



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

EFFECTO DE DIURÉTICOS TIAZIDA SOBRE DE $\text{NCC}\beta$ DE ANGUILA EUROPEA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA
KARLA LEYVA RIOS



Ciudad Universitaria, CDMX 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO
VOCAL: JOSÉ IGNACIO PARAMO RAMIREZ
SECRETARIO: GERARDO GAMBA AYALA
1er. SUPLENTE: PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMENEZ
2° SUPLENTE: ALFONSO RAFAEL SALGADO AGUAYO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**UNIDAD DE FISIOLÓGÍA MOLECULAR DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS EN EL INSTITUTO NACIONAL DE NUTRICIÓN Y CIENCIAS MÉDICAS
SALVADOR ZUBIRÁN**

ASESOR DEL TEMA: DR. GERARDO GAMBA AYALA

SUPERVISOR TÉCNICO: QFB NORMA VÁZQUEZ

RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	6
1. El riñón y manejo renal de NaCl	6
2. Reabsorción de NaCl en túbulo contorneado distal	8
3. El cotransportador de NaCl sensible a tiazidas (NCC)	10
3.1 Identificación molecular y clonación	10
3.2 Familia SLC12	12
3.3 Estructura del NCC	13
3.5 Caracterización funcional del NCC	14
3.6 El NCC en teleósteos	22
3.5.1 El NCC de anguilla europea	22
3.5.2 El NCC de anguila japonesa	23
4. Diuréticos	25
4.1 Tiazidas	27
HIPÓTESIS	32
OBJETIVO GENERAL	32
OBJETIVOS PARTICULARES	32
METODOLOGÍA	33
1. Clonación y secuenciación de ADNc	33
2. Síntesis in vitro de RNAc	34
3. Alineamientos de secuencias	35
4. Extracción y preparación de ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	35
5. Ensayos de expresión funcional	35
6. Uso de Tiazidas	36
7. Mutagénesis puntual	37
8. Análisis de datos	38
RESULTADOS	39
1. Clonación del NCC β de anguila europea	39
2. El eNCC β es un cotransportador de NaCl no sensible a tiazidas	40
3. Perfil de inhibición de tiazidas sobre el eNCC β	42
4. Concentraciones diferentes de tiazida no afectan la función del eNCC β	41
5. Probables sitios de unión a tiazida	44
DISCUSIÓN	60
CONCLUSIONES	65
BIBLIOGRAFÍA	66

RESUMEN

Los diuréticos tipo tiazida constituyen la primera línea de tratamiento farmacológico de la hipertensión arterial. Sin embargo, no se ha podido identificar el o los residuos involucrados en la unión de este fármaco a su proteína blanco, el cotransportador renal electroneutro de Na-Cl (NCC). Trabajos previos realizados en el laboratorio mostraron que el NCC de rata (rNCC) presenta una mayor afinidad por las tiazidas que el NCC del lenguado de invierno (fINCC). Más tarde, como resultado de un estudio detallado de las regiones transmembranales (TM) 8-12 reveló que esta diferencia es consecuencia del cambio de un único residuo en la región TM 11, la serina 575 en rNCC por la cisteína en fINCC. Recientemente han sido identificadas molecularmente las isoformas α y β del NCC de anguila europea. Cuando la secuencia de aminoácidos de estas isoformas se compara con la otros NCCs como el de humano, la rata, el ratón, el conejo, el pez lenguado de invierno, la isoforma β (eNCC β) exhibe el menor porcentaje de identidad ($\leq 70\%$), por lo que su caracterización funcional podría arrojar evidencia importante sobre la relación estructura-función de este cotransportador.

Este proyecto de tesis se enfoca a reportar el efecto que los diuréticos tiazida tienen sobre el eNCC β . Para poder realizar esta caracterización la secuencia del eNCC β fue insertada en el vector pGEMHE, compatible con el modelo de expresión heteróloga de *Xenopus laevis*, lo que posteriormente nos permitió evaluar la función del cotransportador mediante la captación de $^{22}\text{Na}^+$. Los experimentos de captación funcional realizados con ovocitos inyectados con el ARNc del eNCC β mostraron por primera vez un cotransportador de NaCl no sensible a diuréticos tiazida, la evaluación del transporte de $^{22}\text{Na}^+$ a diferentes

concentraciones (10^{-9} hasta 10^{-4} M) comprobó que tal efecto es independiente de la concentración del fármaco empleado.

Un análisis más detallado de la secuencia primaria correspondiente a las regiones TM del eNCC β mostró que posee un 99.36% de identidad cuando se compara con el NCC β de la anguila japonesa (jNCC β), sensible a tiazidas. La diferencia entre estos dos cotransportadores radica en el cambio de únicamente 3 residuos, de esta forma, mediante mutagénesis sitio dirigida se realizaron las mutantes S194F, C379S y A482G en la secuencia del eNCC β . Los resultados muestran que la mutación A482G no tuvo efecto en la sensibilidad a diuréticos tiazida, mientras que los ensayos de expresión funcional realizados con las mutantes eNCC β S194F y eNCC β C379S revelaron un aumento en la sensibilidad a tiazidas en un 30 y 45% respectivamente. A pesar de que el transporte de $^{22}\text{Na}^+$ fue similar entre las mutantes simples y las mutantes dobles y triple, demostrando que no existe un efecto aditivo en los cambios realizados en la secuencia del eNCC β .

En conclusión, los resultados de este trabajo muestran que la presencia de los aminoácidos fenilalanina y serina resultan importantes para establecer la interacción entre los compuestos tiazidas y su proteína blanco, el NCC y así poder ejercer un efecto inhibitor sobre éste

INTRODUCCIÓN

1. El riñón y manejo renal de NaCl

El riñón lleva a cabo múltiples procesos importantes para el funcionamiento adecuado del organismo como eliminación de toxinas y productos del metabolismo, la producción de hormonas involucradas en el metabolismo del calcio, la regulación de la presión arterial y la eritrogénesis, además de participar en el mantenimiento de la homeostasis corporal al regular el pH, el volumen y la concentración de electrolitos (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^-) en los fluidos corporales. Los sistemas complementarios del control del volumen y de la osmolaridad se logran mediante dos procesos principales: la filtración glomerular y la reabsorción tubular. Éstos se llevan a cabo en la unidad funcional del riñón, la nefrona. Cada riñón está constituido por un millón de nefronas y cada una de ellas está conformada por un glomérulo y un túbulo renal. El glomérulo es un conglomerado de capilares rodeado por una cápsula de tejido epitelial, denominada cápsula de Bowman. Por otra parte, el túbulo está formado por un epitelio simple cuyas características van cambiando de acuerdo con la función que se realiza en cada segmento.

Cerca del 20% del plasma sanguíneo que entra al riñón es filtrado en los capilares glomerulares hacia el espacio de Bowman. El filtrado resultante normalmente se encuentra libre de proteínas y células sanguíneas y contiene componentes de bajo peso molecular como glucosa, bicarbonato de sodio, aminoácidos y otros solutos orgánicos además de electrolitos, tales como Na^+ , K^+ y Cl^- . El riñón regula la composición iónica y el volumen urinario por la absorción y secreción activa de iones, así como la reabsorción pasiva de agua en cinco zonas principales a lo largo de la nefrona: túbulo contorneado proximal,

asa ascendente y descendente de Henle, túbulo contorneado distal y conducto colector.

En el **túbulo contorneado proximal** se reabsorbe aproximadamente el 60% del agua y la totalidad de los nutrientes filtrados, como la glucosa y los aminoácidos, acoplado el transporte de éstos a la entrada de sodio¹. El gradiente para la entrada de sodio es generado por la Na^+, K^+ -ATPasa de la membrana basolateral, mecanismo presente a lo largo del epitelio (Figura 1). Además se reabsorbe Na^+ mediante un intercambiador Na^+/H^+ apical y un cotransportador basolateral de $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ siendo éste un mecanismo importante en la regulación ácido-base del organismo. En este segmento se lleva a cabo la filtración de alrededor del 60% de la cantidad total de Na^+ . El Cl^- se reabsorbe por vía paracelular en la parte inicial de este segmento, de acuerdo con el gradiente químico y eléctrico transepitelial que genera la entrada de Na^+ ². En la parte final el Cl^- se reabsorbe por vía transcelular, acoplado a la salida de aniones como oxalato, formato o HCO_3^- ^{1,3}. Dado que el túbulo contorneado proximal es un segmento permeable al agua, toda la reabsorción de Na^+ va acompañada de reabsorción de agua y de esta forma la concentración luminal de este catión se mantiene constante.

El **asa de Henle** reabsorbe cerca del 15% del agua exclusivamente en la rama ascendente delgada. En la porción ascendente se reabsorbe aproximadamente el 30% del NaCl mediante dos mecanismos, un cotransportador electroneutro de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ sensible a bumetanida, denominado NKCC2 ^{2,4}, el cual se expresa exclusivamente en el asa ascendente gruesa; y un transporte paracelular pasivo en la porción del asa ascendente delgada. El asa de Henle forma parte del sistema encargado de concentrar o diluir orina. Participa en la generación de un intersticio medular hipertónico a través de la reabsorción de NaCl en un

segmento impermeable al agua que es aprovechado por los túbulos colectores en donde la reabsorción de agua es estimulada por la diferencia entre la osmolaridad luminal y la intersticial.

El **túbulo distal y el conducto colector** son los principales sitios de reabsorción de agua (entre el 8 y 17%) y aproximadamente el 10% del NaCl filtrado además de responder a la acción de hormonas como la aldosterona, angiotensina y hormona antidiurética (ADH), las cuales son efectoras de los mecanismos de control y osmolaridad del fluido extracelular. En el túbulo distal la principal vía de reabsorción de Na^+ y Cl^- se realiza mediante un cotransportador electroneutro sensible a tiazidas denominado NCC, que también modula la entrada de Ca^{2+} y Mg^{2+} . En los túbulos colectores el Na^+ es reabsorbido a través de un canal de sodio apical (ENaC) y esta reabsorción genera un voltaje transepitelial negativo en el lumen que permite la reabsorción paracelular de Cl^- . Este voltaje también impulsa la secreción de potasio hacia el lumen mediante un canal de K^+ apical llamado ROMK.^{5,6}

2. Reabsorción de NaCl en túbulo contorneado distal

El **túbulo contorneado distal (TCD)** se divide en dos segmentos: el TCD temprano y el TCD tardío, también conocidos como TCD1 y TCD2. En las células de este segmento, la Na^+/K^+ -ATPasa basolateral genera el gradiente de Na^+ necesario para la entrada apical de este catión, a la cual se acopla la entrada de Cl^- vía NCC; un cotransportador electroneutro, blanco de diuréticos tipo tiazida que como ya se había mencionado es la principal vías de reabsorción de NaCl en este segmento, además de modular la reabsorción de otros electrolitos como

calcio y magnesio. El NCC se encuentra principalmente el TCD1 y su expresión disminuye gradualmente a lo largo de TCD2.⁷

Debido a la alta concentración intracelular de Cl^- por encima del equilibrio electroquímico, éste sale a través de membrana basolateral por el canal de Cl^- , CLC-K2 . La continua actividad de la Na^+, K^+ -ATPasa es posible gracias a la salida apical de K^+ vía el canal de potasio llamado ROMK y un cotransportador de K^+/Cl^- KCC1 . Por otra parte en la zona correspondiente al túbulo colector la reabsorción de Na^+ se lleva a cabo principalmente a través de canales de Na^+ sensible a amilorida, un fármaco que bloquea canales de Na^+ denominados ENaC (Epithelial Na^+ Channel, Canal epitelial de Na^+). La función de NCC también está involucrado en el metabolismo de K^+ y el balance ácido-base.

El bloqueo de la función del NCC por el uso de tiazidas puede provocar hipocalcemia, esto debido a la cantidad de NaCl que llega al conducto colector al estar bloqueado NCC, que permite que aumente el intercambio de Na^+ con K^+ por los canales ENaC y ROMK. Los efectos en el balance ácido-base están ligados a los efectos en el metabolismo de K^+ , debido a que la hipocalcemia puede causar alcalosis metabólica, así como la alcalosis puede ser causa de hipocalcemia. Una disminución en la concentración plasmática de K^+ disminuye la cantidad de este catión unido a proteínas y estos sitios de unión pueden unir en su lugar H^+ , disminuyendo así la concentración plasmática de H^+ . Aunado a esto, la secreción de H^+ se ve aumentada en el conducto colector como respuesta a un aumento en el flujo y cantidad de NaCl que llega a este sitio.

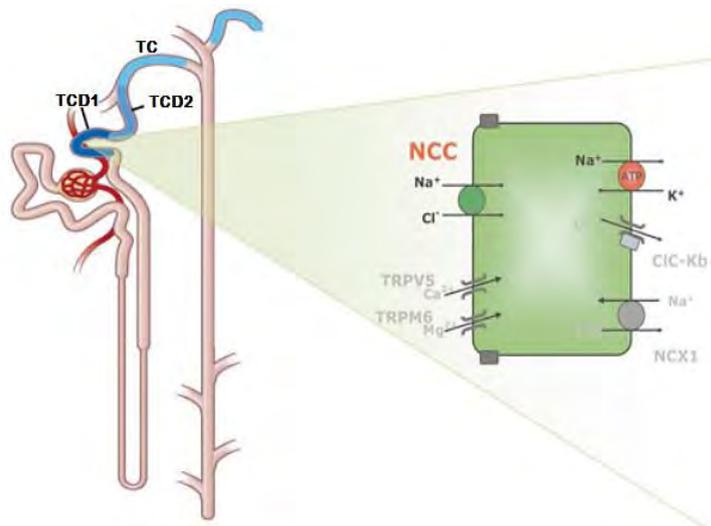


Figura 1. Modelo del transporte transcelular en DCT. En la membrana apical se observa la vía primaria de reabsorción de Na^+ y Cl^- , NCC y los receptores de potencial transitorio de Ca^{2+} (TRPV 5) y Mg^{2+} (TRPV 6). En la membrana basolateral se muestra la Na^+, K^+ -ATPasa, el canal de cloro ClC-Kb y el canal de $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ NCX1. Figura tomada de Moes y col.⁷

3. El cotransportador de NaCl sensible a tiazidas (NCC)

3.1 Identificación molecular y clonación

La primera identificación molecular del NCC se realizó en la vejiga del pez lenguado de invierno (*Pseudopleuronectes americanus*) que pertenece a la clase de los teleósteos.

Evidencia previa indicaba un cotransporte de Na-Cl en la vejiga de este pez sin alteraciones en el voltaje transepitelial, con una fuerte interdependencia entre estos iones⁸, también se observó que este transporte podía ser inhibido exclusivamente por diuréticos tipo tiazida⁹. Puesto que el transporte de Na^+ y Cl^- no requería la presencia de K^+ y diuréticos de asa como bumetanide o furosemide no mostraban efecto alguno, la evidencia indicaba que se trataba de un mecanismo diferente al observado en el asa ascendente gruesa que presenta un transporte con la estequiometría $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ ^{9,10}

Para la clonación se usó una técnica de expresión funcional basada en el sistema de expresión heteróloga de ovocitos de rana *Xenopus laevis*. A partir de la vejiga urinaria del pez lenguado de invierno se extrajo RNA mensajero que fue separado en fracciones usando cromatografía de exclusión y posteriormente estos fragmentos fueron inyectados en ovocitos de rana. Después de cierto tiempo de incubación los ovocitos fueron expuestos a ensayos de captación para medir la capacidad de transporte de $^{22}\text{Na}^+$ sensible a tiazidas y dependiente de la presencia de Cl^- en el medio. Una vez identificada la fracción con estas características se sintetizó ADNc el cual se clonó en el plásmido adecuado para generar una biblioteca que permitiera sintetizar ARNc. La biblioteca de ADNc se dividió aleatoriamente en grupos para sintetizar ARNc que fue inyectado en ovocitos para poder detectar al cotransportador. Así, Gamba y col.¹¹ reportaron en 1993 la secuencia y una predicción estructural de este cotransportador, además de un análisis del perfil de inhibición por diferentes diuréticos y entre ellos las tiazidas. La secuencia reportada contenía un marco de lectura abierto de 3069 nucleótidos que correspondían a una proteína de 1023 aminoácidos, con peso molecular aproximado de 112 kDa. Inicialmente esta proteína se denominó como CST (Cotransportador Sensible a Tiazidas) pero posteriormente, con la identificación de otras proteínas filogenéticamente se unificó la nomenclatura llamándolo NCC (Cotransportador de Na^+Cl^-).

Se ha identificado molecularmente el NCC en mamíferos como la rata, el ratón¹², el conejo¹³ y el humano¹⁴, donde su expresión se restringe al riñón. Recientemente se reportaron dos isoformas de este cotransportador en la anguila japonesa¹⁵ y la anguila europea¹⁶, cuya presencia se ha identificado además del riñón, a lo largo del tracto gastrointestinal. El grado de identidad entre

el NCC de mamíferos es mayor al 90% y cuando se compara con el NCC en teleósteos es de aproximadamente del 60%. Cabe destacar que el grado de identidad entre el NCC entre los teleósteos no es tan alto como en el caso de los mamíferos, ya que si se compara el NCC de lenguado de invierno y anguila europea o japonesa es aproximadamente del 60% mientras que entre estas dos anguilas el grado de identidad es del 98%.

3.2 Familia SLC12

El cotransportador de Na-Cl pertenece a la familia de transportadores de soluto electroneutros cloro-catiónicos SLC12 que contiene 9 miembros. Dentro de esta familia, se conoce la función de 7 de ellos, los cuales realizan cotransporte de Cl⁻ acoplado a Na⁺ y/o K⁺, dividiéndose a su vez en dos subfamilias claramente identificadas (Figura 2). Una de ellas requiere como catión al Na⁺ (con o sin movimiento de K⁺) para realizar el transporte y cuenta con 3 miembros: el NCC, el NKCC1 y el NKCC2 y la otra subfamilia utiliza únicamente potasio como catión y está compuesta por 4 miembros: KCC1-4. El grado de identidad entre ambas familias es de 25%, mientras que los miembros de cada subfamilia varían entre el 50 y 70%. El grado de identidad del NCC con los otros transportadores de la subfamilia que utilizan sodio es de 50%, esta similitud en la secuencia se refleja en una topología muy similar con 12 regiones transmembrana (TM) y un asa extracelular entre las TM 7 y 8. Sin embargo, el NKCC1 y el NKCC2 presentan una diferencia funcional importante respecto al NCC, ya que, además de Na⁺ transportan K⁺, con una estequiometría de 1Na⁺:1K⁺:2Cl⁻, de tal forma que se conserve la electroneutralidad. La dirección de transporte para esta subfamilia, en condiciones fisiológicas, es hacia el interior de la célula, ya que está dirigido por el gradiente de Na⁺.

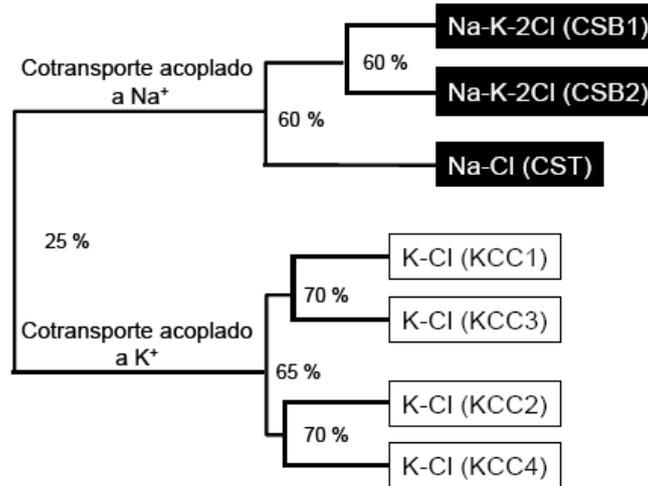


Figura 2. Árbol filogenético de 7 de los miembros de la familia de transportadores de soluto electroneutros cloro-catiónicos SLC12. Se muestra el porcentaje de identidad entre la secuencia primaria de estos transportadores.

Por otra parte, los KCCs medían la salida de iones de la célula ya que el transporte está determinado por el gradiente de K^+ . En este caso la estequiometría es 1:1 ($K^+ : Cl^-$) y como en el caso del NCC se trata de proteínas de 12 regiones TM, flanqueadas por un extremo amino y carboxilo terminal, pero que a diferencia del NCC el asa larga extracelular con los sitios de glicosilación se encuentran entre las regiones TM5-6¹⁷.

