V., Morieux, C., Jeunemaitre, X., et al. (2005). Inactivation of the Na-Cl co-transporter (NCC) gene is associated with high BMD through both renal y bone mechanisms: analysis of patients with Gitelman syndrome y Ncc null mice. *JBone Miner Res* 20, 799-808.

O'Reilly, M., Marshall, E., Speirs, H.J., y Brown, R.W. (2003). WNK1, a Gene within a Novel Blood Pressure Control Pathway, Tissue-Specifically Generates Radically Different Isoforms with y without a Kinase Domain. *Journal of the American Society of Nephrology* 14, 2447-2456.

Ohta, A., Schumacher, F.R., Mehellou, Y., Johnson, C., Knebel, A., Macartney, T.J., Wood, N.T., Alessi, D.R., y Kurz, T. (2013). The CUL3-KLHL3 E3 ligase complex mutated in Gordon's hypertension syndrome interacts with y ubiquitylates WNK isoforms; disease-causing mutations in KLHL3 y WNK4 disrupt interaction. *The Biochemical journal* 451, 111-122.

Oi, K., Sohara, E., Rai, T., Misawa, M., Chiga, M., Alessi, D., Sasaki, S., y Uchida, S. (2012). A minor role of WNK3 in regulating phosphorylation of renal NKCC2 y NCC cotransporters in vivo. *Biology Open* 1, 120-127.

Oppermann, M., Mizel, D., Huang, G., Li, C., Deng, C., Theilig, F., Bachmann, S., Briggs, J., Schnermann, J., y Castrop, H. (2006). Macula Densa Control of Renin Secretion y Preglomerular Resistance in Mice with Selective Deletion of the B Isoform of the Na,K,2Cl Co-Transporter. *Journal of the American Society of Nephrology* 17, 2143-2152.

Ott, S.M., LaCroix, A.Z., Scholes, D., Ichikawa, L.E., y Wu, K. (2008). Effects of three years of low-dose thiazides on mineral metabolism in healthy elderly persons. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis y the National Osteoporosis Foundation of the USA* 19, 1315-1322.

Pacheco-Alvarez, D., y Gamba, G. (2011). WNK3 is a Putative Chloride-sensing Kinase. *Cell Physiol Biochem* 28, 1123-1134.

Pacheco-Alvarez, D., San Cristobal, P., Meade, P., Moreno, E., Vazquez, N., Munoz, E., Diaz, A., Juarez, M.E., Gimenez, I., y Gamba, G. (2006). The Na-Cl cotransporter is activated y phosphorylated at the amino terminal domain upon intracellular chloride depletion. *Journal of Biological Chemistry* 281, 28755-28763.

Pacheco-Alvarez, D., Vazquez, N., Castaneda-Bueno, M., los Heros, P., Cortes-Gonzalez, C., Moreno, E., Meade, P., Bobadilla, N.A., y Gamba, G. (2012). WNK3-SPAK interaction is required for the modulation of NCC y other members of the SLC12 family. *Cell Physiol Biochem* 29, 291-302.

Palmer, L.G., Patel, A., y Frindt, G. (2012). Regulation y dysregulation of epithelial Na⁺ channels. *Clinical y experimental nephrology* 16, 35-43.

Pantanetti, P., Arnaldi, G., Balercia, G., Mantero, F., y Giacchetti, G. (2002). Severe hypomagnesaemia-induced hypocalcaemia in a patient with Gitelman's syndrome. *ClinEndocrinol(Oxf)* 56, 413-418.

Payne, J.A., Stevenson, T.J., y Donaldson, L.F. (1996). Molecular characterization of a putative K-Cl cotransporter in rat brain. A neuronal-specific isoform. *Journal of Biological Chemistry* 271, 16245-16252.

Piechotta, K., Garbarini, N., England, R., y Delpire, E. (2003). Characterization of the interaction of the stress kinase SPAK with the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter in the nervous system: evidence for a scaffolding role of the kinase. *Journal of Biological Chemistry* 278, 52848-52856.

Piechotta, K., Lu, J., y Delpire, E. (2002). Cation chloride cotransporters interact with the stress-related kinases Ste20-related proline-alanine-rich kinase (SPAK) y oxidative stress response 1 (OSR1). *Journal of Biological Chemistry* 277, 50812-50819.

Pisitkun, T., Shen, R.F., y Knepper, M.A. (2004). Identification y proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 13368-13373.

Potton, F., y Dessimond, J.L. (1963). [HYPOCALCIURIC EFFECT OF BENZTHIAZIDE]. *Lyon medical* 210, 1043-1072.

Quentin, F., Chambrey, R., Trinh-Trang-Tan, M.M., Fysekidis, M., Cambillau, M., Pailard, M., Aronson, P.S., y Eladari, D. (2004). The Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger pendrin in the rat kidney is regulated in response to chronic alterations in chloride balance. *Am J Physiol Renal Physiol* 287, F1179-1188.

Rafiqi, F.H., Zuber, A.M., Glover, M., Richardson, C., Fleming, S., Jovanovic, S., Jovanovic, A., O'Shaughnessy, K.M., y Alessi, D.R. (2010). Role of the WNK-activated SPAK kinase in regulating blood pressure. *EMBO MolMed* 2, 63-75.

