

Aspectos estructurales, funcionales y patológicos del cotransportador de NaCl sensible a tiazidas

Erika Moreno,* Diana Pacheco-Alvarez,** Eduardo Ríos Arg aiz*,***

* Unidad de Fisiología Molecular, Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

** Escuela de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Panamericana.

*** Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Structural functional and pathological aspects of the NaCl cotransporter thiazide sensitive

RESUMEN

ABSTRACT

NCC cotransporter is the mayor pathway for sodium chloride reabsorption in the distal nephron and the target of thiazide diuretics which, given their clinical utility in the management of arterial hypertension, are amongst the top sold drugs in the world. NCC protein is of great physiological importance given its role in the maintenance of water and salt homeostasis on the organism. Inactivating mutations in the gene that codes for NCC cause Gitelman's syndrome: an autosomal recessive disease associated with arterial hypotension, metabolic alkalosis, hypokalemia and hypocalciuria. This syndrome represents strong evidence of the relevance of the role of NCC in blood pressure regulation, electrolyte and acid base balance. In this work we review the up to date knowledge regarding this cotransporter with special attention to the molecular aspects of the protein that determine its physiological function and pathological roles.

Key words. Cotransporter. Thiazides. Gitelman's syndrome.

El cotransportador de Na-Cl sensible a tiazidas (NCC o CST) es la principal vía de reabsorción de sal en el túbulo distal de la nefrona y es el sitio de acción de los diuréticos de tipo tiazida que, por su utilidad en el manejo de la hipertensión arterial, se encuentran dentro de los medicamentos más recetados en el mundo. El NCC es una proteína de suma importancia para la fisiología renal, ya que permite mantener la homeostasis de sal y agua en el organismo. Cuando suceden mutaciones inactivantes en el gen que codifica para este cotransportador se produce una enfermedad conocida como síndrome de Gitelman, el cual es un trastorno autosómico recesivo caracterizado clínicamente por hipotensión arterial, alcalosis metabólica, hipocalemia e hipocalciuria, lo que resalta la importancia de este gen en la regulación de la presión arterial y el equilibrio hidroelectrolítico. En este trabajo hacemos una breve revisión de los conocimientos que se tienen acerca de este cotransportador, con especial énfasis en la biología molecular, propiedades fisiológicas y aspectos patológicos del NCC.

Palabras clave. Cotransportador. Tiazidas. Síndrome de Gitelman.

INTRODUCCIÓN

El cotransportador $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ sensible a tiazidas NCC (Na-Cl Cotransporter), también conocido como CST (cotransportador sensible a tiazidas), es una proteína de membrana que pertenece a la familia de transportadores SLC12 cloro-catiónicos y se localiza en la membrana apical de las células del túbulo conorneado distal de la nefrona, en donde constituye la principal vía de reabsorción de NaCl.¹

El NCC es el sitio de acción de los diuréticos tipo tiazida, fármacos utilizados en la práctica clínica y considerados como la primera opción farmacológica para el tratamiento de la hipertensión arterial (HAS),^{2,3} la cual constituye un grave problema de salud pública a nivel mundial, sólo en México afecta a más de 30% de la población adulta (ENSANUT 2012).⁴

Se sabe que mutaciones inactivantes en el gen que codifica para el NCC ocasionan una enfermedad co-

nocida como síndrome de Gitelman, el cual es un trastorno autosómico recesivo caracterizado clínicamente por hipotensión arterial, alcalosis metabólica e hipocalcemia.^{5,6} En contraste, el incremento en la función del NCC, como resultado de mutaciones en los genes que codifican para las cinasas WNK1 y WNK4, produce una enfermedad en espejo al síndrome de Gitelman, es decir, con hipertensión arterial, acidosis metabólica e hipercalemia, conocida como síndrome de Gordon, pseudohipoaldosteronismo tipo II (PHAII) o hipertensión hipercalemica familiar (HHF).¹

Biología molecular del NCC

El NCC fue identificado molecularmente y clonado a partir de diferentes especies como el pez lenguado de invierno (NCCfl),⁷ conejo (NCCrb),⁸ rata (NCCr),⁹ ratón (NCCm),¹⁰ el humano (NCCh)^{11,12} y recientemente en la anguila europea (NCC α y NCC β).¹³ El gen que codifica para el NCC se localiza en el cromosoma 16q13,^{11,12} para el NCCr en 19p12-14¹⁴ y para el NCCm en el cromosoma 8.¹⁵

Dependiendo de la especie de la que fue clonado, el NCC es una proteína de 1,002 a 1,028 residuos de aminoácidos y está compuesto por un dominio hidrofóbico central que contiene 12 regiones transmembranales (TM 1-12) interconectadas por seis asas extracelulares y cinco asas intracelulares. El segmento de interconexión más largo está entre la región TM 7 y 8. Este segmento está glicosilado¹⁶ y por tanto se presume ve al lado extracelular. El dominio hidrofóbico central está flanqueado por un dominio amino-terminal corto y un dominio carboxilo-terminal largo, presumiblemente localizado dentro de la célula.⁹

La identificación molecular del NCC permitió la generación de anticuerpos policlonales anti-NCC, los cuales demostraron que la localización de este cotransportador es específica de la membrana apical de las células del túbulo contorneado distal en la nefrona.^{17,18}

Distintos análisis hechos en la estructura primaria de los NCCs¹ han mostrado que las especies mamíferas muestran hasta 90% de identidad entre ellas, es decir, los NCCs de rata, ratón, conejo y humano son estructuralmente muy parecidos, mientras que el NCC del lenguado de invierno y de la anguila europea muestran ~55% de identidad cuando son comparados con los anteriores.¹³

Análisis de Northern blot en ratas revelaron la expresión específica del NCC a nivel renal.⁹ Sin embargo, estudios posteriores mostraron la expresión

del NCC en el intestino¹⁹ y el hueso.²⁰ Aunque también se ha postulado la presencia del NCC en el cerebro,²¹ vasos sanguíneos,²² páncreas,²³ células mononucleares de sangre periférica,²⁴ vesícula biliar²⁵ y en el corazón.²⁶ La confirmación del NCC en estos tejidos a nivel proteico no ha sido exitosa.