3.3 Estructura del NCC

Desde que se dio a conocer la secuencia primaria y el análisis de hidropatía de la estructura del NCC se ha concebido como una proteína con un dominio central hidrofóbico de 12 regiones TM interconectadas por 6 asas extracelulares y 5 asas intracelulares, flanqueadas por un corto extremo amino y un extremo carboxilo de mayor tamaño ubicados en el citoplasma¹¹. Este análisis coincidió con las predicciones hechas para otros miembros de la familia SLC12, como NKCC1 y NKCC2^{18,19}, que fue más tarde confirmada por el grupo de Turner²⁰. Estudios posteriores mediante ensayos de captación del isótopo radiactivo $^{22}Na^+$

realizados por nuestro laboratorio revelaron que la glicosilación de los sitios N404 y N424 ubicados en la región de interconexión más larga, entre las regiones TM 7 y 8¹⁷, son fundamentales para el correcto anclaje a la membrana celular y función del cotransportador, ya que la eliminación de cada residuo disminuyó la actividad del cotransportador en un 50%, mientras que la eliminación de ambos sitios resultó en una reducción del 95% de la función, con lo cual también se ve afectada la expresión de NCC en la membrana. Se observó que estos sitios de glicosilación también interfieren con la unión de tiazida al cotransportador, ya que la afinidad por este diurético aumenta al mutar estos residuos evitando su glicosilación, en el siguiente orden, N404<N424<N404/N424.

Por otra parte, Pacheco et al. demostraron que el aumento de la función de NCC depende de la fosforilación de los residuos Treonina 58(T58), Serina 71(S71) y Treonina 53(T53) ubicados en el extremo amino, siendo el sitio T58 el de mayor importancia, ya que al eliminar este sitio, el transporte se abate drásticamente.²¹

3.4 Caracterización funcional del NCC

Los primeros estudios de caracterización funcional del NCC fueron realizados por Renfro²² y Velázquez²³ quienes probaron la interdependencia del transporte de Na⁺ y Cl⁻ en la vejiga urinaria del pez lenguado de invierno y en el túbulo distal de rata, respectivamente, obtuvieron determinaciones aproximadas de las concentraciones de iones necesarias para alcanzar el 50% de la actividad máxima.

Los primeros trabajos que abrieron la posibilidad de estudiar aspectos estructurales y funcionales del NCC fueron publicados a principios de la década pasada. En estos estudios se analizaron las características funcionales de dos NCCs, el de rata (rNCC) y el del pez lenguado de invierno (finCC). En el 2000,

Monroy y col.²⁴ reportaron los parámetros cinéticos del rNCC. De acuerdo con la ecuación de Michaelis-Menten, asumiendo un equilibrio rápido, se obtuvieron valores de la K_m para Na^+ y Cl^- de 7.6 ± 1.6 mM y 6.3 ± 1.1 mM respectivamente. Siendo la K_m una constante de equilibrio que refleja la afinidad del sustrato de transporte por el transportador y representa la concentración de sustrato necesaria para alcanzar el 50% de la velocidad máxima.

Las determinaciones realizadas por Monroy y col. se realizaron en presencia de concentraciones saturantes del contraión en el medio, es decir, del ión cuya concentración permanece fija durante el ensayo, midiendo la actividad del transporte en concentraciones crecientes del ión variable.

Posteriormente se realizaron experimentos para evaluar si la concentración del contra-ión tenía efecto sobre el valor de la K_m obtenida. Se observó que en las cinéticas de Na^+ , un aumento en la concentración de Cl^- extracelular, aumentaba la afinidad por el Na^+ (representada por una disminución de K_m) así como la velocidad máxima del transporte ($V_{m\acute{a}x}$). Se observó el mismo efecto al determinar la K_m de Cl^- en concentraciones crecientes de Na^+ . Por lo tanto, se propuso un modelo basado en un sistema de unión al azar para explicar la cinética de transporte, en donde, no existe preferencia por Na^+ o Cl^- para unirse primero al transportador, sin embargo, la unión del primer ión aumenta la afinidad por el segundo.

En cuanto a la afinidad por diuréticos tiazídicos, se determinó la potencia de distintos tipos compuestos, mediante la realización de curvas de dosis-respuesta para determinar el IC_{50} para cada fármaco. De acuerdo con lo reportado el perfil de inhibición fue el siguiente: politiazida > metolazona = bendroflumetiazida > tricloclorometiazida > hidroclorotiazida.

Monroy y col.²⁵ también estudiaron el efecto de diferentes concentraciones extracelulares tanto de Na⁺ como de Cl⁻ sobre la afinidad del cotransportador por tiazidas, observaron que ambos iones disminuyen su afinidad ante la presencia del diurético. Ante estas observaciones se propuso un modelo de unión al azar de los iones en donde las tiazidas compiten por el sitio de unión de ambos sustratos de transporte.

Posteriormente Vázquez y col. reportaron la caracterización funcional del cotransportador del pez lenguado de invierno (fINCC), con mayor detalle del previamente publicado con motivo de su clonación¹¹ donde también muestran una comparación con el cotransportador de rata (rNCC)²⁶. Se observó que el fINCC exhibe una menor afinidad por los sustratos de transporte con valores de la K_m para Na⁺ y Cl⁻ de 58.2 ± 7.1 mM y 22.1 ± 4.2 mM, respectivamente en comparación con el rNCC. Como se había observado para el rNCC, se evidencia la interdependencia entre los sustratos de transporte, ya que las afinidades por ambos iones disminuyen al disminuir la concentración del contraión en el medio. Explicaron que la diferencia en la afinidad por ambos iones, representados por los valores de la K_m del fINCC y del rNCC se debe a una adaptación evolutiva que permite al cotransportador de mamífero una mayor actividad en presencia de concentraciones menores de sustratos, ya que las células del TCD está expuestas a concentraciones menores de iones que el epitelio de la vejiga del lenguado. Este planteamiento se refuerza al comparar los valores de la K_m

obtenidos del transportador de diferente especie, en este caso el cotransportador de ratón (mNCC) resultando similares entre ellos (Figura 3).

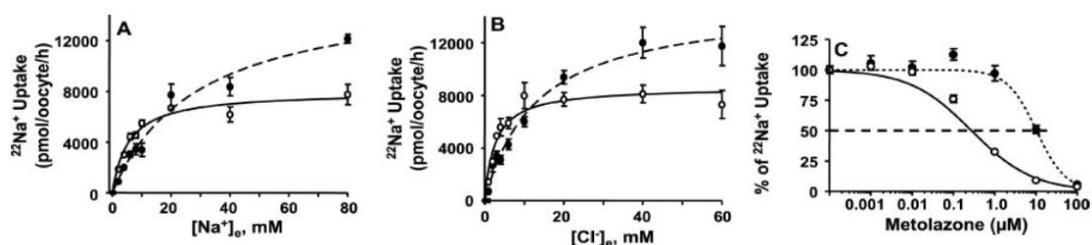


Figura 3. Propiedades funcionales de NCC de rata (NCCr, línea continua) y lenguado de invierno (NCCfl, línea discontinua) usando el sistema de expresión heteróloga de ovocitos de *X. laevis*. Se muestra la captación de $^{22}\text{Na}^+$ dependiente de la concentración de Na^+ de NCCr y NCCfl. (A), la captación de $^{22}\text{Na}^+$ dependiente de la concentración de Cl^- (B) y el porcentaje captación de $^{22}\text{Na}^+$ dependiente de la concentración de Metolazona. Figura tomada de Moreno y col.²⁷

La afinidad del fNCC por los diversos compuestos tiazídicos fue al menos un orden menor en comparación con la afinidad observada para el rNCC. El perfil sin embargo fue similar ya que aunque todos los diuréticos evaluados muestran una menor afinidad en el fNCC, la potencia relativa fue similar a la observada en el rNCCr: metolazona > politiazida > bendroflumetiazida > triclorometiazida > clortalidona (Figura 4).

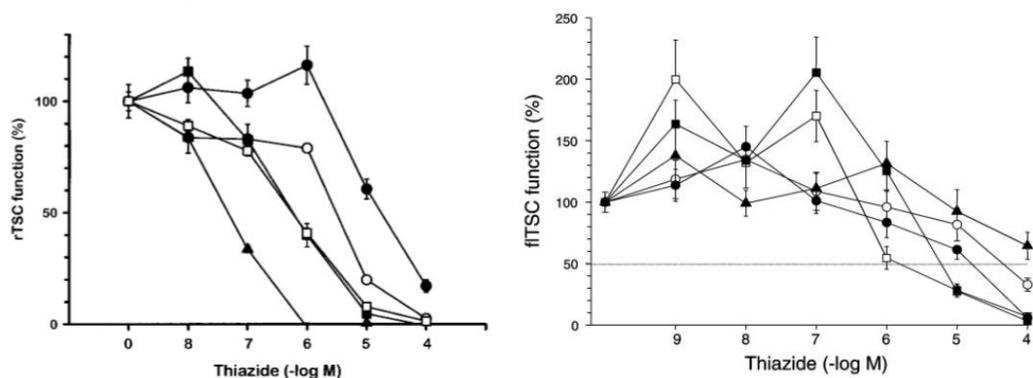


Figura 4. En el panel izquierdo se muestra el análisis cinético de inhibición sobre la función del NCC de rata (rNCC) de diferentes diuréticos tiazida. El perfil de inhibición fue politiazida (▲) > metolazona (■) = bendroflumetiazida (□) > triclorometiazida (○) > hidroclorotiazida (●).
 Figura tomada de Monroy y col.²⁵

En el panel derecho se muestra el análisis cinético de inhibición sobre la función del NCC de lenguado de invierno (fNCC) de diferentes diuréticos tiazida. El perfil de inhibición fue metolazona (□) > politiazida (▲), bendroflumetiazida (●), triclorometiazida (○), clortalidona (▲).
 Figura tomada de Vázquez y col.²⁶

Basándose en las diferencias funcionales entre el rNCC y el fNCC, en 2006 Moreno y col.²⁷ determinaron las regiones del cotransportador involucrados en la afinidad tanto de los sustratos de transporte como de los inhibidores (Figura 5). Para tal efecto, la estructura del cotransportador se segmentó en 5 fracciones: región amino-terminal, regiones TM 1-7, asa interconectora de las regiones TM 7 y 8 y en la que se encuentran los sitios de glicosilación, regiones TM 8-12 y por último, la región carboxi-terminal. Mediante ingeniería genética se realizaron múltiples proteínas quiméricas intercambiando estas regiones entre el rNCC y el fNCC para evaluar el efecto de los cambios realizados sobre la afinidad por Na⁺, Cl⁻ y tiazidas. Se observó que al intercambiar únicamente la sección correspondiente a las regiones TM 8-12 se reproduce la diferencia de afinidad por metolazona entre el rNCC y el fNCC, sin embargo, la eliminación de los distintos sitios de glicosilación (dos en el rNCC y tres en el fNCC), no mostró alteración en los valores originales de IC₅₀ de metolazona para cada cotransportador.

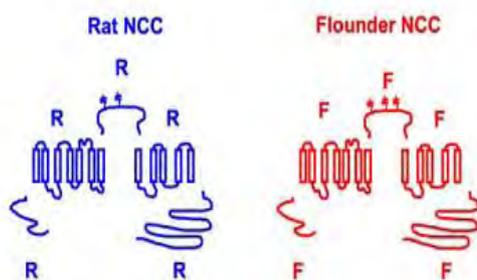


Figura 5. Se muestran los modelos topológicos de NCC de rata (rNCC) a la izquierda en color azul y lenguado de invierno (fNCC) a la derecha en color rojo. Se pueden observar las cinco secciones (amino-terminal, TM1-7, asa extracelular con los sitios de glicosilación, TM8-12 y carboxi-terminal) en las cuales se dividió la estructura de NCC para realizar constructos que permitieran analizar la relevancia de cada sitio en el transporte de iones y afinidad a tiazidas.

En cuanto a la afinidad por los sustratos de transporte, se observó que al intercambiar exclusivamente las regiones TM 1-7 se produce la diferencia en la

afinidad por Cl^- entre el rNCC y el fNCC, mientras que el intercambio de las distintas regiones en diferentes combinaciones no altera la afinidad de estos dos cotransportadores. De acuerdo con estos resultados se concluyó que las regiones TM 1-7 contienen residuos importantes para determinar la afinidad por el Cl^- , las regiones TM 8-12 para determinar la afinidad por el diurético tipo tiazida, mientras que las 12 regiones TM están involucradas en la afinidad por Na^+ . Lo que los llevó a proponer el modelo de unión de iones y tiazidas al NCC que muestra la figura 6.

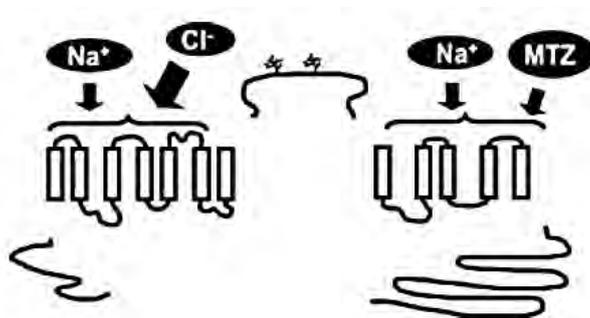


Figura 6. Esquema que muestra los dominios responsables de la afinidad por los sustratos de transporte Na^+ , Cl^- y el inhibidor del transporte Metolazona (MTZ).

Posteriormente, Castañeda y col.²⁸ realizaron un análisis estructural sobre las regiones TM8-12, involucradas en la afinidad por tiazidas, tomando en cuenta las diferencias reportadas entre el rNCC y el fNCC. Después de realizar el alineamiento de la secuencia primaria de estos NCCs identificaron 6 residuos diferentes entre ellos. Señalando en el siguiente orden, aminoácido presente y posición en la secuencia de rNCC, seguida del aminoácido correspondiente en fNCC las diferencias son: 2 ubicadas en TM 9 de (A510T y A516C), 3 en TM 11 (A568S, I574C y S575C) y 1 en la TM 12 (V601T), se decidió realizar mutaciones por bloques y evaluar el efecto de éstas sobre la función del NCC y afinidad por metolazona. Los resultados mostraron que el valor de la IC_{50} determinada para la mutante del rNCC en la región TM 11, es la misma que la determinada para el fNCC silvestre.

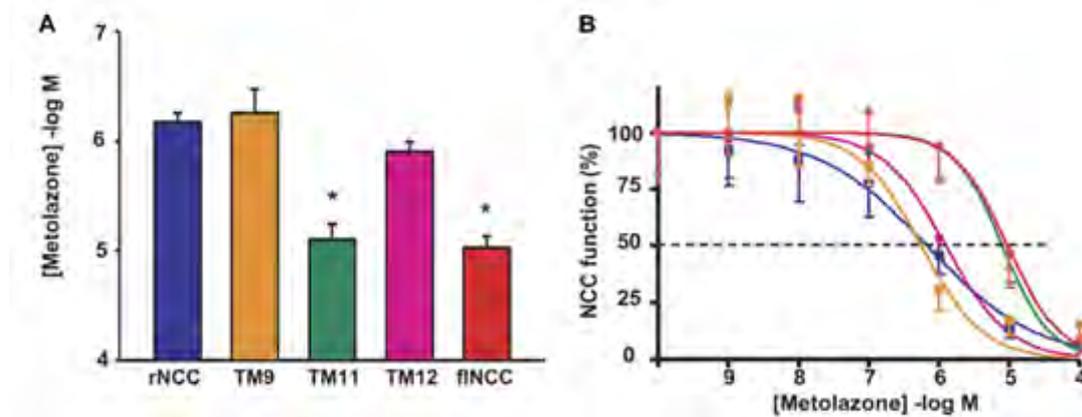


Figura 7. Efecto de las mutaciones en las regiones TM sobre la afinidad por metolazona en rNCC. **A.** Se muestra el IC₅₀ de la forma silvestre rNCC y fINCC, además de las mutantes de las regiones TM 9, 11, 12. **B.** Se muestran las curvas dosis-respuesta realizadas con la forma silvestre de rNCC y fINCC, además de las mutantes de las regiones TM 9, 10, 11 y 12 color naranja, verde y rosa respectivamente.

Por esta observación, los experimentos posteriores se enfocaron exclusivamente en las diferencias en la región TM 11 entre el rNCC y el fINCC. A pesar de haberse encontrado con 3 residuos diferentes en esta región, el análisis se dirigió a los cambios que involucraran un residuo de cisteína, ya que la presencia de un grupo sulfhidrilo en este aminoácido le confiere la característica de establecer una fuerte interacción covalente que puede afectar las propiedades funcionales y estructurales de las proteínas. Se realizaron entonces las mutaciones I574C y S575C, por separado y una doble mutante en la secuencia del rNCC. Se observó que la doble mutante así como la mutante simple S575C disminuyeron la afinidad por metolazona de forma equiparable a la triple mutante (Figura 8A). Para confirmar entonces el papel del cambio de serina por cisteína, se realizó la mutación equivalente en la secuencia de fINCC, C576S, que mostró un aumento en la afinidad por metolazona comparado con la forma silvestre (Figura 8B).

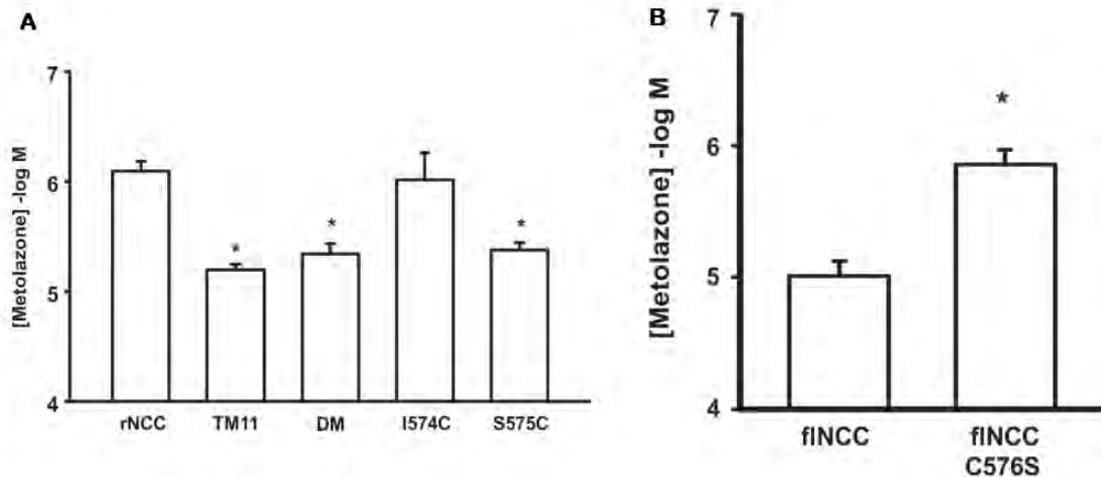


Figura 8. **A.** Se muestra el efecto de las mutaciones en conjunto y por separado de la región TM 11 de rNCC sobre la afinidad por metolazona. **B.** Se muestra el efecto de la mutación de la cisteína en la posición 576 por **serina** en finNCC, que muestra un aumento en la afinidad por tiazidas, equiparable a la forma silvestre de rNCC.

Reuniendo la evidencia reportada en los estudios mencionados se muestra un esquema con la estructura del NCC resaltando las características funcionales más importantes de este cotransportador (Figura 9).

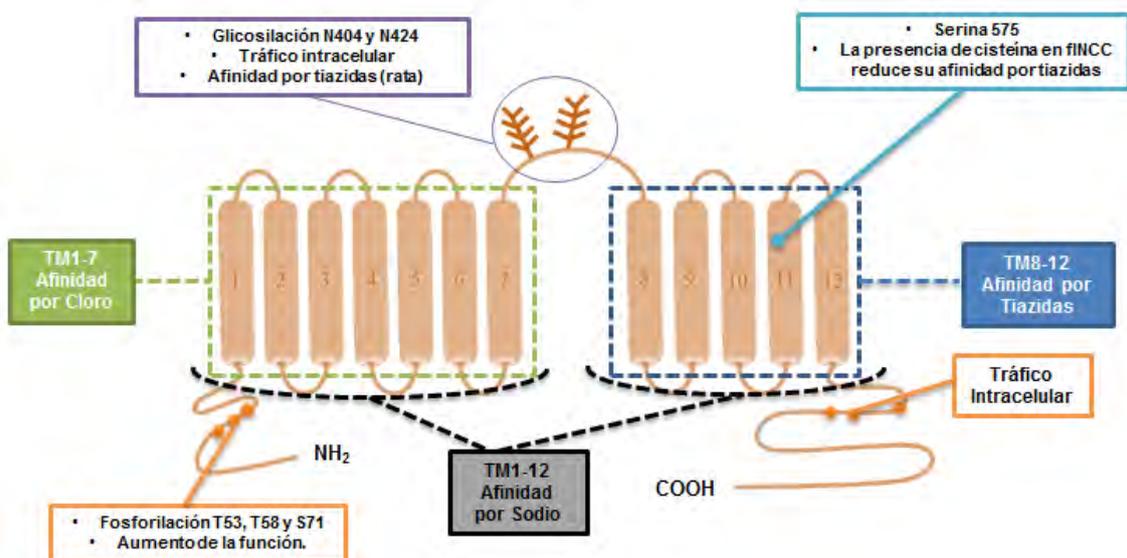


Figura 9. Relación estructura-función de NCC.