Reilly, R.F., y Ellison, D.H. (2000). Mammalian Distal Tubule: Physiology, Pathophysiology, y Molecular Anatomy. *Physiol Rev* 80, 277-313.

Renfro, J.L. (1975). Water y ion transport by the urinary bladder of the teleost *Pseudopleuronectes americanus*. *American Journal of Physiology* 228, 52-61.

Renfro, J.L. (1977). Interdependence of active Na⁺ y Cl⁻ transport by the isolated urinary bladder of the teleost, *pseudopleuronectes americanus* *Journal of experimental zoology* 199, 383-390.

Rettig, R., Folberth, C., Stauss, H., Kopf, D., Waldherr, R., y Unger, T. (1990a). Role of the kidney in primary hypertension: a renal transplantation study in rats. *American Journal of Physiology (Renal Fluid Electrolyte Physiology)* 258, F606-F611.

Rettig, R., Folberth, C.G., Stauss, H., Kopf, D., Waldherr, R., Baldauf, G., y Unger, T. (1990b). Hypertension in rats induced by renal grafts from renovascular hypertensive donors. *Hypertension* 15, 429-435.

Riazi, S., Tiwari, S., Sharma, N., Rash, A., y Ecelbarger, C.M. (2009). Abundance of the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2 is increased by high-fat feeding in Fischer 344 X Brown Norway (F1) rats. *AmJPhysiol Renal Physiol* 296, F762-F770.

Richardson, C., Rafiqi, F.H., Karlsson, H.K., Moleleki, N., Vandewalle, A., Campbell, D.G., Morrice, N.A., y Alessi, D.R. (2008). Activation of the thiazide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter by the WNK-regulated kinases SPAK y OSR1. *Journal of Cell Sciences* 121, 675-684.

Rinehart, J., Kahle, K.T., De Los Heros, P., Vazquez, N., Meade, P., Wilson, F.H., Hebert, S.C., Gimenez, I., Gamba, G., y Lifton, R.P. (2005). WNK3 kinase is a positive regulator of NKCC2 y NCC, renal cation-Cl⁻ cotransporters required for normal blood pressure homeostasis. *ProcNatlAcadSciUSA* 102, 16777-16782.

Riveira-Munoz, E., Chang, Q., Bindels, R.J., y Devuyst, O. (2007). Gitelman's syndrome: towards genotype-phenotype correlations? *PediatrNephrol* 22, 326-332.

Roszkopf, D., Schurks, M., Rimbach, C., y Schafers, R. (2007). Genetics of arterial hypertension y hypotension. *Naunyn Schmiedebergs ArchPharmacol* 374, 429-469.

Sabath, E., Meade, P., Vazquez, N., Berkman, J., Ellison, D.H., y Gamba, G. (2002). Characterization of functional mutations in Gitelman's disease, pp. 75A.

Sambrook, J.F.E.F.M.T. (1989). *Molecular cloning : a laboratory manual* (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory).

San Cristobal, P., De Los Heros, P., Ponce-Coria, J., Moreno, E., y Gamba, G. (2008a). WNK Kinases, Renal Ion Transport y Hypertension. *AmJNephrol* 28, 860-870.

San Cristobal, P., Pacheco-Alvarez, D., Richardson, C., Ring, A.M., Vazquez, N., Rafiqi, F.H., Chari, D., Kahle, K.T., Leng, Q., Bobadilla, N.A., et al. (2009). Angiotensin II signaling increases activity of the renal Na-Cl cotransporter through a WNK4-SPAK-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 4384-4389.

San Cristobal, P., Ponce-Coria, J., Vazquez, N., Bobadilla, N.A., y Gamba, G. (2008b). WNK3 y WNK4 Amino Terminal Domain Defines Their Effect on the Renal Na⁺:Cl⁻ Cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol* 295, F1199-F1206.

Sanchez-Mendoza, A., Hong, E., y Escalante, B. (1998). The role of nitric oxide in angiotensin II-induced renal vasoconstriction in renovascular hypertension. *J Hypertens* 16, 697-703.

Scavo, L., Shuldiner, A.R., Serrano, J., Dashner, R., Roth, J., y de Pablo, F. (1991). Genes encoding receptors for insulin y insulin-like growth factor I are expressed in *Xenopus* oocytes y embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 6214-6218.

Schnermann, J. (1998). Juxtaglomerular cell complex in the regulation of renal salt excretion. *American Journal of Physiology (Regulatory Integrative Comparative Physiology)* 274, R263-R279.

Schultheis, P.J., Lorenz, J.N., Meneton, P., Nieman, M.L., Riddle, T.M., Flagella, M., Duffy, J.J., Doetschman, T., Miller, M.L., y Shull, G.E. (1998). Phenotype resembling Gitelman's syndrome in mice lacking the apical Na⁺ - Cl⁻ cotransporter of the distal convoluted tubule. *Journal of Biological Chemistry* 273, 29150-29155.

Sechi, L.A. (1999). Mechanisms of insulin resistance in rat models of hypertension y their relationships with salt sensitivity. *J Hypertens* 17, 1229-1237.

