



0059 /  
12



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

292398

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**RELACIÓN ESTRUCTURA FUNCIÓN  
DEL COTRANSPORTADOR DE  
Na<sup>+</sup>:Cl<sup>-</sup> SENSIBLE A TIAZIDAS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**

**P R E S E N T A:**

**MC. ADRIANA MONROY GUZMÁN**





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.

**El presente trabajo se realizó en la Unidad de Fisiología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, ubicada en el departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral del INCMNSZ, bajo la asesoría del Dr. Gerardo Gamba Ayala.**



## PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PMDCB/755/2000

M. C. ADRIANA MONROY GUZMÁN  
Alumna del Doctorado en Ciencias Bioquímicas  
P r e s e n t e

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 31 de octubre del presente, conocieron su solicitud de asignación de JURADO DE EXAMEN para optar por el grado de DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS), con la réplica de la tesis "Relación estructura-función del cotransportador de sodio-cloro sensible a tiazidas", dirigida por el Dr. Gerardo Gamba Ayala.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Dra. Herminia Pasantes Morales
VOCAL	Dr. José Luis Reyes
VOCAL	Dr. Luis Vaca Domínguez
VOCAL	Dr. Lorenzo Segovia Forcella
SECRETARIO	Dra. Rosario A. Muñoz Clares
SUPLENTE	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres
SUPLENTE	Dr. Armando Tovar Palacio

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 7 de noviembre de 2000.  
LA COORDINADORA DEL PROGRAMA

  
DRA. AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ-SARAVIA

C.c.p. Archivo

AFGS\*igg.





## PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

A LOS MIEMBROS DE  
JURADO DE EXAMEN

Por medio del presente manifiesto que he revisado el texto sometido a su consideración de la alumna del Doctorado en Ciencias Bioquímicas, M.C. ADRIANA MONROY GUZMÁN titulado:

“Relación estructura-función del cotransportador de sodio-cloro sensible a tiazidas”

ATENTAMENTE

DR. GERARDO GAMBA AYALA  
TUTOR PRINCIPAL



**Para**

**Elisa, Roberto, Fabiola, Claudia y Silvestre**

**Por todo lo que son.**

## ÍNDICE

RELACIÓN DE ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	4
Túbulo proximal	6
Asa de Henle	8
Mácula densa	11
Túbulo contorneado distal	12
Regulación del túbulo contorneado distal	21
Tiazidas	26
Efectos adversos de las tiazidas	30
Síndrome de Gitelman	32
OBJETIVOS	37
RESULTADOS	38
Caracterización del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ sensible a tiazidas. Interacción iónica y diurética	39
Efecto de la cicletanina sobre el cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ sensible a tiazidas	49
Efecto de la N-glucosilación en la actividad del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ sensible a tiazidas	55

<b>Regulación del cotransportador de Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> sensible a tiazidas por proteína cinasa C</b>	<b>66</b>
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b>	<b>86</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>95</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>96</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

### INTRODUCCIÓN

Fig. 1 Heterogeneidad de la nefrona	5
Fig. 2 Fisiología molecular del túbulo contorneado proximal	7
Fig. 3 Fisiología molecular del asa ascendente gruesa de Henle	9
Fig. 4 Isoformas de CSB1	10
Fig. 5 Gráfico de Scatchard que muestra la unión de metolazona[ <sup>3</sup> H] a membranas renales de rata	15
Fig. 6 Modelo de transporte de CST propuesto por Tran y col.	16
Fig. 7 Topología básica del CST	17
Fig. 8 Árbol filogenético de los cotransportadores electroneutros cloro-catiónicos	18
Fig. 9 Fisiología molecular del túbulo distal	21
Fig.10 Estructura química de las diversas tiazidas	27

### RESULTADOS

#### Efecto de la N-glucosilación en la actividad del cotransportador de Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> sensible a tiazidas

Fig. 1 Topología básica y sitios de glucosilación del CSTR	57
Fig. 2 Western blot de CSTR nativo y de las clonas N404Q, N424Q y N404,424Q	59
Fig. 3 Mutantes de glucosilación del CSTR	60
Fig. 4 Expresión funcional del CSTR silvestre y las clonas mutantes N404Q, N424Q y N404,424Q	61
Fig. 5 Cinética del transporte de Na <sup>+</sup> del CSTR nativo y de N404Q	62
Fig. 6 Cinética del transporte de Cl <sup>-</sup> del CSTR nativo y de N404Q	63

#### Regulación del cotransportador de Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> sensible a tiazidas por proteína cinasa C

Fig. 1 Topología básica y sitios de fosforilación por PKC en CSTR	70
Fig. 2 Efecto de los ésteres de forbol sobre el CSTR	71
Fig. 3 Efecto de la dosis y el tiempo de TPA sobre CSTR	72
Fig. 4 Expresión de CSTR y mutantes simples de fosforilación	73
Fig. 5 Efecto del TPA sobre CSTR y la mutante de CSTR S16A	74
Fig. 6 Expresión de CSTR y mutantes múltiples de fosforilación	75
Fig. 7 Expresión de CSTR y mutantes S16A y S559A	76
Fig. 8 Expresión de CSTR y mutantes S16A y T889A	77

<b>Fig. 9 Expresión de CSTR y mutantes S16A y S934A</b>	<b>78</b>
<b>Fig. 10 Expresión de CSTR y mutantes T889A y S934A</b>	<b>79</b>
<b>Fig. 11 Inhibición por TPA sobre CSTR y las mutantes</b>	<b>80</b>

## **DISCUSION**

<b>Fig. 1 Modelo propuesto de reabsorción de Ca<sup>++</sup>, mediada por PTH, en TCD.</b>	<b>94</b>
--	-----------

## RESUMEN

El cotransportador de  $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$  sensible a tiazidas (CST) es el principal responsable de la reabsorción de  $\text{NaCl}$  a nivel del túbulo contorneado distal en la nefrona de los mamíferos y el sitio de acción de las drogas benzotiadiazinas o tiazidas. Estos fármacos son utilizados ampliamente en clínica para el tratamiento de estados edematosos e hipertensivos. Se ha demostrado que mutaciones en esta proteína de membrana son las responsables del Síndrome de Gitelman, enfermedad autosómica recesiva, que presenta un cuadro clínico similar al del abuso en el uso de las tiazidas. Debido a la dificultad en el estudio *in situ* de esta región de la nefrona y para obtener cultivos homogéneos que mantengan sus características, fue hasta la clonación del CST que se ha logrado analizar la función y la estructura de esta proteína.

En el presente trabajo, utilizando la técnica de expresión funcional en ovocitos de *Xenopus*, hemos realizado el estudio inicial de la relación estructura función de este cotransportador. Los resultados de este estudio nos permiten proponer un nuevo modelo de interacción de los iones transportados con el CST, en el que cada ión puede unirse al transportador en forma independiente, al azar, pero una vez unido el primer ión, se aumenta la afinidad por el segundo. Se requiere la unión de ambos iones a la proteína para su transporte.

Las tiazidas muestran una potencia similar de inhibición sobre el transportador que la reportada para su uso clínico. La unión del inhibidor tiazídico se ve afectada por la unión de ambos iones. Dentro de las drogas que tradicionalmente han sido consideradas como tiazidas se encuentra la cicletanina. Sin embargo, nuestro trabajo demuestra que el efecto natriurético de esta droga no es debido a inhibición del CST y, por lo tanto, no debe ser considerada como tiazida.

El transportador es una glucoproteína con dos sitios de N-glucosilación (N404 y N424), cuando uno de estos sitios es mutado (N404Q o N424Q) disminuye la función del transportador en un 70% cada una, mientras que cuando ambos sitios son mutados se obtiene una inhibición del 90%. Esta disminución en la función es debida a una disminución en la incorporación de la proteína a la membrana.

El CST cuenta con varios sitios consenso para fosforilación por la proteína cinasa C. Cuando esta enzima es activada utilizando ésteres de forbol se produce una inhibición en la función del CST que es tiempo y dosis dependiente. Cuando se realizan mutaciones puntuales sobre los sitios de fosforilación se incrementa la actividad del transportador tanto en mutantes simples, como en dobles mutantes. En el caso de la triple mutante no se observa aumento en la función del CST.

## ABSTRACT

The thiazide-sensitive  $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$  cotransporter (TSC) is the major pathway for salt reabsorption in the apical membrane of the mammalian distal convoluted tubule and the principal site of action of benzothiadiazides drugs or thiazides, which are widely used in clinics for treatment of edema and hypertension. It is known that mutations, along this membrane protein cause Gitelman's Syndrome, an autosomal recessive disease, which is quite similar to the abuse of thiazides. In this work, we have done the first approach to the cotransporter structure-function knowledge, through functional expression in *Xenopus* oocytes. We propose a new ion interacting model, in which every ion binds independently, randomly, but the first ion binding increases affinity in the second ion. Both ions are required for transporting.

Thiazides show similar inhibitory potency as TSC as clinical efficacy. Both ion-binding sites modified thiazide-mediated inhibition of transport. Cicletanine was assumed to act like thiazide diuretics. However, our results demonstrate that this natriuretic effect of the drug is not due to an inhibitory effect on CST, and it must not be considered as a thiazide.

Cotransporter is a glycoprotein with two N-glycosylation sites (N404 and N424). Mutation of one site (N404Q and N424Q) decreased transporter function in 70%, while mutation of both sites gave us an inhibition of about 90%. This decrease in function is due to a diminished arrival at membrane.

Cotransporter has some phosphorylation sites by protein-kinase C (PKC). When PKC is activated using forbol esters, TSC has an inhibition on its function. This inhibition is time and dose-dependent. Punctual mutations on phosphorylation sites increase transporter activity, both with simple or double mutations. A triple mutation does not induce additional increases in TSC function.

## INTRODUCCIÓN

Las tiazidas son drogas diuréticas ampliamente utilizadas en clínica para el manejo de estados edematosos e hipertensivos. Estas drogas actúan sobre un receptor que se encuentra localizado en el túbulo distal de la nefrona y es responsable de la reabsorción de sodio a este nivel. Este receptor corresponde al cotransportador de  $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$  sensible a tiazidas (CST).

En los eucariotes superiores la homeostasis de líquidos y electrolitos es crítica para el organismo en funciones tales como el aporte adecuado de oxígeno y nutrientes a los tejidos y la función neuromuscular normal. El NaCl es una sal importante para la preservación de la homeostasis iónica de los mamíferos, entre ellos el hombre. Esta sal tiene importantes efectos sobre el volumen celular y sanguíneo, la presión arterial, etc. y se le ha involucrado en estados patológicos tales como la hipertensión arterial. Su concentración celular y extracelular dependen de finos mecanismos de regulación para controlar su ingesta y excreción.

El riñón juega un papel importante en la determinación del balance de líquidos y electrolitos, manteniendo la homeostasis sin importar la amplia variación en la ingesta. El riñón filtra diariamente 1.5 Kg de NaCl, mientras que la orina solamente contiene de 0.5 g a un poco más de 20 g de esta sal. Por lo tanto, la mayor parte del NaCl filtrado es reabsorbido por las porciones tubulares de la nefrona. Para mantener este balance, los túbulos renales muestran una compleja diferenciación axial en segmentos especializados que están formados por epitelios transportadores: la nefrona proximal con sus porciones contorneada y recta, la porción delgada del asa de Henle, la nefrona distal la cual comprende las porciones medular y cortical de la rama ascendente gruesa (TAL), el túbulo

contorneado distal (TCD), el túbulo conector (TCN) y el conducto colector con sus porciones medular (CCM), cortical (CCC) y papilar. Estudios morfológicos han definido los tipos celulares y el análisis mediante micropunción, biología molecular y técnicas relacionadas han contribuido considerablemente a elucidar la especialización de los segmentos con respecto a una de sus principales funciones como lo es la reabsorción de sodio. La concentración de sodio en el filtrado glomerular es de 145 mmol/l, la cantidad filtrada es de 26,000 mmol/día, la concentración de sodio en la orina es de 30-150 mmol/l y la cantidad excretada diariamente es de 100-300 mmol/día. Una gran parte de la reabsorción tubular ocurre en la nefrona proximal, aproximadamente el 60 al 70 % del  $\text{Na}^+$  filtrado, mientras en la nefrona distal, la rama gruesa ascendente del asa de Henle reabsorbe del 20 al 30%, y la regulación fina ocurre en el túbulo distal y en el conducto colector.

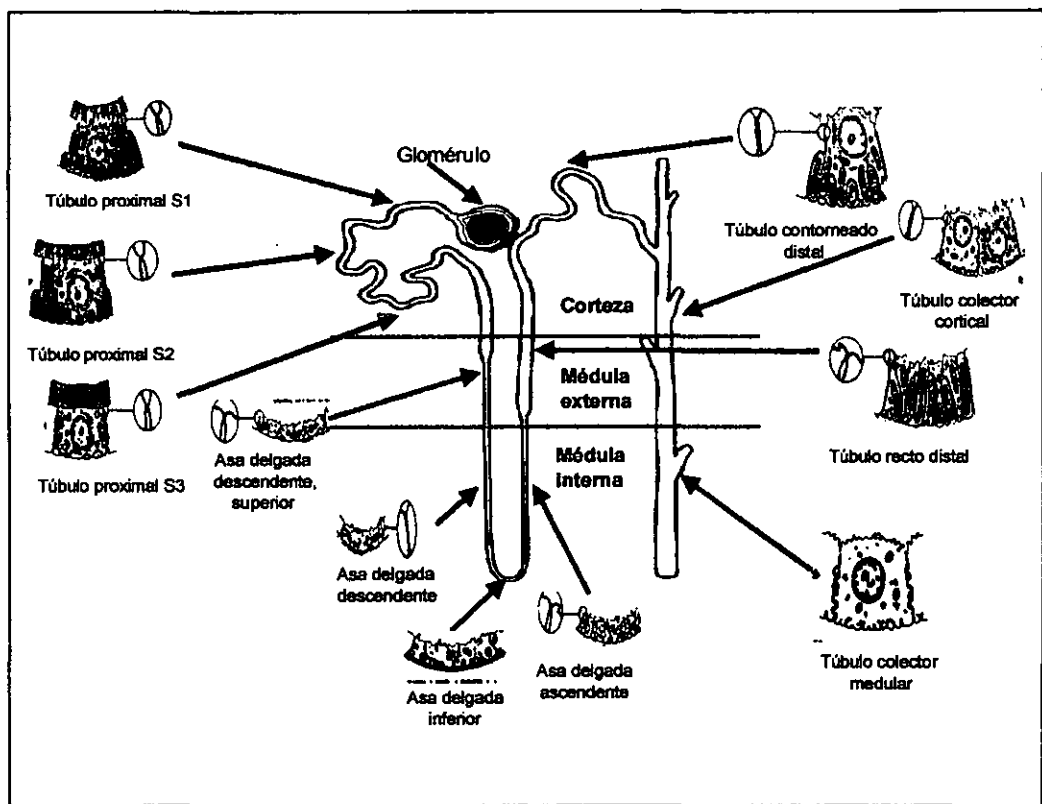


Figura 1. Heterogeneidad de la nefrona (112).

Existe una relación lineal entre el consumo de oxígeno y la reabsorción de  $\text{NaCl}$  (1) con una proporción de 5 mol de  $\text{NaCl}$  reabsorbidos por cada mol de ATP

consumido por la nefrona, si bien en el túbulo distal la proporción es de 3 mol reabsorbidos de NaCl por cada mol de ATP consumido. Esto nos muestra el requerimiento de energía química que mantiene tal reabsorción. Esta energía química es utilizada principalmente por la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, que se expresa en la membrana basolateral de las células tubulares y provee la fuerza primaria para el transporte de sodio manteniendo concentraciones celulares de sodio bajas y las de potasio altas, es decir, generando el gradiente primario de sodio. La  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa también contribuye a mantener el interior de la célula electronegativo con respecto al exterior.

La reabsorción de sodio por los diversos sistemas existentes a lo largo de la nefrona aprovecha el gradiente electroquímico producido por la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa. La reabsorción de sodio por estos transportadores puede ser electrogénica o eléctricamente neutra.

## TÚBULO PROXIMAL

Como en cualquier otro segmento de la nefrona la reabsorción en el túbulo proximal es energéticamente posible debido al gradiente iónico transmembranal producido por la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, el cual es posteriormente aprovechado por otros transportadores. Cuantitativamente, el transporte iónico más importante acoplado a  $\text{Na}^+$  en este segmento de la nefrona es el intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE), el cual conduce una gran parte de la reabsorción electroneutra de sodio y sensible a análogos de amilorida (2). El intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , ubicado en la cara apical, extrae  $\text{H}^+$  del interior celular, los cuales son amortiguados por  $\text{HCO}_3^-$  en el lumen. El ácido carbónico formado es deshidratado a  $\text{CO}_2$  por medio de la enzima anhidrasa carbónica localizada en la membrana luminal. El  $\text{CO}_2$  difunde al espacio intracelular y es nuevamente rehidratado, por medio de la anhidrasa carbónica intracelular, formándose ácido carbónico que se disocia y reintegra el  $\text{H}^+$  para otro ciclo, mientras el  $\text{Na}^+$  es bombeado hacia el intersticio por la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa y el  $\text{HCO}_3^-$  deja la célula por medio de un transportador basolateral acoplado al  $\text{Na}^+$ .

Por este mecanismo, el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{HCO}_3^-$  son absorbidos transcelularmente y la concentración de  $\text{HCO}_3^-$  luminal cae rápidamente a lo largo del túbulo. Este mecanismo de absorción de  $\text{HCO}_3^-$  puede ser detenido mediante inhibición de la anhidrasa carbónica con el diurético acetazolamida.

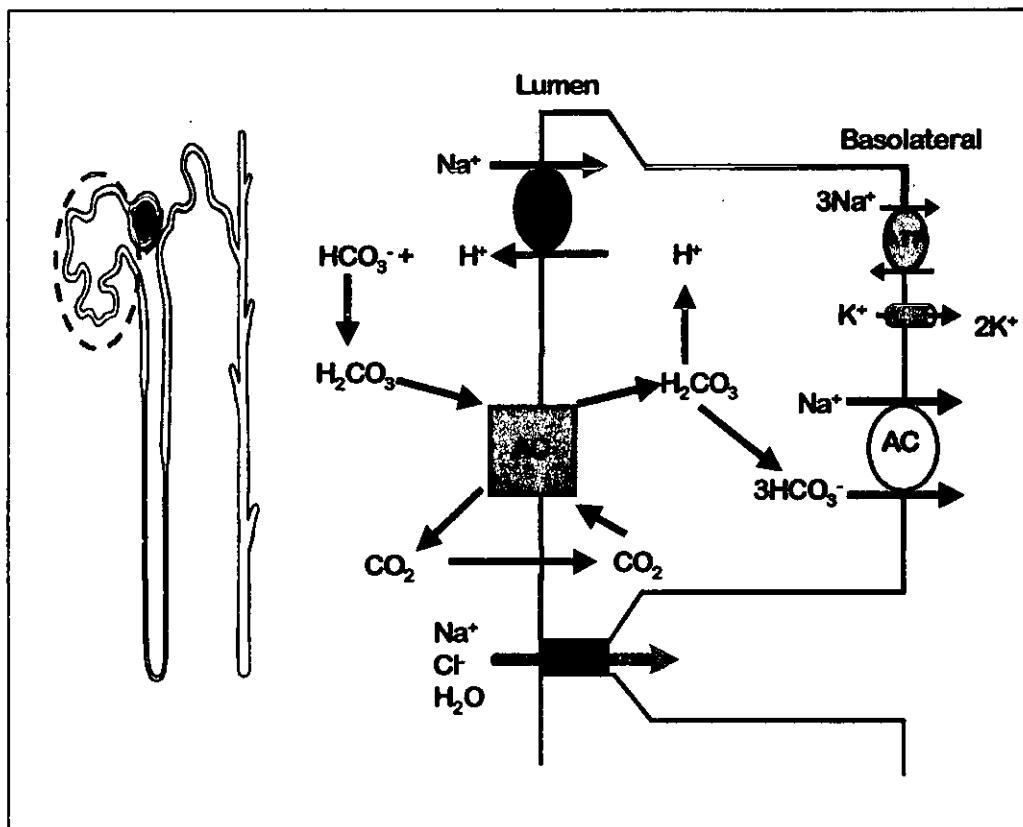


Figura 2. Fisiología molecular del túbulo contorneado proximal. AC=anhidrasa carbónica.

Otros mecanismos de transporte acoplados al sodio y que fueron identificados en el túbulo proximal incluyen a los cotransportadores de sodio-fosfato ( $\text{NaPi}2$ ), sodio-D-glucosa (SGLT1 y SGLT2), sodio-aminoácidos, sodio-sulfato y sodio-lactato. Aunque la reabsorción proximal de sodio se puede adaptar a estados de expansión o contracción de volumen, está bien establecido que la reabsorción a este nivel es constitutiva y que los cambios en la excreción urinaria de sodio y cloro, los cuales reflejan variaciones en la ingesta de sal, son una función del túbulo distal (3).



## ASA DE HENLE

En la nefrona distal, la porción ascendente gruesa del asa de Henle se inicia en los límites entre la médula interna y externa, y se extiende hasta la corteza. Su morfología se caracteriza por una interdigitación celular con un alto contenido de mitocondrias y es responsable de la reabsorción de un 20 a 30% del NaCl filtrado. Este es el segmento de la nefrona primordialmente responsable del establecimiento de los procesos de concentración/dilución, esto debido a su capacidad para reabsorber sodio, cloro, bicarbonato y amonio, pero no agua y por su capacidad para generar diferencias transepiteliales de concentración de solutos. La concentración de NaCl disminuye progresivamente a lo largo de la rama ascendente gruesa del asa de Henle. La reabsorción de cloruro de sodio y no de agua crea un líquido tubular hiposmótico al final de este segmento, además de contribuir a la hiperosmolaridad medular necesaria para la reabsorción de agua mediada por hormona antidiurética a nivel del conducto colector. La porción ascendente gruesa del asa de Henle es el sitio de acción de los diuréticos de asa, tales como bumetanida, furosemida, torasemida, piretanida y ácido etacrínico, los cuales ejercen su acción natriurética bloqueando la entrada apical de sodio, potasio y cloro en las células. La reabsorción de NaCl en esta porción del asa de Henle es realizada por un mecanismo complejo que incluye al cotransportador de  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  sensible a bumetanida (CSB1), el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE) y la  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$  como elementos principales, aunque otros elementos han sido implicados en esta reabsorción (un canal de  $\text{K}^+$  sensible a ATP, dos receptores de  $\text{Cl}^-$  y el receptor de  $\text{Ca}^{++}$ ;4).

El proceso de reabsorción de NaCl en la porción ascendente gruesa del asa de Henle es dirigido también por la  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$  basolateral. El  $\text{Na}^+$  es transportado a través de la membrana luminal por el cotransportador  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{2Cl}^-$  y posteriormente es extraído en la membrana basolateral por la  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$ . El  $\text{Cl}^-$  deja la célula por vía basolateral mediante canales de  $\text{Cl}^-$  y, probablemente,

también por medio de un cotransportador de KCl. El  $K^+$  recicla hacia la membrana luminal por medio de los canales de  $K^+$  tipo ROMK, el reciclaje de  $K^+$  aunado al  $Cl^-$  extraído por mecanismos moleculares localizados en la membrana basolateral, produce un voltaje luminal positivo transepitelial que es aprovechado para la reabsorción de  $Na^+$  por vía paracelular (11).

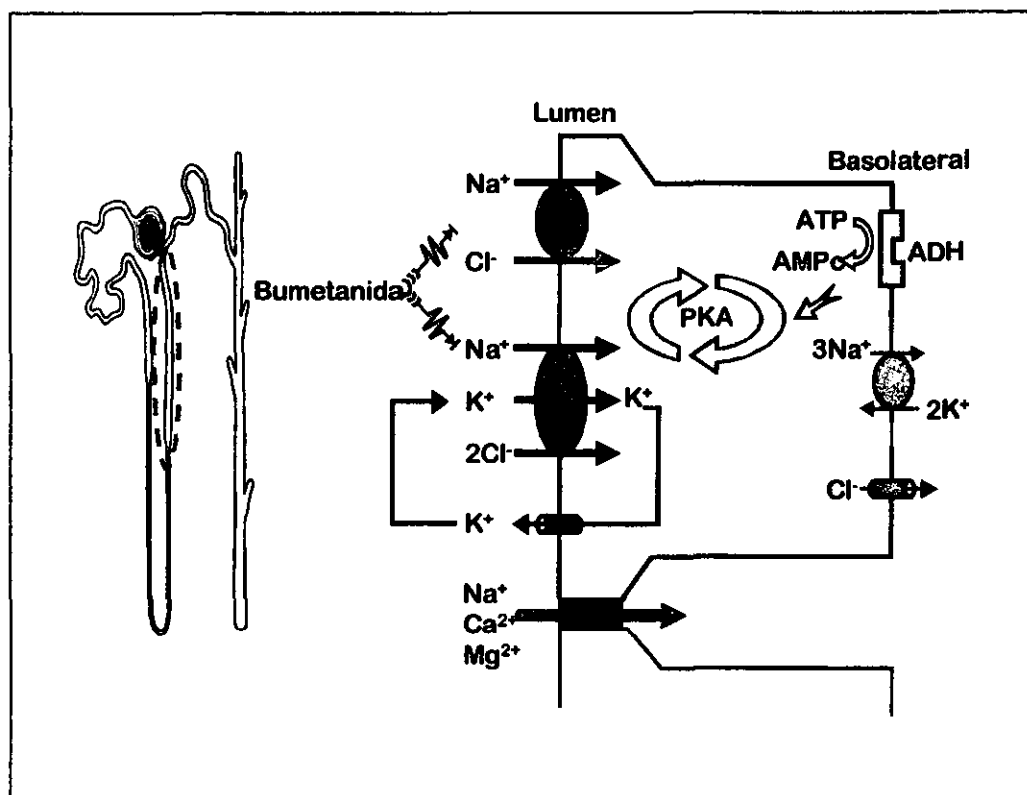


Figura 3. Fisiología molecular del asa ascendente gruesa de Henle (113).

Durante mucho tiempo, se ha reconocido la interdependencia del transporte de sodio y cloro existente en una gran variedad de células. En 1980 Geck y col. (5) mostraron evidencia de que el movimiento de sodio y cloro en las células tumorales de ascitis de Ehrlich estaba acoplado al transporte de potasio y determinaron la estequiometría del transporte como  $1Na^+:1K^+:2Cl^-$ , sensible a furosemida. Esta forma electroneutra de transporte ha sido descrita en una gran variedad de tipos celulares, entre ellos la rama ascendente gruesa del asa de Henle. Dos distintos genes del cotransportador de  $Na^+-K^+-2Cl^-$  han sido clonados (Slc12a1 o CSB1 y Slc12a2 o CSB2;6,7) y ambos se expresan en el riñón de mamíferos. Ambos cotransportadores son proteínas con un peso molecular de

entre 120 y 150 KDa, con una topología muy similar a la de toda la familia de cotransportadores electroneutros de cloro-cationes con doce segmentos transmembrana flanqueados por regiones hidrofílicas intracelulares; se encuentran glucosilados en el asa extracelular entre los segmentos transmembrana 7 y 8 por lo que se observa un peso molecular aparente en gel de 150-195 KDa. El CSB1 se expresa exclusivamente en el asa de Henle y en las células de la mácula densa. La localización de la proteína mediante anticuerpos policlonales la muestran solamente en la membrana apical. Este cotransportador es inhibido por bumetanida y no por tiazidas.

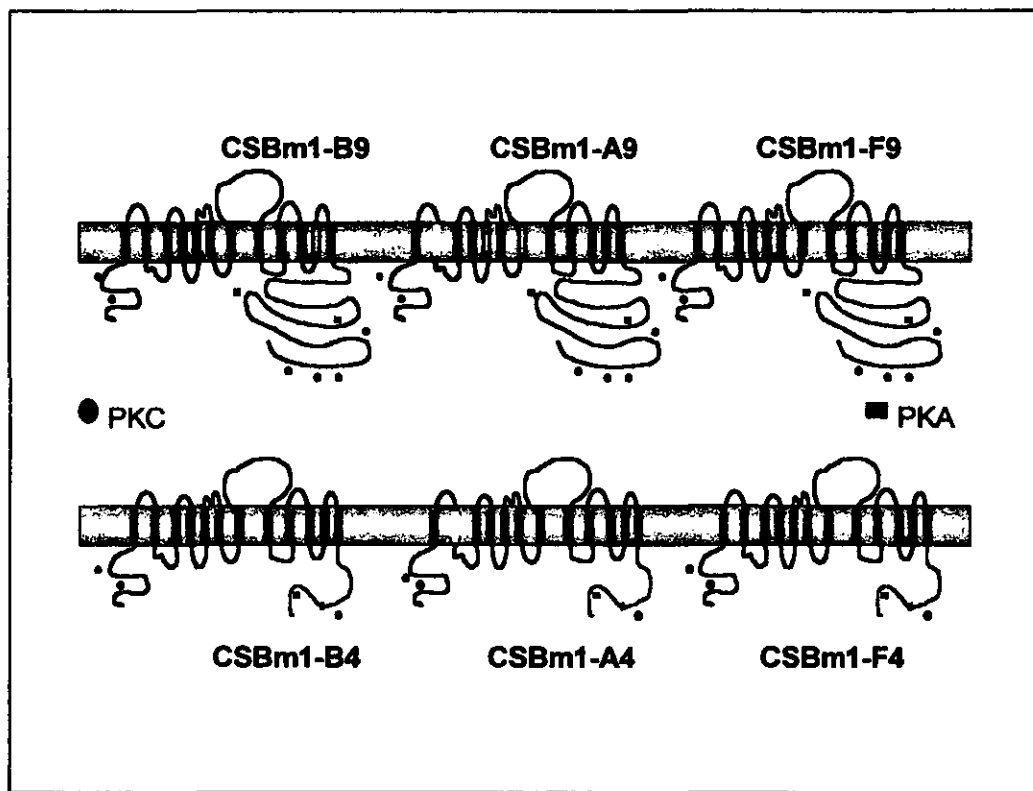


Figura 4. Isoformas del cotransportador de  $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$  apical sensible a bumetanida (CSB1; 113).

Existen dos tipos diferentes de empalme alternativo que producen diferentes isoformas de CSB1. Uno de ellos codifica para 31 aminoácidos que forman la mayor parte del segundo segmento transmembrana y el asa citoplásmica que lo une con el tercer segmento, dando las isoformas A, B y F. El otro empalme genera dos isoformas de CSB1 con diferente segmento carboxi-terminal (8,9).

El CSB2 (Slc12a2) fue clonado originalmente de la glándula rectal del tiburón y luego del humano y ratón. El ARNm de CSB2 se expresa en diferentes tejidos y células, incluyendo el riñón. En la corteza, CSB2 fue localizado en las células granulares productoras de renina y en las células del músculo liso vascular de la arteriola aferente, en el glomérulo y en el mesangio. Debido a la expresión cortical de CSB2 y la expresión de CSB1 en la mácula densa no es de extrañar que la furosemida bloquee tanto al sistema de retroalimentación tubuloglomerular como module la secreción de renina. El CSB2 también se encuentra expresado en las membranas basolaterales de las células intercalares de tipo A (que secretan ácido) del túbulo colector de la rata y en las membranas basolaterales a lo largo del tercio terminal del conducto colector papilar del ratón. Estudios cinéticos sugieren que el orden de unión de los iones es con el sodio uniéndose primero, seguido de un cloro y posteriormente el potasio, para finalmente unirse el segundo cloro. Los diuréticos de asa como la bumetanida parecen unirse en el sitio del segundo cloro o cerca de éste en la proteína, aunque la unión de la bumetanida depende de la presencia de los tres iones (10). Sin embargo CSB1 y CSB2 muestran diferentes afinidades ( $K_m$ ) y constantes de inhibición para bumetanida ( $K_i$ ;11).

## MÁCULA DENSA

La mácula densa es una placa epitelial de células poligonales con un núcleo denso que se encuentra en la porción final del asa de Henle. Las células de la mácula densa constituyen el componente tubular del aparato yuxtaglomerular. Estas células mantienen un contacto regular con el mesangio extraglomerular y ocasionalmente un contacto directo con las arteriolas glomerulares. Las células de la mácula densa pueden reconocer la concentración de NaCl tubular, la cual a este nivel refleja el balance corporal de sodio, así como su incremento durante la expansión de volumen y su disminución en la reducción de volumen. Las células de la mácula densa, al actuar como mediadores entre el túbulo renal y las células

musculares lisas/células granulares productoras de renina de la arteriola glomerular aferente, tienen dos efectos establecidos. A corto plazo, la mácula densa reconoce cambios rápidos en la concentración de cloruro de sodio para ajustar el tono de la arteriola aferente, vía un mecanismo de retroalimentación túbulo-glomerular cuya acción a su vez, estabiliza la descarga de cloruro de sodio al túbulo distal con una respuesta en el tiempo en el rango de minutos (12). A largo plazo, las células de la mácula densa responden a un cambio crónico en el NaCl, transmitiendo una señal intracelular para un cambio de secreción de renina; por lo tanto, ajustando la generación de la angiotensina II y aldosterona a un nivel que es apropiado para el mantenimiento de la homeostasis del sodio.

### TÚBULO CONTORNEADO DISTAL

En el riñón de los mamíferos, el túbulo contorneado distal (TCD) está considerado como el segmento de la nefrona que se encuentra localizado entre la mácula densa y el túbulo conector. Este segmento tiene una longitud de  $1.15 \pm 0.05$  mm en la rata adulta. Es responsable de la reabsorción del 5 al 10% del sodio y el cloro filtrado en condiciones normales y participa importantemente en la secreción de potasio. Está conformado por células de mayor altura que las existentes en el asa ascendente de Henle, y presentan una extensa amplificación de la membrana celular basolateral (esta amplificación definida como el cociente del área de la membrana basolateral y el área de la membrana apical;13). La amplificación, el doble en la rata y en el conejo, resulta de la extensa formación de procesos laterales; estos procesos muestran amplias zonas de interacción célula-célula. Encerradas dentro de estos procesos basolaterales se encuentran mitocondrias, lo cual da a estas células una apariencia de empalizada. El túbulo contorneado distal contiene la mayor cantidad de mitocondrias por unidad de longitud que cualquier otra célula a lo largo de la nefrona. En la porción basal de la célula, los procesos laterales se dividen en crestas que contienen cúmulos de filamentos, se postula que sirven para anclar las células a la membrana basal. El núcleo celular se encuentra uniformemente localizado muy cerca de la superficie apical. Las

mitocondrias no se encuentran interpuestas entre el núcleo y la membrana apical pero llenan la región perinuclear. La membrana apical está caracterizada por numerosas microvellosidades cortas (13). De acuerdo con la alta densidad de mitocondrias y la gran amplificación de la membrana basolateral, la actividad de la enzima  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$  es la más alta que existe a lo largo de toda la nefrona (14,15). En el último tercio del túbulo contorneado distal del humano, rata y ratón, aunque no en el conejo, se encuentran células intercalares. Estas células tienen una apariencia redondeada con membranas apicales mostrando abundantes microproyecciones; sus superficies laterales se adhieren a las células contiguas mediante desmosomas y su núcleo se encuentra en el polo basal.

Debido a la potente capacidad de reabsorción de  $\text{NaCl}$  del asa ascendente de Henle junto con una impermeabilidad al agua, el fluido tubular distal inicial es hipotónico ( $\sim 100$  mOsm/kg  $\text{H}_2\text{O}$ ;16). La concentración de  $\text{NaCl}$  en el túbulo contorneado distal es de 30 a 150 mM y el pH es de 6.57 a 7.41. Si se supone una concentración luminal en el túbulo contorneado distal de  $\text{NaCl}$  de 50 mM y concentraciones intracelulares de 15 mM, las fuerzas directrices serían:  $\text{Na}^+=+102$  mV (+ indicando captación de  $\text{NaCl}$ ) y  $\text{Cl}^-=-38$  mV. El potencial neto sería de +64 mV, favoreciendo el ingreso de  $\text{NaCl}$ . Cuando la descarga de sodio en el túbulo contorneado distal es aumentada agudamente, el transporte de sodio también se ve directamente aumentado, con una reabsorción del 80% del sodio de la carga (17). El potencial de membrana en el túbulo contorneado distal está orientado con el lumen negativo con respecto al intersticio, con valores aproximados de  $-90$  mV, aunque la magnitud del voltaje transepitelial, medido *in vivo* aumenta de la porción proximal al segmento más distal, iniciando con un voltaje transepitelial cercano al cero y a medida que se avanza por el túbulo se encuentran valores más negativos.

Las vías de transporte de sodio y cloro a través del túbulo contorneado distal de los mamíferos han sido investigadas usando técnicas funcionales, ópticas, electrofisiológicas, inmunológicas, moleculares y con radioligandos (13). Durante mucho tiempo, se ha reconocido la interdependencia para el transporte de sodio y cloro existente en una gran variedad de células, y el estudio del transporte

de sodio y cloro en este segmento se facilitó gracias al descubrimiento de un sistema similar en la vejiga urinaria del lenguado de invierno. En 1975, Renfro (18) reportó la existencia del transporte de cloruro de sodio en la vejiga urinaria del lenguado de invierno (*Pseudopleuronectes americanus*); este transporte no altera el voltaje transmembrana, el flujo neto de sodio y cloro en este tejido es igual y presenta completa interdependencia para estos iones, es independiente de la concentración de potasio, el transporte de sodio no se inhibe por altas concentraciones de amilorida, inhibidor del canal de sodio, ni por el estilbene disulfónico (DIDS), un inhibidor de los canales de cloro. De igual manera, al inhibir a la anhidrasa carbónica no se produce una disminución en el transporte de sodio y cloro en este tejido, lo cual va en contra de la idea de que el transporte sea debido a la acción sincrónica de los contratransportadores paralelos de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ . Asimismo bumetanida 0.1 mM no tiene efecto sobre el transporte de cloro y sodio en este tejido y tanto la hidroclorotiazida como la metolazona inhiben casi completamente el transporte de sodio y cloro (19).

La deducción de que un transporte electroneutro de sodio y cloro como el descrito en el lenguado de invierno operaba en el túbulo contorneado distal pudo hacerse gracias a una diversidad de trabajos de diferentes laboratorios. Inicialmente, Kunau y col. (20), midiendo concentraciones de cloro mediante micropunción en el túbulo proximal, y en el inicio y término del túbulo distal, demostraron que el sitio de acción de la clorotiazida es el túbulo contorneado distal. En 1984, Velázquez y col. (21) evidenciaron una interdependencia de transporte entre el sodio y el cloro en el túbulo contorneado distal. Este transporte es independiente de  $\text{K}^+$ , y estos autores también describen las constantes cinéticas aparentes. Cuando la concentración luminal de sodio es de ~9 mM, la absorción de cloro es la mitad de la máxima y cuando la concentración de cloro luminal es de ~12 mM la absorción de sodio es la mitad de la máxima. Este transporte no es debido a la función sincrónica de los intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  o al cotransporte de  $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ , además de ser insensible a la furosemida y sensible a las tiazidas. En 1988, Beaumont y colaboradores, utilizando ensayos de unión de metolazona tritiada a membranas de riñón de rata,

reportan la unión de la metolazona tritiada a dos sitios, uno de alta afinidad ( $K_d=4.27$  nM) y otro de baja afinidad ( $K_d=289$  nM). La unión de la metolazona $^{[3]H}$  al sitio de baja afinidad fue desplazada sólo por meticlotiazida y politiazida de las doce diferentes tiazidas utilizadas, además de que sí fue desplazada por drogas relajantes musculares y antagonistas de calcio; mientras que, la unión de la metolazona $^{[3]H}$  al sitio de alta afinidad fue desplazada por todas las tiazidas utilizadas y no por otros compuestos, por lo que a este último sitio se le consideró como el receptor de tiazidas. El sitio de alta afinidad fue localizado únicamente en la corteza renal y los haluros compiten por la unión a este sitio (22).