3.5 El NCC en teleósteos

3.5.1 El NCC de anguilla europea

En 2008, Cutler y col.¹⁶ reportaron la identificación de patrones de expresión de ARNm correspondientes al NCC en distintos tejidos de *Anguilla anguilla* conocida también como anguila europea aclimatadas en agua dulce (FW, 5 mOsm/kg) y agua salada (SW, 940 mOsmol/kg).

Como resultado de experimentos de clonación usando ARNm de intestino y riñón de anguila lograron identificar molecularmente 2 genes que codifican para NCC que fueron denominados alfa y beta (α y β). El eNCC α fue extraído a partir de los riñones de tejido renal y la isoforma β a partir del intestino.

Para eNCC α se identificó una secuencia de 3848 nucleótidos resultando en una proteína de 1027 aminoácidos; y como consecuencia de empalme alternativo, se obtuvo una segunda secuencia de 3755 nucleótidos codificante de una proteína de 900 aminoácidos debido a la pérdida de 127 aminoácidos en el amino terminal. Por otra parte, la secuencia identificada de la isoforma β del cotransportador resultó de 3437 nucleótidos codificando para 1043 aminoácidos con una versión truncada de 3371 nucleótidos que resulta en 1021 aminoácidos.

En cuanto a la determinación de estas isoformas en tejidos, mediante estudios de Northern Blot se detectó la presencia de banda de 5.4 Kb correspondiente a eNCC α , exclusivamente en riñón y se observó que la abundancia del ARNm disminuye significativamente en anguilas sexualmente maduras

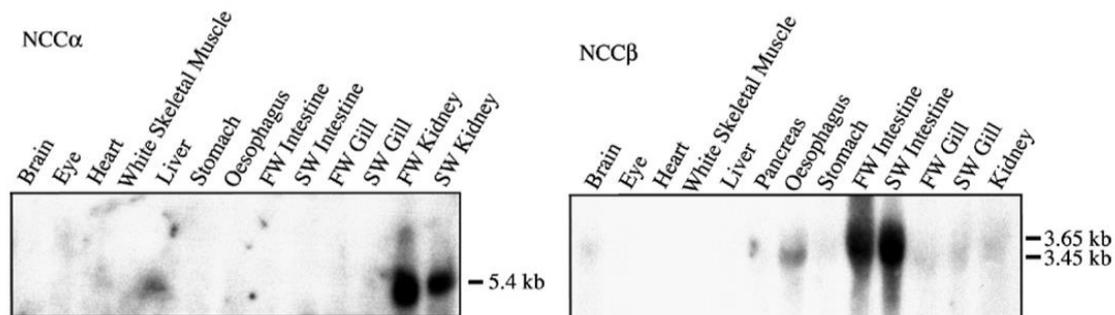


Figura 10. Distribución de expresión de ARNm de NCC α y NCC β en muestras de diferentes tejidos de anguila sexualmente inmadura aclimatada en agua salada (SW) y algunas muestras en agua dulce (FW).

De la misma forma, se identificaron para el eNCC β dos bandas con un peso de 3.45 Kb y 3.65 Kb presentes en diferentes tejidos de anguilas maduras e inmaduras sexualmente; los niveles más altos de ARNm de esta isoforma se detectaron a lo largo en el intestino, particularmente en la sección posterior, mientras que niveles intermedios se detectaron en esófago y niveles bajos en branquias, riñón estómago y cerebro (Figura 10).

La explicación sobre la existencia de dos pares de isoformas de NCC en la anguila europea se basa en la teoría que propone que el genoma de la anguila pudo haber derivado de una antigua especie progenitora de teleósteos cuyo genoma fue duplicado después de la separación de los vertebrados terrestres del linaje de los peces teleósteos.²⁹

3.5.2 NCC de anguila japonesa

En la anguila japonesa (*Anguilla japonica*) también se ha reportado la presencia de dos isoformas del NCC denominadas α^{30} y β^{15} .

Usando RT-PCR, se caracterizaron los patrones de expresión de estas isoformas del cotransportador, la expresión de ARNm de la isoforma α (jNCC α) se identificó exclusivamente en tejido renal, mientras que el ARNm de la isoforma β (jNCC β) se localizó en esófago, la parte posterior del intestino, recto y músculo (Figura 11). La distribución de ARNm de estas isoformas mostró patrones similares a lo observado en la anguila europea.

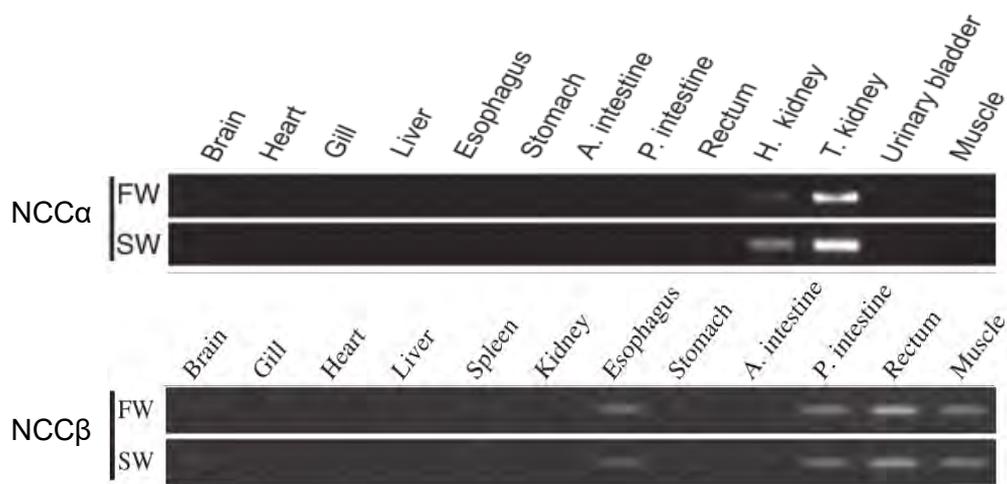


Figura 11. Distribución de expresión de ARNm de NCC α y NCC β en muestras totales de ARN de diferentes tejidos de anguila sexualmente inmadura aclimatada en agua salada (SW) y algunas muestras en agua dulce (FW).

La caracterización molecular reflejó la identificación de una secuencia de 3862pb que codifican para una proteína de 1027 aminoácidos en caso de la isoforma α . La secuencia de la isoforma β resultó de 3851pb que codifican para una proteína de 1042 aminoácidos.

Cuando se hace una comparación de la secuencia de NCC β de la anguila europea (eNCC β) y japonesa (jNCC β) se obtiene un porcentaje de identidad de 98%, reflejado en la cercanía mostrada en el análisis filogenético.

Para evaluar el papel que juega el jNCC β en la absorción de iones y de agua en el recto, se realizaron preparaciones de sacos rectales de anguilas japonesas aclimatadas en agua salada. La determinación del transporte de NaCl se realizó

por diferencia de la medición de las concentraciones de la solución al inicio y después de 1h de incubación, mientras que el movimiento de agua fue determinado con la diferencia de masa antes y después del periodo de incubación. De acuerdo con estos experimentos se observó que la adición de 1mM de HCTZ produce una reducción significativa en la concentración de Na⁺, Cl⁻ y agua, indicando la participación directa de este cotransportador en la absorción de iones en la membrana apical de las células epiteliales del recto (Figura 12).

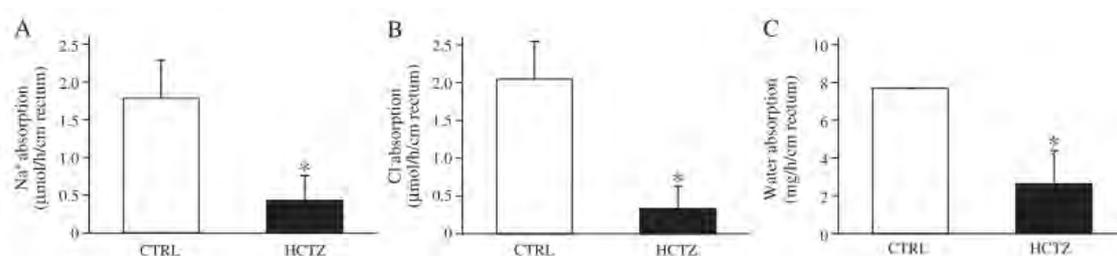


Figura 12. Absorción de iones Na⁺, Cl⁻ y agua en preparaciones de sacos rectales de anguila japonesa. Se muestra el transporte control en barras blancas y la absorción en presencia del inhibidor de NCC hidroclorotiazida (HCTZ) en barras negras.

4. Diuréticos

Como se ha mencionado, el NCC es el blanco de acción de los agentes antihipertensivos tiazidas, a continuación se realiza una revisión de la síntesis de este tipo de compuestos desde una perspectiva histórica.

En 1937 H. Southworth observó que los pacientes bajo tratamiento con sulfanilamida desarrollaban acidosis metabólica, mientras que excretaban orina alcalina³¹. También se notó que los pacientes con insuficiencia cardiaca congestiva a los que se administraba sulfonilamida excretaban bicarbonato de sodio y se incrementaba el volumen de la orina.³² Más tarde este efecto diurético fue atribuido a la inhibición de la anhidrasa carbónica (AC), enzima que se

encuentra revistiendo el borde luminal de las células epiteliales del túbulo contorneado proximal en el riñón³³, a partir de esta observación se sintetizaron compuestos derivados de sulfonamida, el prototipo fue la acetazolamida (Figura 13).

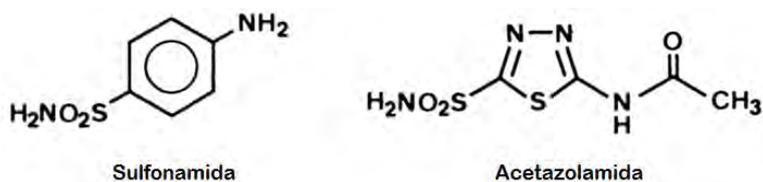


Figura 13. Estructura química de los fármacos sulfonamida, conocido por su actividad antimicrobial y acetazolamida, el primer diurético inhibidor de la AC.

La acetazolamida mostró una potente acción inhibitoria sobre la AC con una actividad 100 veces mayor que la sulfamida^{34,35}, y en 1954 bajo el nombre comercial de Diamox, se convirtió en el primer diurético inhibidor de la AC usado clínicamente.

Estudios de estructura-función mostraron que la presencia del grupo sulfonamida no sustituido en la posición 5 del centro tiadiazol, es el responsable de la inhibición específica de la AC^{36,35,37}, debido a la similitud espacial que esta monosulfonamida presenta con el sustrato de esta enzima; cabe destacar que si el átomo de nitrógeno presente en este grupo se mono o di-sustituye se pierde la acción inhibitoria sobre la AC³⁶. La actividad que presenta este fármaco se refleja en un aumento en la excreción de iones HCO₃⁻ y NaCl acompañados de agua, que promueve el desarrollo de acidosis metabólica. Siendo el túbulo proximal el sitio de acción de la acetazolamida, se podría esperar que la acetazolamida fuera un potente diurético, dado que en esta porción de la nefrona se reabsorbe una gran fracción del filtrado total, sin embargo, la diuresis producida por este compuesto tiende a ser baja debido a que el organismo compensa la excreción aumentada de electrolitos, al ser recapturada en regiones

más distales y la acción diurética se ve disminuida por la acidosis metabólica como resultado de la pérdida de HCO_3^- ³⁸. La identificación de efectos adversos como parestesia, formación de cálculos renales y somnolencia han limitado su uso como diurético en pacientes que presentan edema acompañado de alcalosis metabólica³⁹, actualmente su principal uso es en el tratamiento de glaucoma y mal de montaña⁴⁰.

A pesar de que se sintetizaron compuestos con un mayor efecto diurético con un número más limitado de efectos adversos, la actividad inhibitoria de la AC de forma *in vitro*, permaneció como un importante parámetro en los efectos diuréticos por varios años.

4.1 Tiazidas

Después del desarrollo de acetazolamida, Sprague y col.⁴¹ re-evaluaron las características químicas y farmacológicas de compuestos aromáticos y observaron una inesperada actividad de ciertos derivados de bencendisulfonamida, en particular la serie bencen-1,3-sulfonamida(I). Sustituyentes como halógenos, grupo amino y aciloamino(II), mostraron tener un gran mejoramiento sobre el efecto de eliminación de electrolitos en comparación con los inhibidores de AC. La acilación del grupo amino en la posición orto,(III) mostró mejorar aún más la actividad, relacionando directamente el grado de mejoramiento con la dimensión del residuo acilo, ya que la actividad aumenta con el tamaño de la cadena alifática⁴¹ (Figura 14).

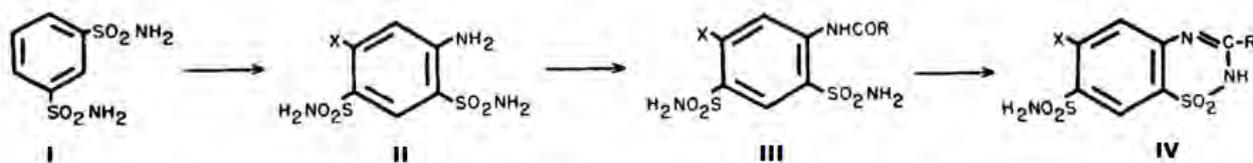


Figura 14. Secuencia en la adición de sustituyentes importantes que derivaron en la síntesis de benzotiadiazina, estructura base de los compuestos diuréticos tiazida.

También observaron que cuando el grupo acilamino ocupa la posición orto del anillo benceno, el cierre del anillo se produce fácilmente, teniendo como producto la estructura base benzotiadiazina³⁶ (IV) (benzotiadiazina-1,1-dióxido).

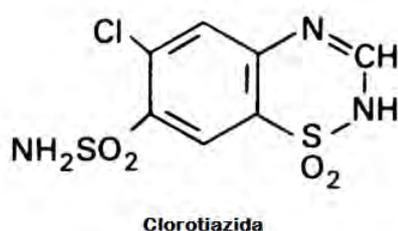


Figura 15. Estructura química de Clorotiazida, primer compuesto del grupo de diuréticos tiazida.

En 1957, Novello y Sprague reportaron la síntesis de un nuevo diurético con la adición de un átomo de Cl al anillo bencénico en la posición 6, Clorotiazida (6-cloro-7-sulfamil-1,2,4-benzotiadiazina-1,1-dioxido)⁴², bajo el nombre comercial Diuril (Figura 15). Este compuesto incorpora en su estructura química el grupo funcional sulfonilamida, característico de los inhibidores de la AC aunque sólo posee una centésima parte de la actividad de la acetazolamida. En cuanto a su actividad farmacológica la principal característica es la capacidad para inhibir la reabsorción tubular de electrolitos, principalmente de Na y Cl y, en menor grado, de K y HCO₃⁻ en comparación con el diurético orgánico mercurial más eficiente hasta entonces, Clormerodrin y el inhibidor de la AC acetazolamida^{43,44}.

Durante los años subsecuentes la clorotiazida fue la estructura base de una numerosa serie de diuréticos denominados tiazidas, con la estructura benzotiadiazina como base (Tabla 1).

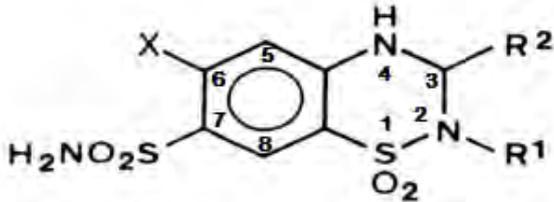
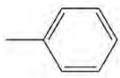
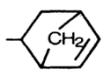
 <p style="text-align: center;">Benzotiadiazina Estructura base de diuréticos tiazídicos</p>				
X	R ¹	R ²	Nombre	Actividad diurética relativa Clorotiazida = 1 ^{45,46}
Cl	H	H	Hidroclorotiazida	10
-CF ₃	H	H	Hidroflumetiazida	10
Cl	H	-CHCl ₂	Triclorometiazida	100
-CF ₃	H		Bendroflumetiazida	200
Cl	-CH ₃	-CH ₂ SCH ₂ CF ₃	Polítiazida	500
Cl	H		Ciclotiazida	250
Cl	H	-CH ₂ - 	Ciclopentiazida	1000

Tabla 1. Tabla con la estructura de los diuréticos tipo tiazida y la actividad diurética relativa, tomando como referencia al fármaco Clorotiazida.

En cuanto a la relación estructura-función de los diuréticos tiazídicos, existen dos posiciones que confieren diferente actividad, la sustitución en el carbono 6 (C-6) y en el carbono 3 (C-3)⁴⁵. La mayor actividad diurética se ha observado con la sustitución de halógenos en el C-6, mostrando una mayor actividad con Cl, Br o -CF₃, mientras que elementos más electronegativos como F o I la actividad es muy baja, lo que sugiere que la inhibición de transporte tubular es la consecuencia de un efecto estérico entre el halógenos y el sitio de acción de

estos compuestos. La relevancia de estos sustituyentes se respalda debido a la falta de actividad natriurética que presenta el compuesto diazóxido. A diferencia de la estructura base de las tiazidas donde un átomo halógeno generalmente en el C-6 y el grupo sulfonamida en el C-7, en el compuesto diazóxido carece del grupo sulfonamida y en el C-7 se encuentra un átomo de Cl.

Por otra parte, se ha observado que hay una relación directa entre el grado de lipofiliidad, representado por el coeficiente de partición (Log P) del sustituyente en el C-3 y la actividad diurética, como se ve en la tabla 2.

Nombre	Actividad diurética relativa	Coefficiente de partición éter/agua (LogP) ⁴⁶
Clorotiazida	1	0.08
Hidroclorotiazida	10	0.37
Triclorometiazida	100	1.53
Ciclopentiazida	1000	10.2

Tabla 2. Tabla con los valores de coeficiente de partición (LogP) de compuestos tiazida y la actividad diurética relativa tomando como referencia al compuesto clorotiazida.

La importancia de los sustituyentes en el orden establecido al sintetizar nuevos compuestos se evidencia en el compuesto diazóxido (Figura 16), ya que al eliminar un radical sulfonamida y adicionar un átomo de Cl⁻ en su lugar tiene como consecuencia la falta de actividad natriurética.⁴⁷

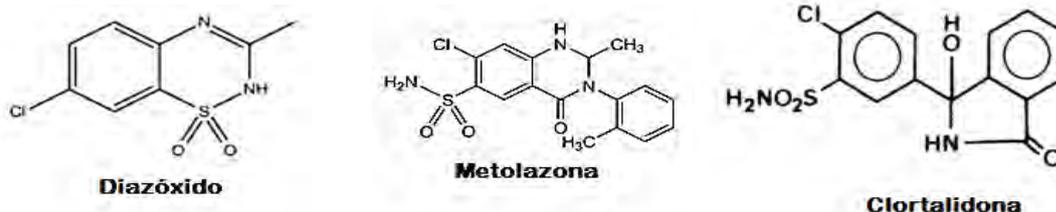


Figura 16. Estructura química de los fármacos diazóxido, carente de efecto antihipertensivo, y los fármacos empleados en el tratamiento de hipertensión metolazona y clortalidona.

Además de estos derivados, el reemplazo del grupo sulfonilo por carboxilo dio paso a compuestos derivados de quinazolina, entre los que se destaca la metolazona. Más tarde, la apertura del anillo de benzotiadiazina y quinazolina resultó en la síntesis de otra serie de compuestos de interés siendo el más importante Clortalidona^{34,45}. Estos últimos compuestos se denominaron diuréticos tipo tiazida, ya que estrictamente no conservan la estructura de benzotiadiazina.

Puesto que el NCC es el blanco farmacológico de un grupo específico de agentes antihipertensivos ampliamente utilizados en la práctica clínica, las tiazidas, con esta tesis tenemos la intención de aumentar el nivel de conocimiento en relación con la estructura función de esta proteína, con el propósito de poder determinar los residuos requeridos para que el cotransportador sea inhibido por estos fármacos. La identificación molecular del NCC β mostró a un cotransportador de NaCl que guarda el menor porcentaje de homología con respecto a otros NCCs, por lo que consideramos que la caracterización funcional de éste podría aportar datos útiles para continuar con el estudio de la relación estructura función del NCC y en un futuro cercano poder establecer los aminoácidos específicos responsables de determinar la funcionalidad del cotransportador. Ya que la caracterización funcional constituye un amplio proyecto el desarrollo de esta tesis se limita a reportar la evaluación de las propiedades inhibitorias de las tiazidas sobre el NCC.