Sechi, L.A., Griffin, C.A., y Schambelan, M. (1994). Effect of dietary sodium chloride on insulin receptor number y mRNA levels in rat kidney. *American Journal of Physiology (Renal Fluid Electrolyte Physiology)* 266, F31-F38.

Shibata, S., Zhang, J., Puthumana, J., Stone, K.L., y Lifton, R.P. (2013). Kelch-like 3 y Cullin 3 regulate electrolyte homeostasis via ubiquitination y degradation of WNK4. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, 7838-7843.

Sigel, E. (1990). Use of *Xenopus* oocytes for the functional expression of plasma membrane proteins. *Journal of Membrane Biology* 117, 201-221.

Simon, D.B., Farfel, Z., Ellison, D., Bia, M., Tucci, J., y Lifton, R.P. (1995). Examination of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter as a candidate gene in Gordon's syndrome, pp. 632.

Simon, D.B., y Lifton, R.P. (1996). The molecular basis of inherited hypokalemic alkalosis: Bartter's y Gitelman's syndromes. *American Journal of Physiology (Renal Fluid Electrolyte Physiology)* 271, F961-F966.

Simon, D.B., Nelson-Williams, C., Johnson-Bia, M., Ellison, D., Karet, F.E., Morey-Molina, A., Vaara, I., Iwata, F., Cushner, H.M., Koolen, M., et al. (1996). Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Nature Genetics* 12, 24-30.

Smith, H.W. (1932). *Kamongo* (New York: The Viking Press).

Smith, H.W. (1939). *Studies in the physiology of the kidney* (Lawrence: University extension division, University of Kansas).

Smith, H.W. (1943). Lectures on the kidney (Lawrence, Kan.: University extension division, University of Kansas).

Smith, H.W. (1953). From Fish to Philosopher (Boston Little Brown y Company).

Smith, H.W. (1962). Principles of renal physiology (New York: Oxford University Press).

Smith, H.W. (1964). The kidney : structure y function in health y disease (New York: Oxford University Press).

Smith, H.W.C.H. (1965). Homer William Smith : his scientific y literary achievements (New York: New York Univ. Press).

Sohara, E., Rai, T., Yang, S.S., Ohta, A., Naito, S., Chiga, M., Nomura, N., Lin, S.H., Vandewalle, A., Ohta, E., et al. (2011). Acute insulin stimulation induces phosphorylation of the Na-Cl cotransporter in cultured distal mpkDCT cells y mouse kidney. PLoSOne 6, e24277.

Song, J., Hu, X., Riazi, S., Tiwari, S., Wade, J.B., y Ecelbarger, C.A. (2006). Regulation of Blood Pressure, the Epithelial Sodium Channel (ENaC), y other Key Renal Sodium Transporters by Chronic Insulin Infusion in Rats. AmJPhysiol Renal Physiol 290, F1055-F1064.

Stokes, J.B. (1988). Passive NaCl transport in the flounder urinary bladder: predominance of a cellular pathway. American Journal of Physiology 255, F229-F236.

Stokes, J.B. (1989). Electroneutral NaCl transport in the distal tubules. Kidney International 36, 427-433.

Stokes, J.B., Lee, I., y D'Amico, M. (1984). Sodium Chloride absorption by the urinary bladder of the winter flounder. A thiazide-sensitive, electrically neutral transport system. Journal of Clinical Investigation 74, 7-16.

Strange, K. (2004). Cellular volume homeostasis. Advances in physiology education 28, 155-159.

Subramanya, A.R., Liu, J., Ellison, D.H., Wade, J.B., y Welling, P.A. (2009). WNK4 Diverts the Thiazide-sensitive NaCl Cotransporter to the Lysosome y Stimulates AP-3 Interaction. Journal of Biological Chemistry 284, 18471-18480.

Subramanya, A.R., Yang, C.L., Zhu, X., y Ellison, D.H. (2006). Dominant-negative regulation of WNK1 by its kidney-specific kinase-defective isoform. AmJPhysiol Renal Physiol 290, F619-F624.

Susa, K., Kita, S., Iwamoto, T., Yang, S.S., Lin, S.H., Ohta, A., Sohara, E., Rai, T., Sasaki, S., Alessi, D.R., et al. (2012a). Effect of heterozygous deletion of WNK1 on the WNK-OSR1/SPAK-NCC/NKCC1/NKCC2 signal cascade in the kidney y blood vessels. Clinical y experimental nephrology 16, 530-538.

Susa, K., Sohara, E., Isobe, K., Chiga, M., Rai, T., Sasaki, S., y Uchida, S. (2012b). WNK-OSR1/SPAK-NCC signal cascade has circadian rhythm dependent on aldosterone. Biochemical y biophysical research communications 427, 743-747.

Thastrup, J.O., Rafiqi, F.H., Vitari, A.C., Pozo-Guisado, E., Deak, M., Mehellou, Y., y Alessi, D.R. (2012). SPAK/OSR1 regulate NKCC1 y WNK activity: analysis of WNK isoform interactions y activation by T-loop trans-autophosphorylation. Biochemistry Journal 441, 325-337.

Tiwari, S., Halagappa, V.K., Riazi, S., Hu, X., y Ecelbarger, C.A. (2007a). Reduced expression of insulin receptors in the kidneys of insulin-resistant rats. *Journal of the American Society of Nephrology* 18, 2661-2671.