El modelo más utilizado para el estudio de la función del NCC es el sistema de expresión funcional en ovocitos de *Xenopus laevis*, el cual permite la síntesis de la proteína transportadora a nivel transmembranal días después de la microinyección del cRNA,^{1,7,10,27-39} lo que le confiere al ovocito la capacidad de transportar ²²Na⁺ a través del NCC. Gracias a este sistema se ha podido estudiar el efecto de la glicosilación y fosforilación del NCC.

El NCC es una proteína glicosilada en dos sitios (N404 y N424) situados en el asa extracelular que une la región TM 7 y 8.¹⁶ La eliminación de cada sitio redujo la actividad del NCCr en 50% y la eliminación de ambos sitios la redujo 95%, disminuyéndose también la expresión del NCC en la membrana plasmática. Por lo tanto se consideró que la glicosilación del NCC es fundamental en el tráfico de la proteína a la superficie celular. La ausencia de glicosilación en el NCCr,¹⁶ pero no en el NCCfl,³⁰ se asocia con un aumento de afinidad por las tiazidas, lo que sugiere que en la rata los azúcares impiden a la tiazida alcanzar el sitio de unión en el cotransportador.

Posteriormente, Pacheco-Alvarez, *et al.*, demostraron que el aumento en la función de este cotransportador depende al menos de la fosforilación de tres residuos localizados en la región amino-terminal (Treonina 53, Treonina 58 y Serina 71).³⁵

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DEL NCC

Dado que el NCC es el blanco farmacológico de un agente antihipertensivo ampliamente utilizado, es de interés establecer las regiones de la proteína o aminoácidos específicos que sean responsables de la translocación de los iones o de la unión de las tiazidas al transportador.

Los primeros trabajos que abrieron la posibilidad de estudiar aspectos estructurales y funcionales del NCC fueron publicados a principios de la década pasada. En estos estudios se analizaron las características funcionales de dos NCCs, el de rata (NCCr)²⁸ y el del pez lenguado de invierno (NCCfl),²⁹ y mostraron importantes diferencias cinéticas (afinidad por los iones Na⁺ y Cl⁻) y farmacológicas entre estos heterólogos.

El NCC del pez lenguado tiene una *K_m* para transporte de Na⁺ de 58.2 ± 7.1 mM y una *K_m* para

Cl^- de 22.1 ± 4.2 mM, mientras que el NCCr mostró una K_m para Na^+ de 7.26 ± 2.4 mM y para Cl^- de 6.46 ± 1.7 mM. Por tanto, el NCCr muestra mayor afinidad por los iones transportados. Además, puede notarse que los valores de la K_m en el NCCr son similares para ambos iones, mientras que en el NCCfl existe mayor afinidad por el Cl^- .

El análisis de la afinidad por tiazidas mostró diferencias importantes; concentraciones de 10^{-4} M de clortalidona o tricloretmetiazida fueron suficientes para inhibir 95% de la función del NCCr, mientras que esta concentración de diurético sólo redujo parcialmente la función del NCCfl (68 y 46%, respectivamente).^{28,29}

Ante estos hallazgos Vázquez, *et al.*,²⁹ analizaron detalladamente la estructura primaria del NCCr y del NCCfl, en donde observaron que el grado de identidad entre estos transportadores es de 62%, siendo las regiones TM las que muestran 80% de identidad, es decir, son las regiones más parecidas entre ellos, mientras que el porcentaje de identidad en la región NH_2 y COOH^- es menor, ya que en el extremo NH_2 es de 20%, mientras que el COOH^- es de 55%.

Años más tarde Moreno, *et al.* determinaron regiones del NCC que definen las diferencias cinéticas para transporte de iones o la sensibilidad a las tiazidas. Esto fue posible mediante la creación de proteínas quiméricas entre el transportador de rata y del pez lenguado de invierno; es decir, una proteína

construida con fragmentos de ambas especies. Este estudio estableció que son las 12 regiones TM las involucradas en el transporte de Na^+ ; mientras que las regiones TM 1-7 son las que contienen los residuos de afinidad para la unión del Cl^- . En contraste, los residuos que definen la diferente afinidad por las tiazidas se encontraron dentro de las regiones TM 8-12.³⁰ Estos hallazgos mostraron ser contrarios al de una propuesta anterior, en la que se consideró que los diuréticos tiazídicos y el cloruro compiten por el mismo sitio de unión.³¹ La observación de que la afinidad por Cl^- está determinada por residuos localizados dentro de los segmentos TM 1-7 se apoya en otro estudio de Moreno, *et al.*,³² en el que se analizaron las consecuencias funcionales de un polimorfismo de nucleótido individual (SNP). En este estudio se observó que una glicina altamente conservada dentro de la TM 4 del NCC juega un papel crítico en definir el nivel de actividad del cotransportador y la afinidad por Cl^- . El SNP G264A (cambio de glicina por alanina en la posición 264 del NCC) resultó en una disminución de 50% en la actividad del cotransportador y se asoció a una mayor afinidad por Cl^- (una orden de magnitud). Posteriormente, Vormfelde, *et al.*,³³ mostraron que la población que tiene el SNP G264A tuvo una mayor respuesta a la administración de furosemida, diurético de asa. Esto se debe a que la disminución de la reabsorción de sal en el asa de Henle inducida por furosemida es