HIPÓTESIS

Si la capacidad que tienen los diuréticos tiazida para inhibir al NCC está determinado por la unión de este fármaco a las regiones transmembranales del cotransportador, entonces el análisis de las secuencias de aminoácidos en distintos NCCs que muestran diversidad en la afinidad por tiazidas y la generación de proteínas mutadas podría revelar aminoácidos específicos involucrados en la inhibición de este cotransportador.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de diuréticos tiazida sobre la función de NCC β de la anguila europea.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Clonación de la isoforma β del NCC de la anguila europea.
2. Estudiar el efecto que ejercen las tiazidas sobre la función del eNCC β .
3. Analizar la estructura primaria de eNCC β detalladamente para determinar si este cotransportador constituye un buen modelo de estudio para determinar aminoácidos específicos o motivos estructurales que le permiten al fármaco unirse a su proteína blanco.
 - 3.1 Realizar alineamientos de diferentes secuencias del NCC y hacer un análisis detallado de los aminoácidos altamente conservados en la secuencia del cotransportador.
 - 3.2 Realizar mutaciones de los aminoácidos que podrían estar involucrados en la unión a diuréticos al eNCC β .
 - 3.3 Determinar las propiedades funcionales de las clonas construidas en el punto 3.2.

METODOLOGÍA

1. Clonación y secuenciación de ADNc

Cutler y col.¹⁶ identificaron molecularmente 2 isoformas del NCC, provenientes de dos genes diferentes a partir de riñón e intestino del pez anguila europea.

La clonación de estos genes fue posible mediante una estrategia metodológica que incluyo la extracción de tejidos de las anguillas europeas (para la obtención del RNA total) así como de la síntesis de iniciadores sentido y antisentido que permitieron la obtención del ADNc del NCC alfa y beta mediante RT-PCR. La secuenciación de estos fragmentos revelo a un NCC alfa de 3848 pb y a una isoforma Beta de 3437 pb. Una vez obtenidos los cDNAs estuvimos interesados en conocer las propiedades funcionales de estos transportadores, de esta forma como parte de un proyecto en colaboración el Dr. Cutler envió a nuestro laboratorio los fragmentos de ambas clonas. Decidimos que mi trabajo de tesis incluiría solo el estudio de la isoforma β , ya que ambos estudios comprenden un largo período de tiempo, sumado a que el NCC β (eNCC β), es la isoforma que presenta el menor porcentaje de identidad con respecto a otros miembros de la familia, por lo que la caracterización funcional de este último podría aportar datos útiles para continuar con el estudio de la relación estructura-función del NCC y en un futuro cercano poder establecer los aminoácidos específicos que sean los responsables de determinar la unión de tiazidas al transportador.

Fue necesario insertar el fragmento obtenido por Cutler en un vector de expresión. Como primer paso, se decidió agregar en cada extremo de la secuencia un sitio que pudiera ser reconocido por una enzima de restricción y que al mismo tiempo estos sitios estuvieran presentes en el vector de expresión en el que sería insertado, además de ser un sitio único dentro de toda la secuencia tanto del vector como de la clona. En este caso se usó el vector de expresión en *Xenopus laevis* pGEMHE de 3022 pb.

La inserción de los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción se realizó mediante mutagénesis puntual utilizando el estuche comercial Stratagene, se incluyó el sitio para la enzima *SmaI* en el extremo 5' y en el extremo 3' para la enzima *XbaI*. Los sitios generados fueron secuenciados para corroborar la adecuada generación.

Posteriormente el fragmento de ADNc del eNCC β *SmaI-XbaI* se ligó al plásmido pGEMHE mediante la enzima ligasa (Promega).

Oligonucleótidos usados para la inserción de sitios de restricción		
SmaI	5'-TTCCCCGGGGATCATGGGGCAGCGCATATCTGGTC-3'	
XbaI	5'-ACTCTAGATCACTGGCAGTAGAAGGTGAGCACATTCT-3'	
Oligonucleótidos usados para la secuenciación del vector con la secuencia de eNCC β		
5'-ATTCCCCCGGGGATC-3'	5'-GAAAAAATGATGAGC-3'	5'-TCTAGAGCAAGCTT-3'
5'-ATTTCATTGGCT-3'	5'-CTTCTGCAGG-3'	

Tabla 3. Tabla con los oligonucleótidos usados para la inserción de los sitios de restricción *SmaI* y *XbaI*. También se muestran los oligonucleótidos utilizados para secuenciar el vector pGEMHE con la secuencia insertada de eNCC β .

Para replicar el DNAc del eNCC β se utilizaron bacterias *Escherichia coli* XL-I blue , y el ADNc fue extraído con el estuche comercial QUIAGEN. Los DNAc obtenidos fueron analizados mediante mapas de restricción para tener la certeza de las clonas generadas. Las muestras se guardaron a -20 °C hasta la síntesis de ARNc.

2. Síntesis in vitro de RNAc

El DNAc del eNCC β fue linearizado en el extremo 3' con la enzima de restricción *NheI* y para la síntesis de ARNc *in vitro* se empleó el sistema de transcripción mMMESSAGE mMACHINE de Ambion, el cual funciona con una polimerasa T7 ARN. El vector PGHEM es un vector de expresión que contiene un promotor T7 en la región 5' por lo que es compatible con este sistema. La calidad del ARNc obtenido fue comprobada mediante electroforesis en gel de agarosa 1%/formaldehído y la concentración fue determinada mediante análisis densitométrico. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso.

3. Alineamientos de secuencias

Las secuencias de aminoácidos de los cotransportadores de Na-Cl presentes en la anguila europea α y β , lenguado de invierno, conejo, humano, ratón, rata y las isoformas α y β de la anguila japonesa (No. de acceso AJ564604, AJ564606, L11615, AF028241, X91220, U61085, U10097, AB689705 y AB510742.1 respectivamente) fueron alineadas y analizadas en la plataforma en línea de Clustal ω .

4. Extracción y preparación de ovocitos de *Xenopus laevis*

El ovocito de *Xenopus laevis* es uno de los sistemas de expresión funcional más usados para estudiar proteínas de membrana, ya que su membrana es relativamente pobre en canales endógenos, además de ser células resistentes que pueden ser manipuladas fácilmente. La principal aplicación que tiene este modelo son los estudios sobre la relación estructura-función, donde la consecuencia de cambios a nivel molecular, son evidenciados en la función de la proteína.⁴⁸. Por lo que es un modelo ideal para el desarrollo de este proyecto.

Los ovocitos en estadio V o VI se extrajeron mediante cirugía de ranas hembras adultas *Xenopus laevis* anestesiadas con tricaina (metanosulfonato de etil 3-aminobenzoato, 0.17%). Posteriormente los ovocitos se incubaron durante 3 horas en colagenasa tipo II (0.3%) disuelta en solución ND96 (sin calcio, consultar tabla de soluciones). Finalizada esta fase, se lavaron con ND96 (con calcio) con gentamicina (5%) y se defolicularon manualmente. Los ovocitos se mantuvieron en esta misma solución. Al día siguiente estos ovocitos fueron inyectados con 50 nL de agua o con ARNc de eNCC β así como de las clonas utilizadas como control experimental (rNCC, hNCC, fNCC) a una concentración de 0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (20 ng de ARNc/ovocito) y se incubaron nuevamente en ND96 por 72 horas antes de realizar los ensayos de expresión funcional.

5. Ensayos de expresión funcional

La actividad del eNCC β fue evaluada mediante la captación de $^{22}\text{Na}^+$. Se usaron para cada experimento entre 20 y 25 ovocitos por grupo experimental, adicionalmente se

incluyó un grupo inyectado con agua, el cual se sometió a las mismas condiciones que el resto de los grupos, con la finalidad de verificar la ausencia del transportador inyectado.

En los ensayos de captación del isótopo radiactivo $^{22}\text{Na}^+$ los ovocitos se expusieron en un periodo de pre-captación sin isótopo radiactivo durante 30 minutos, siendo incubados en solución de Isetionato de Na^+ con la finalidad de favorecer la salida de Cl^- del ovocito. Inmediatamente después se realizó un periodo de captación utilizando $1 \mu\text{Ci}$ de $^{22}\text{Na}^+$ en solución que contenía Na^+ , Cl^- y libre de K^+ durante 60 min a $32 \text{ }^\circ\text{C}$.

En ambos periodos se usaron inhibidores de vías endógenas ajenas a $\text{eNCC}\beta$ por la cual se pueda captar $^{22}\text{Na}^+$; se usó ouabaina 1 mM que es un inhibidor de la ATPasa Na^+/K^+ , amiloride 0.1 mM para inhibir canales de Na^+ propios del ovocitos y bumetanide para bloquear al cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ endógeno (NKCC1).

6. Uso de Tiazidas

La afinidad para los diuréticos tipo tiazida fue medida mediante la exposición de grupos de ovocitos inyectados con el ARNc del $\text{eNCC}\beta$ en presencia de diversas tiazidas (metolazona, bendroflumetiazida, hidroclorotiazida, triclorometizida y clortalidona), también se realizó una curva dosis-respuesta en un rango de concentraciones de 10^{-9} a 10^{-4} M de metolazona, estos fármacos se adicionaron en las soluciones de pre-captación y captación. Al término de la etapa de captación cada ovocito fue colocado por separado en un vial, se adicionó SDS al 10% para lisarlos y líquido de β -centelleo para después ser medido. En todos los experimentos se utilizaron ovocitos inyectados con el RNAc de otros NCCs (rata, lenguado de invierno, humano) como control.

	ND96*	Isetionato de Na ⁺	Captación -K ⁺
[Na ⁺]mM	96.0	96.0	40.0
[K ⁺] mM	2.0	2.0	
[NMDG ⁺] mM			56.0
[Ca ⁺²] mM	1.8	1.8	1.8
[Mg ⁺²] mM	1.0	1.0	1.0
[Cl ⁻] mM	103.6		101.6
[Gluconato ⁻] mM		7.6	
[Isetionato ⁻] mM		96.0	
[HEPES] mM	5.0	5.0	5.0
Osmolaridad (mOsmol)	209.4	209.4	205.4
pH final	7.4	7.4	7.4

Tabla 4. Tabla con el contenido de cada solución empleada durante los experimentos de captación de isótopos radiactivos.

7. Mutagénesis puntual

Se realizaron mutaciones puntuales empleando un estuche comercial Stratagene, que utiliza una DNA polimerasa PFU turbo. El cambio de aminoácidos se realizó en las secuencias del cotransportador de NaCl de la anguila europea y rata. Como resultado del primer alineamiento se realizaron en la secuencia de eNCC β las siguientes mutaciones: metionina por lisina en la posición 333 (M333K) e histidina por lisina en la posición 586 (H586K). También se realizaron los cambios correspondientes en la secuencia del NCC de rata: K313M y K565H.

Realizamos un segundo alineamiento con la secuencia primaria de la isoforma β NCC de anguila japonesa (jNCC β) generamos las mutantes en el eNCC β que corresponden al aminoácido presente en la secuencia del jNCC β . De esta forma, los cambios realizados fueron serina 194 por fenilalanina (S194F), cisteína 379 por serina (C379S) y alanina 482 por glicina (A482G). Estas mutaciones se hicieron por separado y en combinación de dos sitios (S194F/C379S y C379S/A483G) y una mutante que incluyó los tres sitios.

La reacción en cadena de la polimerasa empleada para llevar a cabo las mutaciones se realizó bajo las condiciones indicadas en la tabla 5, usando los oligonucleótidos concentrados en la tabla 6.

CONDICIONES			
Segmento	Ciclos	Temperatura	Tiempo
A	1	95°C	30 seg.
B	16	95°C	30 seg.
		55°C	1 min.
		68°C	7 min.

Tabla 5. Condiciones usadas durante la reacción en cadena para realizar las mutaciones relacionadas a la afinidad por tiazidas en el eNCC β y el rNCC.

MUTACIONES EN EL NCC	
eNCC β M333K	5'- CTTTCGTCGGTCCCGAAGAAG -3'
	5'- CTTCTTCGGAACCGGACGAAG -3'
eNCC β H586K	5'- CATGATGTCATTTACCTGACGCGAC -3'
	5'- GTCGCGTCAGGTAATGACATCATG -3'
rNN K313M	5'- CAAAGCCTCCATGGGTTTCTACAG -3'
	5'- GTGTAGAAACCCATGGAGGCTTTG -3'
rNCC K565H	5'- GATACTACAGCCACTGGGCGGCGC -3'
	5'- GCGCCGCCAGTGGCTGTAGTATC -3'
eNCC β S194F	5'- CACTTGGGTCATCATCTTCATGTCTGTCATCGTC -3'
	5'- GACGATGACAGACATGAAGATGATGACCCAAGTG.-3'
eNCC β S359C	5'-GCAGGGGCCAACATCTGTGGGGACCTCAAGGAC-3'
	5'-GTCCTTGAGGTCCCCACAGATGTTGGCCCCTGC-3'
eNCC β G461A	5'- CACAGCCGGCATCTTTGCGGCCACCCTGTCCTCG -3'
	5'- CGAGGACAGGGTGGCCGCAAAGATGCCGGCTGTG -3'

Tabla 6. Tabla con los oligonucleótidos iniciadores diseñados para realizar las mutaciones relacionadas a la afinidad por tiazidas en el eNCC β y el rNCC.

8. Análisis de datos

Todos los resultados se basaron en un mínimo de 10 experimentos diferentes, cada uno realizado con al menos 20 ovocitos en cada grupo. Los resultados están presentados como el porcentaje de captación funcional de $^{22}\text{Na}^+ \pm$ Error Estándar, los datos fueron normalizados tomando como el 100% de la función la captación de $^{22}\text{Na}^+$ (pmol/ovocito/hora) del eNCC β , las mutantes se normalizaron con la captación correspondiente a la clona analizada. Todos los datos obtenidos fueron analizados con el programa Sigma Plot.

RESULTADOS

1. Clonación del NCC β de anguila europea

Mediante RT-PCR se clonó la isoforma NCC β de la anguila europea (*Anguilla anguilla*) a partir del DNAc preexistente en tejidos rectales de anguillas aclimatadas en agua salada¹⁶, mediante el uso de la DNA polimerasa-Pushion se insertó en el vector de expresión pGEMHE, entre los sitios de restricción *Sma*I y *Xba*I (figura 17A), lo cual fue posible debido a que los mismos sitios de restricción fueron generados en el DNAc del eNCC β (figura 17B), a partir de iniciadores sentido y antisentido específicos (Ver tabla 3 en metodología). El ADNc insertado en el vector fue secuenciado en su totalidad con la ayuda de 5 oligonucleótidos diseñados específicamente para este fin (figura 17C), al final de la secuenciación tuvimos la certeza de no contar con mutaciones no deseadas, el ADNc fue replicado en *E. coli*.

En la figura 17D observamos un gel de agarosa al 1% donde se puede apreciar el ADNc del eNCC β ligado al vector pGEMHE y linearizado con la enzima *Nhe*I, el cual corresponde al peso esperado de 6459 pb. Sintetizamos ARNc *in vitro* utilizando la enzima t7 ARN polimerasa en presencia del análogo CAP (Ambión) a partir del ADNc, el cual se linealizó en el extremo 3' con la enzima de restricción *Nhe*I. En la figura 17E observamos un gel desnaturizante de ARN donde mostramos la calidad del ARNc del eNCC β .

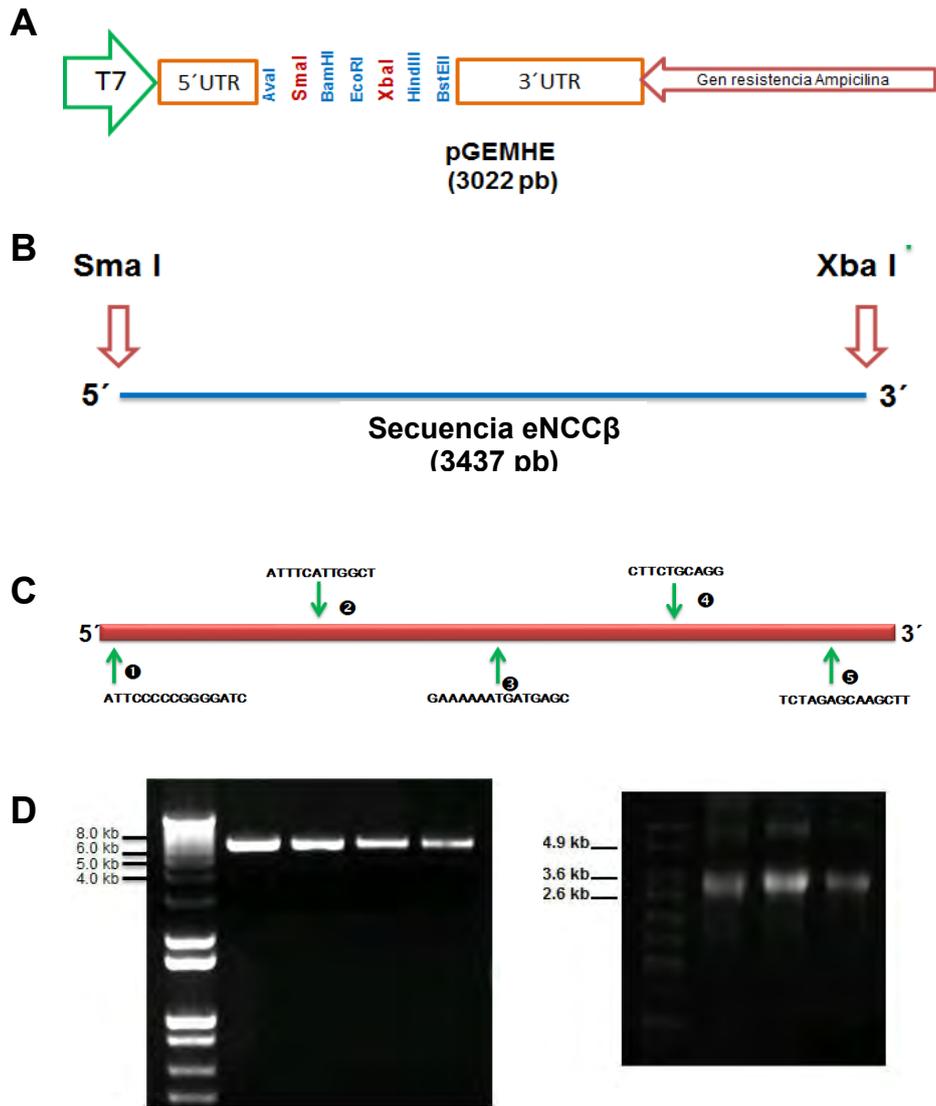


Figura 17. **A.** Esquema del vector de replicación pGEMHE. **B.** Esquema de la inserción de los sitios de restricción *Sma*I y *Xba*I en el 5' y 3' respectivamente. **C.** Esquema con los oligonucleótidos diseñados para la secuenciación total del vector pGEMHE con la secuencia de ADN del eNCC β de anguila europea. **D.** A la izquierda se observa un gel con muestras de ADNc del vector pGEMHE con la secuencia del eNCC β de anguila europea. A la derecha se presenta un gel con muestras de ARNc del eNCC β de anguila europea sintetizado de forma in vitro.

2. El eNCC β es un cotransportador de NaCl no sensible a tiazidas

En un primer experimento evaluamos la capacidad del eNCC β para transportar Na⁺, Cl⁻ e inhibición por tiazidas, mediante ensayos de captación del isótopo radiactivo ²²Na⁺ en ovocitos de *Xenopus laevis*. Inyectamos grupos de ovocitos

con ARNc del eNCC β y como control experimental se inyectaron ovocitos del NCC de humano (hNCC), la rata (rNCC) y el lenguado de invierno (fINCC).

En la figura 18 se muestra gráficamente el transporte de $^{22}\text{Na}^+$ (barras azules) medido mediante β -centelleo en ovocitos inyectados con los distintos ARNs. Todos los grupos estudiados mostraron una captación de $^{22}\text{Na}^+$ la cual fue significativamente mayor en comparación con los ovocitos inyectados con agua y que no expresan endógenamente al NCC (H_2O 189.4 ± 67.2 pmol/ovocito/hora vs hNCC $13,330.0 \pm 462.0$; rNCC $7,198.0 \pm 325.0$; fINCC $1,957.0 \pm 282.8$) Se agregó un siguiente grupo experimental de ovocitos inyectados con los distintos ARNs, los cuáles fueron expuestos a una solución libre de Cl^- , con la finalidad de observar el transporte dependiente de este ión, como se aprecia habitualmente en la función del NCC. En barras verdes se muestra como el transporte de $^{22}\text{Na}^+$ inducido por los ARNc de los distintos NCCs, disminuye considerablemente.