Tiwari, S., Riazi, S., y Ecelbarger, C.A. (2007b). Insulin's impact on renal sodium transport y blood pressure in health, obesity, y diabetes. *AmJPhysiol Renal Physiol* 293, F974-F984.

Tran, J.M., Farrell, M.A., y Fanestil, D.D. (1990). Effect of ions on binding of the thiazide-type diuretic metolazone to kidney membrane. *American Journal of Physiology (Renal Fluid Electrolyte Physiology)* 258, F908-F915.

Ushiro, H., Tsutsumi, T., Suzuki, K., Kayahara, T., y Nakano, K. (1998). Molecular cloning y characterization of a novel Ste20-related protein kinase enriched in neurons y transporting epithelia. *Archives of Biochemistry y Biophysics* 355, 233-240.

van der Lubbe, N., Jansen, P.M., Salih, M., Fenton, R.A., van den Meiracker, A.H., Jan Danser, A.H., Zietse, R., y Hoorn, E.J. (2012a). The Phosphorylated Sodium Chloride Co-transporter in Urinary Exosomes Is Superior to Proxalin as a Marker for Aldosteronism. *Hypertension* 60, 741-748.

van der Lubbe, N., Lim, C.H., Meima, M.E., van Veghel, R., Rosenbaek, L.L., Mutig, K., Danser, A.H., Fenton, R.A., Zietse, R., y Hoorn, E.J. (2012b). Aldosterone does not require angiotensin II to activate NCC through a WNK4-SPAK-dependent pathway. *Pflugers Arch* 463, 853-863.

Vargas-Poussou, R., Dahan, K., Kahila, D., Venisse, A., Riveira-Munoz, E., Debaix, H., Grisart, B., Bridoux, F., Unwin, R., Moulin, B., et al. (2011). Spectrum of mutations in gitelman syndrome. *JAm SocNephrol* 22, 693-703.

Verissimo, F., y Jordan, P. (2001). WNK kinases, a novel protein kinase subfamily in multi-cellular organisms. *Oncogene* 20, 5562-5569.

Verkman, A.S., y Mitra, A.K. (2000). Structure y function of aquaporin water channels. *Am J Physiol Renal Physiol* 278, F13-F28.

Verrey, F., Hummler, E., Schild, L., y Rossier, B.C. (2008). Mineralocorticoid action in the aldosterone-sensitive distal nephron. In *The Kidney: Physiology y Pathophysiology*, R.J. Alpern, y S.C. Hebert, eds. (Burlington, MA: Academic), pp. 889-924.

Vidal-Petiot, E., Cheval, L., Faugeron, J., Malard, T., Doucet, A., Jeunemaitre, X., y Hadchouel, J. (2012). A New Methodology for Quantification of Alternatively Spliced Exons Reveals a Highly Tissue-Specific Expression Pattern of WNK1 Isoforms. *PLoS One* 7, e37751.

Vidal-Petiot, E., Elvira-Matelot, E., Mutig, K., Soukaseum, C., Baudrie, V., Wu, S., Cheval, L., Huc, E., Cambillau, M., Bachmann, S., et al. (2013). WNK1-related Familial Hyperkalemic Hypertension results from an increased expression of L-WNK1 specifically in the distal nephron. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 14366-14371.

Villa, F., Goebel, J., Rafiqi, F.H., Deak, M., Thastrup, J., Alessi, D.R., y van Aalten, D.M. (2007). Structural insights into the recognition of substrates y activators by the OSR1 kinase. *EMBO Rep* 8, 839-845.

Vitari, A.C., Deak, M., Morrice, N.A., y Alessi, D.R. (2005). The WNK1 y WNK4 protein kinases that are mutated in Gordon's hypertension syndrome, phosphorylate y active SPAK y OSR1 protein kinases. *Biochemistry Journal* 391, 17-24.

Vitari, A.C., Thastrup, J., Rafiqi, F.H., Deak, M., Morrice, N.A., Karlsson, H.K., y Alessi, D.R. (2006). Functional interactions of the SPAK/OSR1 kinases with their upstream activator WNK1 y downstream substrate NKCC1. *Biochemistry Journal* 397, 223-231.

Wade, J.B., Fang, L., Liu, J., Li, D., Yang, C.L., Subramanya, A.R., Maouyo, D., Mason, A., Ellison, D.H., y Welling, P.A. (2006). WNK1 kinase isoform switch regulates renal potassium excretion. *ProcNatlAcadSciUS A*.

Wadei, H.M., y Textor, S.C. (2012). The role of the kidney in regulating arterial blood pressure. *Nature reviews Nephrology* 8, 602-609.

Wakabayashi, M., Mori, T., Isobe, K., Sohara, E., Susa, K., Araki, Y., Chiga, M., Kikuchi, E., Nomura, N., Mori, Y., et al. (2013). Impaired KLHL3-Mediated Ubiquitination of WNK4 Causes Human Hypertension. *Cell reports* 3, 858-868.

Wang, H.C., Beer, N., Sassano, D., Blume, A.J., y Ziai, M.R. (1991). Gene expression in *Xenopus* oocytes. *International Journal of Biochemistry* 23, 271-276.