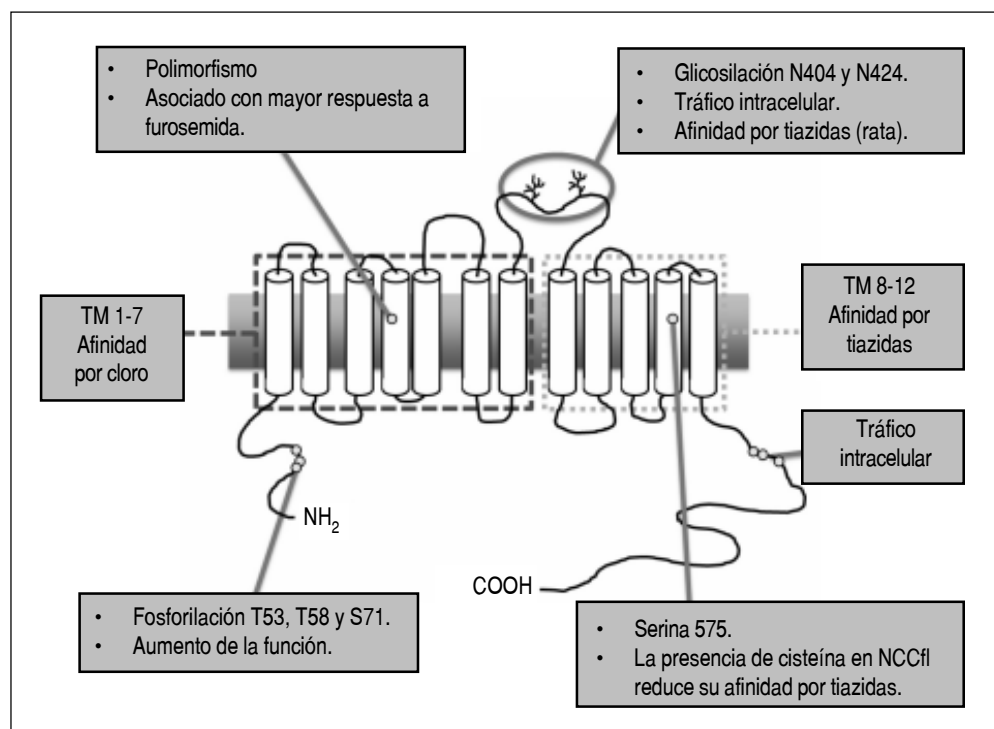


Figura 1. Relación estructura-función del NCC.

parcialmente compensada por el aumento en el túbulo contorneado distal por el NCC. Entonces, la menor función de NCC en los portadores del polimorfismo G264A disminuye la capacidad del túbulo distal de compensar las pérdidas de sal inducidas por la furosemida.

Finalmente, como consecuencia del análisis más detallado de las regiones TM 8-12 entre el NCCr y el NCCfl, Castañeda-Bueno, *et al.*, reportaron que la sustitución de un solo residuo localizado en la región TM11 (Serina 575 presente en NCCr por cisteína presente en el NCCfl) es suficiente para conferir al NCC de rata la afinidad por tiazida que muestra el NCC del lenguado y viceversa.³⁴ Con base en los estudios comentados se ha propuesto el modelo de estructura función que muestra la figura 1.

ENFERMEDADES ASOCIADAS CON NCC

Como se mencionó en la introducción, las alteraciones en la función del NCC dan origen a enfermedades que se asocian con trastornos hidroelectrolíticos. Las alteraciones que generan menor actividad del cotransportador producen el síndrome de Gitelman, mientras que aquéllas que aumentan su actividad se asocian con el síndrome de Gordon. El síndrome de Gitelman imita los efectos de las tiazidas: pérdida de sal, hipocalemia, alcalosis metabólica e hipocalciuria,⁵ mientras que el síndrome de Gordon genera las alteraciones opuestas, es decir, retención urinaria de sal con hipertensión arterial, hipercalcemia, acidosis metabólica e hipercalciauria.⁴⁰

Síndrome de Gitelman

En 1962 Bartter describió por primera vez un nuevo síndrome que asociaba las condiciones de hiperaldosteronismo, hipocalemia y alcalosis

metabólica.⁴¹ Posteriormente, Gitelman, *et al.*, describieron en 1966 tres pacientes con un síndrome similar, pero asociado a hipomagnesemia.⁵ Debido a la ausencia de herramientas moleculares en ese tiempo, la comunidad médica consideró al síndrome descrito por Gitelman como una variante del síndrome de Bartter, y esto generó confusión en la literatura, ya que algunos autores agruparon a pacientes con estos síndromes bajo el nombre de síndrome de Bartter.⁴²

No fue hasta 1992 que se empezaron a diferenciar estas enfermedades. La publicación de los criterios de Bettinelli⁴³ proporcionó una manera sencilla de distinguir entre ambas entidades con base en la edad de presentación y el manejo urinario de cationes divalentes. Los pacientes con síndrome de Gitelman se presentan usualmente en la adolescencia con hipomagnesemia e hipocalciuria, mientras que aquéllos con síndrome de Bartter real presentan desde la infancia hipercalciauria y por lo general concentraciones normales de magnesio (Cuadro 1). A partir de esta publicación, la comunidad médica comenzó a realizar la distinción clínica entre estos dos síndromes, lo que permitió conocer que la mayoría de los casos etiquetados como síndrome de Bartter eran en realidad pacientes con síndrome de Gitelman.⁴⁴

Sin embargo, el mayor avance en el estudio de esta enfermedad se dio en 1996 cuando, gracias a la identificación del gen que codifica para NCC⁷ y al NKCC2 (causante de síndrome de Bartter),⁹ Lifton, *et al.*, demostraron que el origen molecular de la enfermedad de Gitelman radica en mutaciones en NCC.¹¹ Esto permitió establecer sin lugar a duda la distinción entre este síndrome y el síndrome de Bartter, el cual se debe a mutaciones en cinco genes diferentes que codifican para proteínas que regulan la reabsorción de sodio en el asa ascendente de Henle y la mácula densa.⁴⁷

Cuadro 1. Características distintivas entre el síndrome de Bartter y el síndrome de Gitelman.