En este experimento también evaluamos el efecto del diurético tipo tiazida (metolazona) sobre los ovocitos inyectados con los distintos NCCs. En barras de color negro observamos que los ovocitos que fueron inyectados con el ARNc del eNCC β , el transporte no se inhibió con este compuesto ($9,373.0 \pm 689.9$ pmol/ovocito/hora vs $11,021.0 \pm 592.6$ pmol/ovocito/hora), contrario a lo que sucede en los ovocitos que fueron inyectados con el ARNc de otros NCCs (hNCC $13,330.0 \pm 462.0$ pmol/ovocito/hora vs 409.2 ± 149.3 pmol/ovocito/hora; rNCC $7,198.0 \pm 325.0$ pmol/ovocito/hora vs 665.7 ± 191.1 pmol/ovocito/hora; fINCC $1,957.0 \pm 282.8$ pmol/ovocito/hora vs 373.4 ± 95.9 pmol/ovocito/hora). Para asegurarnos del nulo efecto de este fármaco el experimento se repitió en múltiples ocasiones, la gráfica presentada corresponde al promedio de los datos

obtenidos de 5 experimentos diferentes, los cuales fueron normalizados de acuerdo con la captación basal de $^{22}\text{Na}^+$ de cada NCC.

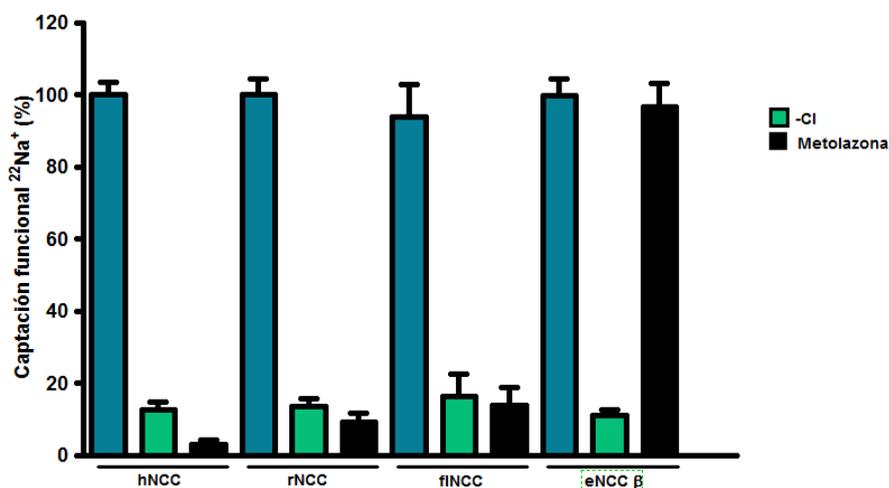


Figura 18. Expresión funcional del cotransportador de NaCl de anguila europea (eNCCβ) en ovocitos inyectados con ARNm del transportador. Como control experimental se muestra la expresión funcional del cotransportador en humanos (hNCC), rata (rNCC) y lengüado de invierno (fNCC). Para todos los casos se midió la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en soluciones con Na^+ y Cl^- , en ausencia de Cl^- y en presencia de metolazona en una concentración de 10^{-4} M.

3. Perfil de inhibición de tiazidas sobre el eNCCβ

Debido a que no observamos un efecto inhibitorio sobre la función del eNCCβ al emplear metolazona, se realizó un siguiente experimento que se muestra en la figura 19 para descartar que las observaciones previas no fueran consecuencia específica del compuesto empleado. Se utilizaron grupos de ovocitos inyectados con el ARNc del eNCCβ, los cuales fueron expuestos a una concentración de 10^{-4} M de diferentes tiazidas: metolazona (MTZ), bendroflumetiazida (BFTZ), triclorotiazida (TCTZ), hidroclorotiazida (HCTZ) y clortalidona (CTD). Como puede observarse en la gráfica ningún compuesto tiazida tuvo efecto sobre la función del eNCCβ (3307.0 ± 261.0 pmol/ovocito/hora vs MTZ 3065 ± 119.7 pmol/ovocito/hora, BFTZ 2880.0 ± 257.7 pmol/ovocito/hora, TCTZ $2834.0 \pm$

308.1 pmol/ovocito/hora, HCTZ 3390.0 ± 216.9 pmol/ovocito/hora, CTD 3243.0 ± 319.7 pmol/ovocito/hora), contrario a lo que se observa en los ovocitos inyectados con el ARNc del fINCC, usado como control experimental en donde se aprecia que con cualquiera de los diuréticos utilizados se disminuye al menos un 75% de la función del cotransportador.

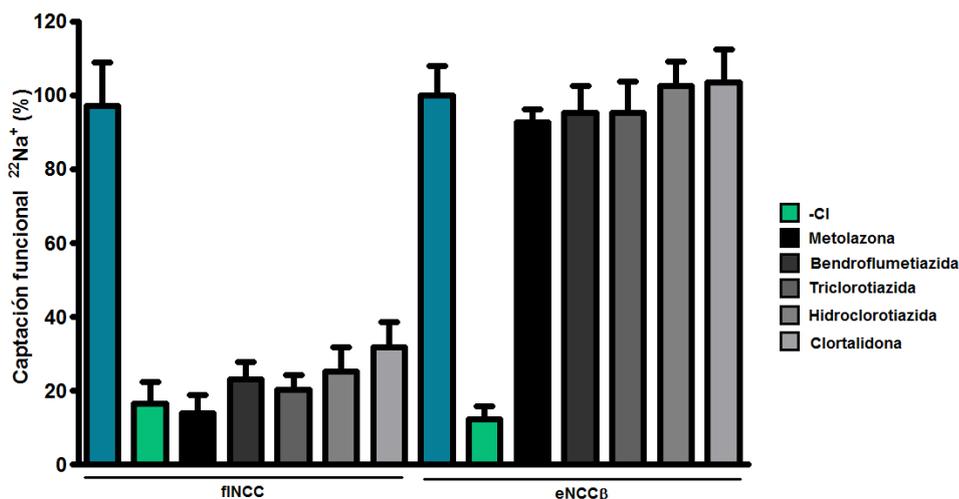


Figura 19. Expresión funcional del cotransportador de NaCl de anguila europea (eNCCβ) en ovocitos inyectados con ARNm del transportador expuesto a una concentración de 10^{-4} M de diferentes tipos de diuréticos tiazida. Como control experimental se muestra la expresión funcional del cotransportador del lenguado de invierno (fINCC) bajo las mismas condiciones. Se midió la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en soluciones con Na^+ y Cl^- , en ausencia de Cl^- .

4. Concentraciones diferentes de tiazida no afectan la función del eNCCβ

El experimento anterior mostró claramente que diferentes tiazidas no afectan la función del eNCCβ a una concentración de 10^{-4} M. Reportes previos ^{11,25,26,49-51} mostraron que esta concentración del fármaco es suficiente para abatir la función en otros NCCs, sin embargo fue necesario estudiar si diferentes concentraciones de compuestos tiazídicos afectan la función del eNCCβ.

En la figura 20 se puede observar el transporte de $^{22}\text{Na}^+$ en grupos de ovocitos inyectados con el ARNc de eNCC β y sometidos a un rango de concentraciones desde 10^{-9} hasta 10^{-4} M de metolazona. Simultáneamente fueron medidos ovocitos inyectados con el NCC de rata (rNCC).

Se observó claramente que la actividad del eNCC β se mantuvo en las diferentes concentraciones de metolazona (línea color rojo), mientras que los ovocitos que fueron inyectados con el ARNc del rNCC (línea color negro) la actividad disminuyó gradualmente inhibiéndose completamente a partir de una concentración de 10^{-5} M del diurético, datos previamente por Monroy y col.²⁴ Con estos resultados podemos concluir que el eNCC β es un cotransportador de Na-Cl no sensible a tiazidas aún en diferentes concentraciones del fármaco.

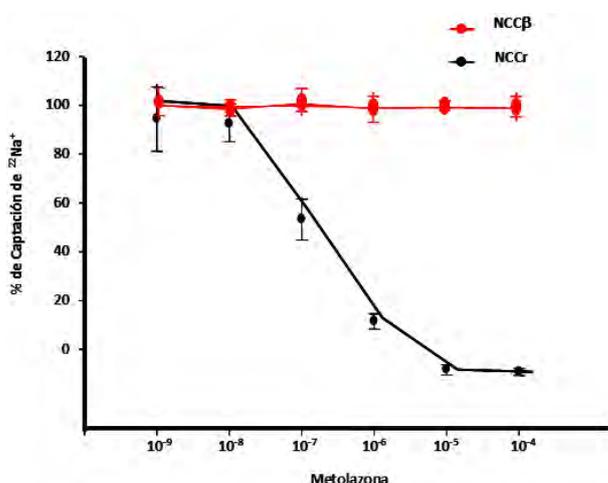


Figura 20. Efecto de diferentes concentraciones de metolazona en ovocitos inyectados con ARNm de cotransportador de NaCl de anguila europea (eNCC β) en color negro y rata (rNCC) en color rojo como control.

5. Probables sitios de unión a tiazida

Desde hace algunos años nuestro grupo ha estado interesado en identificar los residuos o dominios estructurales en el NCC responsables de determinar las propiedades funcionales del transportador, en este proyecto se tiene un interés especial en determinar los residuos que permiten que las tiazidas se unan al

transportador. Como hemos mostrado en los experimentos previos, el eNCC β es el único cotransportador de Na-Cl que ha mostrado resistencia a la inhibición por tiazidas, por lo que consideramos que constituye un buen modelo para poder identificar aminoácidos o motivos que permitan la unión del fármaco a su blanco.

Como estrategia metodológica realizamos un análisis de la secuencia de aminoácidos de la isoforma β del NCC de anguila europea (eNCC β) y lo comparamos con otras secuencias del NCC ya conocidas, humano (hNCC), rata (rNCC), ratón (mNCC), lenguado de invierno (flNCC), la isoforma α de la anguila europea (eNCC α) y las isoformas α y β de la anguila japonesa (jNCC α , jNCC β). El análisis se realizó usando el programa en línea Clustal ω que aplica métodos de alineamiento global para calcular los niveles de semejanza entre las diferentes secuencias.

En la figura 21 se muestra el resultado del alineamiento de las diferentes secuencias, se puede observar la predicción de las 12 regiones TM, de acuerdo con Gamba y col.¹¹ sombreadas en color gris. Debajo de las secuencias se encuentra diferentes símbolos: (*) representa un aminoácido conservado en la secuencia de todos los NCCs comparados, (:) representa residuos superpuestos con características estructurales y fisicoquímicas similares en las diferentes secuencias de NCC y por último (.) indica la superposición de un aminoácido, con características fisicoquímicas y estructurales diferentes.

Human NCC MAE-LPTETPGDADLCSGRFTISTLLSSDEPSPAADT-SSH-----PSHLTHSSSTPCMRFTGYNTIDVVVPEYHANSALQPEPRKRVPLADLHSE
Rat NCC MAE-LVTEPMFD-ALCSGRFTISTLLGGDEPFFA-ACD-NSQ-----PSHLTHGSLYLRFTGYNTIDVVVPEYHANSALQPEPRKRVPLADLHSE
Mouse NCC MAE-LVTEPMFD-ALCSGRFTISTLLGGDEPFFA-ACD-NSQ-----PSHLTHGSLYLRFTGYNTIDVVVPEYHANSALQPEPRKRVPLADLHSE
Rabbit NCC MAE-LPASETPDPPALCSGRFTISTLLVGDDEPSPAADT-GSH-----ASHVTLGSLYMRFTGYNTIDVVVPEYHANSALQPEPRKRVPLADLHSE
Flounder NCC -----MELPGDGHVLAISGFRAPQLAVNGRPAFGUIGL-GS-----GYTQCRDGGSSVASRGSADFTGYDTPVAPHTDFFVANTVYVGRNRRKRVPSLQLSVSD
A. anguilla cNCC -----MADVPPHITVMTSFKNK-----LVVPAAGSD-ESYARY-----SDQDTYHNSNGEANSQSAPPSGYDTLDEAPNTDFYANTVYVGRNRRKRVPSLQLSVSD
A. anguilla cNCC MQQRISSPFWPA-----GQDGRFVSVEZEPFYSCHNHGDORTLNNNLSNNTDGPVLTVMYMEZASDGVSERQDSRRRTLYSTIDAVFTLDTTMTAGRNRRSPLSLTLRNV
A. japonica cNCC -----LKVPPAGSD-ESYARY-----LYNN-----SDQDTYHNSNGEANSQSAPPSGYDTLDEAPNTDFYANTVYVGRNRRKRVPSLQLSVSD
A. japonica cNCC MQQRISSPFWPA-----GQDGRFVSVEZEPFYSCHNHGDORTLNNNLSNNTDGPVLTVMYMEZASDGVSERQDSRRRTLYSTIDAVFTLDTTMTAGRNRRSPLSLTLRNV

Human NCC LKQGRHLHALAFDPSRSHMHTDGLVEGRAGTSSEKMPPEPVRFQWGVNWRMCLNINWVLIYLRPLWITAGQIGLTVWIIILLSVSVTSITGLSISAISTNGKVKSGGTYFLISRSLG
Rat NCC LKQGRHLHALAFDPSRSHMHTDGLVEDEGTANSKSPGEPVRFQWGVNWRMCLNINWVLIYLRPLWITAGQIGLTVWIIILLSVSVTSITGLSISAISTNGKVKSGGTYFLISRSLG
Mouse NCC LKQGRHLHALAFDPSRSHMHTDGLVEDEGTANSKSPGEPVRFQWGVNWRMCLNINWVLIYLRPLWITAGQIGLTVWIIILLSVSVTSITGLSISAISTNGKVKSGGTYFLISRSLG
Rabbit NCC LKQGRHLHALAFDPSRSHMHTDGLVEDEAGAGGE-KPGEVRFQWGVNWRMCLNINWVLIYLRPLWITAGQIGLTVWIIILLSVSVTSITGLSISAISTNGKVKSGGTYFLISRSLG
Flounder NCC PEQDFKPFMTRETAQRMGOGDSE-EEERREHPTPEPPRFQWGVNWRMCLNINWVLIYLRPLWITAGQIGLTVWIIILLSVSVTSITGLSISAISTNGKVKSGGTYFLISRSLG
A. anguilla cNCC LEEDSSPFLTRFNKRAAAGGNGED-SSDEDEGMEPEVEPTFPQWGVNWRMCLNINWVLIYLRPLWITAGQIGLTVWIIILLSVSVTSITGLSISAISTNGKVKSGGTYFLISRSLG
A. anguilla cNCC MDDGETOSSMEDLGDGDT--GNGEQHSHNHRSSQNSQVRFQWGVNWRMCLNINWVLIYLRPLWITAGQIGLTVWIIILLSVSVTSITGLSISAISTNGKVKSGGTYFLISRSLG
A. japonica cNCC LEEDSSPFLTRFNKRAAAGGNGED-SSDEDEGMEPEVEPTFPQWGVNWRMCLNINWVLIYLRPLWITAGQIGLTVWIIILLSVSVTSITGLSISAISTNGKVKSGGTYFLISRSLG
A. japonica cNCC MDDGETOSSMEDLGDGDT--GNGEQHSHNHRSSQNSQVRFQWGVNWRMCLNINWVLIYLRPLWITAGQIGLTVWIIILLSVSVTSITGLSISAISTNGKVKSGGTYFLISRSLG

Human NCC PELGSGTGLIFAFANAVAVAMHTVGFARTVTRDLQEQGAPVINDIRIIGVTVTVLLAISLAGOWESKAQVFFLVIMVSPFANLVGTLIPASDKASKGPFYSYHGDIFVQNLVVD
Rat NCC PELGSGTGLIFAFANAVAVAMHTVGFARTVTRDLQEQGAPVINDIRIIGVTVTVLLAISLAGOWESKAQVFFLVIMVSPFANLVGTLIPASDKASKGPFYSYHGDIFVQNLVVD
Mouse NCC PELGSGTGLIFAFANAVAVAMHTVGFARTVTRDLQEQGAPVINDIRIIGVTVTVLLAISLAGOWESKAQVFFLVIMVSPFANLVGTLIPASDKASKGPFYSYHGDIFVQNLVVD
Rabbit NCC PELGSGTGLIFAFANAVAVAMHTVGFARTVTRDLQEQGAPVINDIRIIGVTVTVLLAISLAGOWESKAQVFFLVIMVSPFANLVGTLIPASDKASKGPFYSYHGDIFVQNLVVD
Flounder NCC PELGSGTGLIFAFANAVAVAMHTVGFARTVTRDLQEQGAPVINDIRIIGVTVTVLLAISLAGOWESKAQVFFLVIMVSPFANLVGTLIPASDKASKGPFYSYHGDIFVQNLVVD
A. anguilla cNCC PELGSGTGLIFAFANAVAVAMHTVGFARTVTRDLQEQGAPVINDIRIIGVTVTVLLAISLAGOWESKAQVFFLVIMVSPFANLVGTLIPASDKASKGPFYSYHGDIFVQNLVVD
A. anguilla cNCC PELGSGTGLIFAFANAVAVAMHTVGFARTVTRDLQEQGAPVINDIRIIGVTVTVLLAISLAGOWESKAQVFFLVIMVSPFANLVGTLIPASDKASKGPFYSYHGDIFVQNLVVD
A. japonica cNCC PELGSGTGLIFAFANAVAVAMHTVGFARTVTRDLQEQGAPVINDIRIIGVTVTVLLAISLAGOWESKAQVFFLVIMVSPFANLVGTLIPASDKASKGPFYSYHGDIFVQNLVVD
A. japonica cNCC PELGSGTGLIFAFANAVAVAMHTVGFARTVTRDLQEQGAPVINDIRIIGVTVTVLLAISLAGOWESKAQVFFLVIMVSPFANLVGTLIPASDKASKGPFYSYHGDIFVQNLVVD

Human NCC WRGPDGTFPMPSPFPFSAATGLLAGANISODLKPVAIPKGTMLAIPWTTISYLAISATIGSCVVRDASGVNDTVTP--GWAGCGLACSGWNPTECTQHSRYGLINYYQMSMV
Rat NCC WRGPDGTFPMPSPFPFSAATGLLAGANISODLKPVAIPKGTMLAIPWTTISYLAISATIGSCVVRDASGVNDTVTP--GWAGCGLACSGWNPTECTQHSRYGLINYYQMSMV
Mouse NCC WRGPDGTFPMPSPFPFSAATGLLAGANISODLKPVAIPKGTMLAIPWTTISYLAISATIGSCVVRDASGVNDTVTP--GWAGCGLACSGWNPTECTQHSRYGLINYYQMSMV
Rabbit NCC WRGPDGTFPMPSPFPFSAATGLLAGANISODLKPVAIPKGTMLAIPWTTISYLAISATIGSCVVRDASGVNDTVTP--GWAGCGLACSGWNPTECTQHSRYGLINYYQMSMV
Flounder NCC WRGPDGTFPMPSPFPFSAATGLLAGANISODLKPVAIPKGTMLAIPWTTISYLAISATIGSCVVRDASGVNDTVTP--GWAGCGLACSGWNPTECTQHSRYGLINYYQMSMV
A. anguilla cNCC WRGPDGTFPMPSPFPFSAATGLLAGANISODLKPVAIPKGTMLAIPWTTISYLAISATIGSCVVRDASGVNDTVTP--GWAGCGLACSGWNPTECTQHSRYGLINYYQMSMV
A. anguilla cNCC WRGPDGTFPMPSPFPFSAATGLLAGANISODLKPVAIPKGTMLAIPWTTISYLAISATIGSCVVRDASGVNDTVTP--GWAGCGLACSGWNPTECTQHSRYGLINYYQMSMV
A. japonica cNCC WRGPDGTFPMPSPFPFSAATGLLAGANISODLKPVAIPKGTMLAIPWTTISYLAISATIGSCVVRDASGVNDTVTP--GWAGCGLACSGWNPTECTQHSRYGLINYYQMSMV
A. japonica cNCC WRGPDGTFPMPSPFPFSAATGLLAGANISODLKPVAIPKGTMLAIPWTTISYLAISATIGSCVVRDASGVNDTVTP--GWAGCGLACSGWNPTECTQHSRYGLINYYQMSMV