Wang, H.R., Liu, Z., y Huang, C.L. (2008). Domains of WNK1 kinase in the regulation of ROMK1. *AmJPhysiol Renal Physiol* 295, F438-F445.

Wang, J., Barbry, P., Maiyar, A.C., Rozansky, D.J., Bhargava, A., Leong, M., Firestone, G.L., y Pearce, D. (2001). SGK integrates insulin y mineralocorticoid regulation of epithelial sodium transport. *Am J Physiol Renal Physiol* 280, F303-313.

Wiens, M., Etmnan, M., Gill, S.S., y Takkouche, B. (2006). Effects of antihypertensive drug treatments on fracture outcomes: a meta-analysis of observational studies. *J Intern Med* 260, 350-362.

Wilson, F.H., Disse-Nicodeme, S., Choate, K.A., Ishikawa, K., Nelson-Williams, C., Desitter, I., Gunel, M., Milford, D.V., Lipkin, G.W., Achard, J.M., et al. (2001). Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science* 293, 1107-1112.

Wilson, F.H., Kahle, K.T., Sabath, E., Lalioti, M.D., Rapson, A.K., Hoover, R.S., Hebert, S.C., Gamba, G., y Lifton, R.P. (2003). Molecular pathogenesis of inherited hypertension with hyperkalemia: The Na-Cl cotransporter is inhibited by wild-type but not mutant WNK4. *ProcNatlAcadSciUSA* 100, 680-684.

Wu, G., y Peng, J.B. (2013). Disease-causing mutations in KLHL3 impair its effect on WNK4 degradation. *FEBS letters*.

Xu, B., English, J.M., Wilsbacher, J.L., Stippec, S., Goldsmith, E.J., y Cobb, M.H. (2000). WNK1, a novel mammalian serine/threonine protein kinase lacking the catalytic lysine in subdomain II. *Journal of Biological Chemistry* 275, 16795-16801.

Xu, B.E., Min, X., Stippec, S., Lee, B.H., Goldsmith, E.J., y Cobb, M.H. (2002). Regulation of WNK1 by an autoinhibitory domain y autophosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 277, 48456-48462.

Xu, B.E., Stippec, S., Chu, P.Y., Lazrak, A., Li, X.J., Lee, B.H., English, J.M., Ortega, B., Huang, C.L., y Cobb, M.H. (2005). WNK1 activates SGK1 to regulate the epithelial sodium channel. *ProcNatlAcadSciUS A* 102, 10315-10320.

Xu, B.E., Stippec, S., Lenertz, L., Lee, B.H., Zhang, W., Lee, Y.K., y Cobb, M.H. (2004). WNK1 activates ERK5 by an MEKK2/3-dependent mechanism. *J BiolChem* 279, 7826-7831.

Yang, C.L., Angell, J., Mitchell, R., y Ellison, D.H. (2003). WNK kinases regulate thiazide-sensitive Na-Cl cotransport. *JClinInvest* 111, 1039-1045.

Yang, C.L., y Ellison, D.H. (2003). WNK1 interacts physically with WNK4. *J Am Soc Nephrol* 14, 77A.

Yang, C.L., Liu, X., Paliege, A., Zhu, X., Bachmann, S., Dawson, D.C., y Ellison, D.H. (2007a). WNK1 y WNK4 modulate CFTR activity. *Biochemical Biophysical Research Communications* 353, 535-540.

Yang, C.L., Zhu, X., y Ellison, D.H. (2007b). The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter is regulated by a WNK kinase signaling complex. *J Clin Invest* 117, 3403-3411.

Yang, S.S., Lo, Y.F., Wu, C.C., Lin, S.W., Yeh, C.J., Chu, P., Sytwu, H.K., Uchida, S., Sasaki, S., y Lin, S.H. (2010a). SPAK-Knockout Mice Manifest Gitelman Syndrome y Impaired Vasoconstriction. *JAm SocNephrol* 21, 1868-1877.

Yang, S.S., Lo, Y.F., Yu, I.S., Lin, S.W., Chang, T.H., Hsu, Y.J., Chao, T.K., Sytwu, H.K., Uchida, S., Sasaki, S., et al. (2010b). Generation y analysis of the thiazide-sensitive Na⁺ -Cl⁻ cotransporter (Ncc/Slc12a3) Ser707X knockin mouse as a model of Gitelman syndrome. *HumMutat* 31, 1304-1315.

Zhao, H., Hyde, R., y Hundal, H.S. (2004). Signalling mechanisms underlying the rapid y additive stimulation of NKCC activity by insulin y hypertonicity in rat L6 skeletal muscle cells. *JPhysiol* 560, 123-136.

Zhou, H., Yuen, P.S., Pisitkun, T., Gonzales, P.A., Yasuda, H., Dear, J.W., Gross, P., Knepper, M.A., y Star, R.A. (2006). Collection, storage, preservation, y normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery. *Kidney International* 69, 1471-1476.