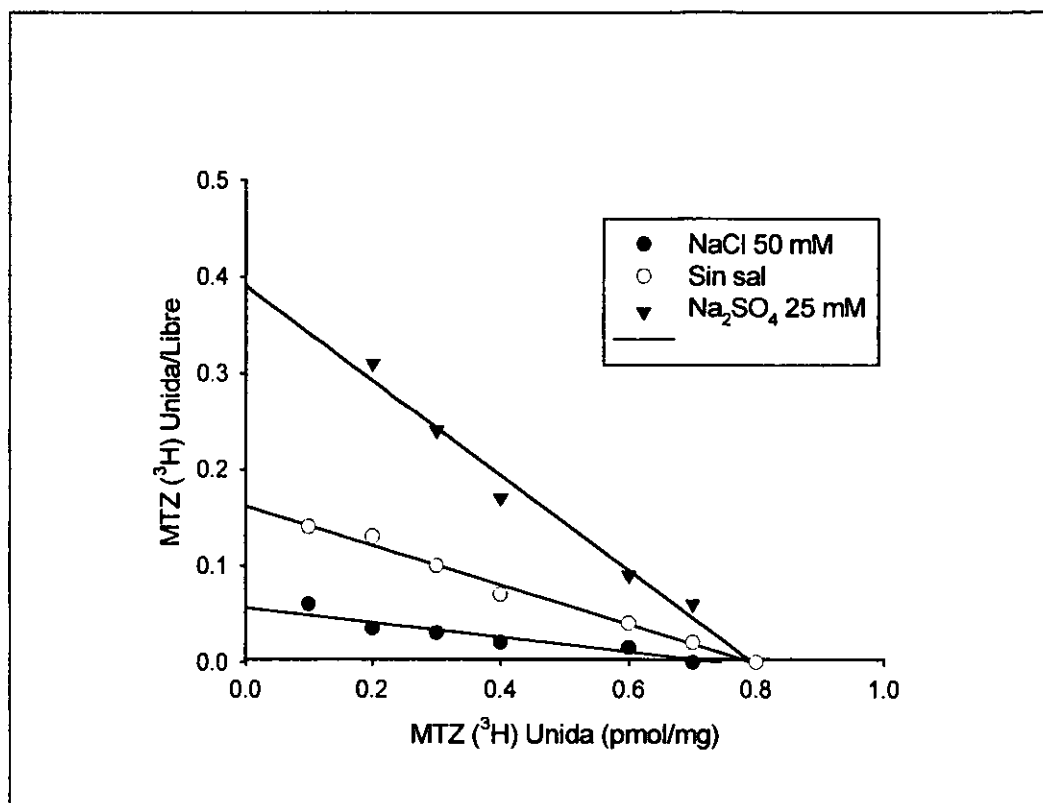


Figura 5. Gráfico de Scatchard mostrando la unión de metolazona tritiada a membranas renales de rata, en ausencia o presencia de sales de sodio (23).

Utilizando así mismo ensayos de unión, Tran y col.(23) encontraron que al incrementar la concentración extracelular de sodio (50 mM en forma de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) se aumenta la afinidad de la metolazona tritiada unida a membranas de corteza renal de rata en ~2.6 veces (disminuye la  $K_d$  de  $3.56\pm 0.15$  a  $1.32\pm 0.11$  nM), mientras que el aumento en las concentraciones extracelulares de cloro (50 mM



de NaCl) disminuyen la afinidad en ~2.6 veces (aumento de la  $K_d$  a  $9.27 \pm 1.11$  nM). Estas diferencias en la afinidad ocurren sin encontrarse cambios en el número máximo de sitios de unión. Estos efectos pueden observarse en el gráfico de Scatchard de la figura 5.

Mediante esta metodología y sobre la base de sus resultados, Tran y col. propusieron un modelo de transporte con dos sitios de unión. Uno es selectivo para sodio y el otro reconoce al cloro y a la metolazona, en una forma mutuamente excluyente y competitiva. La ocupación del sitio del sodio aumenta la afinidad del segundo sitio por cloro o metolazona. El modelo propuesto por Tran y col. fue considerado válido hasta la realización del presente trabajo y se muestra gráficamente en la figura 6.

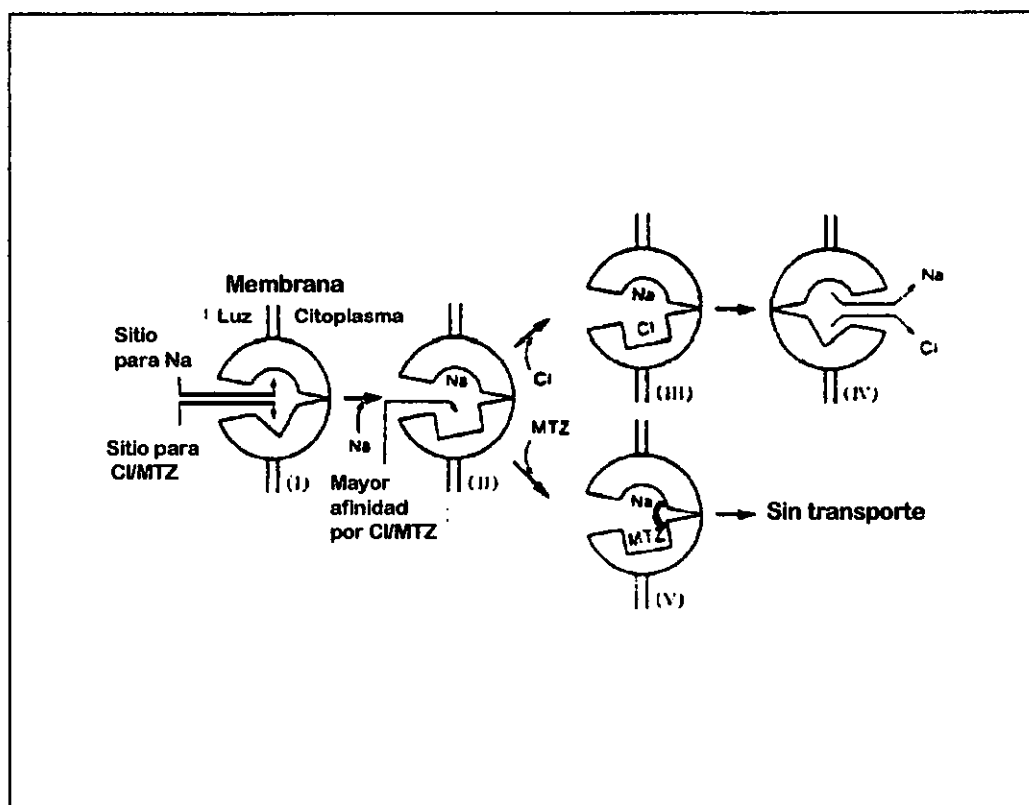


Figura 6. Modelo de transporte de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  del transportador sensible a tiazida propuesto por Tran y col. (23).

Posteriormente, Ellison y col. (24) solubilizaron e iniciaron la purificación del sitio de unión de alta afinidad de metolazona tritiada en corteza renal de conejo obteniendo una banda de 185 KDa.

La identificación molecular del transportador la llevaron a cabo Gamba y col. (25), quienes utilizando una estrategia de expresión funcional clonaron al cotransportador de sodio-cloro sensible a tiazidas a partir de ARNm de vejiga de lenguado de invierno. La secuencia de ARNm de 3.7 kb con un marco abierto de lectura de 3,069 pb predice una proteína de 1,023 aminoácidos, con una masa calculada de 112 KDa.

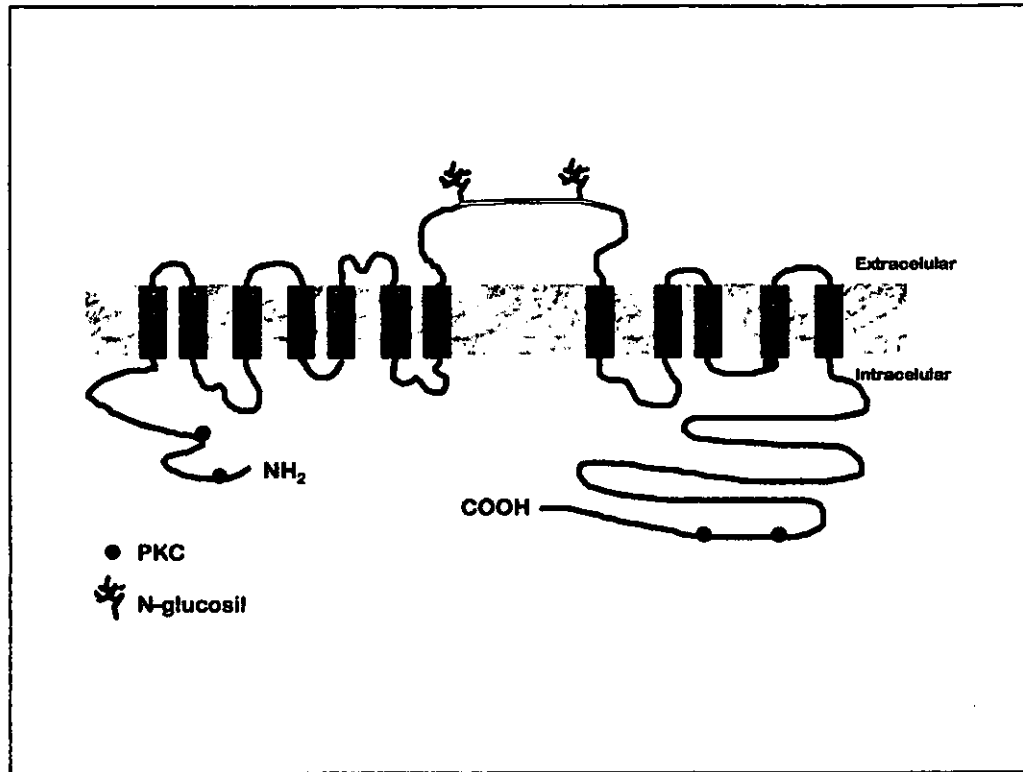


Figura 7. Topología básica del cotransportador de Na<sup>+</sup>:Cl<sup>-</sup> sensible a tiazidas (CST;6).

El análisis de hidropatía de esta secuencia mediante el método de Kyte-Doolittle (26) predice un patrón con una región hidrofóbica central entre dos extremos hidrofílicos. La región central hidrofóbica correspondería a doce posibles segmentos transmembrana con una larga asa extracelular entre los dominios transmembrana 7 y 8. Las regiones hidrofílicas corresponderían a los extremos amino y carboxilo terminales de la proteína, ambos situados quizá intracelularmente con un segmento carboxiterminal largo de aproximadamente 450 aminoácidos. Se describen cinco sitios potenciales para N-glicosilación, de los cuales tres se encuentran localizados en la región hidrofílica entre los segmentos

transmembrana 7 y 8. Consistente con este hallazgo, se encuentra que la traducción del ARNc de CSTfl mediante microsomas da lugar a una banda proteínica de 121 KDa que se reduce a 112 KDa cuando es tratada con endoglucosidasa H (25).

La expresión tisular de CST en el lenguado de invierno, identificada mediante análisis de 'Northern Blot' a alta astringencia muestra una banda de 3.7 kb que corresponde al ADNc de CSTfl, presente únicamente en la vejiga urinaria. Sin embargo, una segunda banda de menor tamaño (3 kb) fue encontrada en intestino, ovario, músculo esquelético, ojo, cerebro y riñón del lenguado. Funcionalmente, se estimó una  $K_m$  para el sodio de  $25.0 \pm 0.4$  mM y una  $K_m$  para el cloro de  $13.6 \pm 0.2$  mM (25). Este transportador fue el primero en clonarse de una familia génica de cotransportadores electroneutros de cloro-cationes, entre los cuales se encuentran el cotransportador de  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  apical (CSB1) y basolateral (CSB2) y los cotransportadores de  $\text{K}^+\text{-Cl}^-$  (KCC1, KCC2, KCC3 y KCC4).

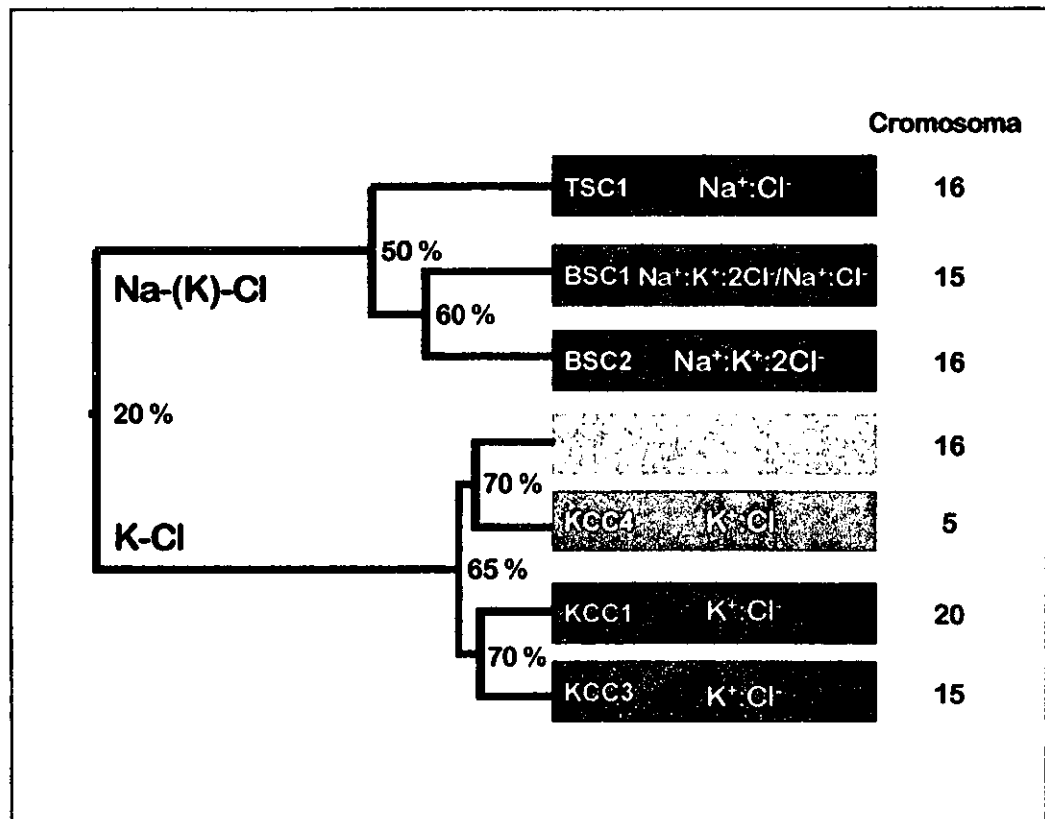


Figura 8. Árbol filogenético de los cotransportadores electroneutros cloro-catiónicos (113).

Posteriormente, una sonda de ARN construida a partir del ADNc del pez fue utilizada para clonar por homología al cotransportador de  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  sensible a tiazida del riñón de rata (CSTr;6), obteniéndose una clona de ~4.4 kb con un segmento codificante de 3,006 pb que predice una proteína de 1,002 aminoácidos. El análisis de hidropatía es similar al del lenguado de invierno, con doce potenciales cruces transmembrana y una región aminoterminal y carboxiterminal citoplásmica. El extremo carboxiterminal está formado por 304 aminoácidos. Mediante 'Northern blot' se encontró este mensaje únicamente en la corteza renal.

La clonación del cotransportador de sodio-cloro sensible a tiazidas de ratón y humano (CSTh;27,111) se realizó por homología mediante hibridización de secuencias de rata y lenguado con una genoteca de riñón murino y humano, respectivamente. Por este medio se aisló un ADNc humano de 55 kb con un marco de lectura de 3063 pb que codifican para 26 exones con un 89% de identidad con el de rata y un 63% de identidad con el del lenguado al nivel de ADN. Se encuentra que existe sólo un gen de CST en el genoma humano identificado en el cromosoma 16q13, una región cercana a los genes de metalotioneina y al gene asociado al síndrome de Bardet-Bidle y que son sinténicas al cromosoma 8 del ratón y 2 de la rata. La secuencia sugiere una proteína de 1,021 aminoácidos y 112 KDa, de entre ellos existen 17 aminoácidos (790-807) que no están en el ADNc de rata y corresponden al exón 20. El patrón de hidropatía es similar al encontrado en el cotransportador en las otras especies aisladas: doce posibles segmentos transmembrana y los segmentos terminales amino y carboxilo citoplásmicos. Los doce dominios transmembrana son los que mantienen el mayor grado de homología de las secuencias de ADNc desde el lenguado hasta el humano. El asa extracelular entre los dominios transmembrana 7 y 8 contiene la secuencia de dos posibles sitios de N-glicosilación, N416 y N426, que se encuentran conservados en todos los CST e incluso en CSB1 y CSB2. Los segmentos hidrofílicos amino y carboxilo terminal muestran algunos sitios posibles de fosforilación por diferentes cinasas de proteína, de entre ellos la Ser953, un sitio consenso para la proteína cinasa C (PKC), se encuentra

conservada en todos los CST. La Ser804 se encuentra en los 17 aminoácidos presentes en el CST de lenguado y humano, pero que están ausentes en el CST de rata. La expresión del ARNm de CST humano analizado por medio de 'Northern blot' en tejidos tales como corazón, cerebro, placenta, pulmón, hígado, músculo esquelético, riñón y páncreas mostró ser riñón específico.

El cotransportador de sodio-cloro sensible a tiazida (CST) ha sido localizado exclusivamente en la membrana apical del túbulo contorneado distal mediante hibridación *in situ* (29,30), RT-PCR de nefronas simples (31) e inmunohistoquímica (32-36). Incluso, el análisis estructural fino mostró al cotransportador (CST) en la membrana celular apical y en vesículas citoplásmicas subapicales en esta región de la nefrona (33). Realizando estudios de colocación con un anticuerpo dirigido contra el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ , se detectó una heterogeneidad antes no apreciada a lo largo del túbulo contorneado distal de la rata, encontrándose que un primer segmento del túbulo expresa CST, pero no al intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ , mientras que en el segundo segmento se encuentran expresadas ambas proteínas (29). El intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^+$  se expresa en la membrana basolateral de las células del túbulo contorneado distal de la rata, ratón y humano donde colocaliza con la proteína que une calcio: calbindina  $\text{D}_{28\text{K}}$  (29,32,37,38). Es ampliamente conocido que los diuréticos que afectan la función del túbulo contorneado distal estimulan el transporte de  $\text{Ca}^{++}$  a través de la membrana basolateral hacia el intersticio, y la expresión de ambas proteínas en el segundo segmento del túbulo contorneado distal apoya estos hallazgos fisiológicos. De igual forma, se ha localizado histoquímicamente al sensor extracelular de  $\text{Ca}^{++}$  en las membranas basolateral y apical de las células del túbulo contorneado distal (39) y el hallazgo de localizarlo junto con CST en vesículas subapicales podría sugerir un papel modulador del  $\text{Ca}^{++}$  en el intercambio proteico de CST desde y hacia la membrana plasmática (40).

Con todos estos datos, el modelo actual de reabsorción de NaCl en el túbulo contorneado distal es el siguiente: nuevamente la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa basolateral dirige el proceso de reabsorción de NaCl: el  $\text{Na}^+$  es transportado a través de la membrana luminal por el cotransportador  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  sensible a tiazida

(CST) y, posteriormente, es bombeado hacia afuera en la membrana basolateral por la  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$ . El  $\text{Cl}^-$  deja la célula por vía basolateral, probablemente por medio de un cotransportador de  $\text{KCl}$ . La absorción de calcio a este nivel se aumenta cuando la absorción de  $\text{NaCl}$  es bloqueada por tiazidas, aún no es claro el mecanismo por el cual las tiazidas afectan la reabsorción de calcio.

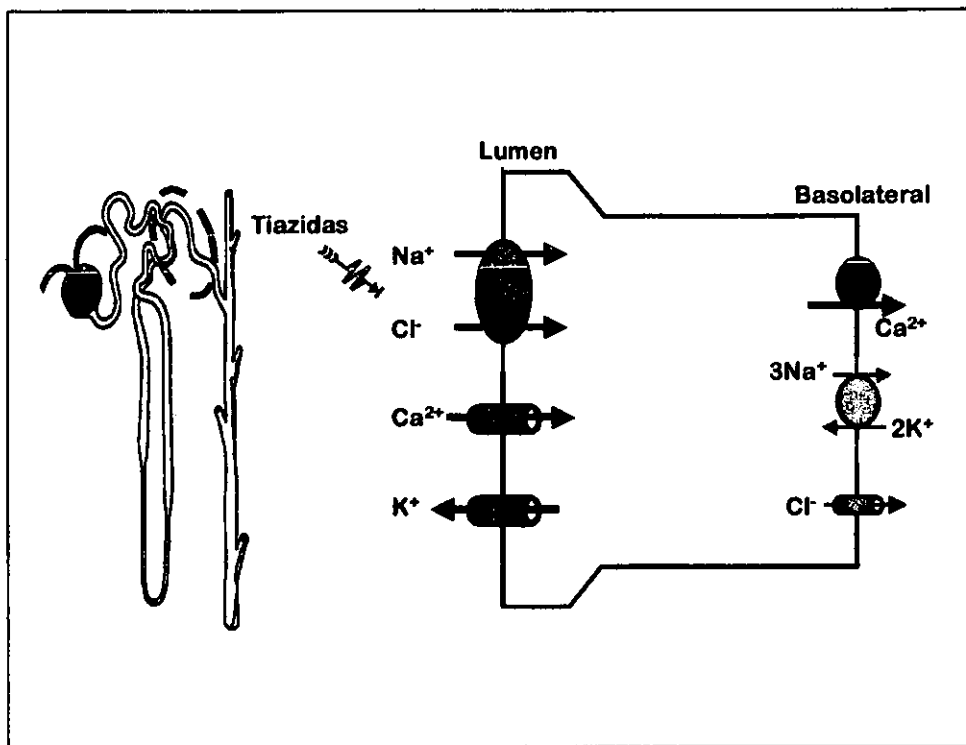


Figura 9. Fisiología de la reabsorción de sal y calcio en el túbulo distal (113).

## REGULACIÓN DEL TÚBULO CONTORNEADO DISTAL

El túbulo contorneado distal reacciona muy eficientemente a cambios en el volumen líquido extracelular y descarga de sal. Incrementos crónicos en la descarga tubular de  $\text{NaCl}$  aumentan el número y el tamaño de las células del túbulo contorneado distal, el número de receptores para diuréticos tipo tiazida, la actividad de la  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$  basolateral y la capacidad de transporte (41-43,53). Estos cambios ocurren aún cuando las concentraciones de glucocorticoides y mineralocorticoides se mantienen constantes (44).

Las hormonas mineralocorticoides contribuyen importantemente a mantener la homeostasis del sodio bajo condiciones normales y patológicas. Aunque los receptores para hormonas glucocorticoides están presentes a través de toda la nefrona, los receptores mineralocorticoides se expresan principalmente en los segmentos distales de la nefrona. Los efectos evidentes de los mineralocorticoides en las células principales sugieren que los mineralocorticoides actúan predominantemente a lo largo del conducto colector y no en el túbulo contorneado distal. Sin embargo, en estudios posteriores, utilizando túbulos renales de conejo disecados se detectó unión mínima de aldosterona tritiada a segmentos del túbulo contorneado distal. Cuando la unión fue examinada por hibridación *in situ*, se detectó unión a lo largo del túbulo contorneado distal y de la porción gruesa del asa de Henle pero a concentraciones de aldosterona mayores (1.5 a 20 nM) a las utilizadas en el conducto colector. Resultados similares fueron obtenidos en ratas, en los cuales la unión de aldosterona[ $H^3$ ] a segmentos del túbulo contorneado distal fue detectada a concentraciones de 2 nM pero no a 0.2 nM, lo cual sugiere un menor número o menor afinidad de estos receptores en túbulo contorneado distal en relación al conducto colector (46). Después de la clonación del receptor de esteroides ha sido posible localizar receptores de mineralocorticoides a escala molecular. Anticuerpos generados en contra de un péptido derivado de la secuencia del receptor de mineralocorticoides fueron utilizados para la inmunolocalización del receptor. De esta forma, se situó al receptor en el túbulo contorneado distal, el túbulo conector y el conducto colector de rata (48), humano (47) y conejo (49).

Datos funcionales y moleculares más recientes confirman la importancia de las hormonas mineralocorticoides en la regulación del transporte de NaCl por el túbulo contorneado distal. Las hormonas mineralocorticoides y glucocorticoides aumentan el número de sitios de unión a metolazona[ $H^3$ ] cuando son administradas a animales adrenalectomizados (50,51). La combinación de glucocorticoides y mineralocorticoides aumenta el número de receptores más que cada hormona por sí sola, lo cual sugiere que ambas hormonas actúan por vías diferentes. Velázquez y col. (51) mostraron que las hormonas mineralocorticoides

estimulan fuertemente la actividad del cotransportador de  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  sensible a tiazida. En estos experimentos el transporte de  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  sensible a tiazida fue apenas perceptible en ratas adrenalectomizadas y dosis altas, aunque en rango fisiológico, de aldosterona o dexametasona aumentaron la capacidad de transporte más de veinte veces. Recientemente, se demostró que la aldosterona aumenta la expresión del cotransportador de  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  sensible a tiazida (CST), determinado por 'Western blot' e inmunocitoquímica de corteza renal de rata (52). Los efectos de la aldosterona para aumentar la expresión de la proteína de CST fueron observadas tanto con un volumen líquido extracelular alto (infusión de aldosterona) como con uno bajo (restricción de NaCl). Estos datos indican que la abundancia y la actividad de CST son reguladas por las hormonas adrenales, niveles altos de hormonas glucocorticoides o mineralocorticoides aumentan la actividad de transporte sensible a tiazida.

La especificidad de la aldosterona es mantenida en los tejidos blanco gracias a la acción metabólica de la enzima  $11\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa. Las hormonas glucocorticoides y mineralocorticoides endógenas se unen al receptor mineralocorticoide con igual afinidad. Las hormonas glucocorticoides circulan normalmente a concentraciones que son cien a mil veces mayores que las concentraciones de hormonas mineralocorticoides. Sin embargo, en células blanco de mineralocorticoides la  $11\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa metaboliza las hormonas glucocorticoides dejando los mineralocorticoides intactos. Esta enzima,  $11\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa, colocaliza con el cotransportador de  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  sensible a tiazida (CST) al nivel proteico en el túbulo distal de rata (30) y en el ámbito del ARNm en el conejo (31).

La incorporación de NaCl por la dieta es un poderoso determinante de los niveles de aldosterona circulante y aunque los efectos de la aldosterona en la abundancia y actividad de CST sugieren que el NaCl en la dieta puede regular la abundancia y actividad de CST, estos efectos no han sido consistentes. En ratas, la restricción en la dieta de NaCl aumenta tres veces el transporte de  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  sensible a tiazida y dos veces la expresión de la proteína (52,53), aunque la restricción en la dieta no muestra un incremento en el número de sitios de unión a



metolazona en la corteza renal de rata ni aumento en el ARNm de CST (54,55). Con la perspectiva anterior, Reilly y Ellison sugieren una hipótesis para la regulación del transporte iónico en el túbulo distal del riñón de rata: las hormonas esteroides adrenales aumentan la actividad del cotransportador de  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  sensible a tiazida (CST) al menos en parte por un aumento en la expresión proteica. Esta acción de las hormonas mineralocorticoides puede predominar a lo largo del segundo segmento del túbulo contorneado distal, un segmento que expresa niveles significativos de  $11\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa. Como en el conducto colector el efecto de las hormonas mineralocorticoides puede ser aumentado cuando la descarga luminal de NaCl es alta. Así, los efectos de la restricción dietética (aldosterona alta/descarga distal baja de NaCl) en la abundancia de CST se ven disminuidos comparados con los efectos de la administración exógena de mineralocorticoides (aldosterona alta/alta descarga distal de NaCl). Reilly y Ellison basados en la ausencia de efecto de la restricción dietética de NaCl en los niveles de ARNm, proponen que los efectos de las hormonas mineralocorticoides en la abundancia proteica de CST puedan ocurrir predominantemente al nivel de síntesis proteica o de la estabilidad y recambio de la proteína.

Los estrógenos estimulan la retención de sodio en humanos. Se ha descrito una mayor sensibilidad a los diuréticos tipo tiazida en animales hembra y esto ha correlacionado con una mayor densidad de unión de metolazona [ $\text{H}^3$ ] en riñones de ratas hembra comparadas con los machos. Así mismo la ovariectomía ha mostrado reducir el número de receptores para diuréticos del tipo tiazida en la corteza renal (50) lo que produjo una simplificación apical de la membrana plasmática del túbulo contorneado distal. Estos cambios fueron asociados con una reducción de la cantidad de proteína apical de CST (34). De estos resultados se ha sugerido que los estrógenos pueden estimular el transporte de sodio aumentando la densidad de CST en el túbulo contorneado distal.

El tratamiento diurético crónico produce importantes efectos en la estructura del túbulo distal y en la función del CST. Dentro de los efectos estructurales, la

infusión crónica de furosemida en ratas causa hipertrofia e hiperplasia de las células del túbulo contorneado distal. La hipertrofia inducida por diuréticos de asa está asociada a un aumento en la amplificación de la membrana celular basolateral y en la actividad de la Na-K-ATPasa. Continuando con el efecto funcional producido por la infusión con furosemida durante una semana, este produce un aumento de aproximadamente tres veces la actividad del CST. Estos efectos de la infusión crónica de diuréticos en la morfología celular y el transporte iónico ocurrieron aún cuando los niveles de glucocorticoides y mineralocorticoides se mantuvieron constantes. En cuanto a los efectos del tratamiento crónico con furosemida al nivel transcripcional, se encuentran datos iniciales que muestran que al inducir la furosemida un aumento en la carga distal de NaCl, se produce un incremento en la expresión del ARNm del CST (29). Aunque en otro reporte la privación de agua aumentó la expresión del ARNm del CST, mientras que la administración de furosemida a dosis bajas que no llevó a deshidratación no tuvo efecto sobre la expresión del ARNm del CST (55). Por lo anterior, se sugiere que el efecto de la furosemida sobre la expresión del CST sea debido a la deshidratación producida por el diurético más que a un efecto directo. Por otra parte, la infusión crónica de diuréticos de asa aumenta la expresión del factor de crecimiento parecido a insulina (IGF) y a la proteína que une al factor de crecimiento parecido a insulina (IGFBP) en el túbulo distal (56) por lo que se propone que los cambios morfológicos que ocurren durante la infusión crónica de diuréticos de asa resulta en parte de la activación de factores de crecimiento.

Ahora bien, con la infusión crónica de diuréticos tiazídicos a ratas, se reduce significativamente la capacidad de reabsorción de sodio y cloro por el túbulo distal. Esta reducción está asociada con un aumento en el número de sitios de unión a metolazona[ $H^3$ ] (42,57). Loffing y col. (37), mostraron que la infusión crónica de tiazida en ratas produjo apoptosis de las células del túbulo contorneado distal y destrucción del epitelio, asociado con una disminución en la cantidad de proteína de CST determinada por 'Western blot'. En función a esto, estos autores postulan que las células del túbulo contorneado distal son dependientes de la entrada de sodio, vía la membrana apical, para mantener su integridad funcional y

estructural, y que los diuréticos de tipo tiazida conducen a cambios estructurales al bloquear la vía más importante de entrada de sodio (37).

La absorción de NaCl en el túbulo contorneado distal es estimulada por  $\beta$ -agonistas, calcitonina, bradicinina y glucagón. Han sido localizados receptores hormonales para  $\beta$ -agonistas, calcitonina y bradicinina en el túbulo contorneado distal. La implicación fisiológica de la bradicinina no se conoce (61).

## TIAZIDAS

Los diuréticos son agentes terapéuticos que aumentan la excreción urinaria de sodio y agua al mismo tiempo que pueden reducir el volumen extracelular. Los grupos de diuréticos difieren ampliamente en su farmacología y farmacocinética. Entre los grupos de diuréticos más utilizados en clínica para el manejo de estados edematosos, hipertensión e hipercalciuria se encuentran las tiazidas.

Los estudios iniciales para la síntesis de tiazidas fueron realizados en 1943 por un grupo de químicos orgánicos y farmacólogos de Sharp and Dohme Inc., en su búsqueda por obtener un diurético derivado de sulfonamidas que pudiese movilizar el edema con mayor potencia que los inhibidores de la anhidrasa carbónica existentes, y con menor toxicidad que los mercuriales utilizados ampliamente hasta entonces. En 1949 Schwartz reportó que el efecto diurético de la sulfanilamida en pacientes con insuficiencia cardiaca congestiva era debido a un aumento en la excreción urinaria de bicarbonato de sodio. Modificando la estructura de la sulfanilamida, se obtuvo una serie de compuestos que fueron desarrollados y estudiados en sus propiedades natriuréticas y cloruréticas. La primera droga, el dirnato, fue probada exitosamente en animales, más no fue efectivo en la práctica clínica. En 1957 los químicos orgánicos Frederick C. Novello y James M. Sprague (62) hicieron la primera descripción de un derivado benzotiadiazina, la 6-cloro-7-sulfamil-1,2,4-benzotiadiazina-1,1-dióxido o clorotiazida, seleccionada para ensayos clínicos. Este nuevo compuesto aumenta

la excreción de sodio y cloro en cantidades casi iguales con mínima pérdida de bicarbonato, además de ser efectivo y seguro en dosis orales. Este descubrimiento marcó un hito en el manejo del edema (63).

Los diuréticos que tienen un mecanismo de acción similar a las tiazidas, es decir, inhibición de la reabsorción tubular distal de cloruro de sodio, incluyen a las sulfonamidas con un anillo dióxido-benzotiadiazina y a los diuréticos sulfonamida que están farmacológicamente relacionados y que difieren en el anillo heterocíclico, tales como metolazona (7-cloro-1,2,3,4-tetrahidro-2-metil-4-oxo-3-otolil-6-quinazolinsulfona-mida), quinetazona, indapamida y clortalidona (quinazolinas) y al diurético derivado de la furopiridina conocido como cicletanina.

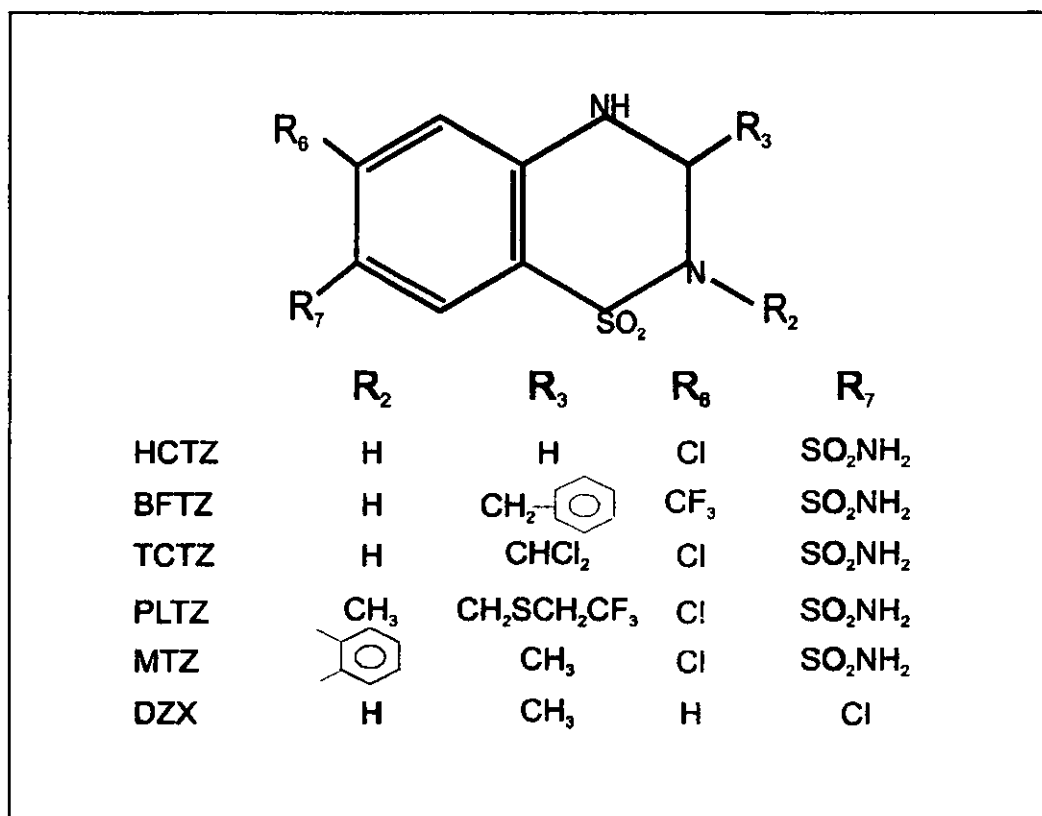


Figura 10. Estructura química de las diversas tiazidas (114).  
HCTZ= hidroclorotiazida, BFTZ=bendroflumetiazida, TCTZ=triclorotiazida, PLTZ= politiazida, MTZ= metolazona, DZX= diazóxido.

Muchos de los diuréticos tiazídicos mantienen el grupo lateral sulfoamílico unido al anillo de benceno, el cual le confiere actividad inhibitoria sobre la anhidrasa carbónica. El orden de potencia para inhibir la anhidrasa carbónica por

los diuréticos tiazídicos mas comúnmente usados es: clortalidona>benzotiazida>politiazida>clorotiazida>hidroclorotiazida>bendroflumetiazida. Algunas tiazidas reducen la reabsorción tubular proximal de sodio gracias a su efecto sobre la anhidrasa carbónica.

Las tiazidas se encuentran disponibles en muchas preparaciones, solas o en combinación. Todas son usadas en los mismos requerimientos clínicos y pueden ser intercambiadas, la única diferencia entre estas drogas es su potencia y la duración de su acción.