Human NCC SGFAPLITVVIIGATLSSALACLVSAAKVFQCLCEDQLYLIIGFQKQYQKNEPVRVYLLAYATAVAFIILAEIAPITISWFFLQSTALINFSOPHASITNSPOWRPSPFYTKWAA
Rat NCC SGFAPLITVVIIGATLSSALACLVSAAKVFQCLCEDQLYLIIGFQKQYQKNEPVRVYLLAYATAVAFIILAEIAPITISWFFLQSTALINFSOPHASITNSPOWRPSPFYTKWAA
Mouse NCC SGFAPLITVVIIGATLSSALACLVSAAKVFQCLCEDQLYLIIGFQKQYQKNEPVRVYLLAYATAVAFIILAEIAPITISWFFLQSTALINFSOPHASITNSPOWRPSPFYTKWAA
Rabbit NCC SGFAPLITVVIIGATLSSALACLVSAAKVFQCLCEDQLYLIIGFQKQYQKNEPVRVYLLAYATAVAFIILAEIAPITISWFFLQSTALINFSOPHASITNSPOWRPSPFYTKWAA
Flounder NCC SGFAPLITVVIIGATLSSALACLVSAAKVFQCLCEDQLYLIIGFQKQYQKNEPVRVYLLAYATAVAFIILAEIAPITISWFFLQSTALINFSOPHASITNSPOWRPSPFYTKWAA
A. anguilla cNCC SGFAPLITVVIIGATLSSALACLVSAAKVFQCLCEDQLYLIIGFQKQYQKNEPVRVYLLAYATAVAFIILAEIAPITISWFFLQSTALINFSOPHASITNSPOWRPSPFYTKWAA
A. anguilla cNCC SGFAPLITVVIIGATLSSALACLVSAAKVFQCLCEDQLYLIIGFQKQYQKNEPVRVYLLAYATAVAFIILAEIAPITISWFFLQSTALINFSOPHASITNSPOWRPSPFYTKWAA
A. japonica cNCC SGFAPLITVVIIGATLSSALACLVSAAKVFQCLCEDQLYLIIGFQKQYQKNEPVRVYLLAYATAVAFIILAEIAPITISWFFLQSTALINFSOPHASITNSPOWRPSPFYTKWAA
A. japonica cNCC SGFAPLITVVIIGATLSSALACLVSAAKVFQCLCEDQLYLIIGFQKQYQKNEPVRVYLLAYATAVAFIILAEIAPITISWFFLQSTALINFSOPHASITNSPOWRPSPFYTKWAA

Human NCC LFGAIVSVVIMFLTWAAALIAIGVFLPLLYYIKKPEVNWSSVQAGSYNLAISYVGLNEVEDHIKNRPPQCLVLTGPPNFRPALVDFVFGVTPTRNLSLMI CGHVLIGP-HKQMPFEL
Rat NCC LFGAIVSVVIMFLTWAAALIAIGVFLPLLYYIKKPEVNWSSVQAGSYNLAISYVGLNEVEDHIKNRPPQCLVLTGPPNFRPALVDFVFGVTPTRNLSLMI CGHVLIGP-HKQMPFEL
Mouse NCC LFGAIVSVVIMFLTWAAALIAIGVFLPLLYYIKKPEVNWSSVQAGSYNLAISYVGLNEVEDHIKNRPPQCLVLTGPPNFRPALVDFVFGVTPTRNLSLMI CGHVLIGP-HKQMPFEL
Rabbit NCC LFGAIVSVVIMFLTWAAALIAIGVFLPLLYYIKKPEVNWSSVQAGSYNLAISYVGLNEVEDHIKNRPPQCLVLTGPPNFRPALVDFVFGVTPTRNLSLMI CGHVLIGP-HKQMPFEL
Flounder NCC LFGAIVSVVIMFLTWAAALIAIGVFLPLLYYIKKPEVNWSSVQAGSYNLAISYVGLNEVEDHIKNRPPQCLVLTGPPNFRPALVDFVFGVTPTRNLSLMI CGHVLIGP-HKQMPFEL
A. anguilla cNCC LFGAIVSVVIMFLTWAAALIAIGVFLPLLYYIKKPEVNWSSVQAGSYNLAISYVGLNEVEDHIKNRPPQCLVLTGPPNFRPALVDFVFGVTPTRNLSLMI CGHVLIGP-HKQMPFEL
A. anguilla cNCC LFGAIVSVVIMFLTWAAALIAIGVFLPLLYYIKKPEVNWSSVQAGSYNLAISYVGLNEVEDHIKNRPPQCLVLTGPPNFRPALVDFVFGVTPTRNLSLMI CGHVLIGP-HKQMPFEL
A. japonica cNCC LFGAIVSVVIMFLTWAAALIAIGVFLPLLYYIKKPEVNWSSVQAGSYNLAISYVGLNEVEDHIKNRPPQCLVLTGPPNFRPALVDFVFGVTPTRNLSLMI CGHVLIGP-HKQMPFEL
A. japonica cNCC LFGAIVSVVIMFLTWAAALIAIGVFLPLLYYIKKPEVNWSSVQAGSYNLAISYVGLNEVEDHIKNRPPQCLVLTGPPNFRPALVDFVFGVTPTRNLSLMI CGHVLIGP-HKQMPFEL

Human NCC QLANTHTKWNKRRIKAFYSVDAIEDLRSGVQILMQAGSGLRMPKPILVVQFKNNWQSAHPATVEDYIGLHDAFDPNYGVVMMRREGOLNVSXMMQAHINVPDPAEDGKRAEA---
Rat NCC RLASGHTKWNKRRIKAFYSVDAIEDLRSGVQILMQAGSGLRMPKPILVVQFKNNWQSAHPATVEDYIGLHDAFDPNYGVVMMRREGOLNVSXMMQAHINVPDPAEDGKRAEA---
Mouse NCC RLASGHTKWNKRRIKAFYSVDAIEDLRSGVQILMQAGSGLRMPKPILVVQFKNNWQSAHPATVEDYIGLHDAFDPNYGVVMMRREGOLNVSXMMQAHINVPDPAEDGKRAEA---
Rabbit NCC RLASGHTKWNKRRIKAFYSVDAIEDLRSGVQILMQAGSGLRMPKPILVVQFKNNWQSAHPATVEDYIGLHDAFDPNYGVVMMRREGOLNVSXMMQAHINVPDPAEDGKRAEA---
Flounder NCC -----SRHVTWLRQKRVRSYFRVYVADLRSGVQILMQAGSGLRMPKPILVVQFKNNWQSAHPATVEDYIGLHDAFDPNYGVVMMRREGOLNVSXMMQAHINVPDPAEDGKRAEA---
A. anguilla cNCC SAGSSVHVAWLNKRHVRSYFRVYVADLRSGVQILMQAGSGLRMPKPILVVQFKNNWQSAHPATVEDYIGLHDAFDPNYGVVMMRREGOLNVSXMMQAHINVPDPAEDGKRAEA---
A. anguilla cNCC SAGSSVHVAWLNKRHVRSYFRVYVADLRSGVQILMQAGSGLRMPKPILVVQFKNNWQSAHPATVEDYIGLHDAFDPNYGVVMMRREGOLNVSXMMQAHINVPDPAEDGKRAEA---
A. japonica cNCC SAGSSVHVAWLNKRHVRSYFRVYVADLRSGVQILMQAGSGLRMPKPILVVQFKNNWQSAHPATVEDYIGLHDAFDPNYGVVMMRREGOLNVSXMMQAHINVPDPAEDGKRAEA---
A. japonica cNCC SAGSSVHVAWLNKRHVRSYFRVYVADLRSGVQILMQAGSGLRMPKPILVVQFKNNWQSAHPATVEDYIGLHDAFDPNYGVVMMRREGOLNVSXMMQAHINVPDPAEDGKRAEA---

Human NCC -----RVDKALVKEEQATTIFQSQKQKTIIDYWLFDGGLTLLIYLLHRRKRWSCK-----RVDKALVKEEQATTIFQSQKQKTIIDYWLFDGGLTLLIYLLHRRKRWSCK
Rat NCC -----RVDKALVKEEQATTIFQSQKQKTIIDYWLFDGGLTLLIYLLHRRKRWSCK-----RVDKALVKEEQATTIFQSQKQKTIIDYWLFDGGLTLLIYLLHRRKRWSCK
Mouse NCC -----RVDKALVKEEQATTIFQSQKQKTIIDYWLFDGGLTLLIYLLHRRKRWSCK-----RVDKALVKEEQATTIFQSQKQKTIIDYWLFDGGLTLLIYLLHRRKRWSCK
Rabbit NCC -----RVDKALVKEEQATTIFQSQKQKTIIDYWLFDGGLTLLIYLLHRRKRWSCK-----RVDKALVKEEQATTIFQSQKQKTIIDYWLFDGGLTLLIYLLHRRKRWSCK
Flounder NCC VQ-TSVTSVSMDDPPQSSVFKKQKQKTIIDYWLFDGGLTLLIYLLHRRKRWSCKVQ-TSVTSVSMDDPPQSSVFKKQKQKTIIDYWLFDGGLTLLIYLLHRRKRWSCK
A. anguilla cNCC LFNANAIDLPDAAVAPQSTGFSKQKQKTIIDYWLFDGGLTLLIYLLHRRKRWSCKLFNANAIDLPDAAVAPQSTGFSKQKQKTIIDYWLFDGGLTLLIYLLHRRKRWSCK
A. anguilla cNCC NS--EDRNGDVGTVQIRTVFQKQKQKTIIDYWLFDGGLTLLIYLLHRRKRWSCKNS--EDRNGDVGTVQIRTVFQKQKQKTIIDYWLFDGGLTLLIYLLHRRKRWSCK
A. japonica cNCC LFNANAIDLPDAAVAPQSTGFSKQKQKTIIDYWLFDGGLTLLIYLLHRRKRWSCKLFNANAIDLPDAAVAPQSTGFSKQKQKTIIDYWLFDGGLTLLIYLLHRRKRWSCK
A. japonica cNCC NS--EDRNGDVGTVQIRTVFQKQKQKTIIDYWLFDGGLTLLIYLLHRRKRWSCKNS--EDRNGDVGTVQIRTVFQKQKQKTIIDYWLFDGGLTLLIYLLHRRKRWSCK

Human NCC NDGFADL--ATVNMRRDCPWKISDEEITKRNKRSRQVRLNEIVDYSRDAALIVITLPIGRKGCPSLYMAMLETLSQDLRPPVILIRGNQENVLFTFYCO
Rat NCC NDGFADL--ATVNMRRDCPWKISDEEITKRNKRSRQVRLNEIVDYSRDAALIVITLPIGRKGCPSLYMAMLETLSQDLRPPVILIRGNQENVLFTFYCO
Mouse NCC NDGFADL--ATVNMRRDCPWKISDEEITKRNKRSRQVRLNEIVDYSRDAALIVITLPIGRKGCPSLYMAMLETLSQDLRPPVILIRGNQENVLFTFYCO
Rabbit NCC NDGFADL--ATVNMRRDCPWKISDEEITKRNKRSRQVRLNEIVDYSRDAALIVITLPIGRKGCPSLYMAMLETLSQDLRPPVILIRGNQENVLFTFYCO
Flounder NCC ETPNFQDSDSPQQQQQEPFMMITEQDLERNKRSRQVRLNEIVDYSRDAALIVITLPIGRKGCPSLYMAMLETLSQDLRPPVILIRGNQENVLFTFYCO
A. anguilla cNCC NDQKRD--SSAVLQKRDPCWVSDKDLRALRKRKRVRLNEIVDYSRDAALIVITLPIGRKGCPSLYMAMLETLSQDLRPPVILIRGNQENVLFTFYCO
A. anguilla cNCC REGLNHE--AVLQKRDPCWVSDKDLRALRKRKRVRLNEIVDYSRDAALIVITLPIGRKGCPSLYMAMLETLSQDLRPPVILIRGNQENVLFTFYCO
A. japonica cNCC REGLNHE--AVLQKRDPCWVSDKDLRALRKRKRVRLNEIVDYSRDAALIVITLPIGRKGCPSLYMAMLETLSQDLRPPVILIRGNQENVLFTFYCO
A. japonica cNCC REGLNHE--AVLQKRDPCWVSDKDLRALRKRKRVRLNEIVDYSRDAALIVITLPIGRKGCPSLYMAMLETLSQDLRPPVILIRGNQENVLFTFYCO

Figura 21. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del cotransportador de Na-Cl que muestra la comparación entre el NCCβ obtenido de anguila europea (*A. anguilla*, No. de acceso AJ564604) y otros NCCs como el α (No. AJ564606) obtenido también de la anguila europea, humano (human, No. X91220), rata (rat, No. U10097) ratón (mouse, No. U611085), conejo (rabbit, No. AF028241), lenguado de invierno (flounder, No. L11615) y las isoformas α y β del NCC de anguila japonesa (*A. japonica* No. de acceso AB689705 y AB510742.1 respectivamente

Para determinar las propiedades inhibitorias del eNCC β hicimos énfasis en las regiones TM del cotransportador, ya que reportes anteriores señalan a los dominios TM 8-12 como responsables de permitir la unión a tiazidas a la proteína^{49,50}. En la tabla 1 se puede apreciar el porcentaje de identidad que existe al comparar las regiones TM y asas interconectoras. Se puede apreciar que existe un porcentaje de identidad mayor al 70% entre el eNCC β y NCC de otras especies

	Alfa	Humano	Rata	Ratón	Conejo	Lenguado
eNCCβ	71.61	73.40	72.77	72.77	74.47	71.61

Tabla 7. Tabla comparativa del porcentaje de identidad de aminoácidos presentes en las regiones TM, asas extra e intracelulares de eNCC β y NCC de otras especies.

Con base en el resultado del alineamiento mostrado en la figura 21 se buscaron residuos que pudieran explicar la diferente sensibilidad a diuréticos tiazida entre el eNCC β y los demás NCCs. El criterio empleado para identificar estos posibles sitios fue reconocer aminoácidos que estuvieran altamente conservados en la secuencia primaria de los NCCs de humano, rata, ratón, conejo y lenguado de invierno pero ausentes en la isoforma β del NCC de la anguila europea.

Como se puede ver en la figura 22, el resultado del análisis muestra 10 posibles residuos que cumplen con el criterio establecido anteriormente, 1 ubicado en el asa que conecta las regiones TM 5 y 6, 2 en la región TM 8, 2 en la TM9, 1 en la TM10, 2 en la TM11 y 1 en la TM12.

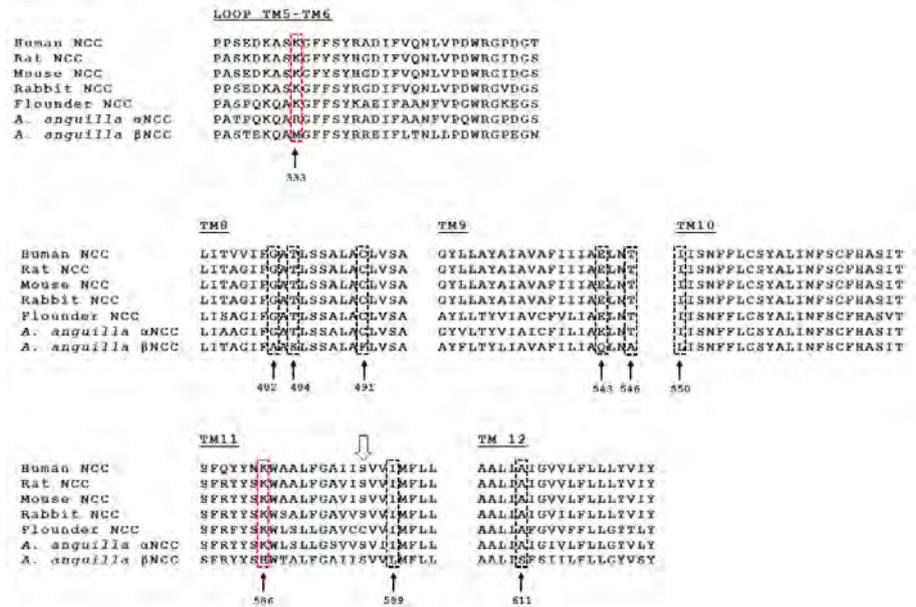


Figura 22. Alineamiento de la secuencia del NCC del asa conectora de las regiones TM5-6 y TM 8-12 de diferentes organismos. En recuadros se resaltan 10 aminoácidos altamente conservados en todas las especies excepto en el eNCCβ. De los sitios posibles, se encuentran marcadas en rojo las primeras dos mutaciones que se realizaron, se encuentran marcadas en rojo las primeras dos mutaciones que se realizaron. Con una flecha se señala al aminoácidos reportado por Castañeda y col.²⁸, responsable de la diferente afinidad entre mamíferos y lenguado de invierno.

Trabajos previos de nuestro grupo⁴⁹, mostraron mediante la construcción de proteínas quiméricas entre el rNCC y fNCC, que las regiones TM 8 a 12 del rNCC son las que confieren la sensibilidad a diuréticos tipo tiazida entre estas dos especies. Posteriormente Castañeda-Bueno²⁸ identificó un único residuo en la TM11 responsable de la diferencia de afinidad entre rNCC y fNCC.

Basados en las observaciones previas y las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos, decidimos comenzar a estudiar los residuos que estuvieran después de la región TM 8 y cumplieran con los requisitos mencionados anteriormente.

De acuerdo con la importancia de la región TM 11 en la sensibilidad a metolazona decidimos realizar una primera mutación en esta región TM en la secuencia del NCCβ, en donde sustituimos el aminoácido histidina 586 por lisina,

ya que este es el aminoácido presente en todas las secuencias del NCC (H586K).

Otro aminoácido que llamo nuestra atención fue la metionina 333 en la secuencia del NCC β localizada en el asa conectora entre la TM5 y la TM6, ya que el resto de los NCCs, esta posición es ocupada por una lisina que es un aminoácido con carga positiva, mientras la metionina posee un tioéter consideramos que esta mutación aunque no se encuentra dentro de las TM8-12 podría resultar en un cambio más significativo que el resto de los cambios que arrojó el análisis de alineación.

De esta forma, mediante PCR generamos las mutaciones H586K y M333K en la secuencia del eNCC β , el ADNc fue secuenciado en su totalidad con el propósito de corroborar la adecuada sustitución del aminoácido. Se sintetizó ARNc *in vitro* y se inyectaron grupos de ovocitos para estudiar la funcionalidad de las clonas generadas.

La figura 23 muestra los datos normalizados de captación de $^{22}\text{Na}^+$ en ovocitos inyectados con agua y con el ARNc del eNCC β silvestre y las mutantes eNCC β -H586K y eNCC β -M333K. Se puede apreciar que en los grupos eNCC β -H586K y eNCC β -M333K la captación de $^{22}\text{Na}^+$ es significativamente mayor en comparación con el grupo de ovocitos inyectados con agua utilizados como control (H_2O 783.3 ± 71.4 pmol/ovocito/hora vs eNCC β -M333K 8952 ± 992.5 pmol/ovocito/hora y eNCC β -H586K 9974.8 ± 903.1 pmol/ovocito/hora). Como era de esperarse la captación de $^{22}\text{Na}^+$ de estos dos grupos disminuyó en ausencia de cloruro extracelular. Sin embargo, la presencia del diurético hidroclorotiazida no afectó la captación funcional del eNCC β -H586K. Este experimento se realizó en múltiples ocasiones y por lo tanto, demostramos que

las mutaciones H586K y M333K en la secuencia de eNCC β no modifican la sensibilidad a diuréticos tipo tiazida.

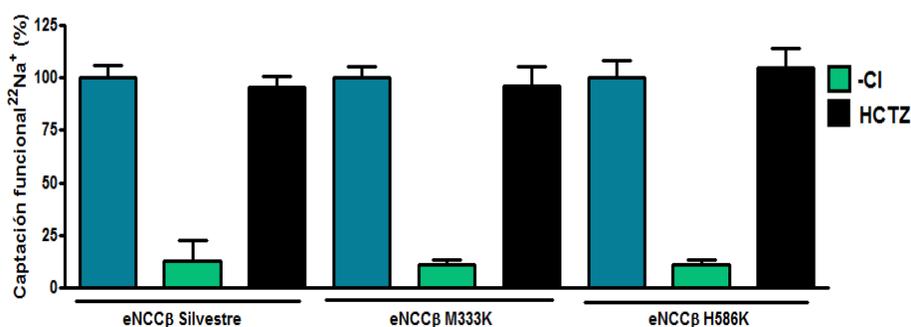


Figura 23. Porcentaje de función del eNCC β silvestre y las mutantes eNCC β -M333K y eNCC β -H586K, en ovocitos inyectados con su respectivo ARNm. Se midió la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en soluciones con Na^+ y Cl^- , en ausencia de Cl^- y adicionando 10^{-4}M de Hidroclorotiazida (HCTZ).

Simultáneamente realizamos estos dos cambios en la secuencia de NCCr. Mediante PCR generamos las mutaciones rNCC-K313M y rNCC-K565H, que corresponden a los aminoácidos estudiados en el experimento anterior, pero en este caso se cambió el aminoácido altamente conservado en todos los NCCs por el que se observa en la secuencia del eNCC β . El ADNc fue secuenciado en su totalidad con el propósito de corroborar la sustitución adecuada del aminoácido. Se sintetizó ARNc in vitro y se inyectaron grupos de ovocitos con agua y con el ARNc del rNCC-K313M y del rNCC-K565H.

En la figura 24 se muestra el porcentaje de captación de $^{22}\text{Na}^+$ en las diferentes clonas estudiadas, siendo significativamente mayor en el grupo de ovocitos del rNCC, rNCC-K313M y rNCC-K565H en comparación con ovocitos inyectados con agua (H_2O 638.5 ± 102.0 pmol/ovocito/hora vs rNCC silvestre 4973.0 ± 620.3 pmol/ovocito/hora, rNCC-K313M 2087 ± 164.8 pmol/ovocito/hora y rNCC-K565H 2194 ± 404.7 pmol/ovocito/hora). También se aprecia el transporte dependiente

del cloruro extracelular, ya que la usencia de este ión disminuye la captación. Sin embargo, tanto el transporte tanto del rNCC-K313M como del rNCC-K565H siguen siendo inhibidos con tiazida. Con estos experimentos demostramos que los aminoácidos altamente conservados en la secuencia del NCC de humano, rata, ratón, conejo y lenguado de invierno K313 y K565 no parecieran estar involucrados en la unión del fármaco a su proteína blanco.