Apéndice

Apéndice 1. Clonas utilizadas

Clona	Especie	Vector	Etiqueta	Fuente
cSTRor	rat	pSPORT		Vazquez, N
CUL3	human	pcDNA6.2	-	Lynn Boyden
CUL3	human	pCDNA3	HA	Louis-dit-picard
CUL3 Δ3'	human	pcDNA6.2	-	Lynn Boyden
Cul3 Δ9	human	pcDNA6.2	-	Lynn Boyden
Cul3 Δ9	human	pCDNA3	HA	Louis-dit-picard
CUL3 N381X	human	pcDNA6.2	-	Lynn Boyden
CUL3 Q107X	human	pcDNA6.2	-	Lynn Boyden
hNCC	human	?		Vazquez, N
hWnk4	human	pGH19	FLAG	Hadchouel J
hWnk4 DA	human	pGH19	FLAG	Chavez-Canales M
hWnk4 F1030A	human	pGH19	FLAG	Chavez-Canales M
hWnk4 F430A	human	pGH19	FLAG	Chavez-Canales M
hWnk4 F430A-F1030A	human	pGH19	FLAG	Chavez-Canales M
hWnk4 HQ	human	pGH19	FLAG	Chavez-Canales M
hWnk4 PHAII	human	pGH19	FLAG	Chavez-Canales M
hWnk4 PHAII DA	human	pGH19	FLAG	Chavez-Canales M
hWnk4 S11190D-S1217D	human	pGH19	FLAG	Chavez-Canales M
KLHL	human	PGEMHE	-	Chavez-Canales M, Boyden L
KLHL	human	pCMV6XL-5	-	Boyden L
KIhI	mouse	pCMV6Entry	Myc 5'	Louis-dit-picard
KLHL FLAG	human	pCMV6XL-5	Flag 5'	Lynn Boyden
KLHL FLAG	human	PGEMHE	Flag 5'	Chavez-Canales M, Boyden L
KIhI R228G	mouse	pCMV6Entry	Myc 5'	Louis-dit-picard
KLHL R528H FLAG	human	pCMV6XL-5	Flag 5'	Lynn Boyden
KLHL R528H FLAG	human	PGEMHE	Flag 5'	Chavez-Canales M, Boyden L
KIhI V361M	mouse	pCMV6Entry	Myc 5'	Louis-dit-picard
KS-WNK1 Δ11	human	pGH19	Myc 3'	Hadchouel, J
KS-WNK1 Δ11 1891	human	pGH19	Myc 3'	Chavez-Canales M
KS-WNK1 Δ11 1900	human	pGH19	Myc 3'	Chavez-Canales M
KS-WNK1 Δ11 1905	human	pGH19	Myc 3'	Chavez-Canales M

Clona	Especie	Vector	Etiqueta	Fuente
KS-WNK1 Δ11 1906	human	pGH19	Myc 3'	Chavez-Canales M
KS-WNK1 Δ11 1907	human	pGH19	Myc 3'	Chavez-Canales M
KS-WNK1 Δ11 F1258A			Myc 3'	Chavez-Canales M
KS-WNK1 Δ11 PY	human	pGH19	Myc 3'	Chavez-Canales M
KS-WNK1 Δ11 S1261D			Myc 3'	Chavez-Canales M
KS-WNK1 Δ11-Δ12	human	pGH19	Myc 3'	Chavez-Canales M
KS-WNK1 Δ9-Δ11	human	pGH19	Myc 3'	Hadchouel, J
L-WNK1 Δ11	human	pGH19	Myc 3'	Hadchouel, J
L-WNK1 Δ11 1891	human	pGH19	Myc 3'	Hadchouel, J
L-WNK1 Δ11 1900	human	pGH19	Myc 3'	Hadchouel, J
L-WNK1 Δ11 1905	human	pGH19	Myc 3'	Hadchouel, J
L-WNK1 Δ11 1906	human	pGH19	Myc 3'	Hadchouel, J
L-WNK1 Δ11 1907	human	pGH19	Myc 3'	Hadchouel, J
L-WNK1 Δ11 DA	human	pGH19	Myc 3'	Pacheco D, Moreno E
L-WNK1 Δ11 F1258A	human	pGH19	Myc 3'	Chavez-Canales M
L-WNK1 Δ11 F316A	human	pGH19	Myc 3'	Pacheco D, Moreno E
L-WNK1 Δ11 F316A-HQ	human	pGH19	Myc 3'	Chavez-Canales M
L-WNK1 Δ11 HQ	human	pGH19	Myc 3'	Chavez-Canales M
L-WNK1 Δ11 PY	human	pGH19	Myc 3'	Chavez-Canales M
L-WNK1 Δ11 S1261D	human	pGH19	Myc 3'	Chavez-Canales M
L-WNK1 Δ11 S2128A	human	pGH19	Myc 3'	Chavez-Canales M
L-WNK1 Δ11 S2128D	human	pGH19	Myc 3'	Chavez-Canales M
L-WNK1 Δ11 S382A	human	pGH19	Myc 3'	Chavez-Canales M
L-WNK1 Δ11 S382E	human	pGH19	Myc 3'	Chavez-Canales M
L-WNK1 Δ11 T60A	human	pGH19	Myc 3'	Chavez-Canales M
L-WNK1 Δ11 T60A-S2128A	human	pGH19	Myc 3'	Chavez-Canales M
L-WNK1 Δ11 T60D	human	pGH19	Myc 3'	Chavez-Canales M
L-WNK1 Δ11 T60D-S2128D	human	pGH19	Myc 3'	Chavez-Canales M
L-WNK1 Δ11-Δ12	human	pGH19	Myc 3'	Hadchouel, J
L-WNK1 Δ9	human	pGH19	Myc 3'	Hadchouel, J
L-WNK1 Δ9-Δ11	human	pGH19	Myc 3'	Hadchouel, J
L-WNK1 Δ9-Δ11-Δ12	human	pGH19	Myc 3'	Hadchouel, J

