

# MECANISMOS MOLECULARES DE REGULACIÓN DEL COTRANSPORTADOR NKCC2

Gustavo Ares Sarmiento<sup>1</sup>, Pablo Ortiz<sup>1</sup>, Néstor H. García<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Hypertension and vascular Research. Henry Ford Hospital, Detroit Michigan. Estados Unidos de Norteamérica. <sup>2</sup> Fundación J Robert Cade, CONICET Córdoba, Argentina.

## Introducción

En nuestro país, existe una incidencia de hipertensión mayor al 30% en personas adultas, y es mayor aún en zonas rurales. En otros países, como Estados Unidos y Canadá, uno de cada tres adultos padece hipertensión. Las causas y consecuencias patológicas de la hipertensión están asociadas a un alto consumo de sal. El riñón cumple un rol clave en la regulación de la presión arterial ya que regula la excreción de sal. La rama gruesa ascendente del asa de Henle reabsorbe aproximadamente un 30% del NaCl filtrado por el glomérulo. Defectos en la reabsorción de NaCl de este segmento del nefrón están relacionados con el desarrollo de diversas patologías. Una disminución en la reabsorción de NaCl en éste segmento del nefrón debido a una mutación en el cotransportador NKCC2 produce el síndrome de Bartter tipo 1. Este síndrome se caracteriza por alcalosis metabólica, hipokalemia, hipercalciuria, y severa pérdida de volumen acompañada de una reducción de la presión arterial. Por el contrario, un aumento en la reabsorción del NaCl en la rama gruesa ascendente del asa de Henle produce hipertensión en modelos animales sensibles a la carga de sal. El cotransportador NKCC2 reabsorbe aproximadamente el 80% del NaCl en la rama gruesa ascendente del asa de Henle. En este segmento del nefrón, hormonas como la arginina-vasopresina, norepinefrina, parathormona y glucagón estimulan la reabsorción del NaCl, mientras que hormonas como el péptido natriurético atrial o autacoides como el óxido nítrico inhiben la reabsorción del NaCl, promoviendo así la excreción de sal. En general, el mecanismo por el cual estos estímulos afectan de manera directa o indirecta la actividad del cotransportador NKCC2 pueden ser, a) por cambios en la afinidad del cotransportador NKCC2 por los iones y/o b) cambios en la cantidad del cotransportador NKCC2 en la membrana apical de la rama gruesa ascendente del asa de Henle, entre otros.

El presente artículo tiene como objetivo discutir los mecanismos moleculares hasta ahora estudiados que regulan la función del cotransportador NKCC2.

## Estructura molecular del cotransportador NKCC2

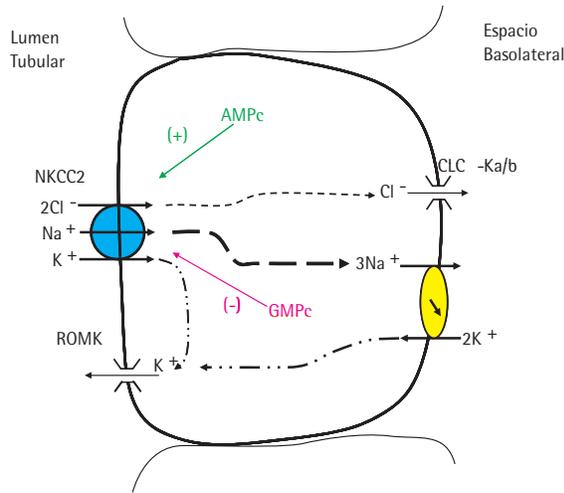
Existen dos isoformas del cotransportador Na/K/2Cl (NKCC) las cuales comparten un 60% de homología. La isoforma 1 se expresa en la membrana basolateral de células epiteliales, mientras que la isoforma 2 es expresada únicamente en la membrana apical de la rama gruesa ascendente del asa de Henle y en la mácula densa.<sup>7,9,17</sup> Debido a su diferente localización, la isoforma 1 secreta iones mientras que la isoforma 2 reabsorbe iones. El cotransportador de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> ubicado en la rama ascendente del asa de Henle ha sido clonado y llamado NKCC2 (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, cotransporter 2) o BSC-1 (*bumetanide sensitive* cotransportador 1).

NKCC2 es una proteína intrínseca de membrana que transporta Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> desde afuera hacia dentro de la célula. La energía necesaria para mediar el transporte activo secundario es provista por el gradiente químico y eléctrico generado por la bomba Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPasa ubicada en la membrana basolateral (**Figura 1**).