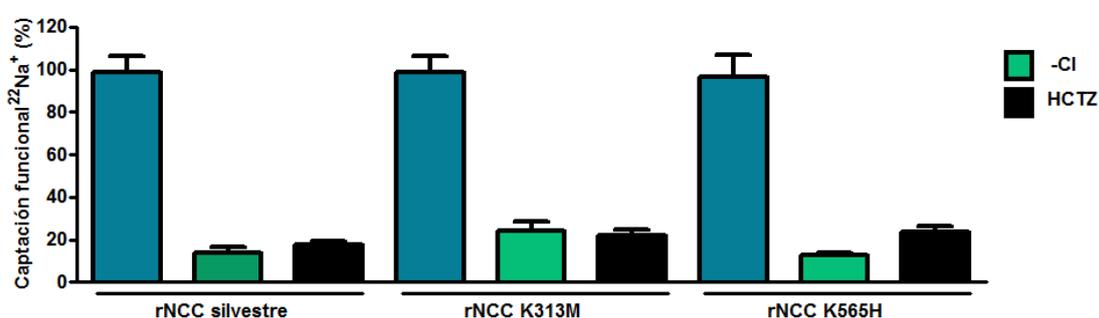


Figura 24. Porcentaje de captación de las mutantes rNCC-K313M y rNCC-K565H del cotransportador de NaCl de rata (NCCr) en ovocitos inyectados con su respectivo ARNm. Como control experimental se muestra la expresión funcional del cotransportador rNCC en su forma silvestre. Se midió la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en soluciones con Na^+ y Cl^- , en ausencia de Cl^- y adicionando 10^{-4}M de Hidroclorotiazida (HCTZ)

Al concluir estos experimentos y mientras generábamos la estrategia de los siguientes cambios de aminoácidos, revisamos detenidamente un trabajo publicado por Watanabe y col. ¹⁵ que muestra la clonación y caracterización molecular del NCC β de la anguila japonesa (*Anguilla japonica*). Ellos reportan la presencia de ARNm que corresponde a la isoforma β del cotransportador de Na-Cl expresado abundantemente en diferentes segmentos del tracto gastrointestinal, esófago, la parte posterior del intestino y recto.

De acuerdo con el alineamiento entre la secuencia del NCC β de la anguila japonesa (jNCC β) y la anguila europea (eNCC β), señalan que existe un 98% de identidad entre estos dos. En experimentos hechos en sacos intestinales

invertidos en las anguilas japonesas mostraron que al adicionar hidroclorotiazida en la solución interna del saco, existe una reducción significativa en el transporte de Na⁺ y Cl⁻ así como en la absorción de agua.

Estos resultados muestran que el transporte de Na-Cl en el intestino de la anguila japonesa y europea exhibe diferente sensibilidad a la hidroclorotiazida, a pesar de tener un alto grado de identidad en la secuencia de aminoácidos. Aprovechando estas observaciones realizamos un nuevo alineamiento de la secuencia de aminoácidos correspondiente a las 12 regiones TM del NCC de diferentes especies, esta vez se agregó la secuencia del NCCβ de la anguila japonesa.

En la tabla 7 se muestra el porcentaje de identidad que existe cuando se comparan las regiones TM, así como las asas extra e intracelulares del eNCCβ contra otros NCCs, incluido el jNCCβ. El resultado muestra que existe un porcentaje de identidad de 99.36% entre el NCCβ de la anguila europea y el NCCβ de la anguila japonesa.

	Beta anguila japonesa	Alfa anguila europea	Humano	Rata	Ratón	Conejo	Lenguado
NCCβ anguila europea	99.36	72.03	73.83	73.19	73.19	74.89	72.03

Tabla 8. Tabla comparativa del porcentaje de identidad de aminoácidos presentes en las regiones TM, asas extra e intracelulares del NCCβ de anguila europea y el NCC de otras especies.

En la figura 25 se puede observar con detalle que ésta mínima diferencia entre eNCCβ y jNCCβ, está dado por 3 aminoácidos presentes en la región TM2, TM6 y TM8. En la región TM2 del eNCCβ se encuentra una serina en la posición 194, mientras que en el jNCCβ está presente una fenilalanina. El siguiente cambio está en la región TM 6, en el eNCCβ existe en la posición 375 una cisteína,

mientras que en el jNCC β y el resto de los NCCs se encuentra una serina, lo que representa el cambio de un aminoácido altamente conservado. En circunstancias similares observamos un último cambio localizado en la región TM8, en este caso mientras que en la posición 482 de eNCC β está presente una alanina, en el resto de los NCCs se encuentra una glicina.

	TM 2	TM 6	TM 8
Human NCC	QAGIVLTWIIILLSVTVTSITGL	FFGMFSIFFPSATGILAGANIS	LITVVIFGATLSSALACLVSA
Rat NCC	QAGIVLTWLIILLSVMVTSITGL	FFGMFSIFFPSATGILAGANIS	LITAGIFGATLSSALACLVSA
Mouse NCC	QAGIVLTWLIILLSVMVTSITGL	FFGMFSIFFPSATGILAGANIS	LITAGIFGATLSSALACLVSA
Rabbit NCC	QAGIVLTWVIIILSVLVTSITGL	FFGMFSIFFPSATGILAGANIS	LITAGIFGATLSSALACLVSA
Flounder NCC	QAGIGLTWVIIILSSFITGITGL	FFGMFSIFFPSATGILAGANIS	LISAGIFGATLSSALACLVSA
<i>A. anguilla</i> α NCC	QAGIGLTWVIIILSSCITGITGL	FFGMFSIFFPSATGILAGANIS	LIAAGIFGATLSSALACLVSA
<i>A. anguilla</i> β NCC	QAGIILTWVIIILSMVIVTSITAL	FFQMFAIFFPSAIGILSGANIS	LITAGIFGATLSSALACLVSA
<i>A. japonica</i> α NCC	QAGIGLTWVIIILSSCITGITGL	FFGMFSIFFPSATGILAGANIS	LITAGIFGATLSSALACLVSA
<i>A. japonica</i> β NCC	QAGIILTWVIIILSMVIVTSITAL	FFQMFAIFFPSAIGILSGANIS	LITAGIFGATLSSALACLVSA

↑
↑
↑

194
379
482

Figura 25. Esquema que muestra 3 únicos aminoácidos diferentes entre el eNCC β y el jNCC β (serina 194 en TM2, cisteína 379 en TM 6 y alanina 482 en TM8) Nótese que el aminoácido diferente en eNCC β en otras secuencias del NCC es altamente conservado

Entonces mediante PCR generamos las mutantes en el eNCC β que corresponden al aminoácido presente en la secuencia del jNCC β . De esta forma, los cambios realizados fueron serina 194 por fenilalanina (S194F), cisteína 379 por serina (C379S) y alanina 482 por glicina (A482G). Para comprobar la correcta generación de las mutantes, el ADNc fue secuenciado en su totalidad y se sintetizó ARNc in vitro.

En la figura 26 se muestra la captación de $^{22}\text{Na}^+$ expresada en porcentaje de función en grupos de ovocitos inyectados con agua y el ARNc del eNCC β silvestre, eNCC β S194F, eNCC β C379S y eNCC β A482G. En todos los grupos se observa una captación significativa de $^{22}\text{Na}^+$ (barras azules) que es dependiente de la concentración de cloruro extracelular (barras verdes). Podemos observar una disminución aproximadamente del 30% en la función del

grupo de ovocitos inyectados en con el ARNc de la mutante S194F (14911.0 ± 868.4 pmol/ovocito/hora) ante la presencia de hidroclorotiazida (9750.0 ± 705.3 pmol/ovocito/hora). También observamos que en el grupo eNCC β -C379S (9498 ± 705.1 pmol/ovocito/hora) la presencia del diurético disminuyó aproximadamente el 45% de la función basal del eNCC β (5765.0 ± 616.6 pmol/ovocito/hora). Sin embargo, no se observaron diferencias en cuanto a la inhibición por tiazidas cuando se realizó la sustitución A482G (6063.0 ± 675.2 pmol/ovocito/hora vs 5014.0 ± 636.7 pmol/ovocito/hora). Como se puede apreciar la presencia del diurético afectó significativamente la función del eNCC β cuando se realizó el cambio C379S.

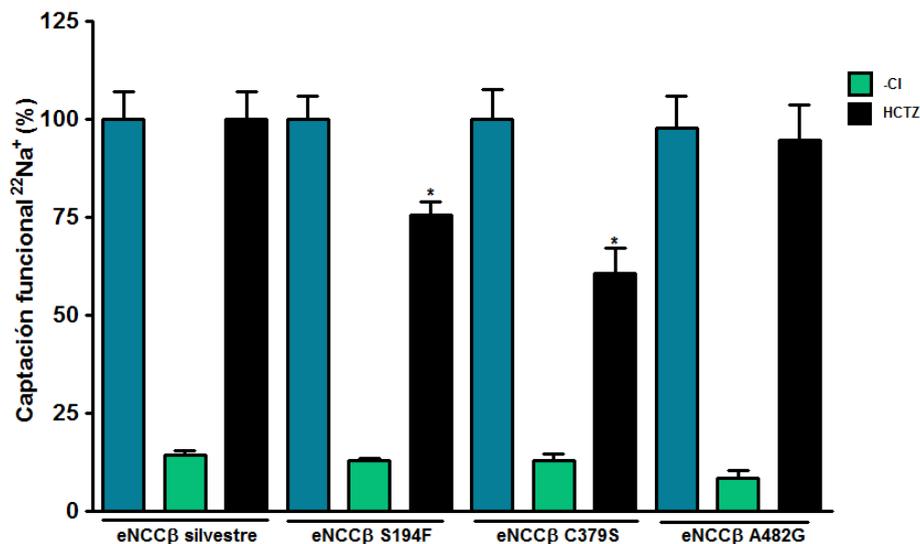


Figura 26. Porcentaje de función de las mutantes eNCC β -S194F, eNCC β -C379S y eNCC β -A482G en ovocitos inyectados con el ARNm correspondiente. Como control experimental se muestra el porcentaje de función del cotransportador eNCC β en su forma silvestre. Se midió la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en soluciones con Na^+ y Cl^- , en ausencia de Cl^- y adicionando 10^{-4}M de Hidroclorotiazida (HCTZ).
* $P < 0.05$ vs HCTZ eNCC β

Para evaluar que el cambio a serina fuera determinante para permitir la inhibición del cotransportador, realizamos una siguiente mutación en la que fue cambiado el aminoácido cisteína 379 por una alanina.

Como puede observarse en la figura 27 la inhibición por tiazidas no se vio afectada cuando se realizó el cambio que incluye el cambio de alanina en lugar de la serina 379 en la secuencia de eNCC β (5222 ± 423.6 pmol/ovocito/hora vs 5136 ± 427.2 pmol/ovocito/hora). En este experimento también observamos que la inhibición que induce la hidroclorotiazida (barras negras) sobre la mutante C379S no es exclusiva de este fármaco, ya que otro compuesto perteneciente al grupo de las tiazidas, la triclorometiazida, (barras grises) reproduce este efecto a una concentración de 10^{-4} M (9498.0 ± 705.1 pmol/ovocito/hora vs 5246.0 ± 543.0 pmol/ovocito/hora). Como era de esperarse, la triclorometiazida no afectó la actividad la función del transportador cuando se realizó el cambio C379A. De acuerdo con estos resultados podemos concluir que los aminoácidos S379 y F194 presentes en la secuencia de los NCCs pueden permitir o favorecer que los compuestos tiazida se unan al transportador.

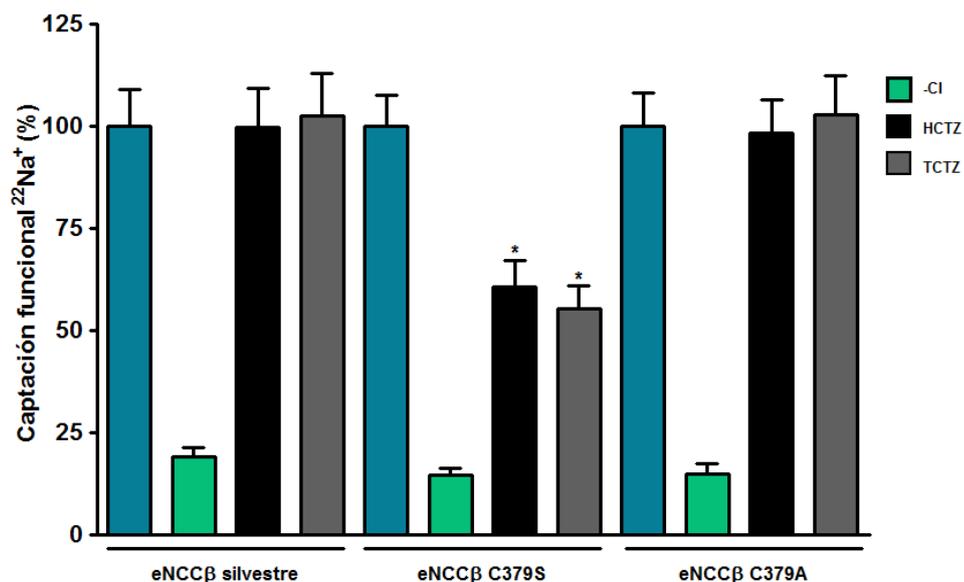


Figura 27. Captación de $^{22}\text{Na}^+$ expresada en porcentaje de las mutantes eNCC β -C379S y eNCC β -C379A en ovocitos inyectados con el ARNm correspondiente. Como control experimental se muestra la expresión funcional del cotransportador eNCC β en su forma silvestre. Se midió la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en soluciones con Na^+ y Cl^- , en ausencia de Cl^- y adicionando 10^{-4} M de Hidroclorotiazida (HCTZ) o Triclorotiazida (TCTZ). * $P < 0.05$ vs eNCC β -C379S y eNCC β -C379A.

También decidimos evaluar si el efecto inhibitorio observado en la S194F y la C379S se incrementaba al tener al eNCC β con las dos mutaciones. Mediante PCR generamos tres nuevas mutantes: una que incluía S194F/C379S, la segunda C379S/A482G y una triple mutante S194F/C379S/A482G. A pesar de que las tiazidas no tuvieron efecto sobre la mutante A482G como observamos en el experimento anterior, decidimos incluirla para evaluar el efecto de los tres cambios existen entre el jNCC β y el eNCC β . Mediante secuenciación automatizada comprobamos la correcta generación de las mutantes. Se sintetizó ARNc in vitro y se inyectaron grupos de ovocitos para medir la captación de $^{22}\text{Na}^+$ y el efecto de tiazidas.

En la figura 28 se muestra la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en grupos de ovocitos inyectados con agua y el ARNc del eNCC β S194F/C379S y eNCC β C379S/A482G, así como una mutante eNCC β S194F/C379S/A482G. En todos los grupos se observa una captación de $^{22}\text{Na}^+$ que es dependiente de la concentración de cloruro extracelular (barras verdes). Podemos observar una disminución significativa de la función del grupo de ovocitos inyectados en con el ARNc de las clonas estudiadas en presencia de hidroclorotiazida (eNCC β S194F/C379S 11919.0 ± 868.4 pmol/ovocito/hora vs 8757.0 ± 626.6 pmol/ovocito/hora; eNCC β C379S/A482G 6709 ± 679.4 pmol/ovocito/hora vs 5091 ± 646.7 pmol/ovocito/hora; eNCC β S194F/C379S/A482G con respecto al eNCC β (6383 ± 723.5 pmol/ovocito/hora vs 3799.0 ± 580.2 pmol/ovocito/hora). Sin embargo, observamos que el eNCC β con una doble o triple mutación no muestra una mayor inhibición por tiazidas al que observamos en las mutantes simples.

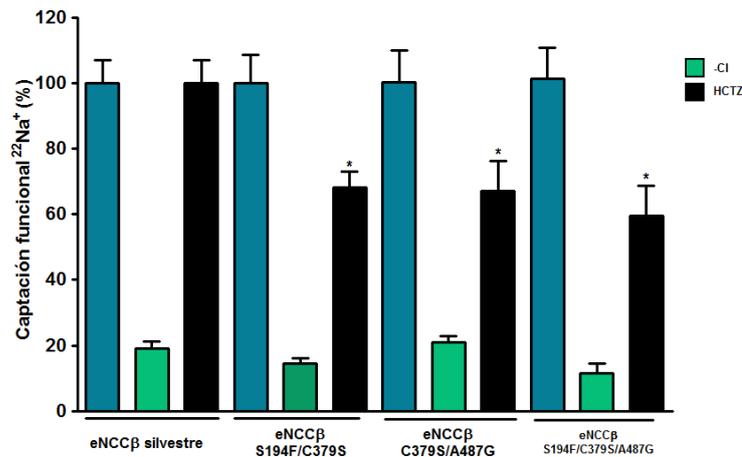


Figura 28. Captación de $^{22}\text{Na}^+$ expresada como porcentaje de función de las mutantes dobles S194F/C379S y C379S/A482G, así como la triple mutante S194F/C379S/A483G de la isoforma β del NCC de anguila europea (eNCC β) en ovocitos inyectados con su respectivo ARNm. Como control experimental se muestra la expresión funcional del cotransportador eNCC β en su forma silvestre. Se midió la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en soluciones con Na^+ y Cl^- , en ausencia de Cl^- y adicionando 10^{-4}M de Hidroclorotiazida (HCTZ). * $P < 0.05$ vs eNCC β S194F/C379S, eNCC β C379S/A482G y eNCC β S194F/C379S/A483G.

Con estas observaciones confirmamos que los cambios S194F y C379S le confieren al eNCC β una inhibición parcial por tiazidas.

De acuerdo con la caracterización que mostraron Watanabe y col.¹⁵ en sacos de intestino invertido de anguila japonesa, el transporte de Na^+ , Cl^- y agua disminuye significativamente al adicionar hidroclorotiazida al medio de incubación en una concentración de 10^{-3} M, con lo que comprueban que la función del jNCC β puede ser inhibido por diuréticos tiazida. En los experimentos que hemos realizados a lo largo de esta tesis empleamos como dosis 10^{-4} M de cualquier tiazida, sin embargo, el efecto inhibitorio observado en la anguila japonesa se observa a una concentración de 10^{-3} M de hidroclorotiazida. Por lo que en un siguiente experimento evaluamos el incremento en la concentración de tiazida sobre la función del eNCC β

En la figura 29 mostramos la captación de $^{22}\text{Na}^+$ expresada en porcentaje de función de ovocitos inyectados con ARNc de eNCC β y sometidos a concentraciones altas de hidroclorotiazida y metolazona. En este experimento observamos que concentraciones de 10^{-4} , 10^{-3} y 10^{-2} M de metolazona (barras negras) así como 10^{-4} y 10^{-3} M de hidroclorotiazida (barras grises) no afectaron la función del cotransportador.

Cabe mencionar que los datos captación de $^{22}\text{Na}^+$ en una concentración de 10^{-2} M de hidroclorotiazida no se muestran, ya que los ovocitos no soportaron esta condición durante múltiples experimentos de captación. Con esta observación se mostramos que el eNCC β no es inhibido por diuréticos tiazida sin importar la dosis empleada.

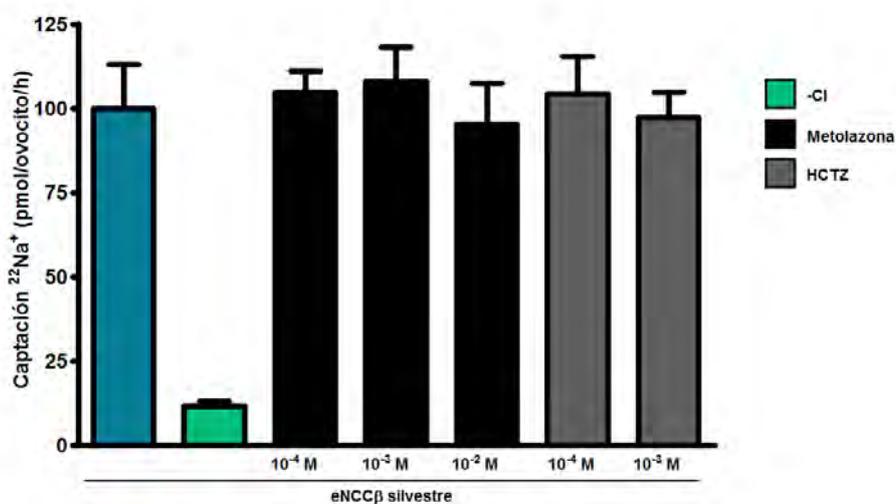


Figura 29. Efecto de diferentes concentraciones de diuréticos sobre la función de ovocitos inyectados con ARNm de la isoforma β del NCC de anguila europea (eNCC β). Se midió la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en soluciones con Na^+ y Cl^- , en ausencia de Cl^- y adicionando dos diuréticos: metolazona en tres diferentes concentraciones (10^{-4} , 10^{-3} y 10^{-2} M) e hidroclorotiazida (HCTZ) en dos concentraciones diferentes (10^{-4} y 10^{-3} M).