Clona	Especie	Vector	Etiqueta	Fuente
L-WNK1 complete	human	pGH19	Myc 3'	Hadchouel, J
NEDD4-2 BS	human	pSDeasy-BS	-	Arroyo, JP
NEDD4-2 CS	human	pSDeasy-BS	-	Arroyo, JP
NEDD4-2 S245A	human	pSDeasy-BS	-	Chavez-Canales M
NEDD4-2 S246A	human	pSDeasy-BS	-	Chavez-Canales M
NEDD4-2 SSAA	human	pSDeasy-BS	-	Chavez-Canales M
rNCC	rat	pSPORT	Flag 5'	Vazquez, N
rNCC R18A	rat	PSPORT	Flag 5'	Pacheco, D
rNCC T58D	rat	pSPORT	Flag 5'	Vazquez, N
rWNK1	rat	pBS SK+	?	Vazquez, N
WNK1 S>G	rat	?	?	Chavez-Canales M
WNK3	human	pGH19	Myc 5'	Vazquez, N
WNK3 DA	human	pGH19	Myc 5'	Pacheco, D
WNK3 F242A	human	pGH19	Myc 5'	Pacheco, D
WNK3 HQ	human	pGH19	Myc 5'	Rojas L, Castañeda M
WNK3 HQ DA	human	pGH19	Myc 5'	Rojas L, Castañeda M
WNK4	mouse	pGH19	HA 5'	Vazquez, N
WNK4 F18A-F997A	mouse	pGH19	HA 5'	Chavez-Canales M
WNK4 F418A	mouse	pGH19	HA 5'	Chavez-Canales M
WNK4 F997A	mouse	pGH19	HA 5'	Chavez-Canales M
WNK4 HQ	mouse	pGH19	HA 5'	Rojas L, Castañeda M
WNK4 PHAII DA	mouse	pGH19	HA 5'	Rojas L, Castañeda M

Apéndice 2. Primers para mutagénesis *in vitro*

Nombre del primer	Secuencia	Clona generada
NEDD4S245A f	CGAGCCCGTGCCTCAACTGTCAC	Nedd4-S245A Nedd4-S245A
NEDD4S245A r	GTGACAGTTGACGCACGGGCTCG	
NEDD4S246A f	GAGCCCGTTCCGGCAACTGTCACG	Nedd4-S246A
NEDD4S246A r	CGTGACAGTTGCCGAACGGGCTC	
NEDD4SSAA f	CGAGCCCGTGC GGCAACTGTCACG	Nedd4-2-SSAA
NEDD4SSAA r	CGTGACAGTTGCCGCACGGGCTCG	
NEDD4-790pb-s	GCCTGGGAGACCATTTC	secuenciación
NCC T58D sense	CCTTTGGTTACAACGATATAGATGTGGTACC	rNCC T58D
NCC T58D antisense	GGTACCACATCTATATCGTTGTAACCAAAGG	
WNK1S1261A f	CGGTTTATAGTGGCTCCTGTGCCAGAAAGC	hWNK1 S1261A
WNK1S1261A r	GCTTTCTGGCACAGGAGCCACTATAAACCG	
WNK1S1261E f	CGGTTTATAGTGGAACCTGTGCCAGAAAGC	hWNK1 S1261E
WNK1S1261E r	GCTTTCTGGCACAGGTTCCACTATAAACCG	
WNK1 F1258A f	GGGAAGGCGGGCTATAGTGAGTCC	WNK1 F1258A
WNK1 F1258A r	GGACTCACTATAGCCCGCCTTCCC	
WNK1RAIVA f	GGGAAGGCGGGCTATAGTGGCTCCT	hWNK1 RAIVA
WNK1RAIVA r	AGGAGCCACTATAGCCCGCCTTCCC	
WNK1RAIVE f	GGGAAGGCGGGCTATAGTGAACC	hWNK1 RAIVE
WNK1RAIVE r	GGTTCCTACTATAGCCCGCCTTCCC	
WNK1S382A f	CTTTTGCCAAGGCTGTGATAGGTAC	hWNK1 S382A
WNK1S382A r	GTACCTATCACAGCCTTGGCAAAAG	
WNK1S382E f	CTTTTGCCAAGGAAGTGTGATAGGTAC	hWNK1 S382E
WNK1S382E r	GTACCTATCACTTCCTTGGCAAAAG	
WNK1DA r	GTCAAGATTGGAGCCCTCGGTCTGG	hWNK1 DA
WNK1DA f	CCAGACCGAGGGCTCCAATCTTGAC	
WNK1F316A F	CGTATCTGAAAAGGGCTAAAGTGATGAAG	hWNK1 F316A
WNK1F316A R	CTTCATCACTTTAGCCCTTTTCAGATACG	
WNK1 A1519P f	CTACTCCTACTTTACCTGAAACCGTGG	hWNK1 A1519P
WNK1 A1519P r	CCACGGTTTCAGGTAAAGTAGGAGTAG	
WNK1 A634T f	GAACCTGAGACAGATCAACATC	hWNK1 A634T
WNK1 A634T r	GATGTTGATCTGTCTCAGGTTC	
WNK1 D635E f	CCTGAGGCAGAACCAACATCAAC	hWNK1 A635T
WNK1 D635T r	GTTGATGTTGTTCTGCCTCAGG	
W1ratP1262A f	CCTACACTACCTGAAACAGTGGTG	rWNK1 P1261A
W1ratP1262A r	CACCACTGTTTCAGGTAGTGTAGG	