En ratones, la combinación de dos mecanismos independientes de *splicing*/rearreglo da lugar a seis diferentes isoformas de NKCC2.<sup>21</sup> Uno de los mecanismos de *splicing*/rearreglo da lugar a la existencia de las isoformas A, B y F.<sup>5,12</sup> La isoforma A se encuentra expresada en la porción medular y cortical, mientras que la isoforma B sólo en la porción cortical y la isoforma F sólo en la porción medular. Estas isoformas presentan distintas afinidades por los iones. El otro mecanismo de *splicing*/rearreglo da lugar a una señal de poliadenilación en la porción COOH-terminal que produce la pérdida de 327 aminoácidos y da lugar a una isoforma corta y a otra isoforma larga, transcribiendo para una proteína de 770 y el otro para una de 1.095 aminoácidos, respectivamente.<sup>21</sup> Esta isoforma corta ha sido encontrada solamente en el ratón. En la rata se ha encontrado la secuencia larga que codifica para una proteína de 1.095 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 120 kDa. La topología de NKCC2, basada en su secuencia de ADN, predice una proteína con 12 dominios de transmembrana, un fragmento NH<sub>2</sub>-terminal corto y un fragmento COOH-terminal largo, ambos citoplasmáticos. Posee sitios de glicosilación en la porción extracelular ubicada entre los dominios de transmembrana 7 y 8 en las posiciones N442 y N452, que le confieren un peso molecular aparente de ~160 kDa en corridas electroforéticas. Otros sitios de glicosilación están ubicados en los dominios de transmembrana y en la porción citoplasmática. Tanto la secuencia de conejo como de rata y ratón contienen 3 sitios consenso de fosforilación en el fragmento NH<sub>2</sub>-terminal (11). Contiene 3 serinas en la porción COOH-terminal que sirven como sitios potenciales de fosforilación para la proteína quinasa A (PKA). Posee sitios consenso para Ste20-related, *proline-alanine-rich kinase* (SPAK) y *oxidative stress response 1* (OSR1) en la porción NH<sub>2</sub>-terminal, los cuales han sido asociados con un aumento en la actividad de NKCC2, además de sitios consenso para la proteína quinasa C, tanto en la porción NH<sub>2</sub>- y COOH-terminal. Sin embargo, hasta ahora no se conocen sitios consenso para la proteína quinasa G (PKG) en NKCC2 (**Figura 2**).

## Regulación por hormonas y segundos mensajeros (AMPC y GMPc)

Varias hormonas son capaces de modificar la capacidad de reabsorción de NaCl en la rama gruesa ascendente del asa de Henle, ya sea de manera inhibitoria o estimuladora generando efectos natriuréticos o antinatriuréticos, respectivamente. En general, las hormonas afectan la reabsorción de NaCl por medio de una cascada de señalización iniciada por receptores de membrana y no por interacción directa con el cotransportador NKCC2.



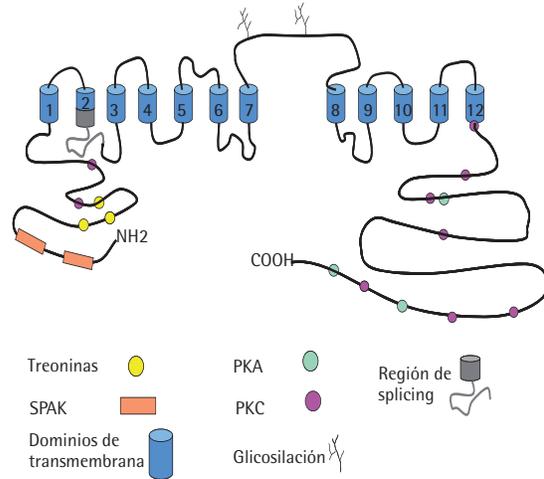
**Figura 1.** Representación esquemática del transporte de NaCl mediado por NKCC2.

**a. Efecto del AMPc sobre NKCC2 en la rama gruesa ascendente del asa de Henle.** Hormonas que estimulan el transporte de NaCl en este segmento del nefrón lo hacen por medio de un aumento de AMPc. Éste es el caso de agonistas beta adrenérgicos (norepinefrina), hormona antidiurética (ADH), hormona paratiroides, calcitonina y glucagón. Esta estimulación de la reabsorción de NaCl por medio de un aumento de AMPc es mediada por la activación de NKCC2.

La ADH es uno de los estímulos más importantes sobre la reabsorción de NaCl en la rama ascendente gruesa del asa de Henle. La ADH produce un aumento en la expresión total de NKCC2, además de un aumento en el estado de fosforilación y acumulación en la membrana plasmática. Hasta el momento, no se sabe si NKCC2 debe ser fosforilado para ser insertado en la membrana plasmática, o si, una vez insertado en la membrana, es fosforilado. Además, no está claro cuáles son las proteínas quinasas involucradas en el estímulo producido por la ADH.

**b. Efecto del GMPc sobre NKCC2 en la rama gruesa ascendente del asa de Henle.** Varias hormonas y autacoides que inhiben el transporte en este segmento lo hacen en general por medio de un aumento de los niveles de GMPc intracelular. Este es el caso del péptido natriurético atrial, endotelina y óxido nítrico, entre otros.