Finalmente nuestros resultados mostraron 2 aminoácidos involucrados en la inhibición de NCC, la S194F y C379S. Sin embargo, se requiere la realización de más mutaciones como se había establecido al inicio del estudio de aminoácidos para poder establecer los aminoácidos involucrados en la unión de tiazidas al cotransportador. En el laboratorio se sigue con el desarrollo de este proyecto y los resultados que presento en esta tesis forman parte del artículo científico que ha sido enviado para su publicación.

DISCUSIÓN

En esta tesis presentamos el estudio de la isoforma β de la anguila europea (eNCC β), en el que mostramos por primera vez un cotransportador de NaCl resistente a la inhibición por tiazidas (metolazona, bendroflumetiazida, triclorotiazida, hidroclorotiazida y clortalidona), en este estudio mostramos también, que diferentes concentraciones del fármaco (10^{-9} hasta 10^{-2} M) no afectan su funcionalidad. Esto nos llevó a considerar que el análisis de la secuencia de aminoácidos en este cotransportador podría ser de gran ayuda para dilucidar las propiedades funcionales del NCC.

Realizamos alineamientos de la secuencia del NCC β mediante el programa clustal w y la comparamos contra las diferentes secuencias reportadas de NCCs sensibles a tiazidas, esto nos permitió identificar aminoácidos importantes que pudieran estar involucrados en la unión de las tiazidas a su proteína blanco. De esta forma se identificaron 10 aminoácidos, de los cuales debido a sus características fisicoquímicas y la predicción de su ubicación en las regiones TM consideramos deberían ser estudiados. Iniciamos realizando las mutaciones M333K y H586K, sin embargo estos cambios no resultaron en un aumento en la afinidad por tiazidas al cotransportador. De la misma forma se realizaron las mutaciones equivalentes en el NCC de rata (K313M y K565H) sin embargo tampoco mostraron tener un efecto diferente a la inhibición por tiazidas.

Watanabe y col.¹⁵ reportaron la presencia de un NCC β en el tracto gastrointestinal de las anguillas japonesas (jNCC β) y mediante análisis de absorción de iones en sacos intestinales invertidos registraron la disminución del transporte de iones Na⁺ y Cl⁻ al adicionar hidroclotiazida, por lo que se observó que el jNCC β es sensible a tiazidas. Realizamos nuevos análisis de alineamiento

de secuencias entre el NCC β de anguilla europea y el NCC β de anguilla japonesa. El resultado de este nuevo análisis arrojó una diferencia de únicamente 3 aminoácidos S194F, C379S y A482G, por lo que consideramos importante realizar estos cambios en el eNCC β para determinar su efecto ante la presencia de tiazidas.

Nuestros resultados mostraron que las mutaciones S194F y C379S fueron capaces de sensibilizar al eNCC β a las tiazidas en un 30 y 45%, respectivamente. Por otra parte, la mutación A482G no mostró tener efecto alguno. Para evaluar que el aminoácido serina fuera determinante en la sensibilización del eNCC β , este fue sustituido por una alanina. Realizamos la mutante C379A, los ensayos funcionales revelaron que la mutante C379A, no le confiere sensibilidad a tiazidas al eNCC β . Esta observación se fortalece con el hecho de que este residuo es altamente conservado en la secuencia de los NCC del humano, rata, ratón conejo y lenguado de invierno, todos ellos sensibles a tiazidas. Por último, las mutaciones en la secuencia de eNCC β no mostraron tener un efecto aditivo, ya que la sensibilidad a tiazidas de las mutantes dobles S194F/C379S y C379S/A482G y la mutante triple S194F/C379S/A482G no revelaron un aumento en la sensibilidad al fármaco al observado en las mutantes simples.

A pesar de que no se ha determinado la estructura cristalográfica del NCC, se puede especular acerca de cómo podría darse la unión de inhibidores a este cotransportador a través de proteínas en las cuales ya se reportado su interacción con compuestos tiazida.

En 2002, Sun y col.⁵² reportaron un estudio estructural y funcional sobre el receptor ionotrópico de glutamato GluR2 selectivo AMPA (ácido- α -amino-3-

hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico) y su modulador alostérico positivo ciclotiazida. Los receptores ionotrópicos de glutamato (iGluRs) son los principales mediadores de la transmisión sináptica excitatoria en el sistema nervioso central de los vertebrados y desempeñan papeles importantes en procesos como el aprendizaje y la memoria, así como en el desarrollo neuronal. Los canales iónicos activados por ligando traducen señales químicas en impulsos eléctricos mediante la apertura de un poro insertado en la membrana como consecuencia de la unión de una o más moléculas de neurotransmisores. Después de la activación, muchos canales iónicos activados por ligando entran en un estado desensibilizado en la que el neurotransmisor permanece unido pero el canal iónico continúa cerrado.

Mediante experimentos de cristalografía muestran importantes residuos de unión para la acción de ciclotiazida, que además de inhibir la desensibilización del canal promueve la dimerización de los dominios extracelulares S1 y S2.

El análisis de cristalografía reveló que el anillo bicíclico de carácter hidrofóbico de la molécula de ciclotiazida interactúa con un sitio no polar complementario formado en la interfase de las subunidades A y B. El anillo benzotiadiazina forma puentes de hidrógeno e interacciones no polares con los residuos prolina 494, fenilalanina 495 y serina 497 dentro de la formación β -plegada, que une los dominios 1 y 2, así como el residuo serina 754 en la α -hélice cercana al carboxi-terminal. La unión con la serina 754 resulta de gran importancia, ya que cuando este sitio se muta por una leucina la actividad de la ciclotiazida sobre el receptor es menor.

En 2009, Ptak y col.⁵³ generaron una serie de estructuras cristalinas de este dominio con diferentes compuestos tiazida para entender cómo la estructura

base de las tiazidas, el anillo benzotiadiazina se unen a la interfaz del dímero S1S2 del GluR2. Los compuestos que usaron son hidroflumetiazida, hidroclorotiazida, clorotiazida y triclorometiazida, para la comparación con la estructura existente para ciclotiazida.

Muestran que la interacción más importante para todas las tiazidas, es la interacción del nitrógeno en la posición 4 dentro de la estructura de benzotiadiazina con la serina 754 mediante la formación de un puente de hidrógeno con el hidroxilo de este aminoácido.

De forma particular muestran que en el caso de la ciclotiazida y triclorotiazida existe la formación de puentes de hidrógeno para ligar el grupo sulfóxido a la serina 497 y el nitrógeno en la posición 4 a la serina 754. De forma alternativa en la estructura de hidroflumetiazida, hidroclorotiazida y clorotiazida, existe una interacción entre el grupo sulfóxido y el grupo amino de la glicina 731, el grupo sulfonamida con la serina 497; mediante puentes de hidrógeno.

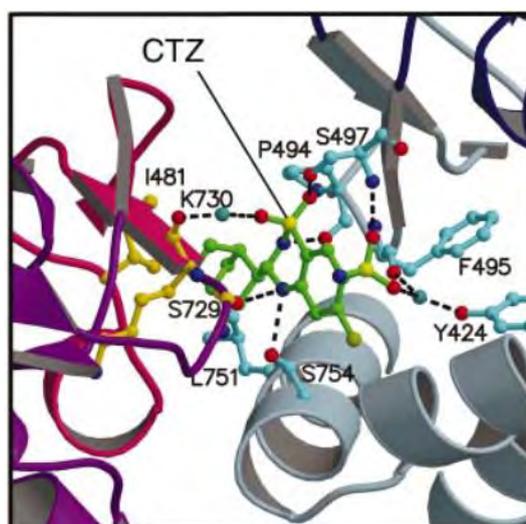


Figura 30. Se muestra un acercamiento a los enlaces formados entre una molécula de ciclotiazida (color verde) con las subunidades A en color gris y azul respectivamente y los dominios 1 y 2 de la subunidad B en rosa y morado

De acuerdo con los estudios reportados, el aumento en la sensibilidad a este tipo de compuestos que nosotros observamos en la mutante eNCC β -C379S se podría deber a que la presencia de una serina favorece la formación de puentes de hidrógeno entre el NCC y el nitrógeno en la posición 4 del anillo de benzotiadiazina en la estructura de la hidroclorotiazida, también presente en la estructura de la metolazona.

En cuanto a la mutante eNCC β -S194F la presencia de una fenilalanina, podría estar favoreciendo interacciones de tipo no polar entre este aminoácido y la hidroclorotiazida. A pesar de que la sensibilidad a tiazidas adquirida por la mutación C379S es mayor a la observada por la mutante S194F, se ha reportado que existe una relación directa entre la hidrofobicidad y la actividad de los compuestos tiazida⁴⁶, por lo que la presencia de un efecto hidrofóbico resulta importante para la actividad inhibitoria de este tipo de compuestos sobre NCC.

De esta forma nuestros resultados muestran que la presencia de los aminoácidos fenilalanina y serina resultan importantes para establecer la interacción entre los compuestos tiazidas y su proteína blanco, el NCC y así poder ejercer un efecto inhibitor sobre éste. Sin embargo para la determinación de residuos específicos que muestren una inhibición equiparable a lo observado en mamíferos se requiere un análisis más detallado entre los aminoácidos altamente conservados de la secuencia de los NCCs sensibles a tiazidas pero ausentes en el NCC β de la anguila europea.

CONCLUSIONES

1. Se realizó la clonación de la secuencia de eNCC β en el vector de expresión pGEMHE.
2. El eNCC β es un cotransportador de NaCl no sensible a diferentes diuréticos tiazida y tipo tiazida, este efecto permanece aún en diferentes concentraciones del fármaco (10^{-4} hasta 10^{-2} M)
3. El eNCC β exhibe un porcentaje de identidad mayor al 70% cuando se compara la secuencia primaria de las regiones TM de este cotransportador con el NCC de la isoforma α de la anguila europea, de humano, la rata, el ratón, el conejo y el pez lenguado de invierno.
4. El alineamiento de las regiones TM entre las secuencias de NCC β de anguila europea y japonesa revela un 99.36% de identidad, reflejado en el cambio de únicamente 3 residuos.
5. Las mutantes H586K, M333K y A482G en la secuencia de eNCC β no están involucrados en la unión a tiazidas al cotransportador.
6. En contraste, las mutaciones S194F y C379S en la secuencia de eNCC β muestran ser importantes para aumentar en un 30 y 45% respectivamente, la afinidad por tiazidas al cotransportador. Este aumento en la afinidad no muestra tener un efecto aditivo al combinar las mutaciones.

BIBLIOGRAFÍA

1. Berry CA, Rector FC. Mechanism of proximal NaCl reabsorption in the proximal tubule of the mammalian kidney. *Semin Nephrol.* 1991;11(2):86-97.
2. Palmer LG, Schnermann J. Integrated control of Na transport along the nephron. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2015;10(4):676-687.
3. Aronson PS, Giebisch G. Mechanisms of chloride transport in the proximal tubule. *Am J Physiol.* 1997;273(2 Pt 2):F179-F192.
4. Markadieu N, Delpire E. Physiology and pathophysiology of SLC12A1/2 transporters. *Pflügers Arch Eur J Physiol.* 2014;466(1):91-105.
5. Eladari D, Chambrey R, Picard N, Hadchouel J. Electroneutral absorption of NaCl by the aldosterone-sensitive distal nephron: implication for normal electrolytes homeostasis and blood pressure regulation. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(15):2879-2895.
6. Eladari D, Chambrey R, Peti-Peterdi J. A new look at electrolyte transport in the distal tubule. *Annu Rev Physiol.* 2012;74:325-349.
7. Moes AD, van der Lubbe N, Zietse R, Loffing J, Hoorn EJ. The sodium chloride cotransporter SLC12A3: new roles in sodium, potassium, and blood pressure regulation. *Pflügers Arch Eur J Physiol.* 2014;466(1):107-118.
8. Renfro JL. Water and ion transport by the urinary bladder of the teleost *Pseudopleuronectes americanus*. *Am J Physiol.* 1975;228(1):52-61.
9. Stokes JB. Sodium chloride absorption by the urinary bladder of the winter flounder. A thiazide-sensitive, electrically neutral transport system. *J Clin Invest.* 1984;74(1):7-16.
10. Velázquez H, Wright FS. Effects of diuretic drugs on Na, Cl, and K transport by rat renal distal tubule. *Am J Physiol.* 1986;250(6 Pt 2):F1013-F1023.
11. Gamba G, Saltzberg SN, Lombardi M, et al. Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the thiazide-sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(7):2749-2753.
12. Schultheis PJ, Lorenz JN, Nieman ML, et al. Phenotype Resembling Gitelman's Syndrome in Mice Lacking the Apical Na⁺-Cl⁻ Cotransporter of the Distal Convoluted Tubule Phenotype Resembling Gitelman's Syndrome in Mice Lacking the Apical Na⁺-Cl⁻ Cotransporter of. *J Biol Chem.* 1998;273(44):29150-29155.
13. Velázquez H, Nárday-Fejes-Tóth A, Silva T, et al. Rabbit distal convoluted tubule coexpresses NaCl cotransporter and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase II mRNA. *Kidney Int.* 1998;54(2):464-472.
14. Mastroianni N, De Fusco M, Zollo M, et al. Molecular cloning, expression

pattern, and chromosomal localization of the human Na-Cl thiazide-sensitive cotransporter (SLC12A3). *Genomics*. 1996;35(3):486-493.

15. Watanabe S, Mekuchi M, Ideuchi H, Kim YK, Kaneko T. Electroneutral cation-Cl⁻ cotransporters NKCC2 β and NCC β expressed in the intestinal tract of Japanese eel *Anguilla japonica*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2011;159(4):427-435.
16. Cutler CP, Cramb G. Differential expression of absorptive cation-chloride-cotransporters in the intestinal and renal tissues of the European eel (*Anguilla anguilla*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2008;149(1):63-73.
17. Hoover RS, Poch E, Monroy A, et al. N-Glycosylation at two sites critically alters thiazide binding and activity of the rat thiazide-sensitive Na⁽⁺⁾:Cl⁽⁻⁾ cotransporter. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(2):271-282.
18. Gamba G, Miyanoshita A, Lombardi M, et al. Molecular cloning, primary structure, and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney. *J Biol Chem*. 1994;269(26):17713-17722.
19. Xu JC, Lytle C, Zhu TT, Payne JA, Benz E, Forbush B. Molecular cloning and functional expression of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(6):2201-2205.
20. Gerelsaikhan T, Turner RJ. Transmembrane topology of the secretory Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter NKCC1 studied by in vitro translation. *J Biol Chem*. 2000;275(51):40471-40477.
21. Pacheco-Alvarez D, Cristóbal PS, Meade P, et al. The Na⁺:Cl⁻ cotransporter is activated and phosphorylated at the amino-terminal domain upon intracellular chloride depletion. *J Biol Chem*. 2006;281(39):28755-28763.
22. Renfro JL, Miller DS, Karnaky KJ, Kinter WB. Na-K-ATPase localization in teleost urinary bladder by [³H]ouabain autoradiography. *Am J Physiol*. 1976;231(6):1735-1743.
23. Velázquez H, Good DW, Wright FS. Mutual dependence of sodium and chloride absorption by renal distal tubule. *Am J Physiol*. 1984;247(6 Pt 2):F904-F911.
24. 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(1):F161-F169.
25. 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(1):F161-F169.
26. Vázquez N, Monroy A, Dorantes E, Muñoz-Clares RA, Gamba G. Functional differences between flounder and rat thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002;282(4):F599-F607.
27. Moreno E, Cristobal PS, Rivera M, Vazquez N, Bobadilla NA, Gamba G. Affinity-defining Domains in the Na-Cl Cotransporter: A DIFFERENT

LOCATION FOR Cl- AND THIAZIDE BINDING. *J Biol Chem.* 2006;281(25):17266-17275.

28. Castañeda-Bueno M, Vázquez N, Bustos-Jaimes I, et al. A single residue in transmembrane domain 11 defines the different affinity for thiazides between the mammalian and flounder NaCl transporters. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010;299(5):F1111-F1119.
29. Cutler CP, Cramb G. Molecular physiology of osmoregulation in eels and other teleosts: the role of transporter isoforms and gene duplication. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2001;130(3):551-564.
30. Teranishi K, Mekuchi M, Kaneko T. Expression of sodium/hydrogen exchanger 3 and cation-chloride cotransporters in the kidney of Japanese eel acclimated to a wide range of salinities. *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol.* 2013;164(2):333-343.
31. Wile D. Diuretics: a review. *Ann Clin Biochem.* 2012;49(5):419-431.
32. Swartz WB. The effect of sulfanilamide on salt and water excretion in congestive heart failure. *N Engl J Med.* 1949;240:173-177.
33. MANN T, KEILIN D. Sulphanilamide as a Specific Inhibitor of Carbonic Anhydrase. *Nature.* 1940;146(3692):164-165.
34. Starke K, Board E, Eichelbaum M, et al. Handbook of Experimental Pharmacology Volume 167. *Handb Exp Pharmacol.* 1990;11(11):468-469.
35. Fried TA, Kunau RT. Thiazide diuretics. In: *Diuretics: Physiology, Pharmacology and .*; 1986:66-85.
36. Sprague JM. The Chemistry of Diuretics. *Ann New York Acad Sci.* 1952;(1):328-343.
37. Maren TH, Parcell AL, Malik MN. A Kinetic analysis of Carbonic Anhydrase Inhibition. 1959;130(I).
38. Lant AF. Modern diuretics and the kidney. *J Clin Pathol.* 1981;34(11):1267-1275.
39. Rose P discussant: BD. Diuretics. *Kidney Int.* 1991;39(2):336-352.
40. Finkel E, Michelle A, Luigi X. *Pharmacology.* 4th ed. (Finkel R, Clark MA, Cubeddu LX, eds.); 2009.
41. Novello FC, Bell SC, Abrams ELA, Ziegler C, Sprague JM. Diuretics: Aminobenzenedisulfonamides. *J Am Chem Soc.* 1960;25(June):965-970.
42. Novello FC, Bell SC, Abrams ELA, Ziegler C. Diuretics: 1,2,4-Benzothiadiazine- 1,1 -dioxides. *J Am Chem Soc.* 1960;25(1950):970-981.
43. Novello FC, Sprague JM. Benzothiadiazine dioxides as novel diuretics. *J Am Chem Soc.* 1957;79(2):2028-2029.
44. Beyer KH. The mechanism of action of chlorothiazide. *Ann New York Acad Sci.* 1958;71:363-379.
45. Szász G, Budvári-Bárany Z. *Pharmaceutical Chemistry of Antihypertensive Agents.pdf.*; 1990.
46. Beyer KH. Clorothiazide. *Ann N Y Acad Sci.* 1982;13:363-379.

47. Rubin AA, Roth FE, Taylor RM, Rosenkilde H. PHARMACOLOGY OF DIAZOXIDE, AN ANTIHYPERTENSIVE, NONDIURETIC BENZOTHIADIAZINE. *J Pharmacol Exp Ther.* 1962;136:344-352.
48. Sigel E, Minier F. The *Xenopus* oocyte: System for the study of functional expression and modulation of proteins. 2005:228-234.
49. Moreno E, Cristóbal PS, Rivera M, Vázquez N, Bobadilla NA, Gamba G. Affinity-defining domains in the Na-Cl cotransporter: a different location for Cl⁻ and thiazide binding. *J Biol Chem.* 2006;281(25):17266-17275.
50. Castañeda-Bueno M, Vázquez N, Bustos-Jaimes I, et al. A single residue in transmembrane domain 11 defines the different affinity for thiazides between the mammalian and flounder NaCl transporters. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010;299(5):F1111-F1119.
51. Moreno E, Tovar-Palacio C, de los Heros P, et al. A single nucleotide polymorphism alters the activity of the renal Na⁺:Cl⁻ cotransporter and reveals a role for transmembrane segment 4 in chloride and thiazide affinity. *J Biol Chem.* 2004;279(16):16553-16560.
52. Sun Y, Olson R, Horning M, Armstrong N, Mayer M, Gouaux E. Mechanism of glutamate receptor desensitization. *Nature.* 2002;417(6886):245-253.
53. Ptak CP, Ahmed AH, Oswald RE. Probing the Allosteric Modulator Binding Site of GluR2 with Thiazide Derivatives. *Biochemistry.* 2009;48(36):8594-8602.