Características	Bartter	Gitelman
Asintomático	Raro	Frecuente
Edad de presentación	Prenatal, neonatal o infancia	Adolescentes y adultos
Retraso en el crecimiento	Sí	No
Poliuria	Sí	No
Alteración en la concentración urinaria	Sí	No
Hipomagnesemia	Raro	Siempre
Excreción urinaria de calcio	Alta	Baja
Condrocalcinosis	No	Reportado
Localización del defecto	Asa ascendente de Henle	Túbulo contorneado distal

Manifestaciones clínicas

Los trastornos hidroelectrolíticos generados por el síndrome de Gitelman se manifiestan clínicamente en forma de calambres en brazos y piernas, espasmos musculares e incluso tetania secundarios a la hipomagnesemia e hipocalcemia. Aunque este síndrome consiste en una nefropatía perdedora de sal, generalmente los pacientes no presentan hipotensión o depleción de volumen⁴² debido a que compensan sus pérdidas aumentando el consumo de sal.⁴⁷ Por ejemplo, en una serie de pacientes recientemente publicada se relatan anécdotas de comportamientos asociados con aumento en el apetito de sal que incluían lamer la sal de frituras o beber el vinagre de los pepinillos.⁴⁸ Además de estas manifestaciones existen reportes de pacientes que presentan artritis por depósito de pirofosfato, los cuales se cree que son secundarios a la hipomagnesemia.⁴⁹

Fisiopatología del síndrome de Gitelman

La fisiopatología de las alteraciones en este síndrome es secundaria a la disminución en la actividad del NCC. Esto genera menor reabsorción de sal y agua en el túbulo distal, lo que se traduce en pérdidas urinarias de sodio. Además de esto, la disminución en la reabsorción electroneutra de sodio y cloro genera mayor llegada de estos iones a las partes más distales de la nefrona (conducto conector y conducto colector), lo que favorece la reabsorción de sodio por la vía electrogénica mediada por el canal epitelial de sodio ENaC. La reabsorción de sodio mediada por ENaC genera un potencial negativo en la luz del túbulo que favorece la secreción de potasio e hidrogeniones causando pérdidas urinarias de estos iones. La actividad de ENaC, además, es favorecida por el hiperaldosteronismo secundario que se