Inicialmente se creyó que la clorotiazida actuaba al nivel de la rama ascendente del asa de Henle. En 1975 Kunau y col. (20) demostraron que el sitio de acción de la clorotiazida es el túbulo contorneado distal. Estudios de microperfusión *in situ* (64) corroboraron que las tiazidas causan inhibición del transporte de NaCl en el túbulo contorneado distal. Más aún, se describió por Beaumont y col. un receptor de alta afinidad para las tiazidas en la corteza renal (22) y la unión de las tiazidas se localiza en el túbulo contorneado distal (65). Con la clonación del cotransportador de sodio-cloro (CST;25) por medio de su sensibilidad a las tiazidas, se ha considerado que este es el principal sitio de acción de los diuréticos tipo tiazida. Hasta antes de la realización del presente trabajo se creía que las tiazidas inhibían al cotransportador (CST) compitiendo por el sitio de unión del cloro (23). Ahora se acepta que el sitio primario de acción de las tiazidas es el túbulo contorneado distal, mientras que el túbulo proximal puede representar un sitio secundario de acción.

Las tiazidas causan una diuresis de NaCl y potencian la descarga distal de Na<sup>+</sup> facilitando la excreción de potasio. El túbulo contorneado distal absorbe solo el 5% del Na<sup>+</sup> filtrado, de tal forma que la eficacia de las tiazidas es limitada. No obstante estas drogas son suficientes y adecuadas para pacientes con estados edematosos ligeros a menos que tengan disfunción renal concomitante. Las tiazidas son ampliamente utilizadas para el tratamiento de edema asociado con enfermedades cardíacas (insuficiencia cardíaca congestiva), hepáticas (cirrosis hepática) y renales (síndrome nefrótico, insuficiencia renal crónica, glomerulonefritis aguda) y en el edema causado por la terapia con

corticoesteroides. Otro de los usos más importantes de los diuréticos tipo tiazida ha sido como agente antihipertensivo, solos o en combinación con otros medicamentos. La administración aguda de una tiazida se ha asociado con una diuresis que induce disminución en el volumen sanguíneo y en consecuencia disminución en la presión sanguínea, sin embargo la disminución en el volumen sanguíneo activa reflejos homeostáticos tales como el sistema renina-angiotensina-aldosterona y al sistema nervioso simpático, los cuales causan un aumento en la reabsorción tubular proximal de sodio y restauración del volumen sanguíneo. El efecto antihipertensivo, sin embargo, se mantiene posiblemente debido a que el uso crónico de las tiazidas causa una disminución de las resistencias vasculares periféricas, cuyo mecanismo de acción es desconocido. Las tiazidas no solo son drogas efectivas administradas solas sino potencian la acción de otras drogas con diferente forma de acción.

Dentro de otros usos clínicos de las tiazidas se encuentra el tratamiento de la hipercalciuria y la osteoporosis. La administración aguda de tiazidas esta asociada con una marcada natriuresis pero solo con un ligero incremento o decremento en la excreción de  $\text{Ca}^{++}$ (66). Basados en estudios de microperfusión *in vivo* en rata, Costanzo y Windhager (64) demostraron que la clorotiazida además de su efecto inhibitorio en la reabsorción de  $\text{Na}^+$  también produce un efecto estimulante en la reabsorción de  $\text{Ca}^{++}$  en el túbulo contorneado distal. La administración de diuréticos tiazidícos a largo plazo produce una franca hipocalciuria que puede ser revertida por el reemplazo con  $\text{NaCl}$ . El efecto hipocalciúrico de las tiazidas parece estar mediado por un mecanismo independiente de la hormona paratiroidea (PTH;67). Existen evidencias clínicas de que las tiazidas pueden ser útiles en la prevención de la pérdida ósea, estudios cruzados y longitudinales de pacientes a los que se les administran tiazidas han mostrado que éstos tienen una mayor masa ósea y menor pérdida ósea que los que no las usan, estudios epidemiológicos indican que la terapia con tiazidas reduce la fractura de cadera en un 30 a 50% (68). Estos efectos se le han atribuido a su acción hipocalciúrica, la cual causa retención de calcio y reduce el

intercambio óseo. Así mismo las tiazidas pueden ser útiles como coadyuvantes en el tratamiento de la hipocalcemia debida a hipoparatiroidismo.

El mecanismo por el cual las tiazidas estimulan la reabsorción distal tubular de  $\text{Ca}^{++}$ , y la naturaleza de la relación entre la reabsorción tubular renal de  $\text{NaCl}$  y la reabsorción tubular renal de  $\text{Ca}^{++}$  aún no se conocen. Se han propuesto tres hipótesis, una de ellas presentada por Walser (69) supone que las tiazidas reducen el voltaje transepitelial (disminuyendo el voltaje negativo luminal), dando como resultado una disminución en el flujo pasivo de  $\text{Ca}^{++}$  en el lumen tubular. Sin embargo, se ha mostrado que las tiazidas tienen poco efecto, sobre la diferencia de potencial transepitelial en el túbulo contorneado distal y la permeabilidad pasiva de este segmento de la nefrona al  $\text{Ca}^{++}$  es significativamente baja. Otro esquema es el propuesto por Constanzo y Windhager (70) quienes sugieren que las tiazidas al inhibir la entrada apical de  $\text{Na}^+$  podrían producir una reducción en la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$ , esta disminución podría inducir la entrada basolateral de  $\text{Na}^+$  a través del intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  basolateral y por lo tanto aumentar el flujo de  $\text{Ca}^{++}$ . El tercer mecanismo propuesto incluye cuatro fases: el bloqueo de la entrada luminal de  $\text{Cl}^-$  por las tiazidas a través del cotransportador de  $\text{Na}^+-\text{Cl}^-$ , el flujo continuo basolateral de  $\text{Cl}^-$  a través de canales de  $\text{Cl}^-$  lo cual resulta en una disminución en la actividad intracelular de  $\text{Cl}^-$ , la reducción del  $\text{Cl}^-$  intracelular hiperpolariza las membranas luminal y basolateral y la hiperpolarización de la membrana aumenta la entrada de  $\text{Ca}^{++}$  vía la membrana luminal por medio de canales de  $\text{Ca}^{++}$  sensibles a dihidropiridina (71).

Debido a que otros haluros son excretados por procesos renales similares a aquellos del  $\text{Cl}^-$ , las tiazidas pueden ser útiles para el manejo de la intoxicación por  $\text{Br}^-$ .

## EFFECTOS ADVERSOS DE LAS TIAZIDAS.

Los efectos adversos de la utilización de las tiazidas son predecibles basados en la farmacología de la droga. Dentro de los efectos adversos en la

hemodinamia y balance electrolítico se encuentran hiponatremia, disminución de volumen, hipotensión, hipocalcemia, hipocloremia, alcalosis metabólica, hipomagnesemia e hipercalcemia.

Aún cuando las tiazidas no ejercen un efecto directo en el transporte de  $K^+$  en el túbulo contorneado distal, estos fármacos están asociados con un aumento en la excreción renal de  $K^+$ , a través de sus efectos al incrementar la descarga de  $Na^+$  al conducto colector, y activando secundariamente la actividad mineralocorticoide. Debido a la capacidad de las tiazidas para inhibir la anhidrasa carbónica, especialmente cuando se administran en dosis altas, pueden inhibir la reabsorción proximal de  $K^+$  de la misma forma que otros inhibidores de la anhidrasa carbónica tales como la acetazolamida; sin embargo este efecto proximal clínicamente tiene poca importancia.

La generación de alcalosis con el uso de las tiazidas es atribuida inicialmente a que el  $HCO_3^-$  se distribuye en un volumen de líquido menor, dando un aumento en la concentración de  $HCO_3^-$ . El mantenimiento de la alcalosis metabólica durante la terapia prolongada con tiazidas tiene varios posibles elementos: el hipoadosteronismo y la continua descarga de  $Na^+$  en la nefrona distal estimula la secreción distal de  $H^+$  y la hipocalcemia estimula la génesis de amonio y la excreción de ácido. El grado de alcalosis producido por tiazidas tiende a ser menos severo que el encontrado en los diuréticos de asa ya que los cambios fisiológicos inducidos por las tiazidas son de menor magnitud.

La reabsorción tubular distal de  $Mg^{++}$  afecta solamente del 5 al 10% del  $Mg^{++}$  filtrado. Las tiazidas administradas en forma aguda estimulan la reabsorción de  $Mg^{++}$  en el túbulo contorneado distal y disminuyen la excreción renal de  $Mg^{++}$ , sin embargo la administración crónica, especialmente si está acompañada de hipocalcemia, produce una reabsorción tubular distal de  $Mg^{++}$  reducida y un aumento en la eliminación del  $Mg^{++}$  acompañada por un potencial de membrana luminal reducido en el túbulo contorneado distal (73). Aunque la terapia prolongada con tiazidas causa una disminución del  $Mg^{++}$  sérico del 5 al 10%, sólo ocasionalmente los pacientes desarrollan hipomagnesemia, si bien la depleción celular de  $Mg^{++}$  puede ocurrir más frecuentemente (74). Los mecanismos exactos



del efecto magnesiúrico de las tiazidas se encuentran aún en debate. Se cree que son preponderantes los mecanismos indirectos; estos efectos indirectos pueden ser secundarios a la alteración del sistema renina-angiotensina-aldosterona, a cambios en la relación PTH-Ca<sup>++</sup>, al tratamiento adicional con otras drogas, a la duración del efecto de la droga y a condiciones subyacentes de la enfermedad de base. Los síntomas de hipomagnesemia incluyen depresión, debilidad muscular, fibrilación auricular y disrritmias cardíacas (75).

Es importante notar que existe un síndrome genético, el Síndrome de Gitelman, el cual es causado por una variedad de mutaciones que dejan al cotransportador de Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> inactivo, y cuyo fenotipo asemeja la farmacología de los diuréticos tipo tiazida.

### SÍNDROME DE GITELMAN

En 1966 Gitelman (76) describió una enfermedad autosómica recesiva manifestada por alcalosis metabólica hipoclorémica, hipocalemia, hipocalciuria e hipomagnesemia que se manifiesta preferentemente en el adulto. Este síndrome fue inicialmente considerado como una variante del síndrome de Bartter.

Bartter y col. en 1962 (77) reportaron en dos niños y un adulto alcalosis metabólica hipoclorémica e hipocalemia. Otras características de este síndrome autosómico recesivo son el aumento en la excreción urinaria de potasio y prostaglandinas, normotensión o hipotensión no obstante un aumento en la actividad plasmática de renina y altas concentraciones séricas de aldosterona además de una relativa resistencia vascular a los efectos sobre la presión sanguínea de la angiotensina II exógena e hiperplasia del aparato yuxtaglomerular. En el síndrome de Bartter, la mayoría de casos se presentan en neonatos, aunque puede presentarse en la niñez y en la vida adulta, existen siempre poliuria y polidipsia además de que frecuentemente se reporta polihidramnios materno con parto prematuro, debidos quizá a un aumento en la producción de orina *in utero*. Algunos de estos niños tienen una apariencia típica

de este síndrome: frente prominente, cara triangular, boca en carpa, ojos grandes y lóbulo de la oreja grande, a más de ello, presentan retraso en el crecimiento. Vómito, fiebre y diarrea se han reportado en algunos casos y se ha descrito una variante neonatal con sordera sensorineuronal. El síndrome de Bartter neonatal puede ser diagnosticado antes del nacimiento midiendo niveles de colesterol y cloro en el líquido amniótico. Un hallazgo común en el síndrome de Bartter neonatal severo es un aumento en la excreción de prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ), por lo que algunos autores han propuesto que sea llamado síndrome de hiperprostaglandinuria  $E_2$ , aunque dado que la diferencia solamente es la severidad del cuadro se ha continuado utilizando la terminología de neonatal.

En contraste con el síndrome de Bartter el síndrome de Gitelman es una enfermedad leve y no presenta sintomatología en la época neonatal. Los pacientes con síndrome de Gitelman no se encuentran clínicamente disminuidos de volumen, y tienen concentraciones de aldosterona plasmática poco elevadas. Muy a menudo los pacientes con síndrome de Gitelman son asintomáticos o solamente refieren malestares neuromusculares intermitentes tales como espasmos musculares, calambres o tetania. La poliuria y polidipsia no se encuentran presentes en el síndrome de Gitelman. En casos esporádicos se ha reportado la presencia de condrocalcinosis.

Bettinelli (78) haciendo un análisis cuidadoso de los hallazgos fenotípicos indicó claramente que el síndrome de Gitelman es distinto del síndrome de Bartter. Este autor diferenció los desórdenes basándose en el metabolismo de los cationes divalentes, mientras que en el síndrome de **Bartter** existe **hipercalciuria** e incluso existe comúnmente nefrocalcinosis medular, en el síndrome de **Gitelman** se presenta **hipocalciuria** (la excreción urinaria de  $Ca^{++}$  en el síndrome de Gitelman tiene cocientes, con relación a la creatinina, de  $<0.20$ ). Por otra parte, en el caso del  $Mg^{++}$  mientras en el síndrome de Bartter las concentraciones séricas de  $Mg^{++}$  se encuentran normales, en el síndrome de Gitelman se encuentran bajas (las concentraciones séricas de magnesio en el síndrome de Gitelman son  $<0.75$  mM).

Dentro de las características sobresalientes de los pacientes con síndrome de Gitelman se encuentra una respuesta natriurética baja a la administración de

tiazidas, pero una natriuresis alta cuando el diurético administrado es furosemida (79), en comparación a pacientes normales.

Debido a que el fenotipo del síndrome de Gitelman se asemeja al uso crónico de diuréticos de tipo tiazida, el gene del cotransportador de  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  sensible a tiazida (CST) fue considerado un gene candidato para este síndrome. En 1996 Simon y col. (27) mostraron un patrón de ligamiento completo del síndrome de Gitelman al locus que codifica para el CST humano. Diecisiete diferentes variantes moleculares fueron identificadas por ellos que predecían alterar la estructura de la proteína codificada. Otros grupos han reportado subsecuentemente mutaciones en el mismo gene que están relacionadas con este desorden. En un reporte preliminar, Simon y col. recolectaron un total de 82 distintas mutaciones que fueron asociadas con síndrome de Gitelman, la mayoría de estas mutaciones fueron cambios no conservativos en aminoácidos que se han mantenido sin alteración a través de la evolución. Hasta la fecha, se han encontrado mutaciones en CST en todos los casos de fenotipo de Gitelman estudiados. De esta forma se ha concluido que este síndrome esta causado por mutaciones en un gene simple.

La identificación del defecto génico responsable del síndrome de Gitelman ha permitido conocer mejor el fenotipo de este síndrome. En general, el síndrome de Gitelman es una enfermedad leve, aunque algunos casos reportados indican la presencia de efectos severos tales como rbdomiolisis hipocalémica. Simon y col. (80) mostraron que los pacientes afectados fueron diagnosticados en una edad promedio de 22.5 años (con un rango de 0.75-65 años). La media de la concentración sérica de  $\text{K}^+$  fue de 2.6 mM (rango 1.0-3.5 mM), el  $\text{HCO}_3^-$  sérico fue de 30.7 mM (rango 22.0-37.4 mM), el  $\text{Mg}^{++}$  fue de 1.2 mM (rango 0.3-1.7 mM) y el radio  $\text{Ca}^{++}$  urinario/creatinina fue de 0.088 (rango 0.0001-0.36). El 83% de los pacientes tuvieron presiones sanguíneas menores del percentil 50 para su edad y sexo y el 51% por debajo del percentil 25. Esto enfatiza que el síndrome de Gitelman puede presentarse a cualquier edad, pero que la **hipocalemia, hipocalciuria e hipomagnesemia** son los hallazgos uniformes de esta

enfermedad. Más aún, ellos sugieren que estos pacientes tienen presiones sanguíneas arteriales menores que los controles normales.

Basados en la herencia autosómica recesiva del síndrome de Gitelman y en los hallazgos fenotípicos del síndrome, Simon y col. (81) postularon que el síndrome de Gitelman resulta de un defecto en el transporte de  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  por el producto génico mutante. En confirmación parcial de esta hipótesis Schultheis y col. (82) detectaron hallazgos fenotípicos similares en el ratón transgénico sin función de CST y el síndrome de Gitelman. Los ratones nulos para CST mostraron una menor excreción urinaria de  $\text{Ca}^{++}$  y concentraciones séricas de  $\text{Mg}^{++}$  más bajas que el ratón silvestre, al mismo tiempo de que la presión sanguínea de los ratones nulos expuestos a una dieta baja de  $\text{Na}^{++}$  fue menor en comparación con los ratones controles. El tamaño y número de células, y el número de mitocondrias en el túbulo contorneado distal se encuentran disminuidas en los ratones nulos en comparación con los ratones control. Sin embargo el pH y  $\text{pCO}_2$  arteriales, así como las concentraciones de aldosterona,  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{K}^+$  séricos se encuentran iguales en los ratones nulos y controles, e incluso los niveles de ARNm no difieren entre los ratones nulos y los silvestres. De esta forma se pueden observar importantes diferencias en el fenotipo entre los ratones que no expresan al CST y el síndrome de Gitelman, entre ellas, la hipocalcemia y la disminución en la presión sanguínea, que se encuentran consistentemente en el síndrome de Gitelman, incluso cuando los pacientes ingieren dietas con cantidades normales de  $\text{Na}^+$ . Mutaciones en muchas regiones del gene de CST han sido reportadas como causantes del fenotipo del síndrome de Gitelman. Kunchaparty y col. (83) compararon las propiedades del CST silvestre de ratón y mutantes de CST equivalentes a mutaciones presentes en pacientes con síndrome de Gitelman mediante expresión funcional en ovocitos de *Xenopus laevis* observándose que mientras la cepa silvestre aumenta la captación de  $^{22}\text{Na}^+$  en aproximadamente siete veces el control, las mutantes captan niveles similares a los controles. Las mutantes estudiadas contenían mutaciones nulas en un sólo aminoácido y dos mutantes truncaban la proteína por 4 y 54 aa. en la porción carboxiterminal.

La identificación de un defecto génico simple como el responsable para la mayoría o todos los casos de síndrome de Gitelman implica que los hallazgos fenotípicos de la enfermedad resultan de la disfunción de esta proteína. La observación de que el gene para el cotransportador de  $\text{Na}^+$ - $\text{Cl}^-$  sensible a tiazidas se expresa predominantemente en el tejido renal implica que todos los hallazgos fenotípicos del síndrome de Gitelman resultan de anomalías de la función renal, mediante mecanismos similares a los expuestos para la administración crónica de tiazidas.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Determinar la relación estructura-función del cotransportador de  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  sensible a tiazidas.

### OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar las características funcionales generales del cotransportador de  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  sensible a tiazidas.
2. Conocer el efecto de las diferentes tiazidas sobre el cotransportador de  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  sensible a tiazidas.
3. Estudiar el papel de la N-glicosilación en la función del cotransportador de  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  sensible a tiazidas.
4. Analizar el efecto de la fosforilación vía proteína cinasa C sobre la función del cotransportador de  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  sensible a tiazidas.

## RESULTADOS

Los resultados se presentan en cuatro diferentes secciones para mayor claridad.

1. Caracterización del cotransportador de  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  sensible a tiazidas. Interacción iónica y diurética
2. Efecto de la cicletanina sobre el cotransportador de  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  sensible a tiazidas.
3. Efecto de la N-glucosilación en la actividad del cotransportador de  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  sensible a tiazidas.
4. Regulación del cotransportador de  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  sensible a tiazidas por proteína cinasa C.

## **CARACTERIZACIÓN DEL COTRANSPORTADOR DE Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> SENSIBLE A TIAZIDAS. INTERACCIÓN IÓNICA Y DIURÉTICA**

### **MATERIALES Y MÉTODOS.**

Los materiales y métodos utilizados para la realización de esta sección se describen en el artículo presentado a continuación.

### **RESULTADOS**

Los resultados de esta sección comprenden la caracterización del cotransportador de Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> sensible a tiazidas, el orden de unión de los iones involucrados y su relación con la tiazida, así como el efecto de la osmolaridad sobre la función del cotransportador. Estos resultados se muestran en el artículo.



# Characterization of the thiazide-sensitive $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ cotransporter: a new model for ions and diuretics interaction

ADRIANA MONROY,<sup>1</sup> CONSUELO PLATA,<sup>1</sup> STEVEN C. HEBERT,<sup>2</sup> AND GERARDO GAMBA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Molecular Physiology Unit, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán and Instituto de Investigaciones Biomédicas, National University of Mexico, Tlalpan 14000 Mexico City, Mexico; and

<sup>2</sup>Division of Nephrology and Hypertension, Department of Medicine, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, Tennessee 37232

Received 12 October 1999; accepted in final form 25 February 2000

**Monroy, Adriana, Consuelo Plata, Steven C. Hebert, and Gerardo Gamba.** Characterization of the thiazide-sensitive  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  cotransporter: a new model for ions and diuretics interaction. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F161–F169, 2000.—The thiazide-sensitive  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  cotransporter (TSC) is the major pathway for salt reabsorption in the apical membrane of the mammalian distal convoluted tubule. When expressed in *Xenopus laevis* oocytes, rat TSC exhibits high affinity for both cotransported ions, with the Michaelis-Menten constant ( $K_m$ ) for  $\text{Na}^+$  of  $7.6 \pm 1.6$  mM and for  $\text{Cl}^-$  of  $6.3 \pm 1.1$  mM, and Hill coefficients for  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  consistent with electroneutrality. The affinities of both  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  were increased by increasing concentration of the counterion. The  $\text{IC}_{50}$  values for thiazides were affected by both extracellular  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$ . The higher the  $\text{Na}^+$  or  $\text{Cl}^-$  concentration, the lower the inhibitory effect of thiazides. Finally, rTSC function is affected by extracellular osmolarity. We propose a transport model featuring a random order of binding in which the binding of each ion facilitates the binding of the counterion. Both ion binding sites alter thiazide-mediated inhibition of transport, indicating that the thiazide-binding site is either shared or modified by both  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$ .

metolazone; distal tubule; osmolarity; salt reabsorption

THE THIAZIDE-SENSITIVE  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  cotransporter is the major  $\text{NaCl}$  transport pathway in the apical membrane of the mammalian distal convoluted tubule (DCT). The presence of such a cotransporter was suggested by Kunau et al. (21), following the observation that chlorothiazide inhibited salt reabsorption in the distal portion of the nephron. Later micropuncture studies (7, 9) provided strong evidence supporting the existence of a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ -coupled transport mechanism of salt reabsorption in the mammalian DCT that was specifically inhibited by thiazides. After these studies, Beamont et al. (2) observed that tracer [ $^3\text{H}$ ]metolazone was able to bind with two different binding sites in plasma membranes: one with high affinity [dissociation constant ( $K_d$ ) = 4.27 nM] and the other with low affinity

( $K_d$  = 289 nM). The high-affinity [ $^3\text{H}$ ]metolazone binding site was found to be present only in renal cortical membrane preparations, and not in those from outer or inner renal medulla or other organs; the binding was selectively blocked by thiazides, with an affinity profile that was similar to their potency as clinical diuretics. These binding properties of the high-affinity site for metolazone were considered compatible with a putative thiazide receptor, that is, with the thiazide-sensitive  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  cotransporter. [ $^3\text{H}$ ]metolazone binding to renal cortical membranes was subsequently used to study this receptor (3, 6, 30).

The primary structure of the thiazide-sensitive  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  cotransporter [TSC or NCC] has been elucidated from cloning of cDNAs from the winter flounder urinary bladder (15) and from rat (rTSC) (14) and human kidney (hTSC) (29). TSC belongs to the superfamily of electroneutral cation-coupled  $\text{Cl}^-$  cotransporters from which seven genes have been identified: one encodes for the thiazide-sensitive  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  cotransporter (14, 15), two genes encode the bumetanide-sensitive  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  cotransporter (14, 32) and four genes encode the  $\text{K}^+\text{-Cl}^-$  cotransporters (16, 23, 25). rTSC mRNA is expressed in renal cortex and rTSC protein is expressed at the apical membrane of DCT cells of rat and human kidney (24, 26). In humans, the TSC gene is localized on chromosome 16 and mutations of this gene have been linked to Gitelman's syndrome (29), an autosomal recessive disease featuring chronic arterial hypotension, hypokalemic metabolic alkalosis, hypomagnesemia and hypocalciuria. Targeted disruption of the TSC gene in mice resulted in a partial Gitelman's-like syndrome (27).

The functional characteristics of TSC from the winter flounder urinary bladder have been studied in some detail (15), revealing that teleost TSC exhibits  $K_m$  values for  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  of  $25.0 \pm 0.4$  and  $13.5 \pm 0.2$  mM, respectively. Hill coefficients for both ions were close to unity, consistent with electroneutral cotransport. In addition, thiazide inhibition of flounder TSC function revealed a potency profile that was similar to

Address for reprint requests and other correspondence: G. Gamba, Molecular Physiology Unit, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán and Instituto de Investigaciones Biomédicas, Natl. Univ. of Mexico, Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan 14000, México City, Mexico (E-mail: gamba@mailier.main.conacyt.mx).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

that previously shown for inhibition of  $\text{Cl}^-$ -dependent  $\text{Na}^+$  absorption in the flounder urinary bladder [assessed as the short-circuit current (22)] and for thiazide competition for the high-affinity [ $^3\text{H}$ ]metolazone binding site on rat kidney cortical membranes (2). In this study we present a functional characterization of the mammalian  $\text{Na}^+$ - $\text{Cl}^-$  cotransporter, rTSC, as expressed in *Xenopus laevis* oocytes.

## METHODS

***X. laevis* oocytes preparation.** Adult female *X. laevis* frogs were purchased from two different vendors: Nasco (Fort Atkinson, MI) and Carolina Biological Supply (Burlington, NC). Oocytes were surgically harvested from anesthetized frogs under 0.17% tricaine and incubated during 1 h under vigorous shaking in ND-96 [(in mM) 96 NaCl, 2 KCl, 1.8  $\text{CaCl}_2$ , 1 MgCl, and 5 HEPES/Tris, pH 7.4] in the presence of 2 mg/ml of collagenase B after which oocytes were washed four times in ND-96 and manually defolliculated. Oocytes were incubated overnight in ND-96 at 18°C supplemented with 2.5 mM sodium pyruvate and 5 mg/100 ml of gentamicin. Stage V-VI oocytes (8) were then injected with 50 nl of water or rTSC cRNA at a concentration of 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  or 25 ng cRNA per oocyte. After injection, oocytes were incubated 3–4 days in ND-96 with sodium pyruvate and gentamicin. The incubation medium was changed every 24 h. The day before the uptake experiments were performed, oocytes were switched to a  $\text{Cl}^-$ -free ND-96 [(in mM) 96  $\text{Na}^+$ -isethionate, 2  $\text{K}^+$ -gluconate, 1.8  $\text{Ca}^{2+}$ -gluconate, 1.0  $\text{Mg}^{2+}$ -gluconate, 5 HEPES, 2.5 sodium pyruvate, 5 mg% gentamicin, pH 7.4] for at least 12 h (15).

***In vitro* rTSC cRNA translation.** To prepare the rTSC cRNA, rTSC cDNA in pSPORT1 (14) was linearized at the 3' end by using *Not I* from Boehringer (Mannheim, Germany) and cRNA was transcribed *in vitro*, by using the T7 RNA polymerase mMESSAGE kit (Ambion). Transcription product integrity was confirmed on agarose gels, and concentra-

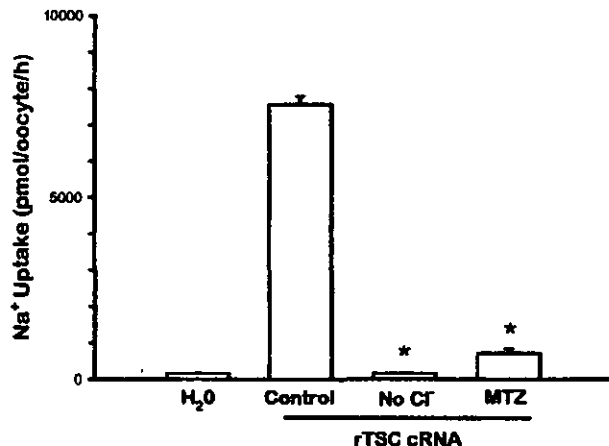


Fig. 1. Functional expression of rat thiazide-sensitive  $\text{Na}^+$ - $\text{Cl}^-$  cotransporter (rTSC) in *Xenopus laevis* oocytes that were injected with water or with 25 ng of cRNA from rTSC, as indicated. In rTSC-injected oocytes,  $\text{Na}^+$  uptakes were assessed in presence of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  (control), in absence of extracellular  $\text{Cl}^-$  or in presence of  $10^{-4}$  metolazone (MTZ), as indicated. Each bar represents a mean of 140 oocytes extracted from 6 different frogs.  $^{22}\text{Na}^+$  uptake was performed during 60 min. \*Significantly different from uptake in control group ( $P < 0.001$ ).

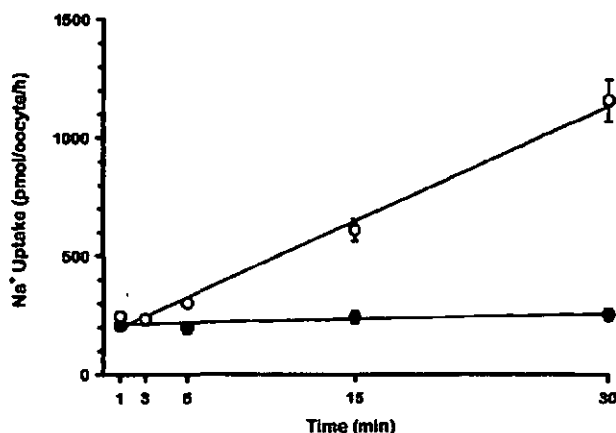


Fig. 2. Time course over 30 min of  $\text{Na}^+$  uptake in *X. laevis* oocytes injected with water (●) or with rTSC cRNA (○). Each circle represents the mean  $\pm$  SE of 15 oocytes. Uptake at 30 min in rTSC-injected oocytes was thiazide sensitive (data not shown).

tion was determined by absorbance reading at 260 nm (DU 640, Beckman, Fullerton, CA). cRNA was stored frozen in aliquots at  $-80^\circ\text{C}$  until used.

**Assessment of the  $\text{Na}^+$ - $\text{Cl}^-$  cotransporter function.** Functional analysis of the  $\text{Na}^+$ - $\text{Cl}^-$  cotransporter was assessed by measuring tracer  $^{22}\text{Na}^+$  uptake (New England Nuclear) in groups of at least 15 oocytes.  $^{22}\text{Na}^+$  uptake was measured by using the following protocol: a 30-min incubation period in an isotonic  $\text{K}^+$ - and  $\text{Cl}^-$ -free medium [(in mM) 96  $\text{Na}^+$ -gluconate, 6.0  $\text{Ca}^{2+}$ -gluconate, 1.0  $\text{Mg}^{2+}$ -gluconate, 5 HEPES/Tris, pH 7.4] with 1 mM ouabain, 100  $\mu\text{M}$  bumetanide, and 100  $\mu\text{M}$  amiloride, followed by 60-min uptake period in a  $\text{K}^+$ -free isotonic medium. For most experiments the isotonic medium contained (mM) 40 NaCl, 56 *N*-methyl-*D*-glucamine (NMDG)-Cl, 1.8  $\text{CaCl}_2$ , 1  $\text{MgCl}_2$ , 5 HEPES, pH 7.4, supplemented with 1 mM ouabain, 100  $\mu\text{M}$  bumetanide, 100  $\mu\text{M}$  amiloride, and 2.5  $\mu\text{Ci}$  of  $^{22}\text{Na}^+$ . Ouabain was added to prevent sodium exit via the  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase, bumetanide to inhibit the oocyte  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -2 $\text{Cl}^-$  cotransporter, and amiloride to block other  $\text{Na}^+$  pathways in the oocytes, such as the  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$  antiporter and  $\text{Na}^+$  channels.

To determine the ion transport kinetics and the order of ion binding to the  $\text{Na}^+$ - $\text{Cl}^-$  cotransporter, we performed experiments using varying concentrations of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$ . To maintain osmolality and ionic strength, gluconate was used as a  $\text{Cl}^-$  substitute and NMDG as a  $\text{Na}^+$  substitute. The sensitivity and kinetics for thiazide-type diuretics were assessed by exposing groups of rTSC cRNA-injected oocytes to each diuretic at concentrations varying from  $10^{-9}$  to  $10^{-4}$  M. For these experiments, the desired concentration of the diuretic was present in both the incubation and uptake periods. In addition, concentration-dependent effect of thiazides on rTSC function was assessed by using uptake solutions containing different concentrations of extracellular  $\text{Na}^+$  or  $\text{Cl}^-$ . Finally, uptake experiments were also performed by using three different osmolality conditions for the oocytes: hypotonicity (110 mosmol/kgH<sub>2</sub>O), isotonicity (210 mosmol/kgH<sub>2</sub>O), and hypertonicity (305 mosmol/kgH<sub>2</sub>O). All solutions for these experiments contained 40 mM NaCl, which resulted in an osmolality of  $\sim 110$ . For the isotonic and hypertonic solutions, osmolality was adjusted by adding 90 mM or 190 mM sucrose, respectively.

All uptakes were performed at 30°C. At the end of the uptake period, oocytes were washed 5 times in ice-cold up-

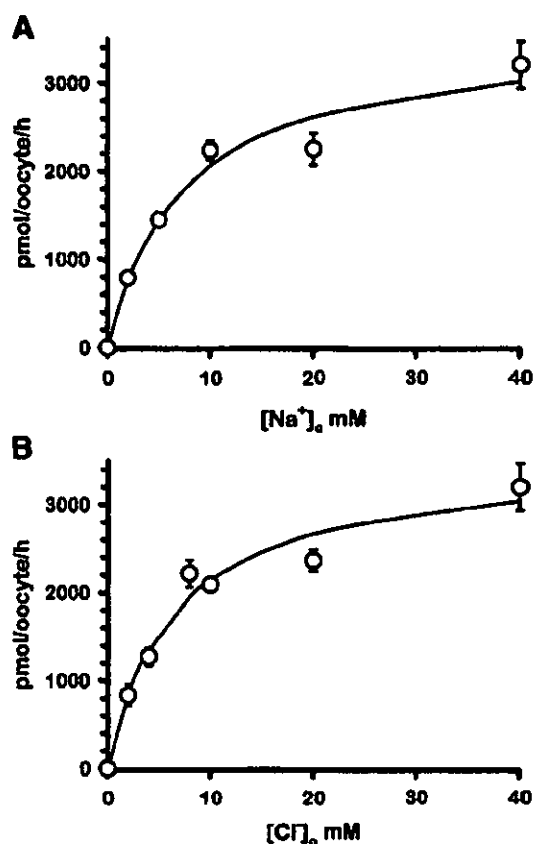


Fig. 3. Kinetic analysis of Na<sup>+</sup> uptake in oocytes injected with rTSC cRNA. A: Na<sup>+</sup> dependency of Na<sup>+</sup> uptake. B: Cl<sup>-</sup> dependency of <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> uptake. Uptakes were performed during 15 min with a fixed concentration of Na<sup>+</sup> or Cl<sup>-</sup> at 40 mM, with changing concentrations of counterion from 0 to 40 mM. Uptakes were also measured in water-injected oocytes (data not shown), and mean values for water groups were subtracted in corresponding rTSC groups to analyze only Na<sup>+</sup> uptake due to rTSC. As shown in Fig. 1, Na<sup>+</sup> uptake in H<sub>2</sub>O-injected oocytes is low, making this latter correction small. Lines were fit using Michaelis-Menten equation. The Hill coefficient for Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> was close to unity: 1.04 ± 0.16 and 1.07 ± 0.14 for Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup>, respectively. [Na<sup>+</sup>]<sub>o</sub> and [Cl<sup>-</sup>]<sub>o</sub>, extracellular Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> concentrations, respectively.

take solution without isotope to remove extracellular fluid tracer. After the oocytes were dissolved in 10% sodium dodecyl sulfate, tracer activity was determined for each oocyte by β-scintillation counting.

**Statistical analysis.** Statistical significance is defined as two-tailed  $P < 0.05$ , and the results are presented as means ± SE. The significance of the differences between groups was tested by one-way ANOVA with multiple com-

parison by using Bonferroni correction or by the Kruskal-Wallis one-way analysis of variance on ranks with Dunn's method for multiple comparison procedures, as needed.

## RESULTS

**Expression of rTSC in *X. laevis* oocytes.** We have previously shown that *X. laevis* oocytes do not exhibit endogenous expression of the thiazide-sensitive Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter (14, 15). Figure 1 shows a summary from six experiments of rTSC expression in oocytes. Na<sup>+</sup> uptake increased from a level of 157 ± 10 pmol · oocyte<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup> in water-injected oocytes to a value of 7,555 ± 228 pmol · oocyte<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup> in rTSC cRNA-injected oocytes. Thus injection of *X. laevis* oocytes with rTSC cRNA resulted in an average 48-fold increase in Na<sup>+</sup> uptake (range 40 to 150-fold in different experiments). The increased Na<sup>+</sup> uptake was chloride dependent and thiazide sensitive, with uptake in the absence of extracellular Cl<sup>-</sup> being 709 ± 114 pmol · oocyte<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup> and in the presence of 10<sup>-4</sup> M metolazone being 1,039 ± 118 pmol · oocyte<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup>. Control uptake in water-injected oocytes collected from different frogs varied from 70 ± 24 to 450 ± 34 pmol · oocyte<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup> but was always insensitive to thiazides.

Figure 2 shows that Na<sup>+</sup> uptake in water-injected oocytes was small and linear during 30 min of uptake. In rTSC cRNA-injected oocytes, the uptake increased rapidly and was also linear during the first 30 min. Thus we used a 60-min uptake period for all experiments, except when evaluating ion kinetic analyses where 15-min uptakes were performed.

**Kinetics of ion binding in rTSC.** Figure 3 shows the Na<sup>+</sup> dependency (Fig. 3A) and Cl<sup>-</sup> dependency (Fig. 3B) of Na<sup>+</sup> uptake in rTSC cRNA-injected oocytes. Uptakes were performed with a fixed concentration of Na<sup>+</sup> or Cl<sup>-</sup> at 40 mM, with changing concentrations of the counterion from 0 to 40 mM. Uptakes were also measured in water-injected oocytes (data not shown) and the mean values for water groups were subtracted from corresponding rTSC groups to assess only the <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> uptake due to rTSC. As shown in Fig. 1, Na<sup>+</sup> uptake in H<sub>2</sub>O-injected oocytes is low, making this latter correction small. Na<sup>+</sup> uptake increased as the concentration of each transported ion was raised until a plateau phase was reached at ion concentrations greater than 20–40 mM, compatible with Michaelis-Menten behavior. The calculated  $K_m$  and maximal velocity ( $V_{max}$ ) for extracellular Na<sup>+</sup> concentration were 7.29 ± 2.1 mM and 3,574 ± 349 pmol · oocyte<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup>, respectively. The calculated apparent  $K_m$  and  $V_{max}$  values for extracellular Cl<sup>-</sup> concentration were 6.48 ±

Table 1. rTSC Cl<sup>-</sup> apparent  $K_m$  and  $V_{max}$  in oocytes exposed to increased extracellular Na<sup>+</sup> concentration

	Extracellular Na <sup>+</sup> Concentration, mM				
	2	5	10	20	40
$K_m$ , mM	21.21 ± 0.4	17.05 ± 4.8	18.68 ± 3.5	8.46 ± 1.7	6.46 ± 1.7
$V_{max}$ , pmol · oocyte <sup>-1</sup> · h <sup>-1</sup>	1,220 ± 188	2,125 ± 288	3,206 ± 293	2,868 ± 215	3,539 ± 317

Values are means ± SE. rTSC, rat thiazide-sensitive Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter;  $K_m$ , Michaelis-Menten constant;  $V_{max}$ , maximal velocity.