Nombre del primer	Secuencia	Clona generada
Wnk1Y954A f	GCCACCACAGGCCCCAGGAGATTC	hWnk1 PY
Wnk1Y954A r	GAATCTCCTGGGGCCTGTGGTGGC	
hWnk1T60A f	CGCCGCCACGCTATGGACAAG	hWnk1 T60A
hWnk1T60A r	CTTGTCATAGCGTGGCGGCG	
hWnk1T60D f	CGCCGCCACGATATGGACAAG	hWnk1 T60D
hWnk1T60D r	CTTGTCATATCGTGGCGGCG	
Wnk1T2128A f	CGACGACCCGCTAAAAGCAAAG	hWnk1 T2128A
Wnk1T2128A r	CTTTGCTTTTAGCGGGTCTGTCG	
Wnk1T2128D f	CGACGACCCGATAAAAAGCAAAG	hWnk1 T2128D
Wnk1T2128D r	CTTTGCTTTTATCGGGTCTGTCG	
Wnk1 T58D sense	CGCCGCCGGCACGATATGGACAAGGACAGTCG	rWnk1 T58D
Wnk1 T58D antisense	CGACTGTCCTTGTCCATATCGTGCCGGCGGCG	
Wnk1 T58A sense	CGCCGCCGGCACGCTATGGACAAGGACAGTCG	rWnk1 T58A
Wnk1 T58A antisense	CGACTGTCCTTGTCCATAGCGTGCCGGCGGCG	
Wnk3S1555A f	CGCCCCAGGCCTTGACACATGTGGAC	Wnk3
Wnk3S1555A r	GTCCACATGTGTCAAGGCCTGGGGGCG	
Wnk3T1283Af	GCAGTCAGCCAGCTTTTTCAAG	Wnk3
Wnk3T1283Ar	CTTGAAAAGCTGGCTGACTGC	
hW4F421A f	GAACGAGAGGGCCACCATCCAGG	hWnk4 F421A
hW4F421A r	CCTGGATGGTGGCCCTCTCGTTC	
hW4F1030A f	CTTGTTGGGCGTGCCCAAGTGAC	hWnk4 F1030A
hW4F1030A r	GTCACCTGGGCACGCCCAACAAG	
hW4S1190D f	CGCCGCCTCGACAAGGGCAGC	hWnk4 S1190D
hW4S1190D r	GCTGCCCTTGTGCGAGGCGGCG	
hW4S1217D F	GCCGCAACGACCTACAGCGCTCTG	hWnk4 S1217D
hW4S1217D R	CAGAGCGCTGTAGGTCGTTGCGGC	
hW4 DA r	CAAATCGGGGCCCTGGGCCTG	hWnk4 DA
hW4DA f	CAGGCCAGGGCCCGATTTTG	
hw4HAf	GCAGAAGGCCTGTGACAG	hWnk4 HQ
hw4HAr	CTCTGACAAGGCCTTCTGC	
hw4QAf	CAGACACTAGCGAAAAAAG	hWnk4 HQ
hw4QAr	CTTTTTTCGCTAGTGTCTG	

Apéndice 3. Primers para secuenciación

Nombre del primer	Secuencia	cDNA blanco
NEDD4-790pb-s	GCCTTGGGAGACCATTTC	human Nedd4-2
wnk1exon8	TACAGGCACAGTCCCAGGGCATA	human WNK1
Wnk1exon10	CAACCTCCAGTGAGGCCACTACT	human WNK1
WNK1h-seq672-s	CATCGAAATCGGCAGAGGC	human WNK1
WNK1s300aa	GAAGTGCATTGTTTTGGTG	human WNK1
WNK1s1240aa	CAACCAATTCCTGCGTCTTC	human WNK1
WNK1s2070aa	GTAGCGACAATGAGTCAG	human WNK1
WNK1sPHAI1	CAGACAGGAATCAAGCAG	human WNK1
Wnk15921-s	GACCAGTGGCATCTCCTCCT	human WNK1
WNK1s1500aa	CTACCACCACTTCATTCC	human WNK1
WNK1s2000aa	CAAGCTGTTCTTCTCTGC	human WNK1
WNK1s1050aa	CAGTTGCAGTAGCACAGAC	human WNK1
wnk3 seqs1555	CTATTCGCCATCTTCCCAATGAG	human WNK3
hW4-seq320aa	CTGGAGCCGCAAATCC	human WNK4
hW4-seq-670aa	GCCTCAGATGCAGCTTC	human WNK4
hWNK4-seq-1000aa	CAGGAAAGCCCTTCACC	human WNK4