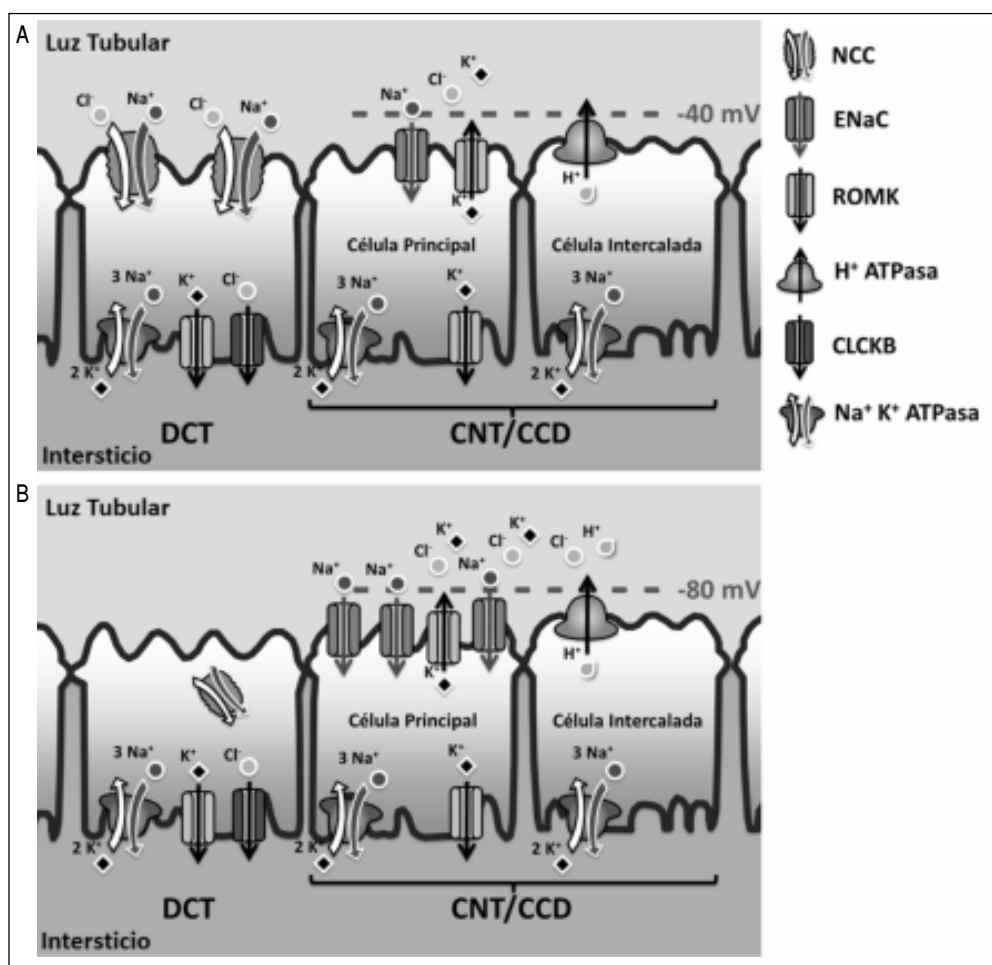


Figura 2. A. Dinámica normal de reabsorción y secreción de iones en la nefrona distal. La mayoría del Na^+Cl^- que llega a la nefrona distal se reabsorbe a través del NCC en el túbulo contorneado distal (DCT) y un menor porcentaje es reabsorbido por ENaC en el conducto conector y colector cortical (CNT/CCD); ENaC reabsorbe sodio de manera electrogénica (sin cloro), lo que genera un potencial transepitelial de 40 mV , negativo en la luz tubular. El potencial negativo en la luz favorece la secreción de potasio y protones. B. En el síndrome de Gitelman la menor función del NCC genera mayor llegada de Na^+Cl^- al CNT/CCD, lo que favorece la reabsorción de Na^+ mediada por ENaC, el cual a su vez presenta mayor expresión debido al efecto del hiperaldosteronismo secundario. El aumento en la reabsorción electrogénica de Na^+ aumenta el potencial transepitelial y esto produce mayor secreción tubular de potasio y protones.

genera en respuesta a las pérdidas de sal.⁵⁰ De esta manera el riñón intenta recuperar la sal que se pierde por la menor función del NCC, pero en este proceso genera pérdidas urinarias de potasio y de protones (Figura 2). A diferencia del síndrome de Bartter, el síndrome de Gitelman no se asocia con defectos en la dilución y concentración urinaria y por lo tanto, no genera poliuria.⁴²

Los mecanismos que generan la hipocalciuria y la hipomagnesemia no se encuentran del todo claros. La hipocalciuria puede deberse a mayor reabsorción de calcio en el túbulo proximal. Las pérdidas urinarias de sodio generan mayor reabsorción de este ion en la nefrona proximal con la consecuente reabsorción paracelular de calcio.⁵¹ Aunque el aumento en la reabsorción de calcio a nivel de DCT también puede contribuir.⁵² El mecanismo responsable de la hipomagnesemia tampoco es claro, una hipótesis se basa en el hallazgo de que la ausencia del NCC (o el tratamiento crónico con tiazidas) genera atrofia del túbulo distal, lo que ocasiona menor expresión del canal TRPM6, el cual es responsable de la reabsorción de magnesio.⁵³

Existen pocos datos sobre las secuelas de este síndrome a largo plazo. El grupo de Lifton reportó que pacientes portadores de mutaciones en el NCC en un solo alelo tienen menor incidencia de hipertensión arterial esencial.⁴⁵ Estas mutaciones reducen la actividad del NCC,⁴⁶ lo que sugiere que una modesta disminución en la actividad del NCC no es suficiente para causar enfermedad, pero sí confieren protección contra hipertensión arterial.

En contraste con los estudios anteriores, un reporte reciente de una cohorte de 36 pacientes con síndrome de Gitelman mostró de manera inesperada que presentaban mayor incidencia de hipertensión arterial que la población en general.⁴⁸ Los autores sugirieron la posibilidad de que la activación crónica del sistema renina-angiotensina-aldosterona con el tiempo genere alteraciones renales que conduzcan a hipertensión arterial. Sumado a esto, un reporte reciente mostró mediante microscopia electrónica alteraciones estructurales en los podocitos de un paciente con síndrome Gitelman y proteinuria; estas alteraciones en los podocitos también fueron observadas en el ratón knockout del NCC.⁵⁴

GENÉTICA DEL SÍNDROME DE GITELMAN

El trabajo del grupo de Lifton en 1996 dejó claro que se trataba de una enfermedad con patrón de herencia recesiva. A la fecha se han reportado más

de 160 mutaciones, las cuales se localizan a lo largo de todo el cotransportador sin predilección por algún sitio en específico.^{47,55} La gran mayoría son mutaciones puntuales con cambio de sentido, sin sentido o que corren el marco de lectura.⁵⁶ La gran mayoría de los pacientes con síndrome de Gitelman son heterocigotos compuestos (es decir, que poseen una mutación diferente en cada alelo). Sin embargo, existen poblaciones en donde los pacientes con síndrome de Gitelman poseen mutaciones homocigotas explicadas por un ancestro común.⁵⁷

De manera interesante, aunque es muy claro que se trata de una enfermedad con patrón de herencia autosómico recesivo, se espera que los pacientes tengan mutaciones homocigotas o heterocigotas compuestas; las series de pacientes con síndrome de Gitelman han encontrado mutaciones en un solo alelo hasta en 18 a 40% de los pacientes.⁵⁸ Estos hallazgos pueden deberse a varias razones, por ejemplo: las técnicas de secuenciación del gen del NCC más empleadas solamente arrojan la secuencia de la región que comprende los exones e intrones; sin embargo, no se obtiene información sobre sitios proximales o distales en el genoma. Recientemente el grupo del Dr. Jeunemaitre utilizó técnicas de amplificación múltiple en la que demostró que algunos pacientes con mutaciones en un solo alelo en realidad poseen rearrreglos genómicos que explican la enfermedad.⁵⁸

RELACIONES ESTRUCTURA-FUNCIÓN DEL NCC EN EL SÍNDROME DE GITELMAN

Utilizando el mismo sistema de expresión en ovocitos de *Xenopus laevis* discutido previamente, varios grupos de investigadores han estudiado el efecto de diferentes mutaciones causales del síndrome de Gitelman sobre la función del cotransportador.^{10,59,60} Debido a la enorme heterogeneidad de mutaciones presentes en el cotransportador es de esperarse que existan varios mecanismos distintos que afecten la función de éste. El primer grupo en estudiar las consecuencias funcionales de las mutaciones causantes del síndrome de Gitelman en el NCC fue el grupo de Ellison,¹⁰ quien reportó que en ocho mutaciones estudiadas existía un defecto en el procesamiento de la proteína con ausencia de glicosilación, lo que genera que la proteína se retenga en el citoplasma y no exista expresión en la superficie celular. Esto concuerda con los experimentos discutidos previamente sobre la importancia de la glicosilación en la función del NCC.¹⁶ Posteriormente otros gru-

pos^{27,55,59,60} han mostrado que mutaciones en distintos sitios del NCC alteran su función por mecanismos que incluyen:

- Ausencia de síntesis de la proteína.
- Errores de procesamiento (glicosilación).
- Menor inserción del cotransportador en membrana.
- Disminución en la función con expresión normal en la membrana.