Table 2. rTSC  $Na^+$   $K_m$  and  $V_{max}$  in oocytes exposed to increased extracellular  $Cl^-$  concentration

	Extracellular $Cl^-$ Concentration, mM					
	2	4	8	10	20	40
$K_m$ , mM	41.9 ± 6.9	50.88 ± 15.7	21.26 ± 8.4	12.11 ± 1.4	7.46 ± 1.0	7.26 ± 2.4
$V_{max}$ , pmol · oocyte <sup>-1</sup> · h <sup>-1</sup>	1,736 ± 175	2,867 ± 570	3,253 ± 629	2,693 ± 131	2,862 ± 135	3,570 ± 400

Values are means ± SE.

1.54 mM and  $3,542 \pm 286$  pmol · oocyte<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup>, respectively. The Hill coefficient for both ions remained close to unity:  $1.04 \pm 0.17$  and  $1.07 \pm 0.14$  for  $Na^+$  and  $Cl^-$ , respectively.

To test whether extracellular  $Na^+$  and  $Cl^-$  concentrations influence the binding of the counterion, we examined the counterion concentration dependency of  $Na^+$  uptakes at varying fixed concentrations of extracellular  $Na^+$  or  $Cl^-$ . Tables 1 and 2 show the results of these experiments as the kinetic parameters ( $K_m$  and  $V_{max}$ ) for  $Cl^-$  or  $Na^+$ , respectively. Table 1 shows that the apparent  $K_m$  for  $Cl^-$  was significantly affected by extracellular  $Na^+$  concentration. The apparent  $K_m$  for  $Cl^-$  increased from  $6.46 \pm 1.7$  to  $21.2 \pm 0.4$  mM ( $P < 0.01$ ) when extracellular  $Na^+$  decreased from 40 to 2 mM. Thus the higher the sodium concentration, the higher the affinity of rTSC for extracellular  $Cl^-$ . Similarly, the  $K_m$  for  $Na^+$  also was affected by extracellular  $Cl^-$ . As Table 2 shows,  $K_m$  for extracellular  $Na^+$  varied from  $7.26 \pm 2.4$  to  $41.9 \pm 6.9$  mM ( $P < 0.01$ ), when extracellular  $Cl^-$  concentration varied from 40 to 2 mM. Thus the higher the chloride concentration, the higher the affinity of rTSC for  $Na^+$ .

**Kinetics of thiazide inhibition of rTSC.** Thiazide-induced inhibition of rTSC has been considered for years as the hallmark of the  $Na^+$ - $Cl^-$  cotransporter that is expressed in the apical membrane of the mam-

malian DCT and the teleost urinary bladder. Thus we analyzed the inhibitory kinetics of several thiazide-type diuretics on rTSC cRNA injected-oocytes. The results of this series of experiments are shown in Fig. 4. The rank of order for rTSC inhibition was polythiazide > metolazone = bendroflumethiazide > trichloromethiazide > hydrochlorothiazide > chlorthalidone (chlorthalidone not shown). rTSC function was not affected by the addition of a nondiuretic thiazide derivative such as diazoxide, tested in concentrations from  $10^{-14}$  to  $10^{-4}$  M in the uptake medium (data not shown). In addition, rTSC function was not inhibited by furosemide or acetazolamide (data not shown).

**Effect of pH on rTSC function and thiazide inhibition.** Table 3 shows that there is no effect of extracellular pH in the range of 6.0 to 8.0 on both rTSC function and thiazide sensitivity. Uptakes were performed in solutions containing 40 mM NaCl, with pH of 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, and 8.0. As Table 3 shows, all groups exhibited similar uptakes. In addition, we tested two different thiazides: metolazone at a concentration of  $5 \times 10^{-6}$  M that is just above  $IC_{50}$  and bendroflumethiazide at  $5 \times 10^{-7}$  M that is just below  $IC_{50}$ . In these experiments, pH had no effect on metolazone or bendroflumethiazide rTSC inhibition of  $Na^+$  uptake (not significant by using one-way ANOVA).

**Effects of extracellular ions on thiazide inhibition of rTSC.** Tran et al. (30) observed that binding of tracer [<sup>3</sup>H]metolazone to its putative receptor was inhibited by increased  $Cl^-$  and stimulated by increased  $Na^+$  concentrations. They proposed that thiazides and  $Cl^-$  competed for the same site or at least for part of the same binding site on the protein. To examine this issue at a functional level, we evaluated the effect of extracellular  $Cl^-$  on the kinetics of inhibition of several thiazides. To this end, we assessed kinetics of rTSC inhibition of five different thiazide-type diuretics, in the presence of 2 or 100 mM extracellular  $Cl^-$ . We used 2 mM  $Cl^-$  because this concentration is clearly below

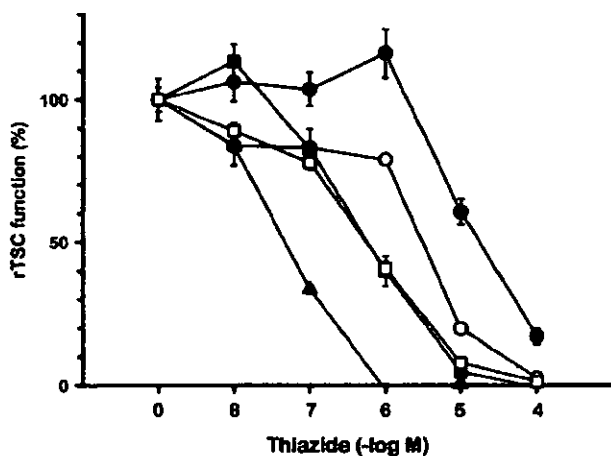


Fig. 4. Kinetic analyses of inhibition of rTSC function by thiazide-type diuretics. All  $Na^+$  uptakes were performed during 60 min with thiazides tested at concentrations from  $10^{-9}$  to  $10^{-4}$  M. The profile of inhibition was polythiazide ( $\blacktriangle$ ) > metolazone ( $\blacksquare$ ) = bendroflumethiazide ( $\square$ ) > trichloromethiazide ( $\circ$ ) > hydrochlorothiazide ( $\bullet$ ). Uptakes were performed during 60 min in uptake solution containing 40 mM  $Na^+$  and 96 mM  $Cl^-$ .

Table 3. Effect of pH on the thiazide sensitivity of rTSC

pH	rTSC Function pmol · oocyte <sup>-1</sup> · h <sup>-1</sup>	% of Inhibition by metolazone ( $5 \times 10^{-6}$ M)	% of Inhibition by bendroflumethiazide ( $5 \times 10^{-7}$ M)
6.0	5,599 ± 293	71.36 ± 3.04	32.46 ± 6.11
6.5	5,348 ± 357	57.07 ± 7.71	33.10 ± 6.86
7.0	6,318 ± 573	79.15 ± 1.38	30.59 ± 5.51
7.5	5,376 ± 500	66.79 ± 5.00	27.42 ± 4.99
8.0	6,542 ± 225	74.07 ± 6.22	21.48 ± 3.54

Values are means ± SE.

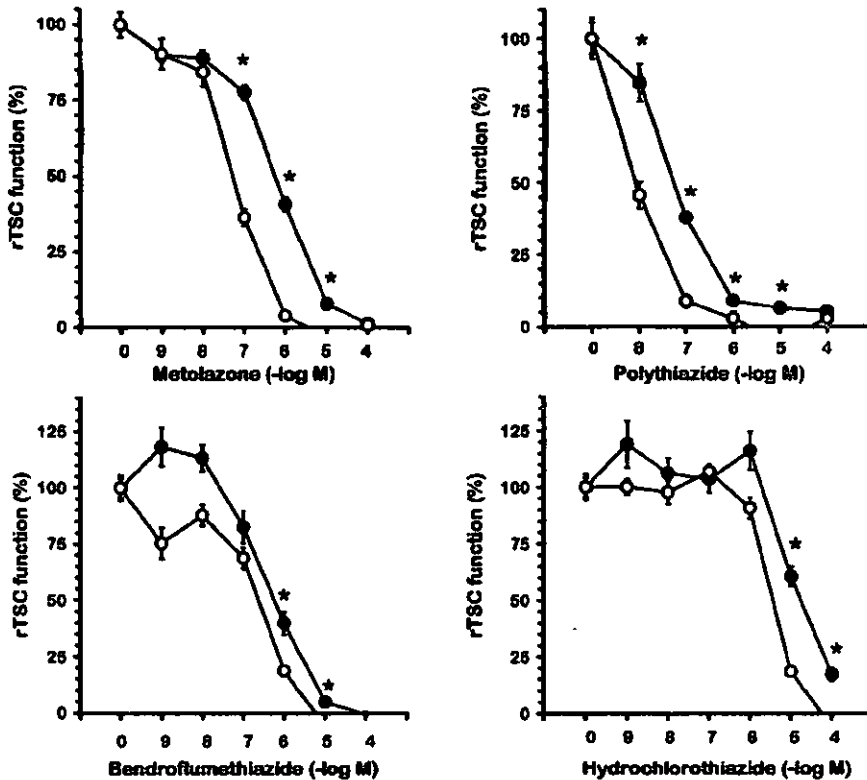


Fig. 5. Kinetics of metolazone, polythiazide, bendroflumethiazide, and hydrochlorothiazide inhibition of rTSC function in oocytes in presence of extracellular  $\text{Cl}^-$  at concentration of 100 mM (●) or 2 mM (○). rTSC function is expressed as % of control  $^{22}\text{Na}^+$  uptake (60 min) in absence of inhibitor. For these experiments  $\text{Na}^+$  concentration in both solutions was 40 mM. The osmolarity and ionic strength for both high and low- $\text{Cl}^-$  solutions were similar. \* $P < 0.05$  vs. % rTSC function by using same thiazide concentration in 2 mM  $\text{Cl}^-$ .

the apparent  $K_m$  for  $\text{Cl}^-$  (Figs. 3 and 4). The results of these series of experiments are shown in Fig. 5 and Table 4. It is clear that the affinity of rTSC for each thiazide is shifted to the left in the presence of a lower extracellular  $\text{Cl}^-$  concentration, indicating that  $\text{Cl}^-$  affects the binding of thiazide diuretics to rTSC. We also assessed the effect of extracellular  $\text{Na}^+$  on inhibition of rTSC by metolazone. As illustrated in Fig. 6, the  $\text{IC}_{50}$  was shifted to the left as  $\text{Na}^+$  concentration decreased in the uptake medium. When  $\text{Na}^+$  concentration was 2 mM, the  $\text{IC}_{50}$  was  $3 \times 10^{-7}$  M, whereas in the presence of 100 mM  $\text{Na}^+$ , the  $\text{IC}_{50}$  was  $2 \times 10^{-6}$  M. Thus the concentration of  $\text{Na}^+$  in extracellular fluid also influences the inhibition of rTSC function by metolazone.

To further examine the effect of ions on thiazide inhibition of rTSC function, we assessed the effect of increased concentrations of extracellular  $\text{Na}^+$  or  $\text{Cl}^-$  on the inhibitory effect of metolazone at a concentration of  $5 \times 10^{-7}$  M, the  $\text{IC}_{50}$  of this diuretic. For these exper-

iments, all solutions had the same osmolarity ( $\sim 210$  mosmol/kg $\text{H}_2\text{O}$ ), as well as ionic strength. As Fig. 7 shows, there is a significant negative correlation between both extracellular  $\text{Na}^+$  ( $r^2 = 0.82$ ,  $P < 0.0001$ ) or

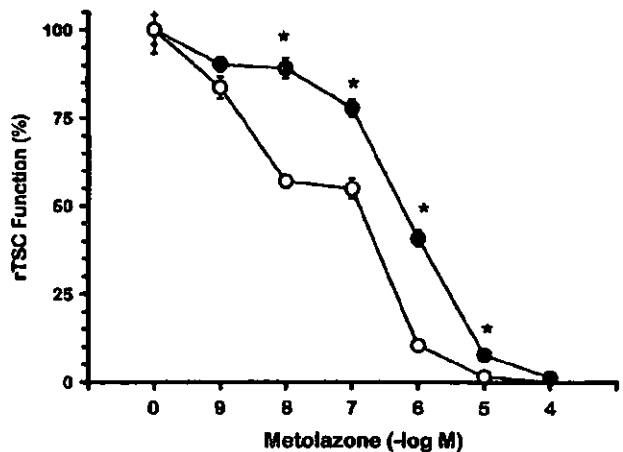


Fig. 6. Kinetics of metolazone inhibition of rTSC function in oocytes in presence of extracellular  $\text{Na}^+$  at concentrations of 100 mM (●) or 2 mM (○). rTSC function is expressed as % of control  $^{22}\text{Na}^+$  uptake (60 min) in absence of inhibitor. For these experiments  $\text{Cl}^-$  concentration in three solutions was 100 mM and NMDG substituted for  $\text{Na}^+$  where needed. Thus osmolarity and ion strength for the three solutions were similar. \* $P < 0.05$  vs. % rTSC function using same thiazide concentration in 2 mM  $\text{Na}^+$ .

Table 4.  $\text{IC}_{50}$  of each thiazide at 2 or 100 mM  $\text{Cl}^-$  concentration

	$\text{Cl}^-$ 2 mM	$\text{Cl}^-$ 100 mM
Metolazone	$3.5 \times 10^{-7}$ M	$2.5 \times 10^{-6}$ M
Bendroflumethiazide	$5.0 \times 10^{-7}$ M	$2.5 \times 10^{-6}$ M
Trichloromethiazide	$5.0 \times 10^{-7}$ M	$5.0 \times 10^{-6}$ M
Hydrochlorothiazide	$7.0 \times 10^{-6}$ M	$7.0 \times 10^{-6}$ M
Polythiazide	$2.0 \times 10^{-6}$ M	$3.5 \times 10^{-7}$ M

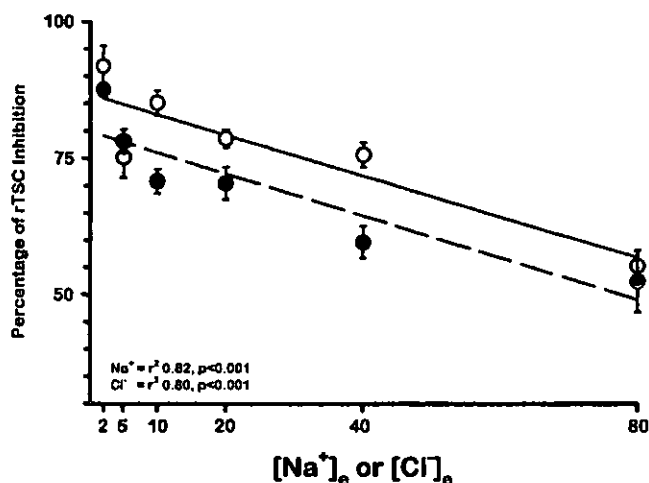


Fig. 7. Correlations between extracellular  $\text{Na}^+$  (● and dashed line) or  $\text{Cl}^-$  (○ and continuous line) concentration and % of rTSC inhibition by  $5 \times 10^{-7}$  M concentration of metolazone. Concentrations of counterions were held constant at 80 mM. The correlations were significant ( $P < 0.001$ ).

$\text{Cl}^-$  ( $r^2 = 0.80$ ,  $P < 0.001$ ) and the percentage of rTSC inhibition by metolazone.

**Regulation of rTSC by osmolarity.** The Na-Cl cotransporter, rTSC, is highly expressed in the apical membranes of the DCT (24, 26). In this nephron segment, the tubular fluid arriving from the medullary thick ascending limb can vary in osmolarity from hypotonic to isotonic. Accordingly, we studied the effect of osmolarity on the transport function of rTSC. The  $\text{Cl}^-$ -dependent fraction and the thiazide-sensitive fraction of  $\text{Na}^+$  uptake was assessed in rTSC-injected oocytes that were exposed to an uptake medium containing 40 mM NaCl at three different osmolarities: hypotonic ( $\sim 110$  mosmol/kgH<sub>2</sub>O), the osmolarity obtained by the 40 mM NaCl concentration in the uptake medium; and isotonic ( $\sim 205$  mosmol/kgH<sub>2</sub>O) or hypertonic ( $\sim 310$  mosmol/kgH<sub>2</sub>O) by adding sucrose to the 40 mM NaCl uptake medium. Thus uptakes were performed in different osmolar conditions, without chang-

ing the extracellular NaCl concentration or ionic strength. Figure 8 shows a representative experiment. Compared with the amount of  $\text{Cl}^-$ -dependent or thiazide-sensitive  $\text{Na}^+$  uptake that was observed in hypotonicity, rTSC function was increased by isotonicity. No further activation was seen with the hypertonic uptake medium.

#### DISCUSSION

In the present study we have functionally characterized the rat thiazide-sensitive  $\text{Na}^+$ - $\text{Cl}^-$  cotransporter, rTSC. As shown previously (14), rTSC gives rise to thiazide-sensitive  $\text{Na}^+$ - $\text{Cl}^-$  cotransport when expressed in *X. laevis* oocytes. The kinetic analyses for both ions reveal that rTSC exhibits very high affinities for  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$ . Hill coefficients for each ion were unity, consistent with a stoichiometry of 1Na:1Cl and the electroneutral nature of the cotransport process. The  $K_m$  values for both ions were  $< 8$  mM. These ion affinities are somewhat higher than those obtained for the Na-Cl cotransporter from winter flounder urinary bladder [ $K_m$  for  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  were  $\sim 25$  and 13 mM, respectively (15)]. The large central hydrophobic domain containing the 12 transmembrane segments of the related Na-K-2Cl cotransporter has been shown to determine the diuretic [in this case bumetanide] and ion binding (20). Because rat and flounder TSC exhibit  $\sim 80\%$  amino acid identity in this central domain, it seems likely that small changes in TSC sequences in this region account for the kinetic differences between these two TSC proteins.

In the DCT, urinary fluid arrives from the loop of Henle with NaCl concentrations and osmolarities that are usually significantly lower than in plasma, due to the intense reabsorption of ions, without water, in the thick ascending limb. Thus, to maintain an appropriate rate of salt reabsorption, the apically expressed Na-Cl cotransporter in the DCT must have very high affinities for both cotransported ions. The high  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  affinities of  $\sim 8$  mM for rTSC are consistent with this model and with the previous observations by Velázquez and coworkers (31) using

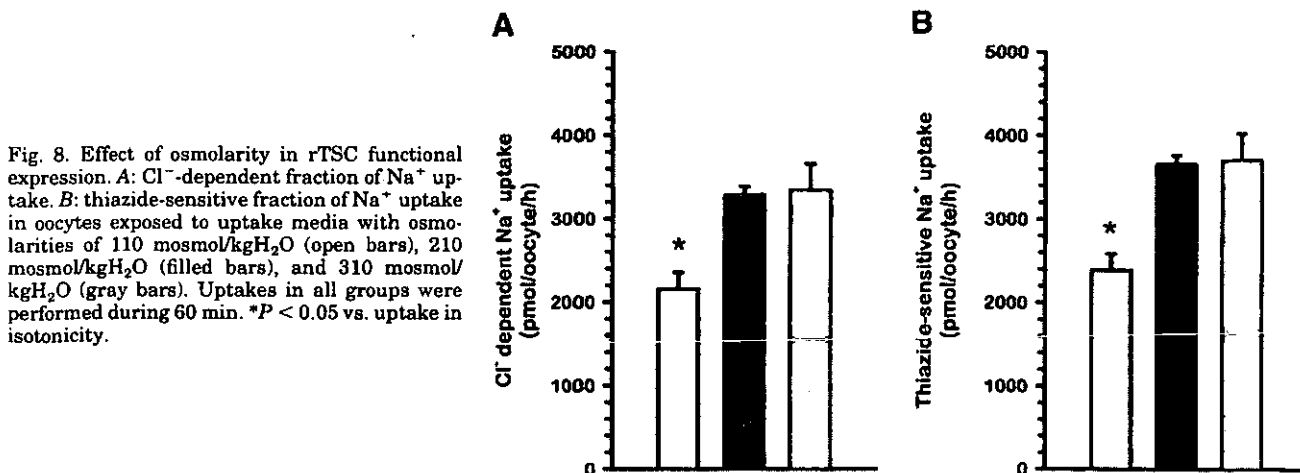


Fig. 8. Effect of osmolarity in rTSC functional expression. A:  $\text{Cl}^-$ -dependent fraction of  $\text{Na}^+$  uptake. B: thiazide-sensitive fraction of  $\text{Na}^+$  uptake in oocytes exposed to uptake media with osmolarities of 110 mosmol/kgH<sub>2</sub>O (open bars), 210 mosmol/kgH<sub>2</sub>O (filled bars), and 310 mosmol/kgH<sub>2</sub>O (gray bars). Uptakes in all groups were performed during 60 min. \* $P < 0.05$  vs. uptake in isotonicity.

in vivo microperfusion experiments in rat DCT in which they found half-maximal stimulation of salt transport at  $\text{Na}^+$  or  $\text{Cl}^-$  concentrations of  $\sim 10$  mM. In addition, any reduction of ion reabsorption in the thick ascending limb or increased flow out of the loop of Henle will result in increased salt (and osmolarity) delivery to DCT. In this latter circumstance, the rate of NaCl transport has been shown to be directly related to the rate of NaCl delivery to the DCT. In this regard, we found in the present study that NaCl transport by TSC was regulated by osmolarity, independently of changes in NaCl concentration or ionic strength, at least in oocytes. Thus it is possible that osmotic-induced activation of TSC could be one of the mechanisms that account for the known immediate increase in NaCl reabsorption rate in DCT when a loop diuretic is administered (4).

Our functional study confirms the predictions made by Tran et al. (30) using [ $^3\text{H}$ ]metolazone binding analysis to renal cortical membranes and by Chang and Fujita (5) using a recently developed computer-based program that TSC possesses two binding sites: one selective for  $\text{Na}^+$  and another for  $\text{Cl}^-$ . However, in contrast to their findings, we observed that the affinity of the cotransporter for  $\text{Na}^+$  or  $\text{Cl}^-$  is clearly affected by the concentration of the counterion in the uptake medium. The  $K_m$  for  $\text{Na}^+$  is affected by  $\text{Cl}^-$  and the apparent  $K_m$  for  $\text{Cl}^-$  is affected by extracellular  $\text{Na}^+$ . The higher the counterion concentration, the higher the  $\text{Na}^+$  or  $\text{Cl}^-$  affinity of the cotransporter. We suggest that these results indicate that the order of binding for  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  to the cotransporter is random. As shown in the APPENDIX, to analyze the order of binding of both ions to the cotransporter we followed the "rapid equilibrium" approach suggested by Segel (28). According to this model, in random bireactant systems, when  $\alpha = 1$ , one ion has no effect on the binding of the other and the apparent  $K_m$  ( $K_{app}$ ) is held constant as the counterion concentration increases; when  $\alpha > 1$  the binding of one ion decreases the affinity for the second ion and the  $K_{app}$  increases as the concentration of counterion increases, and when  $\alpha < 1$  the binding of one ion increases the affinity of the cotransporter for the counterion, and the  $K_{app}$  for the varied ion decreases as the concentration of the fixed ion increases. Thus the observed mutual effects of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  concentration on  $K_{app}$  and  $V_{max}$  in our results are characteristic for random binding of these ions with an  $\alpha < 1$ . If the ion binding were ordered, with  $\text{Na}^+$  binding first, then we would expect that the  $V_{max}$  for chloride remains unaffected. As Table 1 and 2 show, the  $V_{max}$  for both ions was affected by the concentration of the counterion.

The binding of the thiazide-like compound [ $^3\text{H}$ ]metolazone exclusively to cellular membranes from renal cortex has been used for years as a surrogate to study changes in cotransporter expression with modulation of physiological conditions and during different pathophysiological states (1, 3, 6, 11–13). Our results show that TSC function is inhibited by several different

thiazides with an inhibitory profile similar to their potency in clinical medicine, as well as their potency to block the [ $^3\text{H}$ ]metolazone binding to renal cortical membranes (2). In addition, the benzothiadiazine derivative and vasodilator drug diazoxide, which causes vasodilation but does not cause diuresis, possesses no inhibitory effect on TSC function.

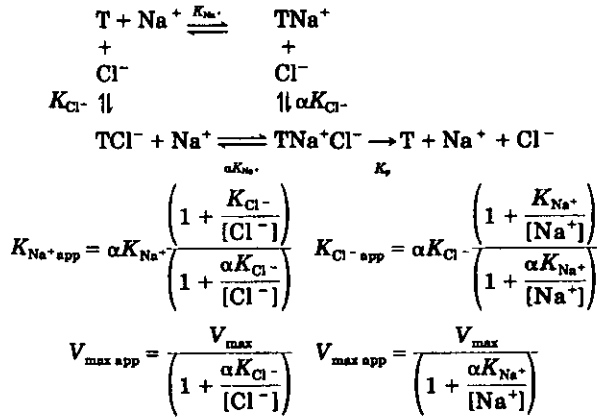
Our data show that the concentration of  $\text{Na}^+$  as well as  $\text{Cl}^-$  in the extracellular medium affects the affinity of rTSC for thiazides. The higher the concentration of both ions, the lower the thiazide-induced inhibition of rTSC function. For example, the  $\text{IC}_{50}$  for metolazone inhibition of rTSC was shifted by one order of magnitude to the left when either  $\text{Cl}^-$  (Fig. 5) or  $\text{Na}^+$  (Fig. 6) in the extracellular uptake medium was decreased from 100 to 2 mM. As shown in Fig. 7, the higher the  $\text{Na}^+$  or  $\text{Cl}^-$  concentration, the lower the rTSC inhibition by thiazides. On the one hand, our findings are in agreement with the observations of Tran and co-workers (30), who found an inhibitory effect of  $\text{Cl}^-$  on thiazide binding to renal cortical membranes, but otherwise diverge from their finding of a stimulatory effect of  $\text{Na}^+$  on thiazide binding. We show that both  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  decrease the inhibitory potency of thiazides on TSC, whereas Tran and co-workers found that raising the  $\text{Na}^+$  concentration increases the binding of thiazides to plasma membranes from renal cortex (5, 30). Thus, regarding the  $\text{Na}^+$  and thiazide interactions, our result appears to be inconsistent with those of Tran et al. (30).

Differences between predictions based on tracer diuretic binding to plasma membranes and analysis of the cotransporter function have been shown to occur. It was predicted by studies using [ $^3\text{H}$ ]bumetanide binding to renal outer medulla membranes that, in the  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  cotransporter, bumetanide binds to the second  $\text{Cl}^-$  site (17). However, recent studies of the  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  cotransporters using chimeras and point mutations demonstrate that altering the second transmembrane domain affects  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , and bumetanide kinetics, but not  $\text{Cl}^-$  kinetics (18–20). If bumetanide and  $\text{Cl}^-$  bind to the same site on the protein, the kinetics of both should be affected by the same alterations in amino acid sequence. Thus bumetanide binding to the Na-K-2Cl cotransporter appears to be distinct from the  $\text{Cl}^-$ -binding site.

Finally, on the basis of our data, we propose a modification of the presently accepted TSC model for NaCl transport and inhibition by thiazides. In this revised Na-Cl cotransporter model, either ion can first (and presumably randomly) bind to the transporter, but the binding of this first ion affects the binding affinity of the second ion (or counterion). In other words, the occupancy of either ion binding site increases the probability for occupancy of the other one. Moreover, both ion binding sites alter thiazide-mediated inhibition of transport, indicating that the thiazide binding site is either shared or modified by both  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$ .

APPENDIX

To determine the order of ion binding to the thiazide-sensitive sodium-chloride cotransporter we used the rapid equilibrium approach by Segel (28). For a random binding assumption we have



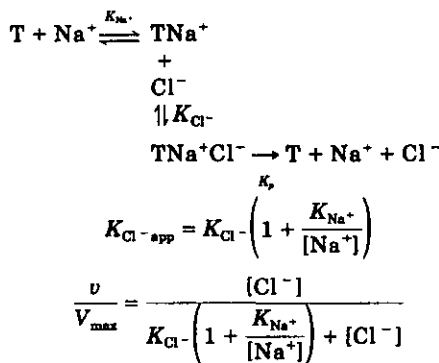
where T is transporter, v is the velocity,  $K_{Na^+}$  and  $K_{Cl^-}$  are the dissociation constants for  $Na^+$  and  $Cl^-$ , respectively, and  $\alpha$  is the factor by which the dissociation constant of one ion is modified by the binding of the other ion to the transporter.  $V_{max}$  is defined as the product of the rate constant,  $K_p$ , and the sum of all states of the transport molecule.

If  $\alpha < 1$  (the binding of one ion increases the affinity of the cotransporter for the counterion), the  $K_{app}$  for the varied ion decreases as the concentration of the fixed ion increases.

If  $\alpha = 1$  (one ion has no effect on the binding of the other), the  $K_{app}$  is equal to the  $K$  for the ion and there are not changes with the variation of the counterion.

If  $\alpha > 1$  (the binding of one ion decreases the affinity for the second ion), in this case the apparent  $K$  value for the varied ion increases as the concentration of fixed ion increases.

The rapid equilibrium approach for an ordered binding if  $Na^+$  binds first yields



The apparent  $K$  for  $Cl^-$  varies with varying concentrations of  $Na^+$  and the  $V_{max}$  remains unaffected by the sodium concentration.

We are grateful to Dr. Rosario Muñoz-Clares for her help in kinetic analysis, Jesús López for his help with frogs' care, and to members of the Molecular Physiology Unit for their suggestions and stimulating discussion.

This work was supported by research Grants 97629m from the Mexican Council of Science and Technology (CONACYT), 75197-

553601 from the Howard Hughes Medical Institute, and National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Grants DK-38603 (to G. Gamba) and DK-38603 (to S. C. Hebert). A. Monroy and C. Plata were supported by scholarship grants from CONACYT and from the Dirección General del Personal Académico of the National University of Mexico. G. Gamba is an International Scholar of the Howard Hughes Medical Institute.

REFERENCES

1. Beaumont K, Vaughn DA, Casto R, Printz MP, and Fanestil DD. Thiazide diuretic receptors in spontaneously hypertensive rats and 2-kidney 1-clip hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens* A12: 215-226, 1990.
2. Beaumont K, Vaughn DA, and Fanestil DD. Thiazide diuretic receptors in rat kidney: Identification with [<sup>3</sup>H]metolazone. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 2311-2314, 1988.
3. Beaumont K, Vaughn DA, Maciejewski AR, and Fanestil DD. Reversible downregulation of thiazide diuretic receptor by acute renal ischemia. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 256: F329-F334, 1989.
4. Beck FX, Ohno A, Müller E, Seppi T, and Pfaller W. Inhibition of angiotensin-converting enzyme modulates structural and functional adaptation to loop diuretics-induced diuresis. *Kidney Int* 51: 36-43, 1997.
5. Chang H and Fujita TA. A kinetic model of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol* 276: F952-F959, 1999.
6. Chen Z, Vaughn DA, Beaumont K, and Fanestil DD. Effects of diuretic treatment and of dietary sodium on renal binding of <sup>3</sup>H-metolazone. *J Am Soc Nephrol* 1: 91-98, 1990.
7. Costanzo LS. Localization of diuretic action in microperfused rat distal tubules: Ca and Na transport. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 248: F527-F535, 1985.
8. Dumont JN. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol* 136: 153-179, 1970.
9. Ellison DH, Velazquez H, and Wright FS. Thiazide-sensitive sodium chloride cotransport in early distal tubule. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 253: F546-F554, 1987.
10. Fanestil DD. Steroid regulation of thiazide-sensitive transport. *Semin Nephrol* 12: 18-23, 1992.
11. Fanestil DD, Tran JM, Vaughn DA, Maciejewski AR, and Beaumont K. Investigation of the metolazone receptor. In: *Diuretics III: Chemistry, Pharmacology and Clinical Applications*, edited by Puschett JB and Greenberg A. New York: Elsevier, 1990, p. 195-204.
12. Fanestil DD, Vaughan DA, and Blakely P. Metabolic acid-base influences on renal thiazide receptor density. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 272: R2004-R2008, 1997.
13. Gamba G, Miyanosita A, Lombardi M, Lytton J, Lee WS, Hediger MA, and Hebert SC. Molecular cloning, primary structure and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney. *J Biol Chem* 269: 17713-17722, 1994.
14. Gamba G, Saltzberg SN, Lombardi M, Miyanosita A, Lytton J, Hediger MA, Brenner BM, and Hebert SC. Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the thiazide-sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 2749-2753, 1993.
15. Gillen CM, Brill S, Payne JA, and Forbush B III. Molecular cloning and functional expression of the K-Cl cotransporter from rabbit, rat and human. A new member of the cation-chloride cotransporter family. *J Biol Chem* 271: 16237-16244, 1996.
16. Haas M and McManus TJ. Bumetanide inhibits (Na+K+Cl) co-transport at a chloride site. *Am J Physiol Cell Physiol* 245: C235-C240, 1983.
17. Insering P, Jacoby SC, Chang J, and Forbush B III. Mutagenic mapping of the Na-K-Cl cotransporter for domains involved in ion transport and bumetanide binding. *J Gen Physiol* 112: 549-558, 1998.
18. Insering P, Jacoby SC, and Forbush B III. The role of transmembrane domain 2 in cation transport by the Na-K-Cl cotransporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7179-7184, 1998.



20. Insering P, Jacoby SC, Payne JA, and Forbush B III. Comparison of Na-K-Cl cotransporters. NKCC1, NKCC2, and the HEK Cell Na-K-Cl cotransporter. *J Biol Chem* 273: 11295-11301, 1998.
21. Kunau RT, Weller DR, and Webb HL. Clarification of the site of action of chlorothiazide in the rat nephron. *J Clin Invest* 56: 410-407, 1975.
22. Li JH, Zuzack JS, and Kau ST. Winter flounder urinary bladder as a model tissue for assessing the potency of thiazide diuretics. In: *Diuretics III: Chemistry, Pharmacology and Clinical Applications*, edited by Puschett JB and Greenberg A. New York: Elsevier, 1990, p. 107-110.
23. Mount DB, Mercado A, Song L, Xu J, George AL Jr, Delpire E, and Gamba G. Cloning and characterization of KCC3 and KCC4, new members of the cation-chloride cotransporter gene family. *J Biol Chem* 274: 16355-16362, 1999.
24. Obermuller N, Bernstein P, Velázquez H, Reilly R, Moser D, Ellison DH, and Bachman S. Expression of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter in rat and human kidney. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 269: F900-F910, 1995.
25. Payne JA, Stevenson TJ, and Donaldson LF. Molecular characterization of a putative K-Cl cotransporter in rat brain. A neuronal-specific isoform. *J Biol Chem* 271: 16245-16252, 1996.
26. Plotkin MD, Kaplan MR, Verlander JM, Lee WS, Brown D, Poch E, Gullans SR, and Hebert SC. Localization of the thiazide sensitive Na-Cl cotransporter, rTSC1, in the rat kidney. *Kidney Int* 50: 174-183, 1996.
27. Schultheis PJ, Lorenz JN, Meneton P, Nieman ML, Riddle TM, Flagella M, Duffy JJ, Doetschman T, Miller ML, and Shull GE. Phenotype resembling Gitelman's syndrome in mice lacking the apical Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter of the distal convoluted tubule. *J Biol Chem* 273: 29150-29155, 1998.
28. Segel IH. *Enzyme kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*. New York, NY: Wiley-Interscience, 1993, p. 957.
29. Simon DB, Nelson-Williams C, Johnson-Bia M, Ellison D, Karet FE, Morey-Molina A, Vaara I, Iwata F, Cushner HM, Koolen M, Gainza FJ, Gitelman HJ, and Lifton RP. Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Nat Genet* 12: 24-30, 1996.
30. Tran JM, Farrell MA, and Fanestil DD. Effect of ions on binding of the thiazide-type diuretic metolazone to kidney membrane. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 258: F908-F915, 1990.
31. Velazquez H, Good DW, and Wright FS. Mutual dependence of sodium and chloride absorption by renal distal tubule. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 247: F904-F911, 1984.
32. Xu J-C, Lytle C, Zhu TT, Payne JA, Benz E Jr, and Forbush B III. Molecular cloning and functional expression of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2201-2205, 1994.



## EFFECTO DE LA CICLETANINA SOBRE EL COTRANSPORTADOR DE $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ SENSIBLE A TIAZIDAS

### INTRODUCCIÓN

La cicletanina es un derivado de la furopiridina (RS)-3-(4 clorofenil)-1,3-dihidro-6 metilfuro[3,4c] piridina-7-ol-hidrocloruro, utilizada ampliamente como antihipertensivo, especialmente en países europeos. Además de su efecto antihipertensivo, es capaz de producir natriuresis.

El efecto antihipertensivo se considera que es directo sobre las células musculares lisas vasculares. En estudios donde células del músculo liso aórtico en cultivo responden al estrés mecánico con un aumento del sodio intracelular por una vía dependiente de calcio, se observó que la cicletanina inhibe este aumento interno de sodio con una  $\text{IC}_{50}$  de  $\cong 1\text{nM}$ . Es posible que este efecto sea debido a la acción de la cicletanina sobre un sitio de acción cercano al canal lento de calcio o posiblemente relacionado con el intercambiador de sodio-cloro (84).

Mediante estudios de micropunción se determinó que el efecto natriurético producido por la cicletanina es debido a la inhibición de la reabsorción de  $\text{Na}^+$  a nivel del túbulo distal (85). En eritrocitos la cicletanina no inhibe el transporte de  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  (86). Debido a que el sitio de natriuresis de la cicletanina es el túbulo contorneado distal y la principal vía de transporte de  $\text{Na}^+$  a este nivel es el cotransportador de  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  sensible a tiazidas, se consideró que esta droga actuaba a este nivel y por lo mismo se le catalogó farmacológicamente como una tiazida, no obstante la existencia de trabajos en donde la hidroclorotiazida, pero no la cicletanina, desplaza a la indapamina [ $\text{H}^3$ ] de su sitio de unión en el riñón del hámster (87).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales y métodos de esta sección se encuentran descritos en el artículo: "Absence d'effet de la cicletanina et de son métabolite sulfoconjugué sur le récepteur aux thiazides exprimé dans des ovocytes de *Xenopus*"

## RESULTADOS

Con la clonación de CST ha sido posible estudiar a escala molecular el efecto de la cicletanina sobre este cotransportador, estos resultados los exponemos en el artículo siguiente titulado "Absence d'effet de la cicletanina et de son métabolite sulfoconjugué sur le récepteur aux thiazides exprimé dans des ovocytes de *Xenopus*", en donde mostramos el efecto de la cicletanina sobre el cotransportador de  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  sensible a tiazidas, demostrando que el sitio de acción de la cicletanina es diferente de este cotransportador y, por lo tanto, la cicletanina no puede ser considerada como una tiazida.