De manera importante no ha sido posible establecer una correlación entre el genotipo y el fenotipo de la enfermedad,⁶⁰ quizá por la cantidad relativamente pequeña de mutaciones de las cuales se ha estudiado su repercusión funcional y, por lo tanto, no existen suficientes datos para generar correlaciones estadísticas.

CONCLUSIONES

El estudio del NCC a partir de su clonación ha permitido tener un conocimiento claro y detallado de las propiedades funcionales y estructurales de este cotransportador. Hoy en día conocemos las regiones de la proteína que están implicadas en determinar su funcionalidad, así como los residuos de aminoácidos que están involucrados en eventos de glicosilación⁶⁰ y fosforilación,⁶¹ procesos vitales para su adecuado funcionamiento. Estos hallazgos han revolucionado el entendimiento de la enfermedad de Gitelman, teniendo repercusiones directas sobre el abordaje clínico de esta enfermedad. Además, el estudio del NCC ha establecido a esta proteína como uno de los genes más importantes que determinan la presión arterial en estados fisiológicos y patológicos.

REFERENCIAS

1. Gamba G. Molecular Physiology and Pathophysiology of the electroneutral cation-chloride cotransporters. *Physiol Rev* 2005; 85 (2):423-93.
2. James PA, Oparil S, Carter BL, Cushman WC, Dennison-Himmelfarb C, Handler J, Lackland DT, et al. Evidence-Based Guideline for the Management of High Blood Pressure in Adults Report From the Panel Members Appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA* 2014; 311(5): 507-20.
3. Novello FC, Sprague JM. Benzothiadiazine dioxides as novel diuretics. *J Am Chem Soc* 1957; 79(8): 2028-9.
4. ENSANUT. Disponible en: <http://ensanut.insp.mx/>
5. Gitelman HJ, Graham JB, Welt LG. A new familial disorder characterized by hypokalemia and hypomagnesemia. *Trans Assoc Am Physicians* 1966; 79: 221-35.
6. Simon DB, Lifton RP. The molecular basis of inherited hypokalemic alkalosis: Bartter's and Gitelman's syndromes. *Am J Physiol. (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1996; 271(5; pt.2): F961-F966.
7. Gamba G, Saltzberg SN, Lombardi M, Miyanoishita A, Lytton J, Hediger MA, Brenner BM, 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(7): 2749-53.
8. Velázquez H, Naray-Fejes-Toth A, Silva T, Andujar E, Reilly RF, Desir GV, Ellison DH. Rabbit distal convoluted tubule co-expresses NaCl cotransporter and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase II mRNA. *Kidney Int* 1998; 54(2): 464-72.
9. Gamba G, Miyanoishita 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* 1994; 269(26): 17713-22.
10. Kunchaparty S, Palcso M, Berkman J, Velázquez 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* 1999; 277 (4; pt.2): F643-F649.
11. Simon DB, Nelson-Williams C, Johnson-Bia M, Ellison D, Karet FE, Morey-Molina A, Vaara I, et al. Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Nature Genetics* 1996; 12(1): 24-30.
12. Mastroianni N, Fusco MD, Zollo M, Arrigo G, Zuffardi O. Molecular cloning, expression pattern, and chromosomal localization of the human Na-Cl thiazide-sensitive cotransporter (SLC12A3). *Genomics* 1996; 35(3): 486-93.
13. Cutler C, Cramb G. Differential expression of absorptive cation-chloride-cotransporters in the intestinal and renal tissues of the European eel (*Anguilla anguilla*). *Comparative Biochemistry and Physiology B Biochem Mol Biol* 2008; 149(1): 63-73.
14. Taniyama Y, Sato K, Sugawara A, Urano A, Ikeda Y, Kudo M, Ito S, et al. Renal tubule-specific transcription and chromosomal localization of rat thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter gene. *J Biol Chem* 2001; 276(28): 26260-8.
15. Pathak BG, Shaughnessy JD Jr., Meneton P, Greeb J, Shull GE, Jenkins NA, Copeland NG. Mouse chromosomal location of three epithelial sodium channel subunit genes and an apical sodium chloride cotransporter gene. *Genomics* 1996; 33(1): 124-7.
16. Hoover RS, Poch E, Monroy A, Vázquez N, Nishio T, Gamba G, Hebert SC. N-Glycosylation at two sites critically alters thiazide binding and activity of the rat thiazide-sensitive Na(+):Cl(-) cotransporter. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(2): 271-82.
17. Bachmann S, Velázquez H, Obermüller N, Reilly RF, Moser D, Ellison D. Expression of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter by rabbit distal convoluted tubule cells. *J Clin Invest* 1995; 96(5): 2510-14.
18. Plotkin MD, Kaplan MR, Verlander JM, Lee WS, Brown D, Poch E, Gullans SR, et al. Localization of the thiazide sensitive Na-Cl cotransporter, rTSC1, in the rat kidney. *Kidney Int* 1996; 50(1): 174-83.
19. Bazzini C, Vezzoli V, Sironi C, Dossena S, Ravasio A, Debiasi S, Garavaglia M, et al. Thiazide-sensitive NaCl cotransporter in the intestine: possible role of HCTZ in the intestinal Ca²⁺ uptake. *J Biol Chem* 2005; 280(20): 19902-10.
20. Dvorak MM, DeJoussineau C, Carter DH, Pisitkun T, Knepper MA, Gamba G, Kemp PJ, et al. Thiazide diuretics directly induce osteoblast differentiation and mineralized nodule formation by interacting with a sodium chloride co-transporter in bone. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18(9): 2509-16.
21. Deng L, Chen G. Cyclothiazide potently inhibits gamma-aminobutyric acid type A receptors in addition to enhancing glutamate responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(22): 13025-9.

22. Clader JA, Schacheter M, Sever PS. Direct vascular actions of hydrochlorothiazide and indapamide in isolated small vessels. *Eur J Pharmacol* 1992; 220(1): 19-26.
23. Bernstein PL, Zawalach W, Bartiss A, Reilly R, Palcsó M, Ellison DH. The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter is expressed in rat endocrine pancreas. *Journal Amer Soc Nephrology* 1995; 6(3): 732.
24. Abuladze N, Yanagawa N, Lee I, Jo OD, Newman D, Hwang J, Uyemura K, et al. Peripheral blood mononuclear cells express mutated NCCT mRNA in Gitelman's syndrome: evidence for abnormal thiazide-sensitive NaCl cotransport. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9(5): 819-26.
25. Cremaschi D, Porta C, Botta G, Bazzini C, Baroni MD, Garavaglia M. Apical Na(+)-Cl(-) symport in rabbit gallbladder epithelium: a thiazide-sensitive cotransporter (TSC). *J Membr Biol* 2000; 176(1): 53-65.
26. Drenowska K, Baumgarten CM. Regulation of cellular volume in rabbit ventricular myocytes: bumetanide, chlorthiazide, and ouabain. *Am J Physiol Cell Physiol* 1991; 260(1; pt.1): C122-C131.
27. De Jong JC, Willems PH, Mooren FJ, van den Heuvel LP, Knoers NV, Bindels RJ. The structural unit of the thiazide-sensitive NaCl cotransporter is a homodimer. *J Biol Chem* 2003; 278(27): 24302-7.
28. Monroy A, Plata C, Hebert SC, Gamba G. Characterization of the thiazide-sensitive Na(+)-Cl(-) cotransporter: a new model for ions and diuretics interaction. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279(1): F161-F169.
29. Vazquez N, Monroy A, Dorantes E, Muñoz-Clares RA, Gamba G. Functional differences between flounder and rat thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 282(4): F599-F607.
30. Moreno E, San Cristóbal P, Rivera M, Vazquez N, Bobadilla NA, Gamba G. Affinity defining domains in the Na-Cl cotransporter: different location for Cl- and thiazide binding. *J Biol Chem* 2006; 281(39): 17266-75.
31. Tran JM, Farrell MA, Fanestil DD. Effect of ions on binding of the thiazide-type diuretic metolazone to kidney membrane. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 1990; 258(4; pt.2): F908-F915.
32. Moreno E, Tovar-Palacio C, De Los HP, Guzmán B, Bobadilla NA, Vazquez N, Riccardi D, et al. A single nucleotide polymorphism alters the activity of the renal Na:Cl cotransporter and reveals a role for transmembrane segment 4 in chloride and thiazide affinity. *J Biol Chem* 2004; 279(16): 16553-60.
33. Vormfelde SV, Sehr D, Toliat MR, Schirmer M, Meineke I, Tzvetkov M, Nurnberg P, et al. Genetic variation in the renal sodium transporters NKCC2, NCC, and ENaC in relation to the effects of loop diuretic drugs. *Clin Pharmacol Ther* 2007; 82(3): 300-9.
34. Castañeda-Bueno M, Vázquez N, Bustos J, Hernández D, Rodríguez-Lobato E, Pacheco-Alvarez D, Cariño-Cortés R, et al. A single residue in transmembrane domain 11 defines the different affinity for thiazides between the mammalian and flounder NaCl transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 299(5): F1111-F1119.
35. Pacheco-Alvarez D, San Cristóbal P, Meade P, Moreno E, Vazquez N, Muñoz E, Díaz A, et al. The Na-Cl cotransporter is activated and phosphorylated at the amino terminal domain upon intracellular chloride depletion. *J Biol Chem* 2006; 281(39): 28755-63.
36. Garzon-Muvdi T, Pacheco-Alvarez D, Gagnon KB, Vazquez N, Ponce-Coria J, Moreno E, Delpire E, et al. WNK4 Kinase is a Negative Regulator of K+-Cl- Cotransporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292(4): F1197-F1207.
37. Plata C, Escamilla J, Carrillo E, Galindo JM, Gamba G, García MC, Sánchez JA. AKAP79 increases the functional expression of skeletal muscle Ca²⁺ channels in *Xenopus* oocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 316(1): 189-94.
38. Meade P, Hoover RS, Plata C, Vazquez N, Bobadilla NA, Gamba G, Hebert SC. cAMP-dependent activation of the renal-specific Na+-K+-2Cl- cotransporter is mediated by regulation of cotransporter trafficking. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284(6): F1145-F1154.
39. Tovar-Palacio C, Bobadilla NA, Cortes P, Plata C, De Los HP, Vazquez N, Gamba G. Ion and Diuretic Specificity of Chimeric Proteins Between Apical Na+-K+-2Cl- and Na+-Cl- Cotransporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 287(3): F570-F577.
40. Gordon RD. Syndrome of hypertension and hyperkalemia with normal glomerular filtration rate. *Hypertension* 1986; 8(2): 93-102.
41. Bartter FC, Pronove P, Gill JR, MacCardle RC. Hyperplasia of the juxtaglomerular complex with hyperaldosteronism and hypokalemic alkalosis. A new syndrome. *JASN* 1998; 9(3): 516-28.
42. Kurtz I. Molecular pathogenesis of Bartter's and Gitelman's syndromes. *Kidney Int* 1998; 54(4): 1396-410.
43. Bettinelli A, Bianchetti MG, Girardin E, Caringella A, Cecconi M, Appiani AC, et al. Use of calcium excretion values to distinguish two forms of primary renal tubular hypokalemic alkalosis: Bartter and Gitelman syndromes. *J Pediatr* 1992; 120(1): 38-43.
44. Gladziwa U, Schwarz R, Gitter AH, Bijman J, Seyberth H, Beck F, et al. Chronic hypokalaemia of adults: Gitelman's syndrome is frequent but classical Bartter's syndrome is rare. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10(9): 1607-13.
45. Ji W, Foo JN, O'Roak BJ, Zhao H, Larson MG, Simon DB, et al. Rare independent mutations in renal salt handling genes contribute to blood pressure variation. *Nat Genet* 2008; 40(5): 592-9.
46. Acuña R, Martínez-de-la-Maza L, Ponce-Coria J, Vázquez N, Ortal-Vite P, Pacheco-Álvarez D, Bobadilla NA, et al. Rare mutations in SLC12A1 and SLC12A3 protect against hypertension by reducing the activity of renal salt cotransporters. *J Hypertens* 2011; 29(3): 475-83.
47. Gamba G. Physiology and Pathophysiology of the NaCl Co-Transporters in the Kidney. In: Alpern RJ, Caplan MJ, Moe OW (eds.). *Seldin and Giebisch's The Kidney Physiology Pathophysiology*. 5th ed. USA, Academic Press, 2012; pp. 1047-80.
48. Berry MR, Robinson C, Karet Frankl FE. Unexpected clinical sequelae of Gitelman syndrome: hypertension in adulthood is common and females have higher potassium requirements. *Nephrol Dial Transplant. Oxford University* 2013; 28(6): 1533-42.
49. Ea H-K, Blanchard A, Dougados M, Roux C. Chondrocalcinosis secondary to hypomagnesemia in Gitelman's syndrome. *J Rheumatol* 2005; 32(9): 1840-2.
50. Halperin ML. *Fluid, Electrolyte and Acid-Base Physiology*. 4th ed. USA, Saunders, 616 pages. 2010.
51. Nijenhuis T, Vallon V, van der Kemp AWCM, Loffing J, Hoenderop JGJ, Bindels RJM. Enhanced passive Ca²⁺ reabsorption and reduced Mg²⁺ channel abundance explains thiazide-induced hypocalciuria and hypomagnesemia. *J Clin Invest. American Society for Clinical Investigation* 2005; 115(6): 1651-8.
52. Friedman PA. Codependence of renal calcium and sodium transport. *Annu Rev Physiol* 1998; 60(1): 179-97.
53. Dimke H, Monnens L, Hoenderop JGJ, Bindels RJM. Evaluation of Hypomagnesemia: Lessons From Disorders of Tubular Transport. *Elsevier Inc* 2013; 62(2): 377-83.
54. Demoulin N, Aydin S, Cosyns J-P, Dahan K, Cornet G, Aubergier I, et al. Gitelman syndrome and glomerular proteinuria: a