# Absence d'effet de la cicléтанine et de son métabolite sulfoconjugué sur le récepteur aux thiazides exprimé dans des ovocytes de *Xenopus*

## Summary

### Lack of Effect of Cicletanine and its Sulfoconjugated Metabolite on Thiazide Receptor Expressed in *Xenopus* Oocytes.

A. Monroy\*, C. Plata\*,  
G. Gamba\*,  
M.-T. Droy-Lefaix\*\*  
et R.-P. Garay\*\*\*

Although the renal receptor at which cicletanine acts is unknown, cicletanine was assumed to act like thiazide diuretics. Here we tested cicletanine and its natriuretic metabolite, cicletanine-sulfate, for inhibitory activity against the thiazide-sensitive NaCl cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes. The renal thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter was expressed in *Xenopus laevis* oocytes injected with rat cRNA TSCr (TSCr : thiazide-sensitive cotransporter from rat kidney) and both, racemic ( $\pm$ ) cicletanine and its sulfoconjugated metabolite were tested for inhibitory activity against oocyte  $^{22}\text{Na}^+$  uptake catalyzed by this cotransporter. Polythiazide was used as reference thiazide. Polythiazide fully inhibited NaCl cotransporter function with  $\text{IC}_{50} = 1.2 \times 10^{-7}$  M. Conversely, neither cicletanine, nor cicletanine sulfate were able to inhibit such cotransporter, i.e.: a minimum concentration of  $10^{-4}$  M of cicletanine was necessary to induce a slight cotransporter inhibition ( $29.5 \pm 18.2\%$ ). Cicletanine sulfate was inactive, even at  $10^{-4}$  M. In conclusion : (i) the natriuretic metabolite of cicletanine (cicletanine sulfate) is unable to inhibit thiazide-sensitive NaCl cotransporter and (ii) inhibition of such cotransporter by cicletanine required concentrations equal or higher than  $10^{-4}$  M - concentrations much more higher than urinary therapeutic ones in humans ( $\approx 10^{-6}$  M). These results clearly demonstrate that cicletanine does not act like thiazide diuretics. Arch Mal Cœur 1999 ; 92 : 1001-4.

Au cours des années 80, de nombreuses études pharmacologiques ont montré que la cicléтанine est un antihypertenseur présentant une double polarité : vasculaire et rénale [1]. Récemment, plusieurs études ont permis de comprendre que ses effets vasorelaxants sont dus, au moins en partie, à l'inhibition de certaines phosphodiésterases (de « faible  $K_m$  ») qui dégradent le GMP cyclique (cGMP) au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires et de l'endothélium vasculaire [2].

En ce qui concerne l'effet natriurétique, la cicléтанine semble agir au niveau du segment cortical de dilution [3], bien que son récepteur rénal ne soit pas encore défini. Par ailleurs, la cicléтанine agit, au moins en partie, par l'intermédiaire de son métabolite urinaire sulfoconjugué : cicléтанine sulfate [4]. A

défaut d'évidences expérimentales ou cliniques, la cicléтанine a été apparentée au point de vue pharmacologique aux diurétiques thiazidiques [5].

Le but de ce travail a donc été d'étudier l'effet de la cicléтанine sur le cotransporteur NaCl sensible aux thiazides, exprimé dans les ovocytes de *Xenopus*. La cicléтанine sulfate (métabolite urinaire natriurétique de la cicléтанine) a été étudiée en parallèle.

## MÉTHODES

### Population

Grenouilles *Xenopus laevis* adultes, femelles (Carolina Biological Supply Company, Burlington, NC, USA). Les grenouilles sont gardées dans une pièce avec humi-

(\*) Instituto de Investigaciones Biomedicas, Universidad Nacional Autónoma de México e Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubiran, Mexico, Vascode Quiroga 15, Tlalpan.

(\*\*) Lab. IPSEN, 24, rue Erlanger, 75015 Paris.

(\*\*\*) INSERM U400, faculté de médecine de Créteil, 8, rue du Général-Sarrail, 94010 Créteil Cedex.

(Tirés à part : Dr R.-P. Garay).

dité et température contrôlées (65 % et 16 °C respectivement). Les animaux reçoivent un régime alimentaire standard (*frog brittle dry food* de *Carolina Biological Supply Company*) et l'eau est changée deux fois par semaine.

#### Préparation des ovocytes et expression du récepteur aux thiazides

Les grenouilles sont anesthésiées avec 0,17 % de tricaine et les agrégats d'ovocytes sont prélevés et incubés pendant 1 h, à température ambiante, avec agitation dans une solution ND96, libre de calcium, contenant (en mM) : 96 NaCl, 2 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub> et 5 Hepes/Tris (pH 7,4) avec 2 mg/mL de collagénase B. Ensuite, les ovocytes sont désagrégés manuellement et incubés pendant la nuit à 17 °C dans un milieu ND96 avec 2,5 mM de pyruvate de sodium et 5 mg/100 mL de gentamicine. Le lendemain, les ovocytes mûrs (stage V-VI) sont injectés avec 50 nL d'une solution contenant ARNc CSTR (CSTR = cotransporteur NaCl, sensible aux thiazides, de rein de rat) à une concentration de 0,5 µg/µL (25 ng par ovocyte) ou avec son véhicule. Les ovocytes sont ensuite incubés à 17 °C dans ce même milieu ND96 (avec 2,5 mM de pyruvate de sodium et 5 mg/100 mL de gentamicine) pendant 3 jours (le milieu d'incubation est changé tous les jours).

Le jour précédant l'expérience, les ovocytes sont incubés dans un milieu Ringer, libre de chlore, avec la composition suivante (en mM) : 96 iséthionate de sodium, 2 gluconate de potassium, 1,8 gluconate de calcium, 1,0 gluconate de magnésium, 5 mM Hepes, 2,5 pyruvate de sodium, 5 mg % gentamicine, pH 7,4) afin de réduire la concentration de chlore intracellulaire et d'augmenter l'énergie nécessaire à l'entrée du sodium par le cotransporteur NaCl [6, 7].

#### Mesure de l'activité du cotransporteur NaCl

L'activité du cotransporteur NaCl a été déterminée en mesurant l'entrée du <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> dans les ovocytes injectés avec ARNc (acide ribonucléique complémentaire) CSTR. Les ovocytes sont incubés pendant 30 min dans un milieu libre de potassium et de chlore (en mM : 96 sodium iséthionate, 1,8 calcium gluconate, 1,0 gluconate de magnésium, 5 mM Hepes, 2,5 pH 7,4) avec 1 mM d'ouabaïne, 100 µM d'amiloride et 100 µM de bumétanide : suivis de 60 min d'incubation à 30 °C dans un milieu Ringer (en mM : 40 NaCl, 56 NMDG-Cl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1,8 CaCl<sub>2</sub>, et 5 HEPES/Tris, pH 7,4) contenant 2,5 µCi/mL de <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> et les mêmes inhibiteurs utilisés pendant l'incubation précédente.

À la fin de la période d'entrée de <sup>22</sup>Na<sup>+</sup>, les ovocytes sont lavés 5 fois avec une solution froide et libre d'isotope et lysés avec une solution de dodécyl sulfate de sodium (10 %) et l'activité du <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> est mesurée par scintillation β.

#### Produits

La ciclélanine racémique (±) et son métabolite sulfoconjugué (ciclélanine sulfate) : Laboratoire IPSEN (Paris) – <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> : Dupont New England Nuclear (Boston,

États-Unis) – Ouabaïne, amiloride et bumétanide : Sigma (St Louis, États-Unis) – Collagénase B et enzymes de restriction : Boehringer (Mannheim, Allemagne).

La sensibilité du cotransporteur NaCl à la ciclélanine et au polythiazide a été testée pendant la période d'incubation et d'entrée de <sup>22</sup>Na<sup>+</sup>.

#### Analyse statistique

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (*Standart error of the mean*). Les différences de moyennes sont testées à l'aide d'un test non apparié de Student. La significativité statistique est acceptée pour des valeurs de  $p < 0,05$ .

## RÉSULTATS

#### Entrée du <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> dans les ovocytes de *Xenopus*

L'ARNc CSTR est injecté dans les ovocytes de *Xenopus* et l'entrée de <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> est mesurée comme il est décrit précédemment. La figure 1 compare l'entrée de <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> dans ces ovocytes vis-à-vis des ovocytes contrôles (injectés avec du véhicule). On peut observer que l'injection de l'ARNc CSTR induit une très importante (4 124 ± 429 pmol/ovocyte/h) et significative ( $p < 0,001$ ,  $n = 5$ ) augmentation de la vitesse d'entrée de <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> (vs 108 ± 17 pmol/ovocyte/h au niveau des ovocytes contrôles). De plus, le polythiazide antagonise complètement cette stimulation d'entrée de <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> (177 ± 18 pmol/ovocyte/h,  $p < 0,001$  vs groupe ARNc

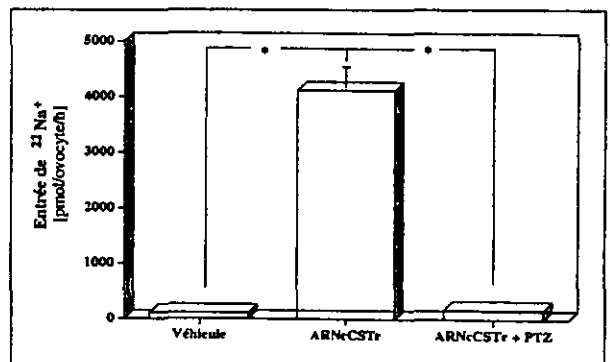


FIG. 1. – Entrée de <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> au niveau des ovocytes de *Xenopus laevis* injectés avec de l'ARNc CSTR (CSTR = cotransporteur NaCl, sensible aux thiazides, de rein de rat). L'injection de l'ARNc CSTR induit une très importante et significative augmentation de la vitesse d'entrée de <sup>22</sup>Na<sup>+</sup>, qui est complètement inhibée par le polythiazide (PTZ). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM de 5 expériences, réalisées avec des ovocytes de 5 grenouilles différentes.  $p < 0,05$ . FIG. 1. – Entry of <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> into *Xenopus laevis* oocytes injected with RNAc CSTR (CSTR = thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter, rat kidney) injection of RNAc CSTR induces a very big and significant increase in entry of <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> which is completely inhibited by the polythiazide. Values expressed as mean ± SD of 5 experiments performed with oocytes of 5 different frogs. \* :  $p < 0,05$  (unpaired Student's test).

CSTR ; fig. 1). Ces résultats montrent que l'injection de l'ARNc CSTR dans les ovocytes de *Xenopus* induit l'expression du cotransporteur NaCl.

### Sensibilité du cotransporteur NaCl à la ciclétanine

La figure 2 montre que le polythiazide inhibe totalement l'activité du cotransporteur NaCl des ovocytes avec une  $CI_{50} = 1,2 \cdot 10^{-7}$  M. Par contre, la ciclétanine s'est avérée incapable d'inhiber ce cotransporteur, c'est-à-dire qu'une dose minimale de  $10^{-4}$  M de ciclétanine est nécessaire pour provoquer une faible inhibition ( $29,5 \pm 18,2$  %). La figure 3 montre que la ciclétanine sulfate, quant à elle, est complètement inactive, et cela même à  $10^{-4}$  M.

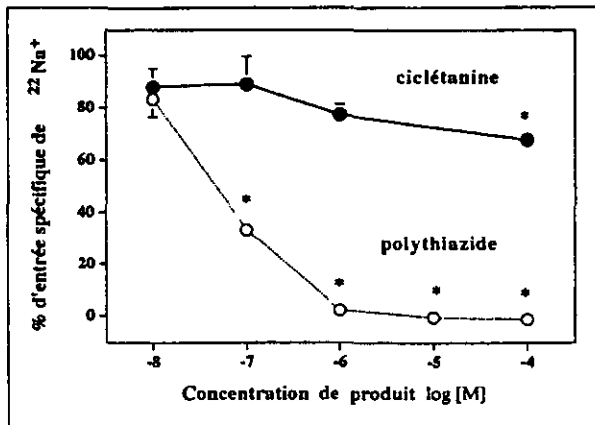


FIG. 2. - Effet de la ciclétanine sur l'activité du cotransporteur NaCl exprimé dans les ovocytes de *Xenopus laevis*. La ciclétanine n'inhibe ce cotransporteur que faiblement ( $29,5 \pm 18,2$  %) et à de très fortes doses ( $10^{-4}$  M). Par contre, le polythiazide l'inhibe totalement avec une  $CI_{50} = 1,2 \cdot 10^{-7}$  M. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM ( $n = 10^{-18}$  par point expérimental) ; \* :  $p < 0,05$ .  
 FIG. 2. - Effects of cicletanine on the activity of Na-Cl cotransporter expressed in the ovocytes of *Xenopus laevis*. Cicletanine is only a weak inhibitor of this cotransporter ( $29,5 \pm 18,2\%$ ) and at very high doses ( $10^{-4}$  M). On the other hand, polythiazide inhibits it totally with a  $CI_{50} = 1,2 \times 10^{-7}$  M. The values are expressed as the mean  $\pm$  SD ( $N = 10^{-18}$  per experimental point). \* :  $p < 0,05$  (unpaired Student's test).

### DISCUSSION

Le cotransporteur NaCl du rein de rat a été exprimé dans les ovocytes de *Xenopus laevis*, afin de tester la ciclétanine et son métabolite sulfate pour leur capacité à inhiber l'entrée du  $^{22}\text{Na}^+$  catalysée par ce cotransporteur. La ciclétanine est un très modeste inhibiteur du cotransporteur NaCl et la ciclétanine sulfate, quant à elle, est complètement inactive.

**MOTS CLÉS :** ciclétanine, thiazides, cotransporteur NaCl, diurétiques, transport ionique.

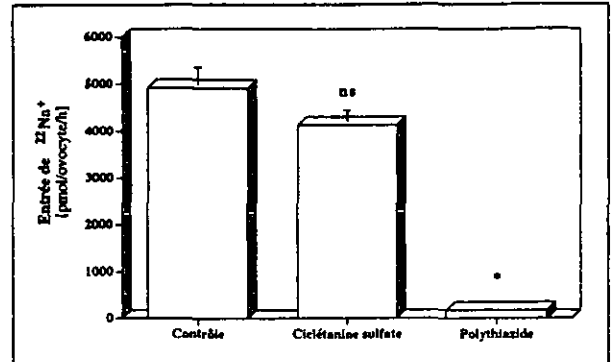


FIG. 3 - Absence d'effet de la ciclétanine sulfate sur l'activité du cotransporteur NaCl exprimé dans les ovocytes de *Xenopus laevis*. La ciclétanine sulfate est testée à la concentration de  $10^{-4}$  M. Le polythiazide ( $10^{-4}$  M) inhibe totalement le cotransporteur NaCl. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM de 4 expériences, réalisées avec des ovocytes de 4 grenouilles différentes ; ns : non significatif ; \* :  $p < 0,05$ .  
 FIG. 3 - Effects of cicletanine sulphate on the activity of Na-Cl cotransporter expressed in the ovocytes of *Xenopus laevis*. Cicletanine sulphate was tested at  $10^{-4}$  M. Polythiazide ( $10^{-4}$  M) inhibits Na-Cl cotransporter. The values are expressed as the mean  $\pm$  SD of 4 experiments with ovocytes of 4 different frogs. NS : not significant ; \* :  $p < 0,05$  respectively (unpaired Student's test).

L'inhibition du cotransporteur NaCl par la ciclétanine nécessite des concentrations égales ou supérieures à  $100 \mu\text{M}$ . Cela contraste avec les faibles concentrations urinaires de la ciclétanine inchangée : (i)  $= 15 \mu\text{M}$  chez des rats traités avec des doses natriurétiques de ciclétanine (calculé à partir des données de la réf. 8) et (ii)  $0,9-1,6 \mu\text{M}$  chez le volontaire sain recevant une dose thérapeutique de ciclétanine (calculé à partir des données de la réf. 9). On peut donc conclure que le mécanisme natriurétique de la ciclétanine n'implique pas le cotransporteur NaCl sensible aux thiazides. Un argument supplémentaire confirmant ce point est que la ciclétanine sulfate - métabolite natriurétique de la ciclétanine - est dépourvue d'activité inhibitrice sur le cotransporteur NaCl.

### CONCLUSION

Le métabolite natriurétique de la ciclétanine (ciclétanine sulfate) n'exerce aucune activité sur le cotransporteur NaCl sensible aux thiazides et l'inhibition de ce cotransporteur par la ciclétanine nécessite des concentrations égales ou supérieures à  $100 \mu\text{M}$  - concentrations très supérieures aux concentrations urinaires thérapeutiques de ciclétanine chez l'homme ( $= 1 \mu\text{M}$ ). Nos résultats démontrent donc que la ciclétanine n'est pas un diurétique apparenté sur le plan pharmacologique aux diurétiques thiazidiques.

## Références

1. Koltai M, Esanu A, Braquet P. Relaxation of vascular smooth muscle by cicletanine. Importance of potassium channels and prostacyclin. In : Frölich JC, Försterman U (eds). *Klinische Pharmakologie. Clinical pharmacology. Importance of prostacyclin and potassium channels for the regulation of vascular tone.* Munich : Zuckschwerdt Verlag, 1990, vol. 7 : 106-36.
2. Garay RP, Alvarez-Guerra M, Alda O. Pharmacologie des énantiomères et des métabolites du cicletanine. *La Lettre du Pharmacologue* 1997; 11(suppl au n° 1): 22-6.
3. Hadj-Aïssa A, Pozet H, Labelin M, Zech P. Site of renal action of cicletanine in man. In : Puschet SB, Greenberg A (eds). *Diuretics II. Chemistry, pharmacology and clinical applications.* New York : Elsevier, 1987: 35-9.
4. Garay RP, Rosati C, Fanous K, Allard M, Morin E, Lamiable D, et al. Evidence for (+)-cicletanine sulfate as an active natriuretic metabolite of cicletanine in the rat. *Eur J Pharmacol* 1995 ; 274 : 175-80.
5. *Dictionnaire Vidal. Cicletanine.* Paris: Éditions du Vidal 1998.
6. 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 USA* 1993 ; 90 : 2749-53.
7. 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 : 17713-22.
8. Vistelle R, Lamiable D, Morin E, Trenque T, Kaltenbach M. Urinary excretion of cicletanine in the rat. *Drug Metab Disposition* 1995 ; 23 : 988-92.
9. Pruñonosa J, Peraire C, Torrent J, Obach R. Pharmacokinetic study of cicletanine in healthy volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1992 ; 30 : 265-70.

## EFFECTO DE LA N-GLUCOSILACIÓN EN LA ACTIVIDAD DEL COTRANSPORTADOR DE Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> SENSIBLE A TIAZIDA

### INTRODUCCIÓN

El peso molecular previsto por la secuencia para la proteína del CST es de 110 KDa. Sin embargo, los pesos moleculares mayores observados en el análisis de 'Western blot', entre 135 y 150 KDa, utilizando un anticuerpo específico, sugieren que la proteína está glucosilada. (33).

Las glucoproteínas son proteínas que tienen una cadena de oligosacáridos unida a alguno de sus restos aminoacídicos dispuestos extracelularmente. La unión covalente de la cadena de oligosacáridos puede darse a residuos aminoacídicos del tipo de serina y treonina llamada O-glucosilación, debido a que la cadena de oligosacáridos se une al átomo de oxígeno de las cadenas laterales de estos residuos, mientras que en la N-glucosilación se une al átomo de nitrógeno del radical amida en la cadena lateral de un residuo de asparagina. Mientras la O-glucosilación es un evento postraducciona l y no depende de la estructura primaria de la proteína, la N-glucosilación es un evento cotransducciona l en el cual una cadena de oligosácaridos es transferida al polipéptido naciente en residuos de asparagina dentro de una secuencia consenso específica (Asn-Xaa-Ser/Thr, Xaa≠Pro;88). La secuencia aminoacídica de CST de rata (CSTr) incluye algunas secuencias consenso para N-glucosilación, dos de las cuales están presentes en posibles asas extracelulares. Algunos estudios indican que la N-glucosilación en algunas proteínas puede tener un papel modulador de su actividad y su vida media biológica, en dirigir el ensamblaje de las proteínas, y en la regulación de su expresión en la superficie celular.

El presente estudio fue llevado a cabo para discernir si la glucosilación afecta la función del CSTr.



## MATERIALES Y MÉTODOS

Racimos de ovocitos, fueron incubados durante una hora en agitación continua en un medio libre de  $\text{Ca}^{++}$ , ([mM] 82.5 NaCl, 2.0 KCl, 1.0  $\text{MgCl}_2$  y 5.0 Hepes/Tris, pH 7.4), conteniendo 2 mg/ml de colagenasa tipo B. Posteriormente, los ovocitos en estadio V y VI fueron transferidos a Ringer de rana ND96 ([mM]: 96.0 NaCl, 2.0 KCl, 1.8  $\text{CaCl}_2$ , 1.0  $\text{MgCl}_2$  y 5.0 Hepes/Tris, pH 7.4), defoliculados manualmente, utilizando pinzas finas e incubados toda la noche a 18 °C. Al día siguiente, los ovocitos que resisten la manipulación (comúnmente >95%) fueron inyectados con 50 nl de agua como control o con agua conteniendo 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de ARN complementario que fue transcrito *in vitro* usando el promotor de ARN T7 en presencia del análogo CAP, de la clona silvestre y las mutadas, previa linearización con la enzima *Not1* (Boehringer Mannheim). Los ovocitos fueron incubados en solución ND96, adicionada con piruvato de sodio (25 mM) y gentamicina (5 mg/ml) durante tres días y al cuarto día en ND96 libre de  $\text{Cl}^-$  ([mM]: 96 isetonato de  $\text{Na}^+$ , 2.0 gluconato de  $\text{K}^+$ , 1.8 gluconato de  $\text{Ca}^{++}$ , 1.0 gluconato de  $\text{Mg}^{++}$  y 5.0 H Hepes/Tris, pH 7.4) para reducir la actividad celular del  $\text{Cl}^-$  y así aumentar la potencia de ingreso del marcador. La captación con  $^{22}\text{Na}^+$  fue realizada en grupos de 20 a 30 ovocitos cuatro días después de la inyección utilizando el siguiente protocolo: una incubación de 30 min. en un medio de ND96 sin  $\text{Cl}^-$  ([mM]: 96.0 gluconato de  $\text{Na}^+$ , 2.0 gluconato de  $\text{K}^+$ , 6.0 gluconato de  $\text{Ca}^{++}$ , 1.0 gluconato de  $\text{Mg}^{++}$  y 5.0 Hepes/Tris, pH 7.4) conteniendo ouabaína (1 mM), amilorida (0.1 mM) y bumetanida (0.1 mM), seguido por un período de captación de 60 min. en un medio con NaCl libre de  $\text{K}^+$  ([mM]: 80.0 NaCl, 16.0 gluconato de  $\text{Na}^+$ , 2.0 KCl, 1.8  $\text{CaCl}_2$ , 1.0  $\text{MgCl}_2$  y 5.0 Hepes/Tris, pH 7.4), conteniendo ouabaína, amilorida, bumetanida, en las concentraciones citadas y 2  $\mu\text{Ci}$  de  $^{22}\text{Na}^+$  por ml (NEN). La ouabaína fue agregada para evitar el eflujo de  $^{22}\text{Na}^+$  por medio de la  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$  y la amilorida para prevenir la captación del  $^{22}\text{Na}^+$  por medio de canales de  $\text{Na}^+$  o del contratransportador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . La exclusión del  $\text{K}^+$  extracelular y la adición de bumetanida al medio de captación fue para prevenir la captación de  $^{22}\text{Na}^+$  por medio del cotransportador de  $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$  endógeno

expresado en ovocitos (6). Para determinar la fracción de la captación dependiente de  $\text{Cl}^-$ , grupos pareados de ovocitos fueron incubados en medios de captación con o sin  $\text{Cl}^-$  ([mM]: 96.0 gluconato de  $\text{Na}^+$  6.0 gluconato de  $\text{Ca}^{2+}$ , 1.0 gluconato de  $\text{Mg}^{2+}$  y 5.0 Hepes/Tris, pH 7.4). La sensibilidad a la tiazida fue obtenida midiendo la captación de  $^{22}\text{Na}^+$  en grupos pareados de ovocitos con o sin metolazona (0.1 mM) en el medio de incubación y de captación. Todos los experimentos fueron realizados a 32 °C.

## RESULTADOS

La estructura primaria de CSTR contiene 7 sitios consenso para N-glicosilación, sólo tres de los cuales, N247, N404 y N424, están localizados en asas extracelulares de la proteína de acuerdo al modelo de estructura secundaria propuesto y por lo tanto susceptibles de glicosilación *in vivo*.

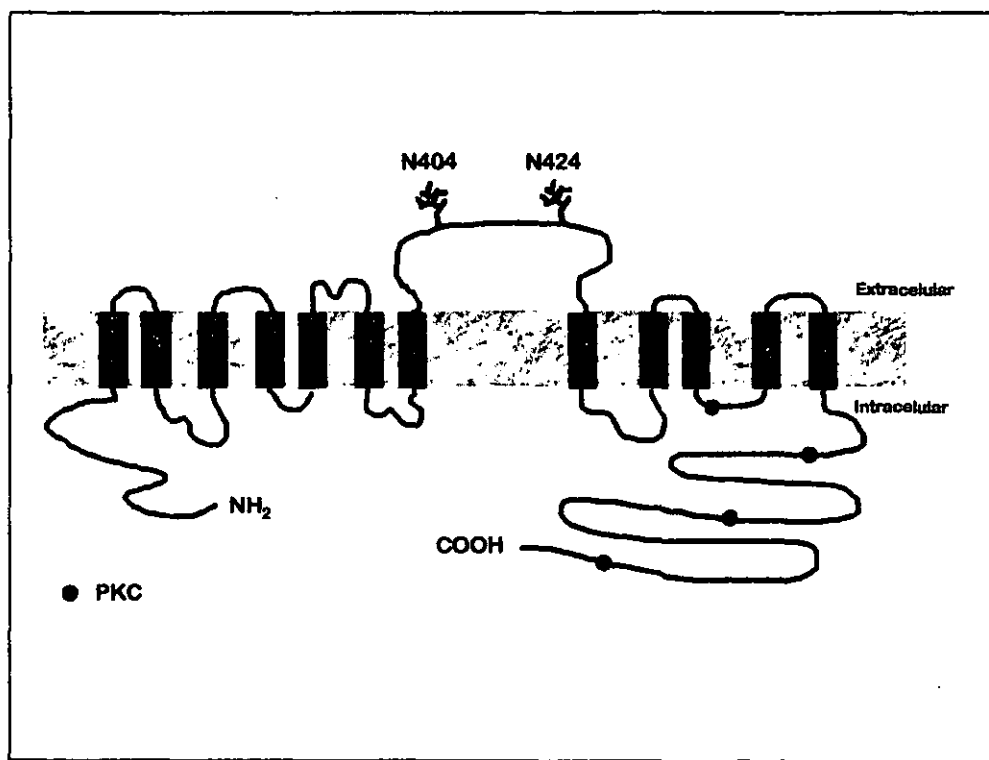


Figura 1. Topología básica y sitios de glicosilación en el transportador de  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  de la rata (CSTR) según el algoritmo Asn-Xaa-Ser/Thr, donde Xaa es cualquier aminoácido excepto prolina (113).

Con respecto a las otras cuatro secuencias consenso, dos de ellas, N356 y N546, están localizadas dentro de regiones hidrofóbicas de la proteína que predicen regiones transmembrana. Las dos secuencias consenso restantes, N666 y N779, pertenecen a la región carboxiterminal de la proteína, que posiblemente se encuentra localizada intracelularmente, y por lo tanto sin posibilidad de estar glucosiladas. En revisiones recientes de proteínas con múltiples cruces transmembrana se hacen notar condiciones óptimas para que los sitios consenso de N-glucosilación sean utilizados *in vivo* (88,91). Entre las condiciones descritas se encuentran: las características de los aminoácidos cercanos a la secuencia consenso, la localización del sitio consenso con relación a las regiones hidrofóbicas, el tamaño del asa extracelular en la cual se localiza el sitio de glucosilación, así como si el sitio se mantiene conservado en las diferentes especies. Mientras la secuencia consenso N-Xaa-S/T, Xaa≠P, es un prerrequisito para la N-glucosilación, esta puede no ser suficiente, debido a que muchas proteínas que contienen tales secuencias consenso no se encuentran glucosiladas. Se ha reportado por varios autores (89,90), que la presencia de un residuo de prolina en posición carboxiterminal después de la secuencia consenso impide la glucosilación. Específicamente en el caso del sitio N247, su localización se halla cercana a la tercera región transmembrana y en una asa relativamente pequeña (17 residuos), la secuencia cercana al sitio (N247GTP), contiene un residuo de prolina, además de no encontrarse presente en el lengüado de invierno, ni en el humano. Todo lo anterior resume condiciones adversas para la glucosilación *in vivo* de este sitio. A diferencia de lo discutido para N247, la secuencia para los otros dos sitios está libre de prolina cercana al sitio consenso (N404DTI y N424FTE). Asimismo los sitios N404 y N424 se encuentran en una larga asa extracelular de aproximadamente 59 residuos aminoacídicos entre el séptimo y octavo cruce transmembrana y se encuentran conservados en todas las secuencias conocidas de CST, por lo que se considera que es más probable que estos sitios se encuentren glucosilados *in vivo*.

La posibilidad de que en CSTr uno o varios de los sitios de glucosilación localizados en un asa extracelular fuesen utilizados *in vivo* fue considerada

después del trabajo de Gamba y col.(6), quienes utilizando traducción *in vitro* del ARNc de CSTr observaron un aumento en el peso molecular aparente en la presencia de membranas microsomales caninas, las cuales expresan actividad oligosacaril transferasa, y este efecto fue revertido mediante deglucosilación enzimática utilizando endoglucosidasa H.

Análisis de Western blot de proteínas de membrana de células HEK293 transfectadas con CSTr y la mutante de CSTr N404Q,N424Q demostraron que la glucosilación fue totalmente eliminada en la doble mutante o por tratamiento con tunicamicina en la cepa silvestre (92).

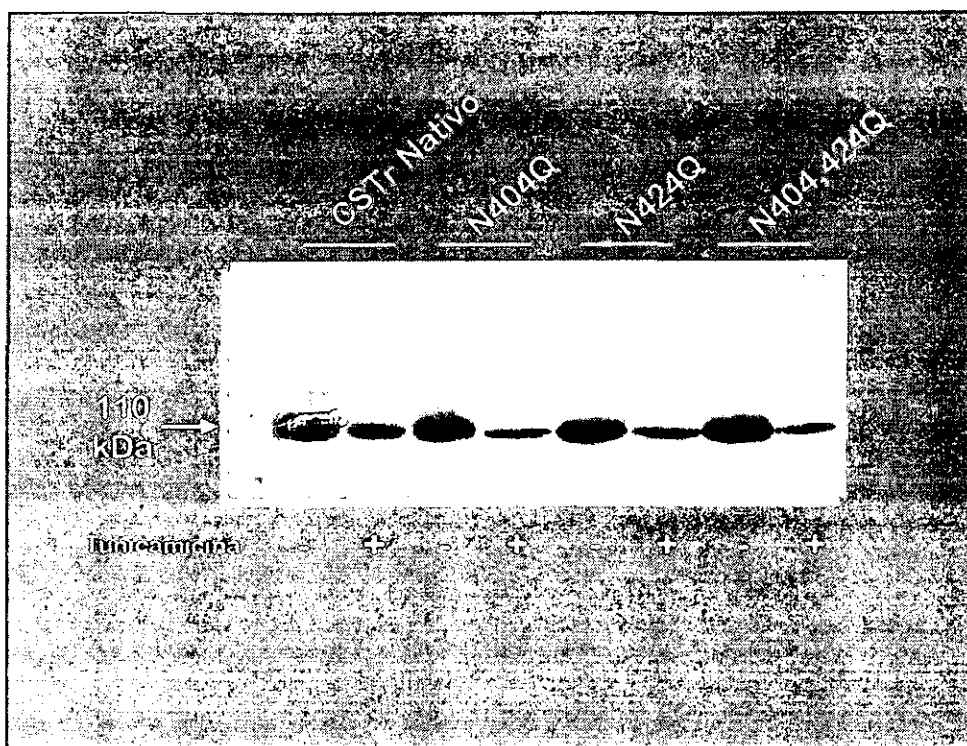


Figura 2. Análisis de Western blot de CSTr nativo y de las clonas N404Q, N424Q y N404,424Q. En presencia y ausencia de tunicamicina (92).

La tunicamicina, enzima aislada del hongo *Streptomyces lysosypirificus* con peso molecular entre 802 y 858 KDa, inhibe la transferencia de GlcNAc-1-P desde la UDP-GlcNAc al dolicol-P para formar dolicol-PP-GlcNAc. Esta última molécula corresponde al inicio de la cadena de oligosacáridos, y por lo tanto al evitar su formación se inhibe la N-glucosilación. Por otro lado las mutantes N404Q y N424Q mostraron una reducción significativa de la banda de mayor peso molecular,

reflejando una glucosilación parcial, mientras que la doble mutación y la cepa silvestre tratada con tunicamicina se expresaron como formas no-glucosiladas (110 KDa).

Para analizar el efecto de la N-glucosilación en las propiedades funcionales de CSTR se utilizaron a las mutantes de glucosilación en donde las argininas de los sitios 404 y 424 fueron cambiados a residuos glutamina mediante mutaciones puntuales. Estas mutantes fueron producidas por Nishio Toshi en el laboratorio del Dr. Steven C. Hebert, en la Universidad de Yale, con quienes colaboramos para realizar este trabajo.

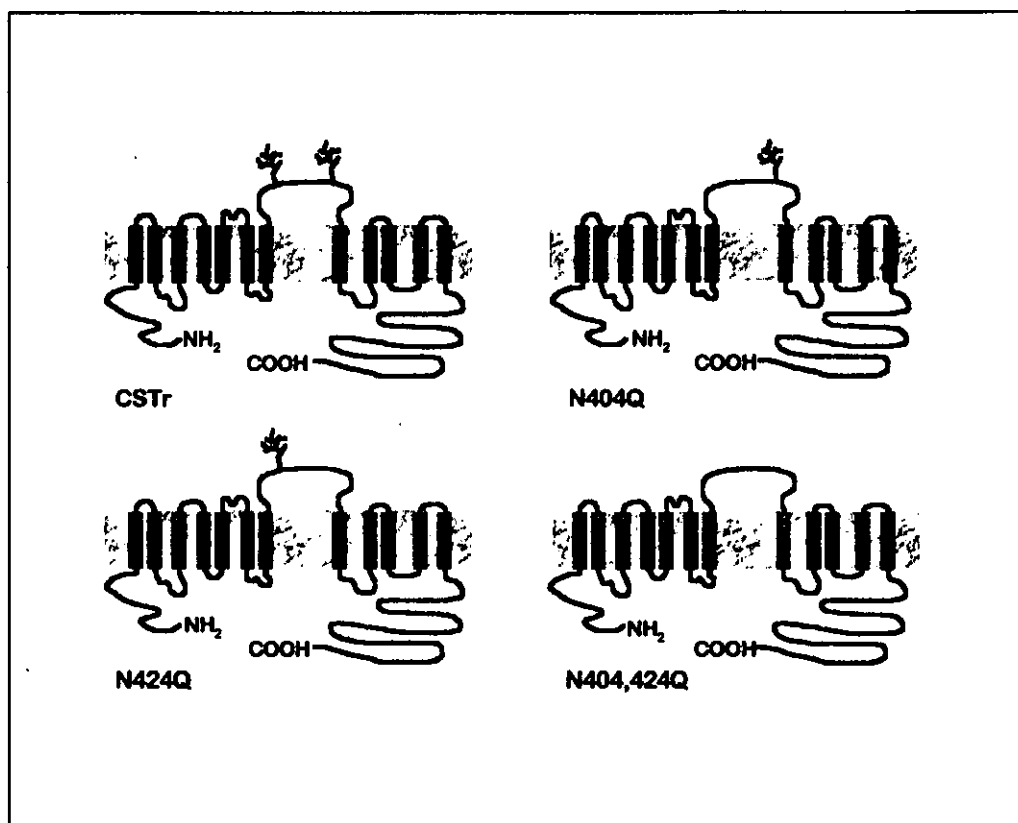


Figura 3. Clonas mutantes producidas mediante mutagénesis puntual con PCR del CSTR.

De esta forma se realizaron ensayos de captación de  $^{22}\text{Na}^+$  en ovocitos inyectados con CSTR silvestre y con las mutantes N404Q, N424Q y N404,424Q.

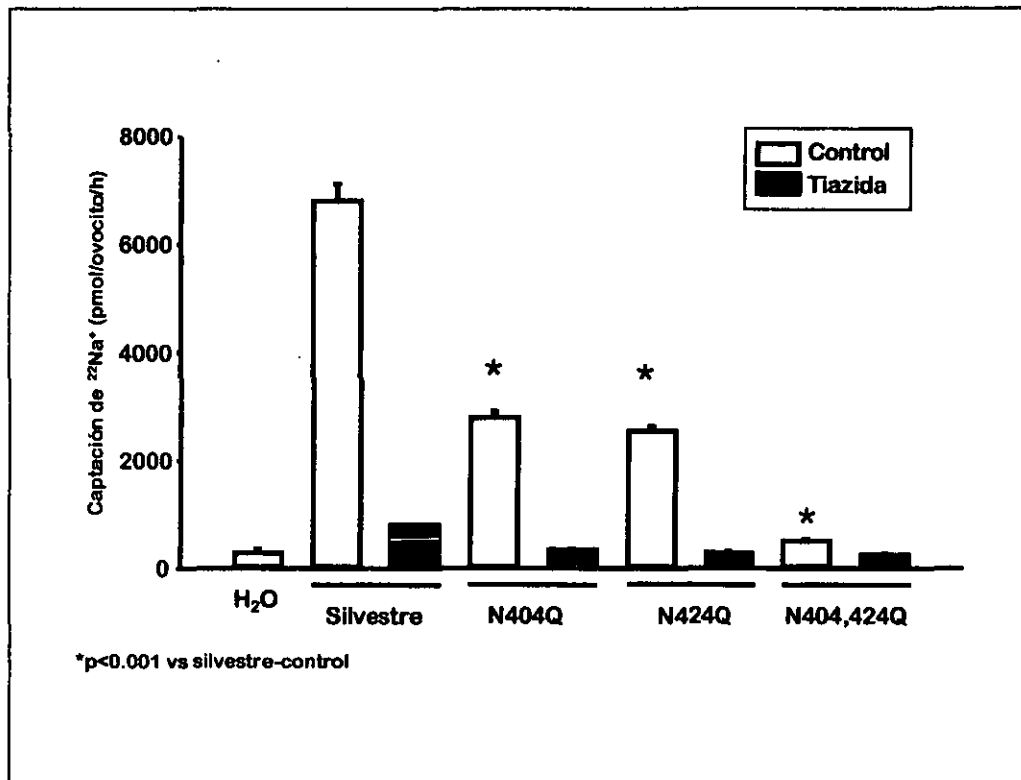


Figura 4. Expresión funcional en ovocitos de *Xenopus laevis* del CSTR silvestre y las clonas mutantes N404Q, N424Q y N404,424Q

Los ovocitos inyectados con la clona silvestre mostraron una captación de  $^{22}\text{Na}^+$  significativamente mayor que la observada en los ovocitos controles inyectados con agua. La captación de  $^{22}\text{Na}^+$  observada en los ovocitos inyectados con la cepa silvestre fue completamente abolida en ausencia de cloro extracelular o en presencia de 0.1 mM de metolazona, siendo estas propiedades características del cotransportador de  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  sensible a tiazidas. Los ovocitos inyectados con ARNc transcrito a partir de ADNc de la mutante de glucosilación N404Q también mostraron una captación de  $^{22}\text{Na}^+$  significativamente mayor al control, la cual fue  $\text{Cl}^-$  dependiente y sensible a tiazida. Sin embargo el nivel de captación en los ovocitos inyectados con la mutante N404Q fue en un 65 a 70% menor que en el grupo pareado de ovocitos inyectado con la clona silvestre ( $p<0.01$ ). De igual manera los ovocitos inyectados con el ARNc de la mutante N424Q presentaron captación de  $^{22}\text{Na}^+$  significativamente mayor que el control inyectado con agua, esta captación fue dependiente de  $\text{Cl}^-$  y sensible a tiazida, de la misma forma esta captación fue en un 65 a 70% menor que el grupo pareado de

ovocitos inyectados con la clona silvestre. La captación obtenida por las dos clonas mutantes N404Q y N424Q es muy similar. Por otra parte la captación de  $^{22}\text{Na}^+$  en los ovocitos inyectados con el ARNc de la doble mutante N404,424Q se ve reducida en un 97% y cerca del nivel de los ovocitos inyectados con agua, es decir, la captación de esta mutante eliminó casi completamente la función del CSTR.