link between loss of sodium-chloride cotransporter and podocyte dysfunction. *Nephrol Dial Transplant* 2014; suppl. 4: iv117-20.

55. Takeuchi Y, Mishima E, Shima H, Akiyama Y, Suzuki C, Suzuki T, et al. Exonic Mutations in the SLC12A3 Gene Cause Exon Skipping and Premature Termination in Gitelman Syndrome. *J Am Soc Nephrol* Jul 24. Pii: 2013091013, 2014.
56. Riveira-Munoz E, Chang Q, Godefroid N, Hoenderop JG, Bindels RJ, Dahan K, et al. Transcriptional and functional analyses of SLC12A3 mutations: new clues for the pathogenesis of Gitelman syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18(4): 1271-83.
57. Coto E, Rodriguez J, Jeck N, Alvarez V, Stone R, Loris C, et al. A new mutation (intron 9 +1 G>T) in the SLC12A3 gene is linked to Gitelman syndrome in Gypsies. *Kidney Int* 2004; 65(1): 25-9.
58. Vargas-Poussou R, Dahan K, Kahila D, Venisse A, Riveira-Munoz E, Debaix H, et al. Spectrum of mutations in Gitelman syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22(4): 693-703.
59. Sabath E, Meade P, Berkman J, de Los Heros P, Moreno E, Bobadilla NA, et al. Pathophysiology of functional mutations of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter in Gitelman disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 287(2): F195-F203.
60. de Jong JC, van der Vliet WA, van den Heuvel LPWJ, Willems PHGM, Knoers NVAM, Bindels RJM. Functional Expression

of Mutations in the Human NaCl Cotransporter: Evidence for Impaired Routing Mechanisms in Gitelman's Syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(6): 1442-8.

61. Yang S-S, Fang Y-W, Tseng M-H, Chu P-Y, Yu I-S, Wu H-C, et al. Phosphorylation regulates NCC stability and transporter activity in vivo. *J Am Soc Nephrol* 2013; 24(10): 1587-97.

Reimpresos:

Dr. Eduardo Ríos Argai

Unidad de Fisiología Molecular
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México e
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición
Salvador Zubirán
Vasco de Quiroga, Núm. 15
Col. Sección XVI,
14080, México, D.F.
Correo electrónico: lalo.argaiz@gmail.com

*Recibido el 1 de Octubre de 2014.
Aceptado el 15 de Diciembre de 2014.*