Para explorar el mecanismo de reducción de la captación de  $^{22}\text{Na}^+$  en las mutantes de glucosilación, realizamos análisis cinético de la clonas de CSTR usando un amplio rango de concentraciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en el medio de captación (0, 2.5, 5, 10, 15, 20, 40 y 80 mM).

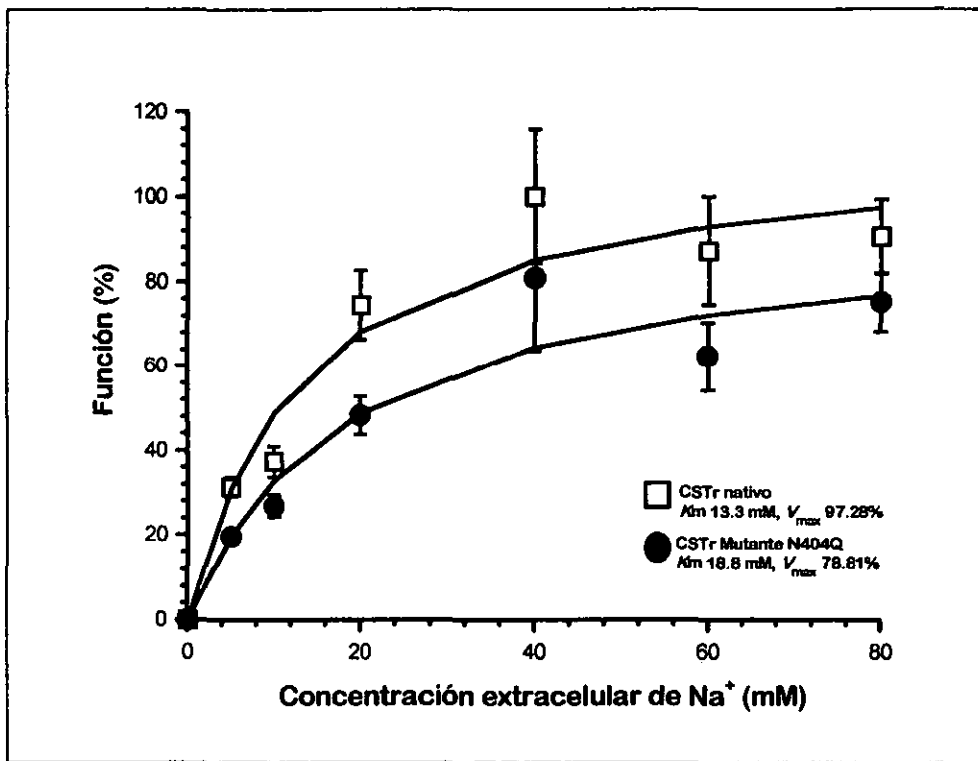


Figura 5. Cinética del transporte de  $\text{Na}^+$  en ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con ARNc del CSTR nativo y de la mutante de CSTR N404Q.

Las figuras 5 y 6 muestran el desarrollo cinético de la captación de  $^{22}\text{Na}^+$  en los ovocitos inyectados con la cepa silvestre de CSTR y con la mutante N404Q expuestos a diferentes concentraciones de  $\text{Cl}^-$  o  $\text{Na}^+$  extracelular. La mutante de glucosilación N404Q inyectada en ovocitos mostró una afinidad iónica similar comparada con la cepa silvestre de CSTR. La  $K_m$  para  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  fue de  $13.3 \pm 4.8$  y

3.6 ± 1.7 mM para la cepa silvestre y de 18.8 ± 8.4 y 4.9 ± 3.0 mM para la clona mutante N404Q. Por lo que se considera que la N-glicosilación no se encuentra involucrada en la determinación de la afinidad iónica del CSTR. Sin embargo, existe una tendencia hacia velocidades máximas menores para ambos iones entre la cepa silvestre de CSTR y la mutante de glicosilación N404Q. La  $V_{max}$  para  $Na^+$  fue de 97.28% en la cepa silvestre de CSTR contra 78.81% en N404Q. En el caso del  $Cl^-$  la  $V_{max}$  fue de 88.8% para la cepa silvestre y 68.66% en N404Q.

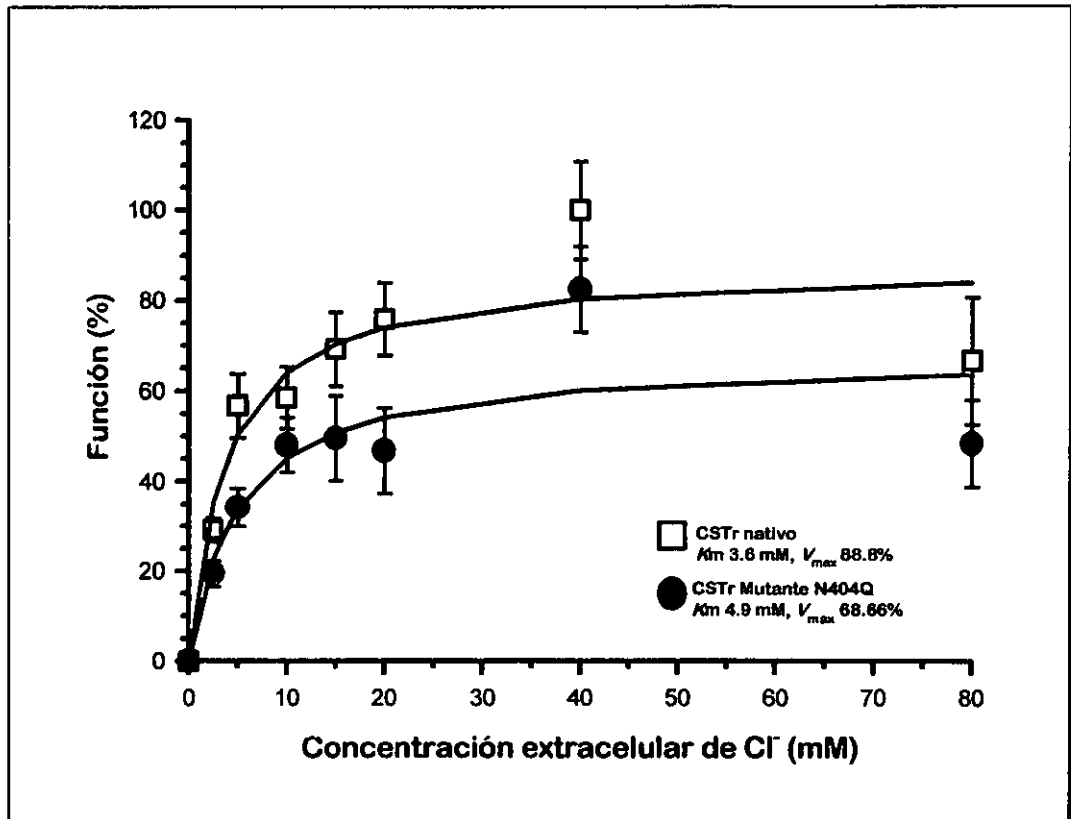


Figura 6. Cinética del transporte de  $Cl^-$  en ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con ARNc del CSTR nativo y del CSTR mutante N404Q.

Estos datos cinéticos sugieren que la N-glicosilación de CSTR es necesaria para la función del cotransportador. La  $V_{max}$  menor observada en la mutante de glicosilación N404Q puede ser secundaria a una disminución en la síntesis o recambio de la proteína, por una disminución en el número de transportadores funcionales en la superficie de membrana, o por una reducción en la función de los cotransportadores expresados en la superficie que podrían explicar la disminución significativa de la captación observada en las mutantes de glicosilación.



## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Se ha descrito el efecto de la glucosilación en la actividad funcional de diferentes tipos de proteínas membranales de transporte. La glucosilación ha mostrado ser importante en el mantenimiento de la estructura de la proteína con alta afinidad para el sustrato, como es el caso del transportador de glucosa GLUT1 (93) y en el transportador catiónico-orgánico (94) con un aumento en la  $K_m$  y ningún cambio en la  $V_{max}$  después de la inhibición de la glucosilación. Por otra parte, la glucosilación ha mostrado afectar la actividad de transporte máximo, pero no la  $K_m$  en el transportador de glicina GLYT1 (95), el contratransportador  $Na^+/H^+$  (96), el transportador renal de Na-Pi (97) y el transportador de serotonina (98). Los mecanismos subyacentes a estos cambios parecen ser defectos en el ensamblaje de la proteína a la membrana plasmática en GLYT1 no-glucosilada y probablemente en los transportadores de Na-Pi, y una reducción *in situ* en la actividad de transporte en los transportadores de serotonina y  $Na^+/H^+$ . Lo anterior sugiere que para algunos transportadores la glucosilación puede ser importante en el mantenimiento de la forma activa del transportador en la membrana, quizá promoviendo su estabilidad o previniendo su proteólisis, como ha sido visto para proteínas sin una estructura terciaria adecuada dentro del lumen del retículo endoplásmico. De esta forma el papel preciso de la N-glucosilación puede variar dependiendo de la proteína específica de interés.

Kunchaparty y col., (83) mediante expresión funcional en ovocitos de *Xenopus* encontraron que, en contraste con la clona silvestre de CST, la cual mostró una captación de  $^{22}Na^+$  sensible a tiazida, la clona que contiene una mutación detectada en pacientes con síndrome de Gitelman que carece de 54 aminoácidos en la región carboxiterminal (R948X) no mostró aumento en la captación de  $^{22}Na^+$  en comparación a ovocitos controles inyectados con agua. De esta forma la mutación del síndrome de Gitelman elimina completamente la capacidad de la proteína para transportar sal. El mecanismo por el cual la mutación de Gitelman afecta el transporte fue investigada usando el sistema de expresión en ovocitos de *Xenopus*. Se encontró que la mutante de CST R948X

era traducida normalmente por los ovocitos, pero no era glucosilada e inclusive la proteína mutada no era descargada en la membrana plasmática. Estos datos sugieren que mutaciones que conllevan a un desarreglo estructural de la proteína activan el sistema de control de calidad del retículo endoplásmico. El sistema de control de calidad es capaz de detectar proteínas sin un adecuado arreglo conformacional, marcándolas para degradación, a menudo vía una interacción con el proteosoma dependiente de ubiquitina. En diez mutaciones más presentes en el Síndrome de Gitelman se mostró que la disfunción de la proteína fue causada por defectos en el procesamiento. De esta forma casos del síndrome de Gitelman parecen resultar debido a un plegamiento anormal de la proteína, lo cual activa el sistema de control de calidad del retículo endoplásmico, lo que conlleva a una disminución en la descarga a la membrana plasmática.

Los datos anteriores apoyan la posibilidad de que la eliminación de la glucosilación en CST afecta el ensamblaje de la proteína en el retículo endoplásmico, llevando a una mayor degradación de la proteína y menor llegada de ésta a la membrana plasmática, lo cual explicaría la disminución en la captación de  $^{22}\text{Na}^+$  en las mutantes de glucosilación.

## REGULACIÓN DEL COTRANSPORTADOR DE $\text{Na}^+$ - $\text{Cl}^-$ SENSIBLE A TIAZIDAS POR PROTEÍNA CINASA C

### INTRODUCCIÓN

Como se ha comentado, el riñón es el principal órgano regulador de la composición de los fluidos corporales, para cumplir su función el riñón utiliza miles de nefronas las cuales trabajan en paralelo. Una nefrona es una sucesión de segmentos tubulares compuesta por diferentes tipos de células epiteliales que son capaces de seleccionar específicamente de entre los componentes fluidos corporales, para su eliminación en la orina final, las cantidades exactas de iones y moléculas para mantener la homeostasis. Un número considerable de hormonas controla la actividad de las células renales para mantener el equilibrio hidromineral. Es cada vez más difícil interpretar este control multihormonal en términos de procesos reguladores. Se ha propuesto que las hormonas actúan en combinación: niveles circulantes de las hormonas individuales actúan en las células tubulares pudiendo determinar la configuración de las vías de transporte paracelular y transcelular del epitelio. La configuración podría depender de la distribución y actividad del receptor en la superficie de la membrana basolateral en contacto con las hormonas circulantes. Esta distribución junto con la estimulación de las respectivas vías de transducción de señales podría llevar a los efectos biológicos finales. Es bien conocido que la distribución de los receptores celulares varía de acuerdo a factores tales como la edad, variabilidad nutricional, status hormonal, grado de desensibilización de los receptores, etc. La modulación de las respuestas hormonales dependería por lo tanto del grado de acoplamiento de los complejos hormona-receptor a las diferentes vías intracelulares de transducción de señales y a las interacciones negativas y/o positivas resultantes entre estas vías.

El túbulo contorneado distal es blanco de acción de numerosas hormonas, entre ellas se pueden considerar a la aldosterona (51), paratohormona (PTH), glucagon (99), calcitonina (100), insulina (101), hormona antidiurética (ADH o AVP), péptido atrial natriurético y estradiol (34).

El túbulo contorneado distal expresa receptores de mineralocorticoides y a la enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa, por lo tanto representa un blanco de acción para la aldosterona. Muy recientemente, el cotransportador de Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> apical (CST), el cual constituye la principal vía de transporte apical de Na<sup>+</sup> en este segmento, ha mostrado ser fuertemente inducido por aldosterona en el largo plazo.(102). De igual forma, Colussi et al. reportaron que la terapia antialdosterona es efectiva para aminorar la hipocalemia e hipomagnesemia en el síndrome de Gitelman (103).

Por otra parte, en el riñón, la PTH estimula la reabsorción de calcio en la nefrona distal, inhibe la reabsorción de fosfato y bicarbonato en los túbulos proximales y estimula la síntesis de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> en las células del túbulo proximal. El ARNm del receptor de PTH (PTH1R) ha sido encontrado por técnicas de hibridación *in situ* en el túbulo contorneado distal (104,105). Estudios mediante micropunción han mostrado que PTH, calcitonina y glucagon aumentan la absorción de magnesio en el túbulo distal, aunque no se han discernido los mecanismos involucrados, se sabe que estas hormonas actúan estimulando la acumulación de AMPc celular (99,100). Se ha reportado que la calcitonina de salmón aumenta dos veces la densidad de receptores de tiazida, medidos como cuantificación de [<sup>3</sup>H]metolazona unida a membranas renales de rata (106).

Se ha referido que la insulina produce un efecto antinatriurético que posiblemente sea localizado en el túbulo distal (107). Un nuevo miembro de la familia del receptor de insulina, el receptor relacionado con el receptor de insulina (IRR), se ha encontrado mediante 'Northern blot', PCR e hibridación *in situ* expresado en el túbulo contorneado distal (108).

Los datos anteriores muestran la amplia gama de hormonas que tienen efecto sobre el túbulo contorneado distal, en algunas de ellas, como aldosterona y calcitonina se ha demostrado un aumento en la densidad del cotransportador de

$\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  (CST), aunque el mecanismo mediante el cual se produce este efecto no es conocido, mientras que en el resto de hormonas que actúan sobre el túbulo contorneado distal se ignora el efecto o la interacción de éstas con el cotransportador de  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  sensible a tiazidas (CST).

Muchas de las hormonas que regulan el transporte de agua y electrolitos en el riñón, tales como la hormona paratiroidea (PTH), vasopresina, glucagon y calcitonina comparten un mecanismo común de transducción de señales, una vez que el receptor se une a la hormona conlleva a un aumento en la concentración intracelular de AMPc. También se ha reportado que el receptor de PTH es capaz de acoplar además de a la adenilatociclasa, a la fosfolipasa C (PLC) e incluso se asegura que la estimulación de la absorción de calcio por las células del túbulo contorneado distal mediada por PTH requiere de la activación de ambas vías PKA y PKC (109).

En los últimos años se han acumulado datos que muestran que en adición a los receptores clásicos nucleares, los cuales son factores transcripcionales nucleares activados por ligando, existen también otros receptores para aldosterona que median acciones rápidas, independientes de la transcripción y traducción. Un rápido incremento en inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ),  $\text{Ca}^{++}$ , y/o la actividad de proteína cinasa C (PKC), así como una activación del intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y canales de  $\text{K}^+$  han sido observados en algunos tipos celulares, en particular en el músculo liso vascular y células endoteliales. (102,110).

Si a los datos anteriores aunamos el hecho de que la estructura primaria del cotransportador de  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  sensible a tiazidas (CST) predice la presencia de múltiples sitios potenciales para fosforilación por proteína cinasa C, se puede considerar que el CST puede ser un efector final de las hormonas anteriormente expuestas a través de regulación por medio de fosforilación dependiente de la proteína cinasa C.

Basándose en lo anterior nos dimos a la tarea de estudiar el efecto de la activación de la vía de la PKC sobre la función del CSTr.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

Se realizó expresión funcional del CSTR en ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con ARNc de CSTR. Después de la microinyección del ARNc, los ovocitos fueron incubados por cuatro días en ND96 y un día en ND96 sin cloro. La expresión del CST se determinó en grupos de 20 ovocitos mediante captación de  $^{22}\text{Na}^+$ : incubación de 30 min con 1 mM de ouabaina, 0.1 mM de amilorida y 0.1 mM de bumetanida y a continuación un período de captación de 60 min en ND96 sin potasio, con las mismas drogas y con 2.0  $\mu\text{Ci}$  de  $^{22}\text{Na}^+$ . Para determinar las fracciones de ingreso de  $^{22}\text{Na}^+$  sensibles a tiazida, grupos de ovocitos fueron incubados en presencia de 0.1 mM de tiazida. Se utilizaron las mutantes sencillas S16A, S559A, T889A, S934A, las dobles mutantes S16,559A, S16,T889A, S16,934A, T889A,S934A y la triple mutante S16A-T889A-S934A. Para determinar las fracciones de ingreso de  $^{22}\text{Na}^+$  sensibles a 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), grupos de ovocitos inyectados con ARNc de CSTR y de las diferentes mutantes fueron incubados en presencia de 0.1  $\mu\text{M}$  de TPA. La captación de  $^{22}\text{Na}^+$  se midió en cada ovocito mediante centelleo líquido.

## RESULTADOS

La estructura primaria de CSTR cuenta con ocho sitios consenso para fosforilación por PKC. Los sitios corresponden a los aminoácidos S16, S124, T239, T424, S433, S559, T889 y S934, de estos, tres se encuentran localizados en posibles asas extracelulares de la proteína de acuerdo al modelo de estructura secundaria propuesto (T239, T424 y S433) y por lo tanto no susceptibles de fosforilación. Los dos sitios consenso restantes se encuentran localizados en el segmento aminoterminal (S16 y S124), los cuales son compartidos por el humano, la rata y el ratón pero no por el pez. El sitio S559 se encuentra en el asa intracelular que comunica a los segmentos transmembrana 10 y 11, muy cercano al inicio del undécimo segmento transmembrana y se mantiene conservado en todas las secuencias de CST conocidas. En el segmento carboxiterminal se

encuentran los sitios T889, ausente en el lengüado de invierno, y S934 que se encuentra conservado en todas las secuencias conocidas de CST.

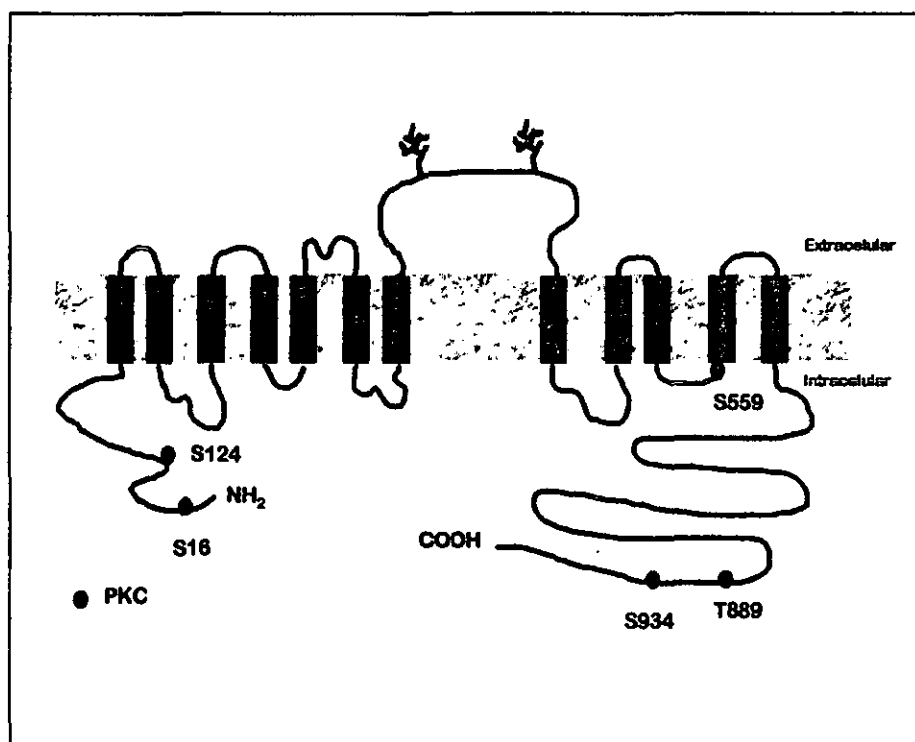


Figura 1. Topología básica y sitios potenciales de fosforilación por PKC en el CSTr, según el algoritmo Arg-Xaa-Xaa-Ser/Thr-Xaa-Arg, donde Xaa es cualquier aminoácido a excepción de prolina.

Para analizar el efecto de la vía de transcripción de señales dependiente de PKC en el CSTr estudiamos el efecto del éster de forbol TPA (activador de la PKC) sobre la función del transportador. También se investigó la diferencia entre la clona silvestre y las mutantes de fosforilación S16A, S559A, T889A, S934A, las dobles mutantes S16,559A, S16,T889A, S16,934A, T889,S934A, la triple mutante S16,T889,S934A y el efecto del TPA sobre estas clonas mutantes.

Para determinar el efecto de los ésteres de forbol sobre la función del CSTr se realizaron ensayos de captación con <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> en ovocitos inyectados con CSTr y expuestos durante 2.5 min a TPA en concentraciones de 10<sup>-7</sup>M. En la figura 2 se observa una captación del radionúclido al menos ochenta veces mayor en los ovocitos inyectados con ARÑc de CSTr (5998.9±89.4 pmol/ovocito/h) comparado

con ovocitos inyectados con agua ( $71.3 \pm 5.2$  pmol/ovocito/h), que funcionan como controles. Esta captación se ve totalmente inhibida cuando los ovocitos son expuestos a 0.1 mM de tiazida ( $130.79 \pm 5.8$  pmol/ovocito/h), el inhibidor específico de CSTR. En el mismo gráfico de la figura 2 podemos observar como la exposición de los ovocitos al éster de forbol TPA  $10^{-7}$  M durante los 2.5 minutos previos a la captación inhibe en un 56% la función del CSTR ( $2684.23 \pm 278.4$  pmol/ovocito/h). Para definir si el efecto del éster de forbol es debido a la activación de la PKC, también se expusieron los ovocitos a un éster de forbol que no activa a la PKC, el  $4\alpha$ PDD  $10^{-7}$  M y como puede observarse los niveles de captación son iguales a aquellos obtenidos en el CSTR ( $6199.9 \pm 222.6$  pmol/ovocito/h).

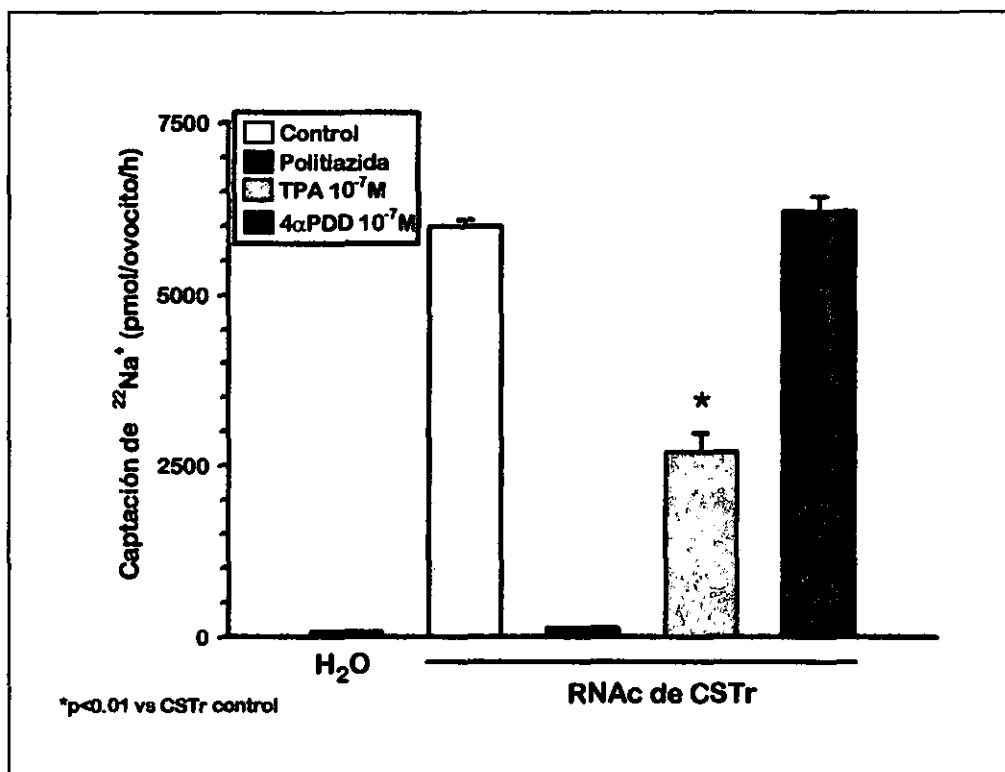


Figura 2. Efecto de los ésteres de forbol TPA y  $4\alpha$ PDD sobre la expresión funcional del CSTR en ovocitos de *Xenopus* inyectados con ARNc. TPA y  $4\alpha$ PDD  $10^{-7}$  M 2.5 min. de exposición durante la preincubación

El efecto del TPA sobre CSTR es tiempo y dosis dependiente. La función de CSTR puede ser inhibida a una concentración de  $10^{-12}$  M (75% de función), sin embargo el efecto máximo se encuentra en concentraciones cercanas a  $10^{-6}$  M (40% de función), como puede observarse en el panel derecho de la figura 3.



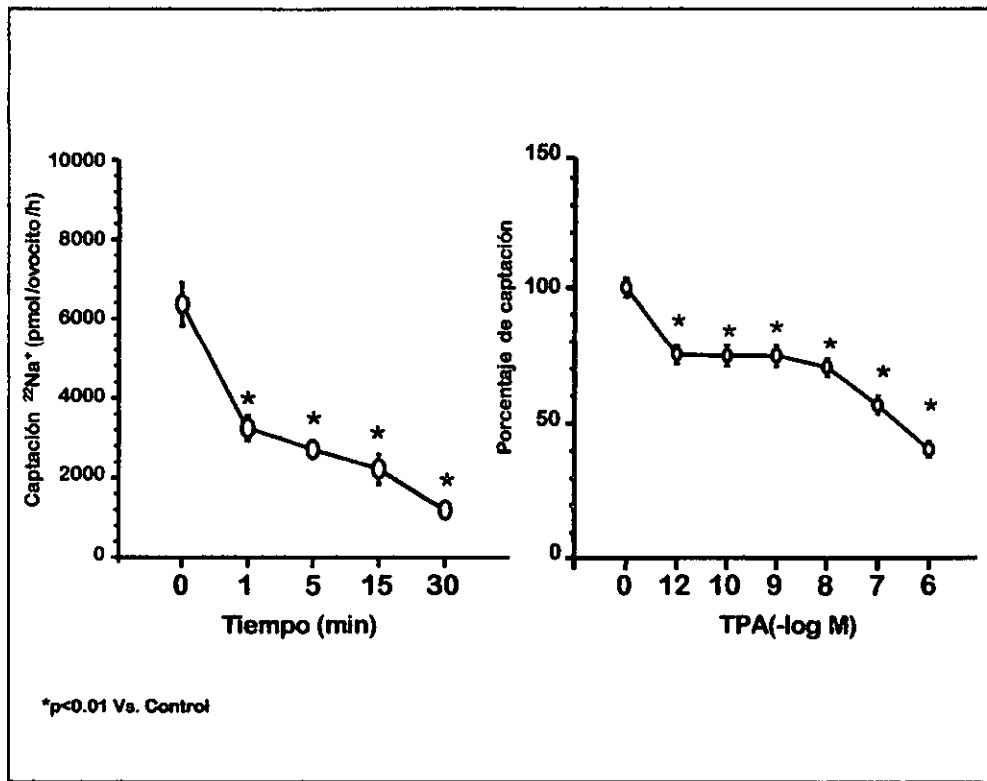


Figura 3. Efecto de la dosis y el tiempo de tratamiento con TPA sobre la función del CSTr.

Respecto al tiempo de tratamiento, panel izquierdo de la figura 3, la inhibición se observa desde el primer minuto de exposición al TPA, en donde se observa un 41% de inhibición en comparación con el control, alcanzándose una inhibición del 64% a los treinta minutos de exposición al TPA. La captación obtenida en presencia de TPA es totalmente sensible a 0.1 mM de tiazida.

Para determinar si el efecto de la PKC sobre el CSTr es a través de una fosforilación directa se obtuvieron las mutantes de fosforilación S16A, S559A, T889A, S934A, las dobles mutantes S16,559A, S16,T889A, S16,934A, T889A-S934A y la triple mutante S16A-T889A-S934A.

Como puede observarse en el gráfico de la figura 4, al comparar la función del CSTr silvestre (considerado como 100% de la función) con las mutantes simples, es decir aquellas que llevan únicamente un sitio potencial de fosforilación

mutado, la función se ve incrementada significativamente en todas. La mutante S16A es la que presenta el menor incremento en función con un aumento del 40%, mientras la mutante S559A muestra un aumento del 74%, la mutante T889A un incremento del 100% y la mutante S934A muestra un aumento del 200%. El máximo incremento se encuentra en la mutante S934A, cuyo sitio mutado se encuentra en la región carboxiterminal y que es compartida por todas las secuencias de CST conocidas hasta la fecha. Los datos anteriores son el resumen de al menos tres diferentes experimentos y de por lo menos 60 diferentes ovocitos.

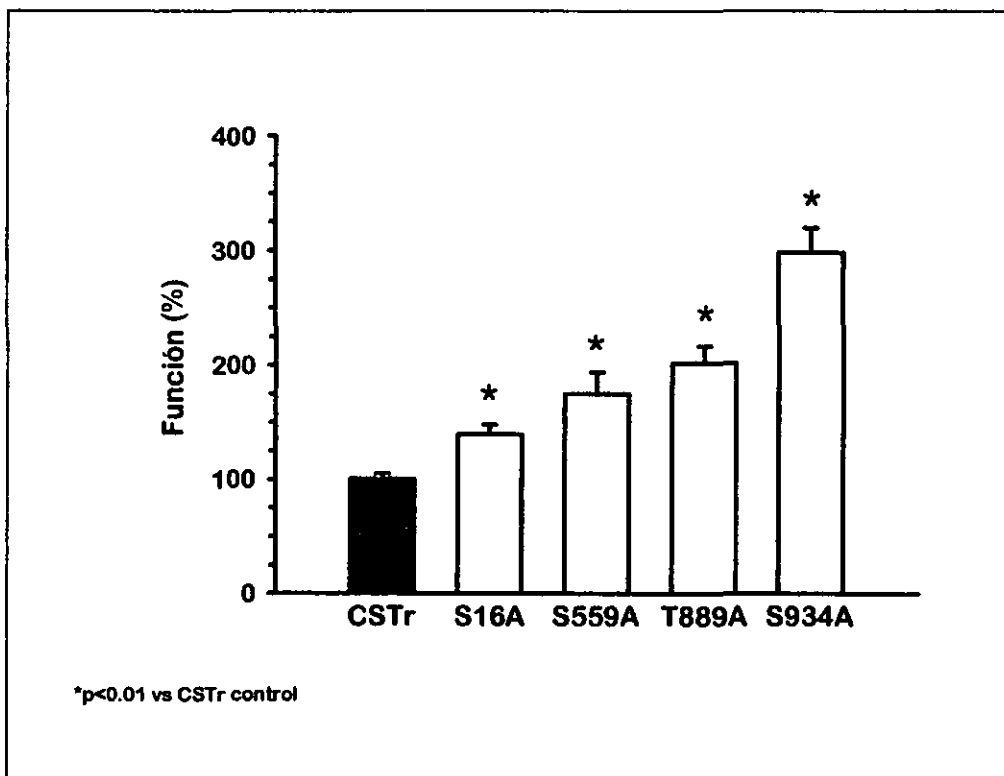


Figura 4. Expresión de CStr y mutantes de fosforilación.

Todas las mutantes son completamente sensibles a tiazida. Esto se encuentra ejemplificado con la mutante S16A (figura 5). En este caso la clona silvestre muestra una captación de  $4,903.89 \pm 404.65$  pmol/ovocito/h, la captación obtenida cuando se incubaba en presencia de la tiazida triclorometiazida  $10^{-4}$ M es de  $492.70 \pm 53.49$  pmol/ovocito/h. En el caso de la mutante S16A los niveles de

captación alcanzados son de  $8,451.61 \pm 244.81$  pmol/ovocito/h, los cuales se reducen a  $344.82 \pm 34.11$  pmol/ovocito/h en presencia de la tiazida, es decir, la mutación no altera la interacción con el inhibidor, lo que apoya que este aumento en la captación no es debida a un efecto inespecífico de la inyección de la mutante en el ovocito. El TPA mantiene un efecto inhibitorio en la mutante similar al que se observa en la captación obtenida en los ovocitos inyectados con la clona silvestre.

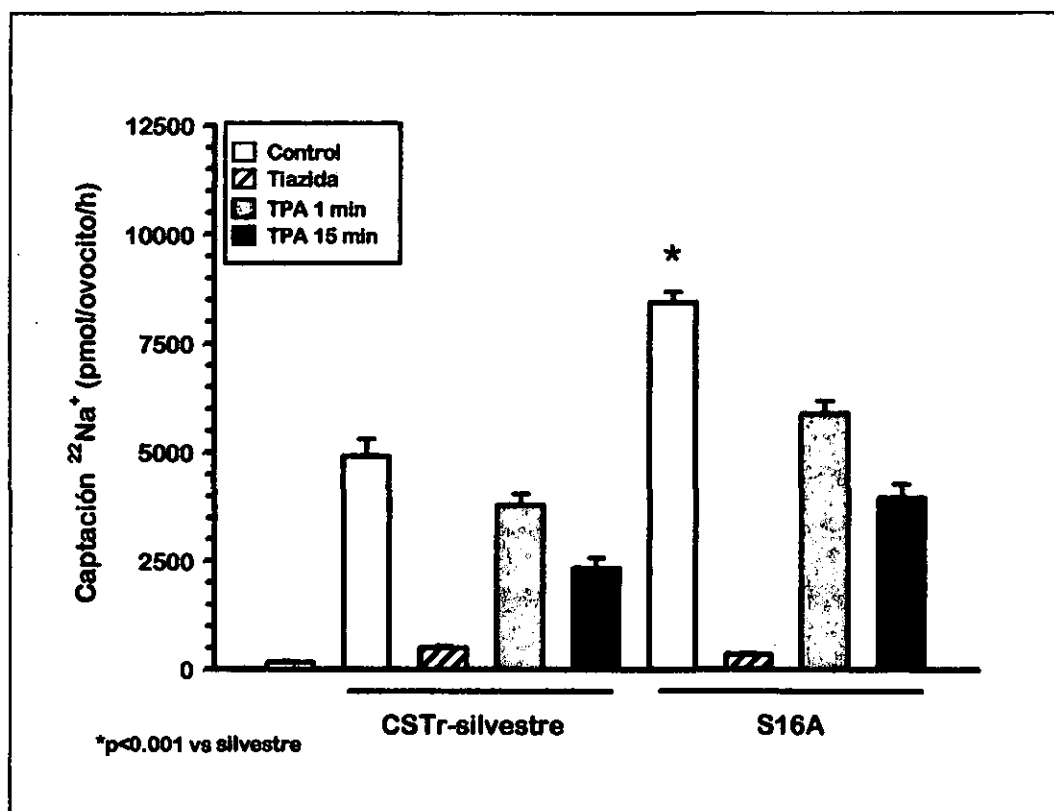


Figura 5. Efecto del TPA sobre CSTR y la mutante de CSTR S16A. TPA  $10^{-7}$  M, 1 min. y 15 min. en preincubación.

Ahora bien, al analizar la figura 6 en donde se grafica la función de CSTR silvestre y a las mutantes múltiples, podemos observar que en todas las dobles mutantes, es decir proteínas con dos sitios potenciales de fosforilación mutados, se encuentra un incremento en la función cuando son comparadas con la cepa silvestre. De aquí tenemos que la mutante T889,S934A es la doble mutante que tiene el menor aumento en función con un 57%, seguida por la mutante S16,934A con un incremento del 100%, la mutante S16,559A muestra un 150% de adición

en función y finalmente la mutante S16,T889A es la que cuenta con la mayor ganancia en función con un 310%.

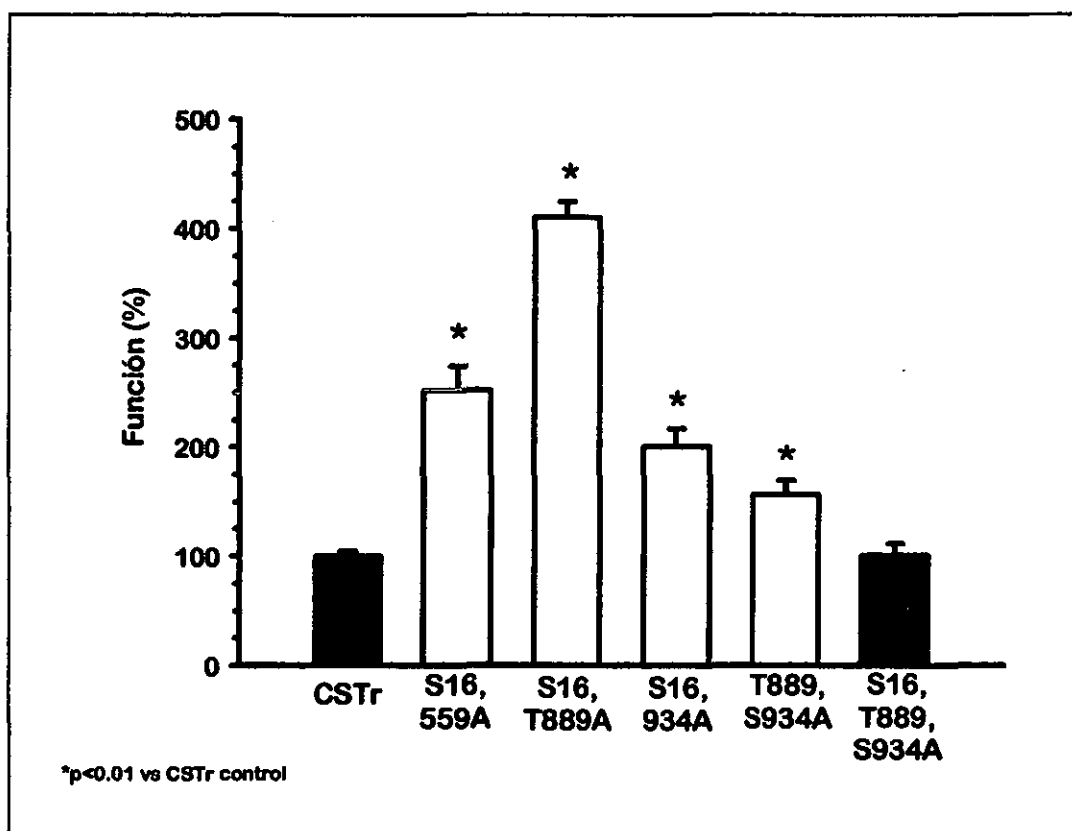


Figura 6. Expresión de CSTR y mutantes múltiples de fosforilación.

En el caso de la mutante triple S16,T889,S934A no se encuentra un incremento en la función presentado niveles de captación similares a los obtenidos con la clona silvestre.

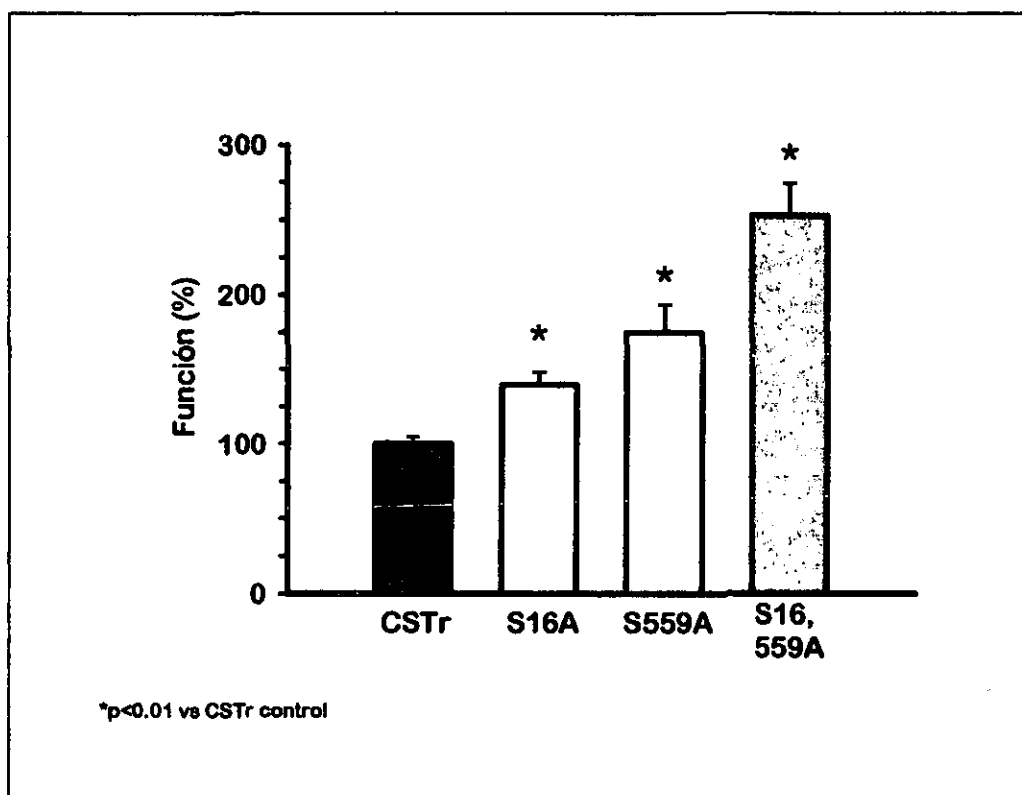


Figura 7. Expresión de CStr y mutantes de fosforilación conteniendo las mutaciones S16A y S559A.

Al analizar individualmente a las mutantes podemos observar que en el caso de la mutante S16,559A se halla un incremento en la función del 150%. En las mutaciones simples S16A y S559A se alcanzan aumentos del 40% y del 75% respectivamente (figura 7). Esto último revela un efecto aditivo en el caso de esta doble mutación. La localización de estas mutaciones son el extremo aminoterminal para la S16A y el asa intracelular entre los segmentos transmembrana S10 y S11 para la S559A.

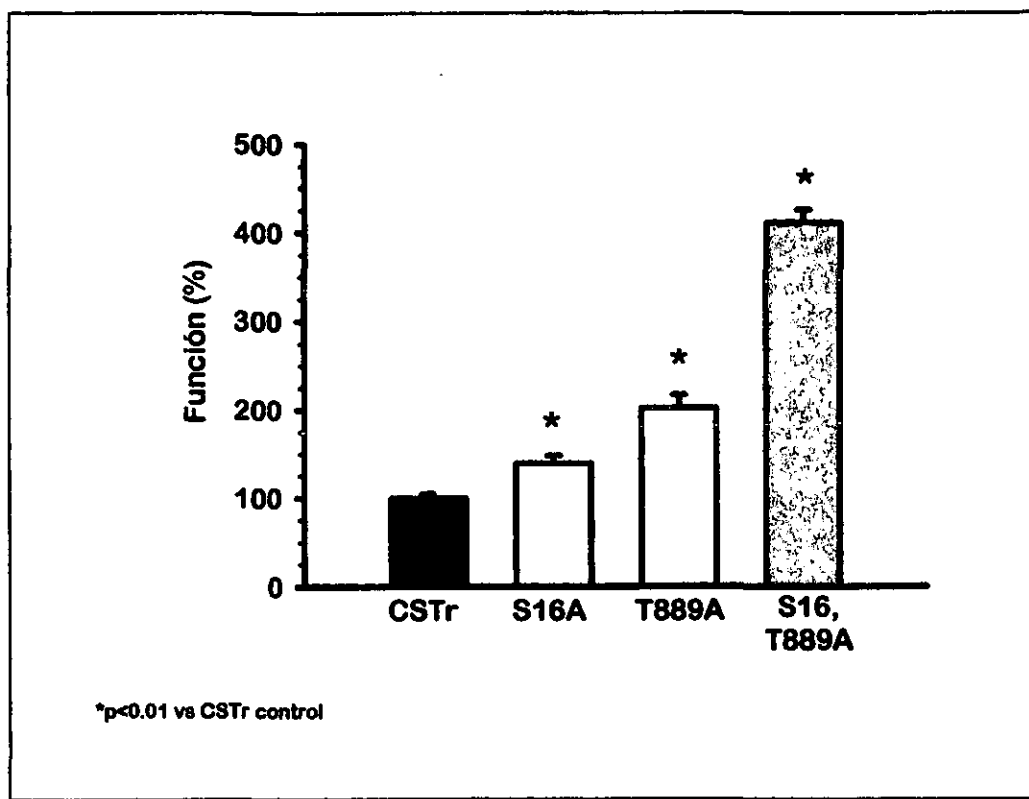


Figura 8. Expresión de CStr y las mutantes de fosforilación que contienen las mutaciones S16A y T889A.

En el caso de la doble mutante S16,T889A la ganancia en la función es de un 310%, que se encuentra muy por arriba de la suma del incremento en función de las clonas simples S16A (40%) y T889A (100%). La primera localizada en el segmento aminoterminal y la segunda en el segmento carboxiterminal.

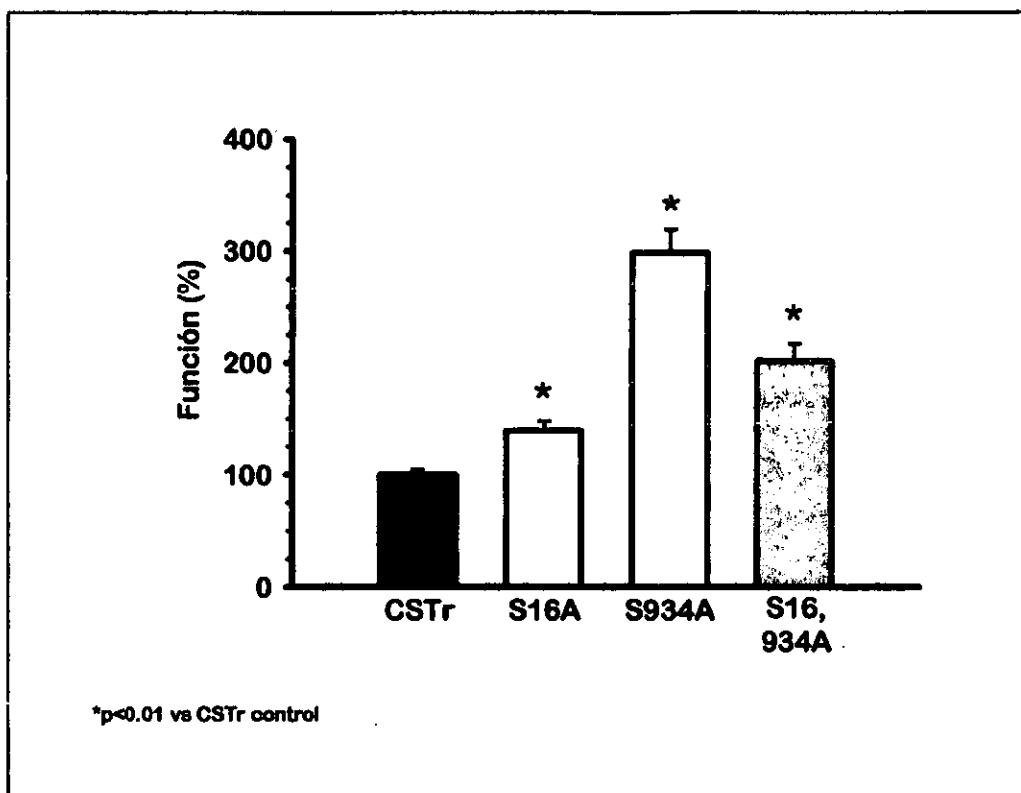


Figura 9. Expresión de CSTR y mutantes de fosforilación conteniendo las mutaciones S16A y S934A.

En contraste con lo observado en las clonas anteriores, como puede verse en la gráfica de la figura 9, la doble mutante S16,934A no muestra un incremento aditivo en la función en relación con las mutantes simples, de esta forma esta doble mutante duplica la función de la clona silvestre, mientras que la mutante S16A tiene un incremento en la función del 40% y la S934A triplica la función de la clona silvestre. Es posible que la diferencia en el patrón aditivo en el caso de esta doble mutante sea debido a que la mutante S934A es la mutación simple que lleva a mayor incremento en la función del CSTR.

La figura 10 muestra los resultados obtenidos con la mutante T889,S934A y la triple mutante S16,T889,S934A

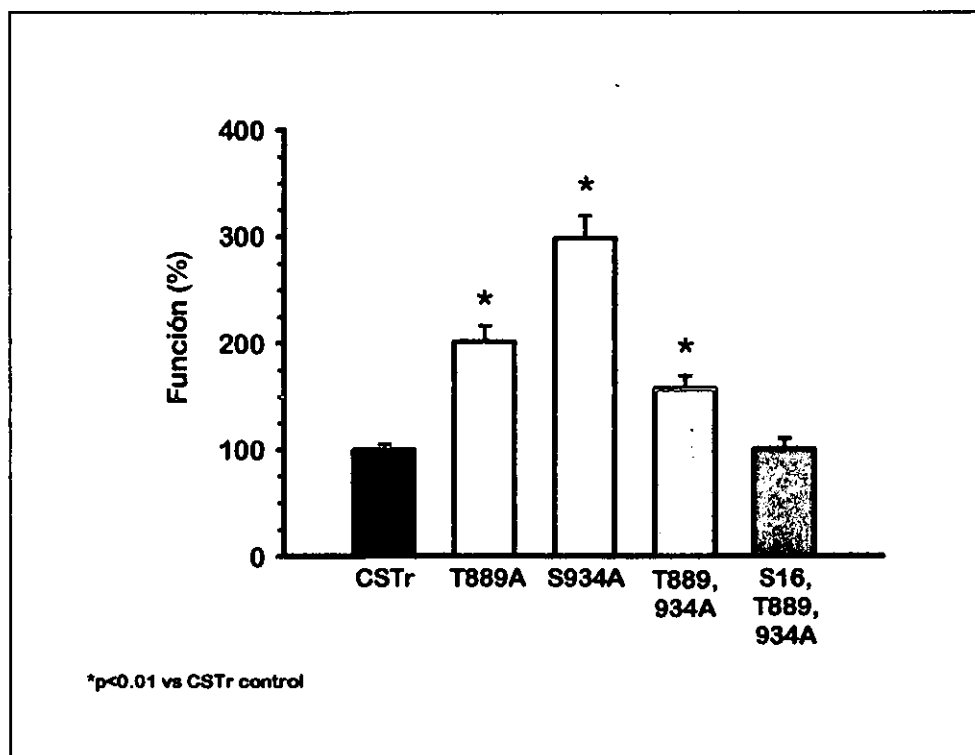


Figura 10. Expresión funcional de CStr y las mutantes de fosforilación que contienen las mutaciones T889A y S934A.

La doble mutante T889,S934A, muestra un incremento en la función de un 57%, sensiblemente menor a la respuesta obtenida de las mutantes simples T889A (100%) y S934 (200%), comparadas con la clona silvestre. Más aún, la triple mutante S16,T889,S934A no muestra incremento en la función, teniendo captaciones similares a las de la clona silvestre.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA



El efecto del TPA  $10^{-7}$  M, 1 min. previo a la captación, sobre la función del CSTR silvestre y las diferentes mutantes, se muestra en la figura 11.

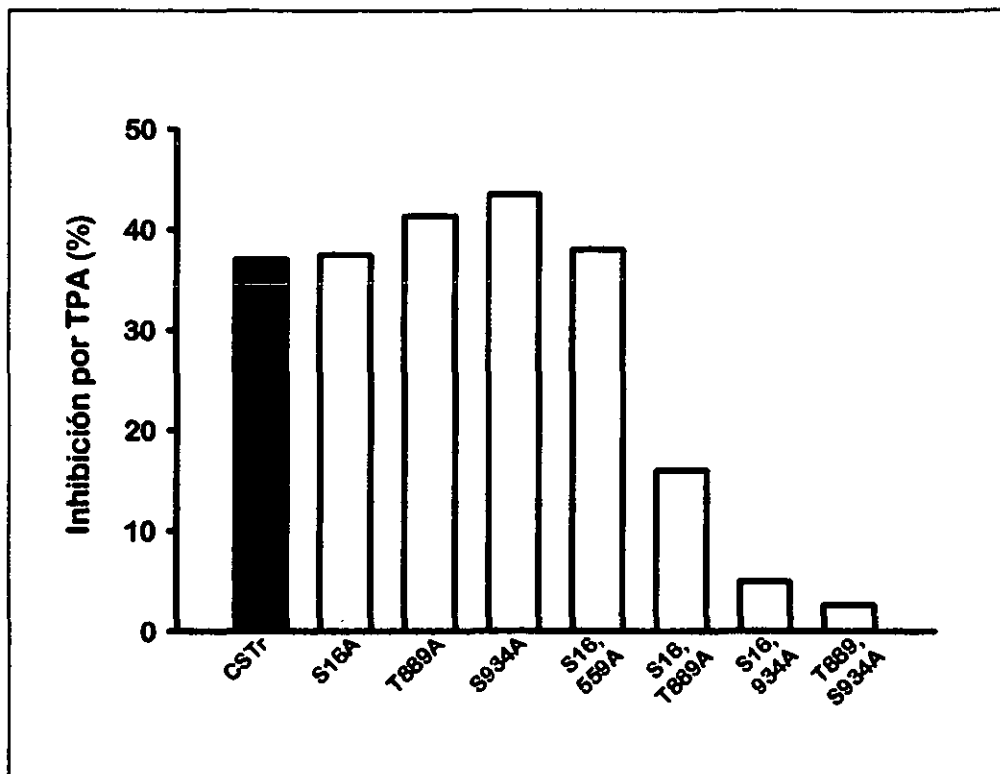


Figura 11. Porcentaje de inhibición por TPA sobre CSTR y las mutantes de fosforilación. TPA  $10^{-7}$  M y 1 min. durante la preincubación.

Si comparamos el efecto de la exposición a TPA  $10^{-7}$  M 1 min. previo a la captación de las diferentes clonas, podemos observar que las clonas con mutación única tienen porcentajes de inhibición muy cercanos a los alcanzados por la clona silvestre: Silvestre 37%, S16A 37%, T889A 41%, S934A 43%. Sin embargo, en el caso de las dobles mutantes, a excepción de una, pierden sensibilidad al TPA: S16,559A 38%, S16,T889A 16%, S16,934A 5% y T889,S934A 2%.

## DISCUSIÓN

La fosforilación proteínica es el mecanismo molecular más importante a través del cual la función de las proteínas es regulada en respuesta a estímulos extracelulares. Virtualmente todos los tipos de señales extracelulares, incluyendo hormonas, factores tróficos y citocinas producen la mayoría de sus diversos efectos biológicos mediante la regulación por fosforilación de fosfoproteínas específicas en sus células blanco. Aunque las proteínas pueden ser modificadas covalentemente en muchas otras formas, tales como ribosilación por ADP, acilación (acetilación, miristoilación, isoprenilación), carboximetilación, sulfatación de tirosinas y glucosilación, ninguno de estos mecanismos es tan ampliamente y realmente sujeto a regulación por estímulos fisiológicos como la fosforilación.

Una proteína substrato es convertida de la forma defosforilada a la fosforilada por medio de una proteína cinasa y la forma fosforilada es regresada a defosforilada por medio de una proteína fosfatasa. Las proteínas cinasas son clasificadas como protein-serin-treonin-cinasas, las cuales fosforilan las proteínas substrato en residuos de serina o treonina, o como protein-tirosin-cinasas, las cuales fosforilan las proteínas substrato en residuos tirosina. Cerca del 95% de la fosforilación proteínica ocurre en residuos serina, 3-4% en residuos treonina y menos del 1% en residuos tirosina. En todos los casos, las cinasas catalizan la transferencia del grupo fosfato terminal ( $\gamma$ ) del ATP al radical hidroxilo en la cadena lateral del residuo aminoacídico respectivo, el  $Mg^{++}$  es requerido para esta reacción. Las protein-fosfatasas catalizan la ruptura de esta unión fosfoéster por medio de hidrólisis. Debido a que los grupos fosfato están cargados negativamente, la fosforilación de una proteína altera su carga, lo cual puede alterar la conformación de la proteína y finalmente su actividad funcional. Un cambio en el estado de fosforilación proteínica puede ser dirigido fisiológicamente a través de incremento o decremento en la actividad de una proteína cinasa o una proteína fosfatasa. Dos mecanismos mayores están involucrados en las vías a través de las cuales las señales extracelulares regulan la función proteínica por medio de fosforilación. En el primero, la señal extracelular, o primer mensajero,

regula directamente a la proteína cinasa o proteína fosfatasa por la acción de receptores de membrana que poseen la actividad enzimática dentro de su dominio citoplásmico. En el otro caso el primer mensajero regula la actividad de las proteína cinasas y fosfatasas indirectamente por medio de receptores de membrana que regulan la concentración intracelular de un segundo mensajero. Segundos mensajeros que directamente activan a proteína cinasas incluyen al AMPc, GMPc,  $Ca^{++}$  y diacilglicerol (DG). Las proteínas cinasas difieren en su distribución celular y subcelular, especificidad por el sustrato y regulación. Entre las proteínas cinasas mejor estudiadas se encuentran las activadas por los segundos mensajeros AMPc, GMPc,  $Ca^{++}$  y DG.

La vía de la proteína cinasa C se inicia con la interacción agonista-receptor, que activa a la enzima fosfolipasa C (PLC), a través de la subunidad  $\alpha$  de las proteínas G. Esta enzima hidroliza al fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato ( $PIP_2$ ), un fosfolípido componente de la membrana en su cara intracelular, a inositol-1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ) y *sn*-1,2-diacilglicerol (DG). El  $IP_3$ , que es hidrosoluble, actuando como segundo mensajero difunde en el citoplasma hacia el retículo endoplásmico en donde actúa sobre un canal de  $Ca^{++}$  para liberar  $Ca^{++}$ , el cual estimula una variedad de procesos celulares a través de la calmodulina. El DG, que se mantiene en el plano de la membrana, también actúa como un segundo mensajero activando a la proteína cinasa C (PKC) en la presencia de fosfatidilserina y para algunas enzimas de la familia de PKC en presencia de  $Ca^{++}$ . La PKC, realmente una familia de enzimas, que se encuentra unida a la membrana, fosforila y modula de esta forma la actividad de otras proteínas. Los ésteres de forbol, tales como el 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), son potentes activadores de la PKC mediante una similitud estructural con DG. La PKC es una cadena polipeptídica de 77-83 kDa, forma una subfamilia proteínica, producto de dos genes que mediante empalme alternativo forman dos grupos, el primero formado por las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_{II}$  y  $\gamma$  que son  $Ca^{++}$  dependientes, mientras el otro formado por las isoformas  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$  y  $\theta$ , las cuales son  $Ca^{++}$  independientes. La PKC actúa fosforilando proteínas en los residuos de serina y treonina en una amplia variedad de sitios de fosforilación, la secuencia Arg-Xaa-Xaa-Ser/Thr-Xaa-Arg es el sitio consenso por

excelencia, aunque dependiendo de la isoforma de PKC los requerimientos pueden llegar a ser tales como el de contener el sitio un residuo básico en la posición P-3 o/y P3.

La fosforilación de los residuos de tirosina esta controlada por un balance en la actividad entre protein-tirosin-quinasas y fosfatasas. Las protein-tirosin-quinasas (PTK) se pueden dividir en protein-tirosin-quinasas unidas a receptor (RPTK) y no unidas a receptor (NRPTK). Entre las NRPTK se encuentran las cinasas Src, Jak, Abl, Tec y Fak; estas cinasas se encuentran en la cara interna de la membrana plasmática, libres en citoplasma, en membranas endosomales y en el núcleo. Las RPTK a su vez se pueden clasificar en 14 familias, incluyendo entre ellas al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) y el receptor de insulina. Los RPTK cuentan con un dominio extracelular encargado de unirse a la hormona o factor de crecimiento, el dominio transmembrana es único y corto, de ~25 residuos aminoacídicos y finalmente un dominio citoplásmico que consiste de la región catalítica y de varios sitios de autofosforilación que regulan la actividad catalítica y sirven de sitio de reconocimiento a otras proteínas. La unión del ligando al RPTK induce una dimerización del receptor, la cual produce transfosforilación entre las dos subunidades. La transfosforilación o autofosforilación aumenta la actividad catalítica. Dentro de las moléculas que son modificadas por las protein-tirosin-quinasas unidas a receptor o RPTK se encuentran la fosfolipasa C- $\gamma$ 1(PLC- $\gamma$ 1) y la cinasa de 3-fosfatidilinositol (PI-3-cinasa). La PLC- $\gamma$ 1 al ser fosforilada por la RPTK se activa y cataliza la formación de diacilglicerol (DG) y de inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>), los cuales a su vez activan a la PKC y liberan Ca<sup>++</sup>. Así mismo las RPTK pueden activar la vía de las MAPK en diferentes formas.

Los efectos sobre el cotransportador de Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> de las diferentes vías de transducción de señales, que pueden ser activadas por hormonas y ejercen su acción en el túbulo contorneado distal se desconocen. Eso se debe, al menos en parte, a la dificultad para obtener cultivos celulares de esta región que mantengan las características propias del túbulo contorneado distal. Con el advenimiento de las técnicas de biología molecular y la clonación del CST estamos en condiciones

de iniciar el acercamiento a la regulación de esta forma de transporte. Varias de las hormonas que actúan sobre el túbulo contorneado distal comparten una misma vía de transducción de señales y de esta forma la PKC puede ser activada por la PTH, insulina y aldosterona mediante sus efectos no-genómicos.

Nuestros datos muestran claramente un efecto inhibitorio sobre la función del CSTR (evaluado mediante expresión funcional en ovocitos de *Xenopus*) de la activación de la PKC mediada por ésteres de forbol tales como el TPA. El efecto inhibitorio conseguido por activación de la PKC es tiempo y dosis dependiente, observándose desde el primer minuto de exposición al TPA, lo que hace menos posible que el efecto del éster de forbol sobre la captación sea debido a un efecto aditivo de cambios intracelulares no específicos. Así mismo este efecto es dosis dependiente, el efecto se observa desde dosis tan bajas como  $10^{-12}$ M. Estos datos pueden ser analizados desde la perspectiva funcional sugiriendo que hormonas tales como la PTH podrían inhibir la función del CST a través de la activación de la PKC en el túbulo contorneado distal y esto aumentaría la reabsorción de calcio a este nivel, como es bien sabido se produce por el efecto inhibitorio crónico de la administración de tiazidas.

Ahora bien, en el análisis de los resultados obtenidos con las mutantes de fosforilación podemos sugerir, que el aumento en la función del CSTR cuando se han mutado sitios únicos de fosforilación podría indicar que el transportador se encuentra constitutivamente fosforilado en algunos de los sitios y que el efecto de fosforilación debido a PKC sobre la proteína sea un efecto aditivo que dependa del mayor número de sitios fosforilados. Estos sitios no presentan la misma capacidad para activar el transporte, pues como podemos apreciar no se observa el mismo incremento con la eliminación de los diferentes sitios. Es interesante que la mutación del sitio conservado en todas las especies (S934A) sea el que produzca un mayor incremento en la actividad del transportador.

Aunque la función del transportador en aquellas clonas en donde se han mutado dos o más sitios se encuentra aumentada como en las mutaciones únicas, encontramos que en dos casos la doble mutación presenta un efecto igual a la suma del incremento en la función de las simples o incluso mayor (S16, 559A y

S16,T889A), en estos casos tenemos mutaciones en dos segmentos diferentes de la molécula como lo son el extremo aminoterminal, el asa que conecta los segmentos S10 y S11 y el carboxiterminal. Por otra parte tenemos las dobles mutantes en donde existe una función menor que la suma del incremento en la función de las mutaciones simples (S16,934A y T889,S934A), son estas clonas las que muestran la mayor pérdida de sensibilidad al TPA. Como es evidente el factor común en estas clonas es la mutación de la serina 934 que se encuentra conservada en todas secuencias conocidas hasta la fecha, además de ser la mutación que por si sola produce el mayor incremento en la función del CST. Estos datos sugieren que la serina 934 es un sitio primordial en la regulación del CST por fosforilación. Los datos anteriores apoyan el hecho de que los sitios de fosforilación no tengan igual valor en la regulación de la proteína.

La ausencia de cambio sobre la función observada en la triple mutante S16,T889,S934A puede deberse a un cambio conformacional más drástico de la proteína, no relacionado con el efecto sobre la fosforilación y que anula éste. Sin embargo, con los datos obtenidos hasta el momento ignoramos si el efecto inhibitorio de la PKC sobre el transportador y el efecto de las mutaciones son debido a un cambio en la afinidad del transportador ( $K_m$ ) o a una diferencia en la presencia de transportadores activos en la membrana ( $V_{max}$ ) o a una mezcla de ambos efectos.

## CONCLUSIONES.

Nuestros datos sugieren que el CSTr es regulado por PKC produciendo una inhibición en su función.

Por los datos expuestos se sugiere que el CSTr se encuentra constitutivamente fosforilado en sitios consenso para PKC. Los sitios de fosforilación en CSTr no son equivalentes.

Por lo anterior, se sugiere que hormonas tales como PTH, que pueden activar a la PKC, podrían regular la función del CSTr.

## DISCUSIÓN GENERAL

El cotransportador de  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  sensible a tiazidas (CST) es de gran importancia fisiológica por formar parte de las proteínas reguladoras de la reabsorción de sodio en la porción distal de la nefrona. Farmacológicamente su importancia se debe a que es el sitio de acción de los fármacos diuréticos más utilizados, las tiazidas. Esto, aunado a su posible participación en el síndrome de Gitelman, le confiere relevancia médica. Sin embargo, debido a la dificultad para poder aislar a las células del túbulo contorneado distal y a las limitaciones para realizar estudios fisiológicos en esta región, ha sido hasta la clonación del CST que se ha podido explorar la relación entre la estructura, la función y la regulación de este transportador.

En el presente trabajo, utilizando el modelo de expresión funcional en ovocitos de *Xenopus*, hemos realizado un acercamiento a la biología molecular del transportador. Al analizar la cinética del transporte de los iones, proponemos un modelo novedoso para este, además del efecto del diurético tiazídico sobre los iones transportados; logramos diferenciar a fármacos tradicionalmente considerados como tiazidas que no actúan sobre el cotransportador, aportamos datos que sugieren que el transportador es una glucoproteína y determinamos el efecto de la glucosilación sobre la función de la proteína. Logramos un primer acercamiento con las posibles vías de regulación mediante fosforilación que podrían modular la función del cotransportador.

Iniciamos el estudio del transportador analizando la cinética de la interacción de los iones sobre el transporte y la interacción de la tiazida con los iones transportados.

Como ya se ha comentado, debido a la importante reabsorción de  $\text{NaCl}$  y a la impermeabilidad al agua del asa de Henle, el fluido tubular distal es hipotónico,  $\sim 100$  mOsm/Kg  $\text{H}_2\text{O}$  (16), con concentraciones de  $\text{NaCl}$  entre 30 y 150 mM, y un pH entre 6.57 y 7.41. Los valores cinéticos obtenidos en nuestro modelo utilizando ovocitos de *Xenopus*,  $K_m$ :  $\text{Na}^+$  7 mM,  $\text{Cl}^-$  6 mM, se encuentran muy cercanos a los

valores reportados por Velázquez y col.,  $K_m$ :  $\text{Na}^+$  9 mM,  $\text{Cl}^-$  12 mM (21), obtenidos mediante microperfusión *in vivo* del transporte de NaCl en la cara apical del túbulo contorneado distal. Por otra parte, en nuestro trabajo no encontramos variación en la función del CSTR con cambios en pH dentro del rango de 6 a 8. Sin embargo, cambios en la osmolaridad si producen variaciones en la función del CSTR, de esta forma, el cambio de hipotonicidad (110 mOsm/Kg  $\text{H}_2\text{O}$ ) a isotonicidad (210 mOsm/Kg  $\text{H}_2\text{O}$ ) aumenta la función del transportador, sin existir mayor variación, cuando se llega a hipertonicidad (310 mOsm/Kg  $\text{H}_2\text{O}$ ). En contraste, Tran y col. (23), utilizando unión de metolazona[ $\text{H}^3$ ] a membranas renales corticales de rata, encontraron que la unión de la metolazona marcada es dependiente de pH, con una lenta y gradual, pero significativa disminución presentando un máximo a pH 5.5 hasta un mínimo a pH 10. En este estudio cambios en la osmolaridad de la solución, obtenidos mediante la adición de sacarosa al medio, no produjo efecto en la unión de la metolazona[ $\text{H}^3$ ]. Las diferencias encontradas entre los resultados descritos y nuestro trabajo, pueden ser debidas a la diferencia en la metodología utilizada. Mientras Tran y col. miden la unión del inhibidor, nosotros determinamos el transporte de uno de los iones. De tal forma que la unión del inhibidor es muy posible que si se vea afectada por cambios en el pH, mientras que el transporte no sea afectado por éste, dentro del rango fisiológico. En el caso de la osmolaridad, Tran y col. incrementaron la tonicidad de la solución inicial, la cual es isotónica, de tal forma que ellos no probaron soluciones hipotónicas, donde observamos la variación. Como ya se ha comentado, el incremento en la descarga de NaCl en el túbulo contorneado distal, incrementa la reabsorción (53). Esto podría reflejar un aumento en la función del CSTR debida a un incremento en la osmolaridad del líquido tubular, desde la hipotonicidad hasta la iso o hipertonicidad. Por todo lo anterior, nuestro modelo parece reflejar, de manera más cercana la función fisiológica del transportador.

El modelo propuesto por el grupo de Fanestil (23) para el transporte del  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , y su interacción con la tiazida, se basa en la unión secuencial de los iones al transportador, con el  $\text{Na}^+$  uniéndose primero y el  $\text{Cl}^-$  compitiendo por el mismo sitio que la tiazida. De acuerdo a este modelo la disminución en la concentración de



$\text{Cl}^-$ , pero no de  $\text{Na}^+$ , aumentaría el efecto inhibitorio de la tiazida. En contraste, nuestros resultados sugieren que la disminución en la concentración de ambos iones aumenta el efecto inhibidor de la tiazida. Estos resultados y el hecho de que la afinidad del transportador por ambos iones se ve afectada por la concentración del contraión, nos permiten proponer un nuevo modelo. En éste, la unión de los iones se realiza al azar, uniéndose cualquiera de los dos iones primero, pero aumentando la afinidad del transportador por el contraión. El sitio de unión a la tiazida se ve afectado por la unión de ambos iones.

El análisis de los valores cinéticos del cotransportador y su interacción con los iones transportados presentados en este trabajo son una aproximación útil que permitirá continuar el estudio de este transportador. Así, pueden analizarse los cambios producidos en el sistema por otras drogas e incluso el comparar las variables cinéticas entre un organismo y otro que pueden ser debidas a las diferencias fisiológicas entre estos, como las encontradas entre los valores cinéticos reportados para el pez ( $K_m$ :  $\text{Na}^+$  25 mM,  $\text{Cl}^-$  13 mM) (25) y los observados en la rata. De particular interés será conocer las propiedades cinéticas de otras especies y, principalmente, las del humano por su implicación médica. Así mismo, dada la alta homología en secuencia entre los diferentes transportadores de la familia, estos datos pueden auxiliar en el estudio estructural implicado en la diferencia de iones transportados ( $\text{K}^+$  en KCCs,  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$  en CSBs) y sensibilidad a diuréticos entre los diferentes cotransportadores de la familia (furosemida y bumetanida en CSB, furosemida y tiazida en KCCs y tiazida en CST) .

El efecto de las tiazidas sobre el transporte de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en el túbulo contorneado distal ha sido primordial en el estudio de éste, así como para la clonación e identificación del transportador. Por ello, decidimos analizar el efecto de estas drogas sobre los iones transportados.

Las tiazidas forman parte de las drogas que se administran con mayor frecuencia en todo el mundo (114). De aquí la importancia de conocer su mecanismo de acción. En el presente trabajo mostramos como el patrón de inhibición de las diferentes tiazidas en nuestro modelo, es consistente con la potencia clínica de estas drogas (114). Así, se sugiere que las tiazidas producen

su acción natriurética, fundamentalmente por su interacción con el CST. Incluso, drogas que tienen una estructura química similar a la de las tiazidas, como el diazóxido, pero que carecen de efecto natriurético en clínica, también carecen de efecto sobre el CST (115).

Aunque, en el presente trabajo no logramos determinar cual es el sitio de unión de la droga al transportador, ni el tipo de inhibición producido por la droga sobre el transporte, si aportamos datos que pueden modificar la visión que se tenía hasta el momento. Es evidente que la mayor parte del conocimiento de la interacción de la droga con el transportador aún espera de mayor estudio y nuestro trabajo abre esta posibilidad.

En este sentido, el presente trabajo modifica la idea acerca de la función de algunas drogas, como la cicletanina. Este fármaco había sido tradicionalmente considerado como tiazida, debido a que el sitio de acción de este es el túbulo contorneado distal; sin embargo, la acción natriurética no se explica por la inhibición del transporte de NaCl a nivel del transportador, como lo demostramos en la sección del efecto de la cicletanina sobre el CST.

La comprensión total de las implicaciones de la glucosilación para la estructura y función de una proteína sólo puede ser alcanzada cuando una glucoproteína es vista como una entidad simple, esto debido al amplio efecto que tiene la glucosilación sobre diversas proteínas. En el transportador de glucosa GLUT1, al eliminar los sitios consenso para N-glucosilación en esta proteína, mediante mutagénesis puntual, se ha encontrado que una importante proporción de la proteína mutada permanece en el compartimiento intracelular, además de tener una vida media menor en relación a la silvestre (93,116). En el caso del transportador de glicina GLYT1, se ha mostrado, mediante mutagenesis dirigida, que la mutación de los cuatro sitios de N-glucosilación produce una disminución progresiva del transporte. Sin embargo, la deglucosilación enzimática de esta proteína y el análisis mediante inmunofluorescencia mostraron que la N-glucosilación no es indispensable para la actividad de transporte, pero sí para la adecuada inserción de la proteína en la membrana (95). En el cotransportador de

sodio-fosfato (NaPi<sub>2</sub>), la eliminación mediante mutagenesis puntual dirigida de los dos sitios de N-glicosilación en este transportador, y su análisis realizando expresión funcional del transportador silvestre y de las mutantes en ovocitos de *Xenopus*, mostraron una reducción en el transporte por las mutantes en relación con la silvestre. La inmunocitoquímica de estas células reveló una mayor localización intracelular en los cotransportadores mutados no glicosilados (97).

Al igual que en los casos anteriores, en nuestro trabajo se muestra claramente la disminución de la función al eliminar un sitio de N-glicosilación y la pérdida total de la función cuando se eliminan los dos sitios de glicosilación. Esta pérdida es debida a una disminución en la cantidad de la proteína existente en la membrana, probablemente, a causa de una alteración en el procesamiento de la proteína. La importancia fisiológica y clínica de nuestros datos se encuentran fuertemente apoyados por los datos encontrados por Kunchaparty y col. (83), en los cuales una mutación encontrada en pacientes con síndrome de Gitelman no es adecuadamente procesada y liberada en la membrana plasmática debido a un defecto en la glicosilación de esta mutante. Sin embargo aún queda por averiguar si la ausencia de los sitios de glicosilación no permiten un adecuado ensamblaje de la proteína, o si aumentan la degradación de esta.

La fosforilación y defosforilación de un transportador es uno de los principales mecanismos de regulación postraducciona. La existencia de sitios consenso para una proteína cinasa dentro de la secuencia de aminoácidos de un transportador no indica, inequívocamente, que éste sea regulado por esa vía, o incluso, que tales sitios sean los utilizados. Como ejemplo podemos mencionar al cotransportador de sodio-fosfato (NaPi<sub>2</sub>), el cual cuenta con varios sitios consenso para proteína cinasa C (PKC), sin embargo, la eliminación de tales sitios mediante mutagenesis puntual dirigida no produjo ningún cambio en la función, medida como expresión funcional en ovocitos de *Xenopus* (117). No obstante cuando se utilizaron esteroides de forbol para activar a la PKC, se produjo una inhibición del transporte, tanto en el transportador silvestre como en las mutantes. De aquí se concluyó que la regulación del NaPi<sub>2</sub> por PKC no incluye a los sitios consenso. En el presente trabajo, utilizando igualmente ovocitos de *Xenopus*, hemos logrado

determinar que el CSTR se inhibe vía PKC, y que esta inhibición si implica a los sitios consenso.

Entre los transportadores de la familia de C<sup>ST</sup>, existe evidencia de que el CSB2 se regula mediante fosforilación en residuos de serina y treonina, y que cambios en la actividad del transportador correlacionan con cambios en el estado de fosforilación de la proteína. De igual manera se ha descrito que el transportador se encuentra fosforilado constitutivamente y que la proteína se fosforile en aproximadamente cinco sitios diferentes, cuando va de la basal a un estadio de activación máxima (10,120).

Los datos obtenidos utilizando las mutantes de fosforilación, nos permite sugerir que el CSTR se encuentra constitutivamente en un estado intermedio de fosforilación. Cuando se produce activación de la PKC, y por lo tanto fosforilación de un número mayor de sitios, se disminuye la función del CSTR. Cuando algún estímulo disminuyera el número de sitios fosforilados, por un incremento en la actividad de fosfatasas o una disminución en la actividad de cinasas, se aumentaría la función del transportador. La ausencia de cambio sobre la función de CSTR advertido en la triple mutante S16,T889,S934A esta en contra del enfoque anterior. La fosforilación y defosforilación de un transportador esta acoplada a cambios en la orientación y afinidad de los sitios de unión iónica. Para estudiar los efectos de estos cambios, usando mutagénesis dirigida y otras técnicas somos capaces ahora de rediseñar proteínas para investigar su función biológica. Sin embargo, la interpretación de los resultados obtenidos mediante estas técnicas requiere considerar el efecto que tienen estos cambios sobre la estructura tridimensional de la proteína en cuestión, pues un cambio único en un residuo aminoacídico en la cadena puede generar un cambio conformacional lo suficientemente drástico como para producir un desarreglo total de la proteína y por lo tanto la pérdida total de la función o la incapacidad de que la proteína sea reconocida por otras proteínas reguladoras y de esta forma una falla en la integración a la membrana plasmática. En el presente trabajo mostramos que las mutaciones en los sitios de glucosilación disminuyen la  $V_{max}$ , este efecto debido posiblemente a que tales mutaciones interfieren con el metabolismo del

transportador y con su ingreso a la membrana. Las mismas consideraciones se aplican al interpretar los datos obtenidos con las mutaciones de los sitios de fosforilación. Así, es posible que la ausencia de efecto de la triple mutante de fosforilación pueda deberse a una alteración conformacional, que pueda llevar a una falla en la integración de la proteína en la membrana plasmática. Existe evidencia experimental reciente del grupo de Ellison para apoyar esta idea (83). En este trabajo (83), los autores reportan que la mutación de CST de ratón R948X, la cual carece de los 54 aminoácidos finales en la porción carboxiterminal, es traducida, pero no glucosilada, ni integrada a la membrana plasmática. Es importante notar como una modificación en la región carboxiterminal, lejana a los sitios de glucosilación, produce alteraciones en la glucosilación y un inadecuado procesamiento de la proteína.

El hecho de que los sitios consenso para glucosilación y fosforilación sean funcionales, apoyan el modelo de estructura secundaria propuesto, con una asa extracelular entre el séptimo y octavo segmentos transmembrana y las regiones amino y carboxiterminales intracelulares.

La regulación del CST es de gran importancia fisiológica ya que forma parte de las porciones distales de la nefrona y por lo tanto responsables, junto con el conducto colector, del volumen urinario y de las concentraciones urinarias de sodio, cloro, calcio e incluso magnesio. En este trabajo, aportamos datos relevantes para el estudio de la regulación del transportador. Hemos mostrado como el CST disminuye su función cuando se activa a la PKC. De esta forma hormonas que son conocidas por activar esta vía, y que actúan sobre el túbulo contorneado distal, modificando la movilización del sodio y calcio, podrían realizar su función a través del CST. Entre estas hormonas se puede considerar a la aldosterona, hormona paratiroidea e insulina. Sin embargo, la aldosterona y la insulina, promueven la reabsorción de  $\text{Na}^+$  en este segmento de la nefrona, por lo que es poco probable que estas hormonas regulen por vía de la activación de PKC al CST. En el caso de la hormona paratiroidea (PTH), la cual actúa promoviendo la reabsorción de  $\text{Ca}^{++}$  en el túbulo contorneado distal, podría estar inhibiendo la función del CST, a través de la activación de la PKC, ya que, como comentamos

anteriormente, al inhibir la función del CST mediante el uso de tiazidas o a través de mutaciones, como las ocurridas en el síndrome de Gitelman, se aumenta la reabsorción de  $\text{Ca}^{++}$  en este segmento de la nefrona. Se ignora hasta el momento cual es el mecanismo responsable de este aumento en la reabsorción de calcio. Sin embargo, Friedman (118) propone que para la reabsorción de  $\text{Ca}^{++}$  en el túbulo contorneado distal por vía transcelular, se requiere de la presencia de un transporte apical de sodio, el CST. La inhibición de este transporte hiperpolariza la membrana y activa a un canal de calcio en la membrana apical, el calcio sale de la célula mediante el intercambiador de  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{++}$  y la  $\text{Ca}^{++}$ -ATPasa de la membrana basolateral. La reciente clonación del canal epitelial de  $\text{Ca}^{++}$  (ECaC), localizado en la región apical de los segmentos tubulares distales de la nefrona, y sensible a voltaje, apoya este modelo (119). De igual manera, la colocalización del intercambiador de  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{++}$  y de calbidina  $\text{D}_{28\text{K}}$  con CST, soportan el modelo en cuestión (29,38). Se sabe que PTH y clorotiazida hiperpolarizan la membrana (118).

La hiperpolarización de la membrana debida a PTH, es un efecto directo de la hormona, ya que esta acción esta presente aún cuando la entrada de calcio se encuentra inhibida por el uso de nifedipina (118).

Estos resultados permiten sugerir un modelo de acción en el que la PTH al unirse al receptor PTHR1, un receptor unido a proteínas G que es capaz de activar a la PKA y PKC, pueda inhibir al CST por la vía de PKC y producir hiperpolarización de la membrana, lo cual activaría la entrada de  $\text{Ca}^{++}$  luminal a través del canal ECaC. La difusión del  $\text{Ca}^{++}$  intracelular se llevaría a cabo por medio de calbidina  $\text{D}_{28\text{K}}$ . El transporte activo del  $\text{Ca}^{++}$  en la membrana basolateral se realizaría a través del intercambiador  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{++}$  y de la  $\text{Ca}^{++}$ -ATPasa, obteniéndose un incremento en la reabsorción de  $\text{Ca}^{++}$  mediada por PTH. Sin embargo queda por determinarse si la PTH tiene efecto sobre el CST.

Se puede proponer un mecanismo similar de acción para las tiazidas, en relación a su capacidad de aumentar la reabsorción de  $\text{Ca}^{++}$ , en el cual al inhibir al CST, se produzca hiperpolarización de la membrana y apertura de ECaC.

La hipocalciuria es un signo cardinal en el síndrome de Gitelman, incluso presente en el modelo murino transgénico sin función de CST, éste podría explicarse mediante el mismo mecanismo expuesto anteriormente para la inhibición por tiazidas.

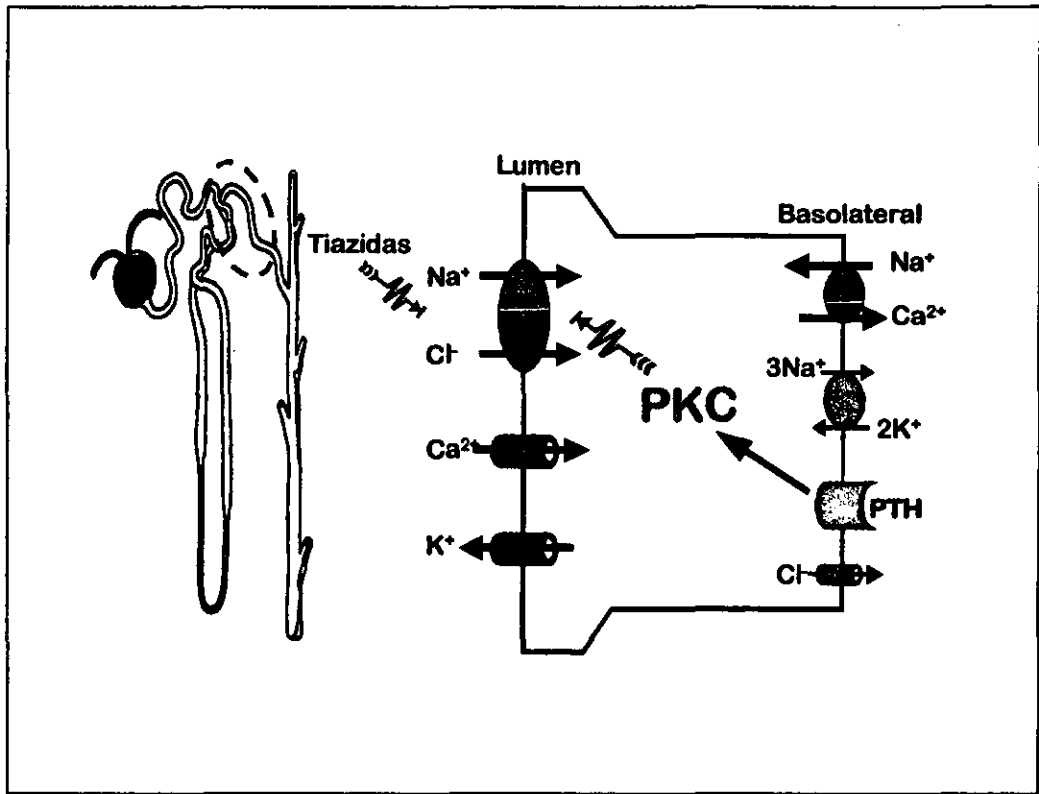


Figura 1. Modelo propuesto de reabsorción de Ca<sup>++</sup> en TCD, mediada por PTH. La unión de PTH a su receptor PTHR1 activa PKC, la cual inhibe a CST. Esto hiperpolariza la membrana y activa a ECaC, el Ca<sup>++</sup> sale de la célula por medio del intercambiador Na<sup>+</sup>-Ca<sup>++</sup> basolateral.

Existe una evidente interrelación entre la función y la estructura de las proteínas, y avances en el conocimiento de la estructura tienen una gran repercusión en determinar la función. De manera similar, cambios en la función pueden ser explicados como cambios en la estructura. El presente trabajo se ha centrado en el estudio de esta interrelación del cotransportador de Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> sensible a tiazidas o CST.

## CONCLUSIONES GENERALES

El cotransportador de  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  sensible a tiazidas (CST) transporta con alta afinidad al  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , con valores que se encuentran dentro del rango fisiológico existente en el túbulo contorneado distal. El nuevo modelo de transporte propuesto indica que la unión de la tiazida se ve afectada por la concentración de ambos iones.

La cicletanina no es una tiazida.

La glucosilación del CSTR tiene importancia funcional. Eliminar ambos sitios de glucosilación elimina totalmente la función del CSTR, debido a un menor número de transportadores en la membrana.

El CSTR se encuentra fosforilado constitutivamente. El CSTR se inhibe al activarse la PKC, y podría ser regulado por la PTH por esta vía.



## BIBLIOGRAFIA

1. Deetjen. P, Kramer. K. Die Abhängigkeit des O<sub>2</sub>-Verbrauchs der Niere von der Na-Rückresorption. *Pflugers Arch.* 273:636-42, 1961.
2. Biemesderfer D, Rutherford PA, Nagy T, Pizzonia JH, Abu-Alfa AK, Aronson PS. Monoclonal antibodies for high-resolution localization of NHE3 in adult and neonatal rat kidney. *Am. J. Physiol* 273:F289-99, 1997.
3. Bachmann S, Bostanjoglo M, Schmitt R and Ellison DH. Sodium transport-related proteins in the mammalian distal nephron-distribution, ontogeny and functional aspects. *Anat. Embryol* 200:447-468, 1999.
4. Bailly C. Transduction pathways involved in the control of the NaCl reabsorption in the thick ascending limb of Henle's loop. *Kidney Int.* [Suppl 65]:S29-S35, 1998.
5. Geck P, Pietrzyk C, Burckardt B-C, Pfeiffer B, Heinz E. Electrically silent cotransport of Na, K and Cl in Ehrlich cells. *Biochim. Biophys Acta* 600:432-447, 1980.
6. Gamba G, Miyanosita A, Lombardi M, Lytton J, Lee WS, Hediger MA, Hebert SC. Molecular cloning, primary structure and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney. *J. Biol. Chem.* 296:177713-177722, 1994.
7. 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. USA.* 91:2201-2205, 1994.
8. Mount DB, Baekgaard A, Hall AE, Plata C, Xu J, Beier DR, Gamba G, Hebert SC. Isoforms of the apical Na-K-2Cl cotransporter in murine thick ascending limb. I. Molecular characterization and intra-renal localization. *Am. J. Physiol. (Renal Physiol)* 276:F347-F358, 1999.
9. Plata C, Mount DB, Rubio V, Hebert SC, Gamba G. Isoforms of the apical Na-K-Cl cotransporter in murine thick ascending limb. II. Functional characterization and mechanism of activation by cyclic-AMP. *Am. J. Physiol. (Renal Physiol)* 276:F359-F366, 1999.
10. Russell JM. Sodium-Potassium-Chloride Cotransport. *Physiol. Rev.* 80(1):211-276, 2000.

11. Hebert, SC. Molecular Mechanism. *Seminars in Nephrology* 19(6):504-23,1999.
12. Holstein-Rathlou NH, Marsh DJ. Oscillations in tubular pressure, flow, and distal Cl concentration. *Am. J. Physiol.* 256:F1007-F1014,1989.
13. Reilly RF and Ellison D. Mammalian Distal Tubule:Physiology, Pathophysiology, and Molecular Anatomy. *Physiol. Rev.* 80:277-313,2000.
14. Katz AI, Doucet A, Morel F. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity along the rabbit, rat, and mouse nephron. *Am. J. Physiol.* 236 (*Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 5):F114-F120, 1979.
15. Schmitt R, Dubach C. Activity of (Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>)-stimulated adenosinotriphosphatase in the rat nephron. *Pflügers Arch.* 409:81-92, 1987.
16. Navar L. G. Renal Hemodynamic Effects of Diuretics. En *Diuretic Agents*. Donald Seldin y Gerhard Giebisch editores. Academic Press. p 135-169.
17. Khuri RN, Wiederholt M, Strieder N and Giebisch G. Effects of graded solute diuresis on renal tubular sodium transport in the rat. *Am. J. Physiol.* 228:1262-1268,1975.
18. Renfro JL. Water and ion transport by the urinary bladder of the teleost *Pseudopleuronectes americanus*. *Am. J. Physiol* 228:52-61, 1975.
19. Stokes JB. Sodium chloride absorption by the urinary bladder of the winter flounder. *J. Clin. Invest.* 74:7-16, 1984.
20. Kunau RT, Wéller DR and Webb HL Clarification of the site of action of chlorothiazide in the rat nephron. *J. Clin. Invest.* 56:401-407, 1975.
21. Velázquez H, Good DW, Wright FS. Mutual dependence of sodium an chloride absorption by renal distal tubule. *Am. J. Physiol.* 247(16):F904-911, 1984.
22. Beaumont K., Vaughn DA., Fanestil DD. Thiazide diuretic drug receptors in rat kidney: Identification with [<sup>3</sup>H]metolazone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2311-14, 1988.
23. Tran JM, Farell MA, Fanestil DD. Effect of ions on binding of the thiazide-type diuretic metolazone to kidney membrane. *Am. J. Physiol.* 258:F908-F915, 1990.
24. Ellison, Morrissey and Desir. Solubilization and partial purification of the thiazide diuretic receptor from rabbit renal cortex. *Biochimica et Biophysica acta.* 1069:241-9, 1991.

25. Gamba G, Saltzberg N, Lombardi M, Miyanoshita A, Lytton J, Hediger MA, Brenner BM and Hebert SC. Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the thiazide-sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2749-2753, 1993.
26. Kyte, J. and Doolittle, R.F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. (1982) *J. Mol. Biol.* 157, 105-132.
27. Simon DB, Nelson-Williams C, Johnson M, Ellison D, Karet FE, Morey A, Vaara I, Iwata F, Cushner HM, Koolen M, Gainza FJ, Gitelman HJ, Lifton JP. Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Nature genetics* 12:24-30, 1996.
28. Mastroianni N, De Fusco M, Zollo M, Arrigo G, Zuffardi O, Bettinelli A, Ballabio A and Casari G. Molecular cloning, expression pattern, and chromosomal localization of the human Na-Cl thiazide-sensitive cotransporter (SLC12A3) *Genomics* 35:486-493, 1996.
29. Obermüller N, Bernstein P, Velázquez H, Reilly R, Moser D, Ellison DH, Bachmann S. Expression of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter in rat and human kidney. *Am J. Physiol* 269:F900-F910, 1995.
30. Bostanjoglo M, Reeves WB, Reilly FF, Velázquez H, Robertson N, Litwack G. 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, mineralocorticoid receptor and thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter expression by distal tubules. *J. Am. Soc. Nephrol* 9:1347-1358, 1998.
31. Velázquez H, Naray-Fejes-Tóth A, Silva T, Andujar E, Reilly RF, Desir GV, Ellison DH. Rabbit distal convoluted tubule coexpresses NaCl cotransporter and 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase II mRNA. *Kidney Int* 54:464-472, 1998.
32. Bachmann S, Velázquez H, Obermüller N, Reilly RF, Moser D, Ellison DH. Expression of thiazide-sensitive NaCl cotransporter by rabbit distal convoluted tubule cells. *J. Clin. Invest.* 96:2510-2514, 1995.
33. Plotkin MD, Kaplan MR, Verlander JW, Lee WS, Brown D, Poch E, Gullans SR, Hebert SC. Localization of the thiazide sensitive Na-Cl cotransporter, rTSC1, in the rat kidney. *Kidney. Int.* 50:174-183, 1996.
34. Verlander JW, Tran TM, Zhang L, Kaplan MR, Hebert SC. Estradiol enhances thiazide-sensitive NaCl cotransporter density in the apical plasma membrane of the distal convoluted tubule in ovariectomized rats. *J. Clin. Invest.* 101:1661-1669, 1998.
35. Kim J, Kim H, Cha JH, Tisher CC, Madsen KM. Intercalated cell subtypes in connecting tubule and cortical collecting duct of rat and mouse. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10:1-12, 1999.

36. Schmitt R, Ellison DH, Farman N, Rossier Bc, Reilly RF, Reeves WB, Oberbaumer I, Tapp R, Bachmann S. Developmental expression of sodium entry pathways in rat distal nephron. *Am. J. Physiol.* 276 (Renal Physiol. 45):F367-F381,1999.
37. Loffing J, Loffing-Cueni D, Hegyi I, Kaplan MR, Hebert SC, Le Hir M, Kaissling B. Thiazide treatment of rats provokes apoptosis in distal tubule cells. *Kidney Int.* 50:1180-1190,1996.
38. Loffing J, Valderrabano V, Froesch P, Kaplan M, Knepper M, Hebert S, Rossier B, Kaissling B. Segmentation of the mouse distal nephron: morphology and distribution of transport proteins. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9:39A, 1998.
39. Riccardi D, Hall AE, Chattopadhyay N, Xu JZ, Borwn EM, Hebert SC. Localization of the extracellular Ca<sup>++</sup>/ polyvalent cation-sensing protein in rat kidney. *Am. J. Physiol.* 274:F611-F622,1998.
40. Xu JZ, Hall AE, Peterson LN, Bienkowski LJ, Eessalu TE, Hebert SC. Localization of the ROMK protein on apical membranes of rat kidney nephron segments. *Am. J. Physiol.* 273:F739-F748,1997.
41. Scherzer P, Wald H, Popovtzer MM. Enhanced glomerular filtration and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase with furosemide administration. *Am. J. Physiol.* 252:F910-F915,1987;
42. Chen ZF, Vaughn DA, Beaumont K, Fanestil DD. Effects of diuretic treatment and of dietary sodium on renal binding of 3H-metolazone. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1:91-98,1990.
43. Loffing J, Le Hir M, Kaissling B. Modulation of salt transport rate affects DNA synthesis in vivo in rat renal tubules. *Kidney Int.* 47:1615-1623,1995.
44. Stanon BA and Kaissling B. Adaptation of distal tubule and collecting duct to increased sodium delivery. II. Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transport. *Am. J. Physiol.* 255(Renal Fluid Electrolyte Physiol. 24):F1269-F1275,1988.
45. Hierholzer KM, Wiederholt h, Holzgreve H, Giebisch G, Klose RM y Windhager EE. Micropuncture study of renal transtubular concentration gradients of sodium and potassium in adrenalectomized rats. *Pflügers Arch.* 285:193-210, 1965.
46. Farman N y Bonvalet JP. Aldosterone binding in isolated tubules. III. Autoradiography along the rat nephron. *Am. J. Physiol.* 245 (Renal Fluid Electrolyte Physiol.14) F606-F614,1983.

47. Krozowski SZ, Rundle SE, Wallace C, Castell MJ, Shen JH, Dowling J, Funder JW and Smith I. Immunolocalization of renal mineralocorticoid receptors with an antiserum against a peptide deduced from the complementary deoxyribonucleic acid sequence. *Endocrinology* 125:192-198, 1989.
48. Smith RE, Li KX, Andrews RK and Krozowski Z. Immunohistochemical and Molecular characterization of the rat 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type II enzyme. *Endocrinology* 138:540-547, 1997.
49. Lombès M, Farman N, Oblin ME, Baulieu EE, Bonvalet JP, Erlanger BF and Gasc JM. Immunohistochemical localization of renal mineralocorticoid receptor by using an anti-idiotypic antibody that is an internal image of aldosterone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1086-1088, 1990.
50. Chen Z, Vaughn DA, Blakeley P and Fanestil DD. Adrenocortical steroids increase renal thiazide diuretic receptor density and response. *J. Am. Soc. Nephrol.* 5:1361-1368, 1994.
51. Velázquez H, Bartiss A, Bernstein PL and Ellison DH. Adrenal steroids stimulate thiazide-sensitive NaCl transport by the rat renal distal tubule. *Am. J. Physiol.* 270 (*Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 39):F211-F219, 1996.
52. Kim GH, Masilamani S, Turner R, Mitchell C, Wade JB and Knepper MA. The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter is an aldosterone-induced protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:14552-14557, 1998.
53. Ellison DH, Velázquez H, and Wright FS. Adaptation of the distal convoluted tubule of the rat: structural and functional effects of dietary salt intake and chronic diuretic infusion. *J. Clin. Invest.* 83:113-126, 1989.
54. Fanestil DD, Vaughn DA and Blakely P. Dietary NaCl and KCl do not regulate renal density of the thiazide diuretic receptor. *Am. J. Physiol.* 273 (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 42):R1241-1245, 1997.
55. Moreno G, Merino A, Mercado A, Herrera JP, Gonzalez-Salazar J, Correa-Rotter R, Hebert SC and Gamba G. Electroneutral Na-coupled cotransporter expression in the kidney during variations of NaCl and water metabolism. *Hypertension* 31:1002-1006, 1998.
56. Kobayashi S, Clemmons DR, Nogami K, Roy AD and Venkatachalam A. Tubular hypertrophy due to work load induced by furosemide is associated with increases of IGF-1 and IGFBP-1. *Kidney Int.* 47:818-828, 1995.
57. Morsing P, Velázquez H, Wright FS and Ellison H. Adaptation of distal convoluted tubule of rats. II. Effects of chronic thiazide infusion. *Am. J. Physiol.* 261 (*Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 30):F137-F143, 1991.

- 58.** Beaumont K, Vaughn DA, Maciejewski AR and Fanestil DD. Reversible downregulation of thiazide diuretic receptors by acute renal ischemia. *Am. J. Physiol.* 256 (*Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 25):F329-F334, 1989.
- 59.** Wang Z, Rabb H, Haq M, Shull GE and Soleimani M. A possible molecular basis of natriuresis during ischemic-reperfusion injury in the kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9:605-613, 1997.
- 60.** Edelstein CL, Shi Y, Berkman J and Ellison DH. Renal ischemia decreases thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter expression (Abstract) *J. Am. Soc. Nephrol.* 9:34A, 1998.
- 61.** Greger R. Renal handling of individual solutes of the glomerular filtrate. En. Greger R, Windhorst U, editores. *Comprehensive human physiology, from cellular mechanisms to integration.* New York: Springer Verlag; 1996.p.1517-44.
- 62.** Novello FC and Sprague JM.. Benzothiadiazine dioxides as novel diuretics. *Journal of Amer. Chem. Soc.* 79:2028-29, 1957.
- 63.** Eknoyan Garabed. A History of Diuretics in Diuretic Agents Clinical Physiology and Pharmacology. Donald Seldin y Gerhard Giebisch editores. Academic Press 1997, p23-27.
- 64.** Costanzo LS and Windhager, E. Calcium and sodium transport by the distal convoluted tubule of the rat. *Am. J. Physiol.* 235:F492-F506, 1978.
- 65.** Beaumont K, Vaughn DA and Healy DP. Thiazide diuretic receptors: autoradiographic localization in rat kidney with [<sup>3</sup>H] metolazone. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 250:414-419, 1989.
- 66.** Breslau NA, Moses AM and Weiner IM. The role of volume contraction in the hypocalciuric actino of chlorothiazide. *Kidney Int.* 10:164-170, 1976.
- 67.** Costanzo LS and Weiner IM. Relationship between clearances of Ca and Na: Effect of distal diuretics and PTH. *Am. J. Physiol.* 230:67-73, 1976.
- 68.** LaCroix AZ, Wienjpahl J, White LR, Wallace RB, Scherr PA, George LK, Coroni-Huntley J and Ostfeld AM. Thiazide diuretic agents and the incidence of hip fracture. *N. Engl. J. Med.* 322:286-290,1990.
- 69.** Walser, M. Calcium-sodium interdependence in renal transport. In "Renal Pharmacology"(J.W. Fisher, Ed.), pp. 21-41. Appleton-Century-Crofots, New York. 1971.
- 70.** Costanzo, L.S, Windhager, EE. Renal regulation of calcium balance. En "The Kidney: Physiology and Pathophysiology" (D.W. Seldin y G. Giebisch, Eds.), 2a. ed., pp2375-2393. Raven, New York. 1992.

- 71.** Sakhaee K. The effects of diuretics on calcium metabolism: physiologic and clinical effects. En *Diuretic Agents. Clinical physiology and pharmacology*. Donald Seldin y Gerhard Giebisch editores. Academic Press 1997, p595-609.
- 72.** Brater DC. Pharmacology of diuretics. *Am. J. Med. Sci.* 319(1):38-50,2000.
- 73.** Dai LJ, Friedman PA and Quamme GA. Cellular mechanism of chlorothiazide and cellular potassium depletion on Mg<sup>2+</sup> uptake on mouse distal convoluted tubule cells. *Kidney Int.* 51:1008-1017,1996.
- 74.** Quamme GA. Renal magnesium handling: New insights in understanding old problems. *Kidney Int.* 52:1180-1195, 1997.
- 75.** Wilcox CS. Metabolic and adverse effects of diuretics *Sem. Nephrol.* 19(6):557-568,1999 and Sakhaee K. The effects of diuretics on magnesium metabolism: physiologic and clinical effects. En *Diuretic Agents. Clinical physiology and pharmacology*. Donald Seldin y Gerhard Giebisch editores. Academic Press 1997, p611-619.
- 76.** Gitelman HJ, Graham JB, Welt LG. A new familial disorder characterized by hypokalemia and hypomagnesemia. *Trans. Assoc. Am. Physicians* 1966;79:221-35.
- 77.** Bartter FC, Pronove P, Gill J Jr and MacCardle RC. Hyperplasia of the juxtaglomerular complex with hyperaldosteronism and hypokalemic alkalosis: a new syndrome. *Am. J. Med.* 33:811-28,1962.
- 78.** Bettinelli A. Use of calcium excretion values to distinguish two forms of primary renal tubular hypokalemic alkalosis: Bartter and Gitelman syndromes. *J. Pediatr.* 120:38-43, 1992.
- 79.** Sutton RA, Mavichak V, Halabe A, Wilkins GE. Bartter's syndrome: evidence suggesting a distal tubular defect in a hypocalciuric variant of the syndrome. *Miner. Electrolyte Metab.*;18:43-51,1992.
- 80.** Simon DB, Cruz DN, Lu Y and Lifton RP. Genotype-phenotype correlation of NCCT mutations and Gitelman's syndrome (Abstract ) *J. Am. Soc. Nephrol.* 9:111A, 1998.
- 81.** Simon DB, Nelson-Williams C, Bia MJ, Ellison D, Karet FE, Molina AM, Vaara I, Iwata F, Cushner HM, Koolen M, Gainza FJ, Gitelman JH and Lifton RP. Gitelman's variant of Bartter's syndrome; inherited hypokalaemia is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Nat. Genet.* 12:24-30, 1996.

- 82.** Schultheis PJ, Lorenz JN, Meneton P, Nieman ML, Riddle TM, Flagella M, Duffy JJ, Doetschman T, Miller ML and Shull GE. Phenotype Resembling Gitelman's Syndrome in Mice Lacking the Apical Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> Cotransporter of the Distal Convoluted Tubule. *J. Biol. Chem.* 273:29150-29155, 1998
- 83.** Kunchaparty S, Palcso M, Berkman J, Velazquez H, Desir GV, Bernstein P, Reilly RF and Ellison DH. Defective processing and expression of thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter as a cause of Gitelman's syndrome. *Am. J. Physiol.* 277 (Renal Physiol. 46):F643-F649, 1999.
- 84.** Rosati C, Cavalier S, Braquet P, Berthet P, Tarrade T, Ruchoux MM, Garay R. Perturbations ioniques produites par un flux non laminaire dans les cellules musculaires lisses vasculaires en culture. *Arch. Mal. Coeur Vaiss* 82:41-44, 1989.
- 85.** Greven J. Effects of Cicletanine on Kidney Function 1. Clearance and Micropuncture Studies in Anesthetized Rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 273(3):1190-1202, 1995.
- 86.** Garay RP, Nazaret J, Diez A, Etienne A, Bourgain R, Braquet P and Esanu A. Stimulation of K<sup>+</sup> fluxes by diuretic drugs in human red cells. *Biochem. Pharmacol.* 33:2013, 1984.
- 87.** Calder JA, Schachter M, Server PS. Identification of indapamine binding sites in guinea pig renal membranes. *Br. J. Pharmacol.* 107:426P, 1992.
- 88.** Landolt-Marticorena, C., Reithmeier, A.F. Transmembrane helix-helix interactions and accessibility of H2DIDS on labelled band 3, the erythrocyte anion exchange protein. *Biochem. J.* 302, 253-260, 1994.
- 89.** Roitsch, T., Lehle, L. Expression of yeast invertase in oocytes from *Xenopus laevis*. Secretion of active enzyme differing in glycosylation. *Eur. J. Biochem.* 181, 525-529, 1989.
- 90.** Gavel, Y., von Heijne, G. Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Prot. Eng.* 3, 433-442, 1990.
- 91.** Rudd PM, and Dwek R A. Glycosylation: Heterogeneity and the 3D Structure of Proteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 32(1):1-100, 1997.
- 92.** Nishio T, Poch E, Monroy A, Plata C, Hall A, Welsh R, Xu JZ, Gamba G and Hebert SC. Effects of two glycosylation sequons on function of the thiazide-sensitive Na-Cl Cotransporter (rTSC) (Abstract) *J. Am. Soc. Nephrol.* 9:42A, 1998.



- 93.** Asano T, Katagiri H, Takata K, Lin JL, Ishihara H, Inukai K, Tsukuda K, Kikuchi M, Hirano H, Yazadi Y, Oka Y. The role of N-glycosylation of GLUT1 for glucose transport activity. *J. Biol. Chem.* 266:24632-24636,1991.
- 94.** Ott RJ, Hui AC, Giacomini KM. Inhibition of N-linked glycosylation affects organic cation transport across the brush border membrane of opossum kidney (OK) cells. *J. Biol. Chem.* 267:133-139,1992.
- 95.** Olivares L, Aragón C, Giménez C, Zafra, F. The role of N-glycosylation in the targeting and activity of the GLYT1 glycine transporter. *J. Biol. Chem.* 270:9437-9442,1995.
- 96.** Yusufi AN, Szczepanska-Konkel M, Dousa TP. Role of N- linked oligosaccharides in the transport activity of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in rat renal brush-border membrane. *J. Biol. Chem.* 163:13683-13691,1988.
- 97.** Hayes G, Busch A, Lötscher M, Waldegger S, Lang F, Verrey F, Biber J, Murer H. Role of N-linked glycosylation in rat renal Na/Pi-cotransport. *J. Biol. Chem.* 269:24143-24149,1994.
- 98.** Tate CG, Blakely RD. The effect of N-linked glycosylation on activity of the Na(+)- and Cl(-) –dependent serotonin transporter expressed using recombinant baculovirus in insect cells. *J. Biol. Chem.* 269(42):26303-10, 1994.
- 99.** Bailly C, Roinel N, Amiel C. Stimulation by glucagon and PTH of Ca and Mg reabsorption in the superficial distal tubule of the rat kidney. *Pflügers Arch.* 403:28-34,1985.
- 100.** Elalouf JM, Roinel N, De Rouffignac C. Stimulation by human calcitonin of electrolyte transport in distal tubules of rat kidney. *Pflügers Arch.* 399:111-118,1983.
- 101.** Dai LJ, Ritchie G, Bapty BW, Kerstan D, Quamme GA. Insulin stimulates Mg<sup>2+</sup> uptake in mouse distal convoluted tubule cells. *Am. J. Physiol.* 277(6 Pt 2):F907-13, 1999.
- 102.** Verrey F. Early aldosterone action: toward filling the gap between transcription and transport. *Am. J. Physiol.* 277(46):F319-F327, 1999.
- 103.** Colussi G, Rombolá G, De Ferrari ME, MacOluso M, Minetti L. Correction of hypokalemia with antialdosterone therapy in Gitelman's syndrome. *Am. J. Nephrol.* 14:127-135,1994.
- 104.** Lee K, Brown D, Urena P, Ardaillou N, Ardaillou R, Deeds J, Segre GV. Localization of parathyroid hormone/parathyroid hormone-related receptor mRNA in kidney. *Am. J. Physiol.* 270(39):F186-F191,1996.
- 105.** Mannstadt M, Jüppner H, Gardella J. Receptors for PTH and PTHrP: their biological importance and functional properties. *Am. J. Physiol.* 277(46):F665-F675,1999.

- 106.** Blakely P, Vaughn DA, Fanestil DD. Effects of calcium-modulating hormones on thiazide receptor density. *J. Am. Soc. Nephrol.* 7(7):1052-7, 1996.
- 107.** Ter Maaten JC, Serne EH, van Eps WS, ter Wee PM, Donker AJ and Gans Ro. Effects of insulin and atrial natriuretic peptide on renal tubular sodium handling in sickle cell disease. *Am. J. Physiol.* 278(3):F499-505,2000.
- 108.** Mathi SK, Chan J, Watt VM. Insulin receptor-related receptor messenger ribonucleic acid: quantitative distribution and localization to subpopulations of epithelial cells in stomach and kidney. *Endocrinology* 136(9):4125-32,1995.
- 109.** Friedman PA, Coutermarsh BA, Kennedy SM, Gesek FA. Parathyroid hormone stimulation of calcium transport is mediated by dual signaling mechanisms involving protein kinase A and protein kinase C. *Endocrinology* 137(1):13-20,1996.
- 110.** Wehling M. Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annu. Rev. Physiol.* 59,365-393,1997.
- 111.** Mastroianni N, De Fusco M, Zollo M, Arrigo G, Zuffardi O, Bettinelli A, Ballabio A and Casari G. Molecular cloning, expression pattern, and chromosomal localization of the human Na-Cl thiazide-sensitive cotransporter (SLC12A3) *Genomics* 35:486-493, 1996.
- 112.** Hebert S.C. Nephron heterogeneity. En *Handbook of Physiology*. Windhager E.E. New York. Oxford University Press. 1992, pag. 875/925.
- 113.** Gamba G. Molecular biology of distal nephron sodium transport mechanisms. *Kidney Int.* 56:1606-1622,1999.
- 114.** Jackson E. K. Diuretics. En *Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*. Hardman J.E., Molinoff P.B., Ruddon T.W., Goodman Gilman A. editores. McGraw-Hill.1996, pag. 701-704.
- 115.** Oates J. A. Antihypertensive agents and the drug therapy of hypertension. En *Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*. Hardman J.E., Molinoff P.B., Ruddon T.W., Goodman Gilman A. editores. McGraw-Hill. 1996, pag. 780-808.
- 116.** Asano T, Takata K, Katagiri H, Ishihara H, Inukai K, Anai M, Hirano H, Yazadi Y, Oka Y. The role of N-glycosylation in the targeting and stability of GLUT1 glucose transporter. *J. Biol. Chem.* 266:24632-24636,1991.
- 117.** Hayes G, Busch AE, Lang F, Biber J, Murer H. Protein kinase C consensus sites and the regulation of renal Na/Pi-cotransport (NaPi-2) expressed in XENOPUS laevis oocytes. *Pflugers. Arch.* 430(5):918-24,1995.

**118.** Friedman PA . Codependence of renal calcium and sodium transport. *Annu. Rev. Physiol.* 60:179-97,1998.

**119.** Hoenderop JGJ, Willems PHGM, Bindels RJM. Toward a comprehensive molecular model of active calcium reabsorption. *Am. J. Physiol. Renal Physiol* 278:F352-360,2000.

**120.** Lytle C. Activation of the Avian Erythrocyte Na-K-Cl Cotransport Protein by Cell Shrinkage, cAMP, Fluoride, and Calyculin-A Involves Phosphorylation at Common Sites. *J. Biol. Chem.* 272:15069-15077,1997.