Un aumento en los niveles intracelulares de GMPc inhibe la reabsorción de NaCl en la rama gruesa ascendente del asa de Henle.<sup>15</sup> Varios estudios demostraron que un aumento de GMPc endógeno, producido por el péptido natriurético atrial o el óxido nítrico, o exógeno, por medio del uso de análogos permeables a la membrana plasmática como 8-Br-GMPc, disminuye la reabsorción de NaCl. El efecto producido por el péptido natriurético atrial es mediado por la estimulación de la enzima guanilato ciclasa particulada en la rama gruesa ascendente



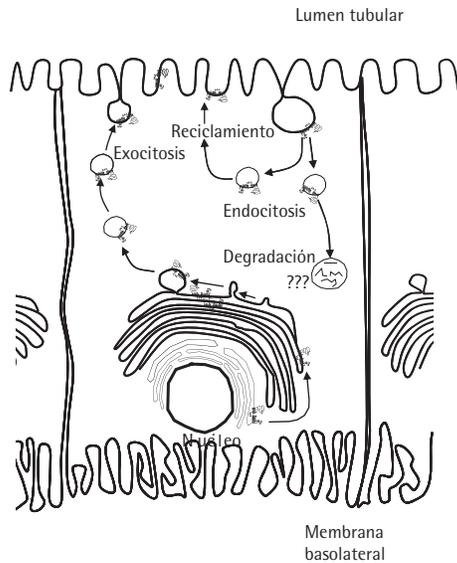
**Figura 2.** Estructura representativa del cotransportador Na/K/2Cl (NKCC2).

del asa de Henle. Recientemente, estudios realizados por Ortiz y cols.<sup>1</sup> mostraron que GMPc disminuye la cantidad de NKCC2 en la membrana plasmática apical de la THAL. Tanto los efectos de GMPc sobre el transporte de NaCl como los niveles de NKCC2 en la membrana plasmática desaparecen cuando la enzima fosfodiesterasa 2 (PDE2) es inhibida. Estos datos sugieren que un aumento intracelular de GMPc podría estar hidrolizando el AMPc por medio de la estimulación de PDE2. Esta disminución en la expresión de NKCC2 en la membrana plasmática va acompañada de inhibición en la reabsorción del NaCl. Esto podría indicar que la hidrólisis de AMPc mediada por PDE2, regula el tráfico de NKCC2 hacia la membrana apical. Sin embargo, hasta el momento el proceso por el cual GMPc inhibe la absorción de NaCl en la rama gruesa ascendente del asa de Henle no ha sido dilucidado todavía.

### Mecanismos moleculares de regulación del cotransportador NKCC2

Los mecanismos moleculares que afectan la actividad del cotransportador NKCC2 pueden ser, a) por cambios en la afinidad del cotransportador NKCC2 por los iones y/o b) cambios en la cantidad del cotransportador NKCC2 en la membrana apical de la rama gruesa ascendente del asa de Henle entre otros.

Los mecanismos estudiados hasta el momento son: tráfico de proteínas, fosforilación, glicosilación, interacción proteína-proteína, modificaciones estructurales y dimerización. Éstos no son los únicos, pero son los que han sido estudiados más ampliamente. Además, hay que tener en cuenta que durante una estimulación o inhibición del transporte de NaCl, todos estos procesos ocurren simultáneamente, y es difícil describir uno sin tener en cuenta los otros.



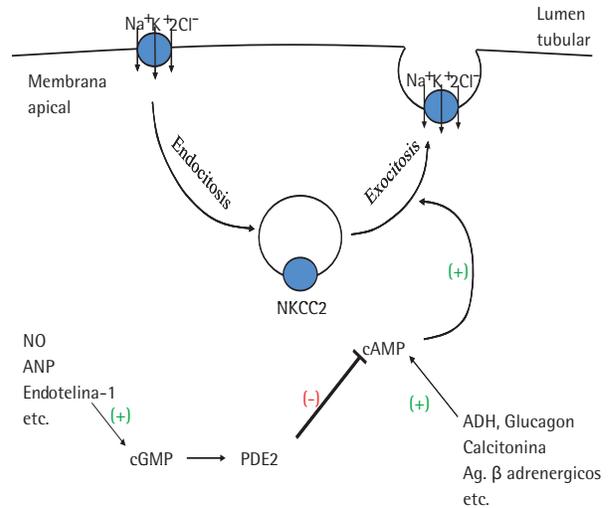
**Figura 3** Esquema de una célula epitelial mostrando la endocitosis, exocitosis, reciclamiento y degradación de proteínas.

## Regulación por tráfico de proteínas

En general, la cantidad de una proteína en la membrana plasmática es el resultado del balance entre la endocitosis, la exocitosis y el movimiento intracelular de dicha proteína desde un compartimento a otro. Este proceso es conocido como tráfico de proteínas (**Figura 3**). Mediante estudios de inmunolocalización utilizando microscopía electrónica, Knepper y cols. mostraron que, en la rama gruesa ascendente del asa de Henle, el NKCC2 se localiza en la membrana apical y el espacio citoplasmático (vesículas intracelulares, el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático).<sup>16</sup> Previamente, estudios realizados por Ortiz y cols.<sup>1,3,18</sup> mostraron que en la rama gruesa ascendente del asa de Henle, aproximadamente un 3-5% del cotransportador NKCC2 se encuentra localizado en la membrana plasmática apical, mientras que el resto se encuentra en el espacio intracelular.

Estos datos sugieren que el tráfico intracelular de NKCC2 regula los niveles de expresión en la membrana así como también la reabsorción del NaCl en la rama gruesa ascendente del asa de Henle.

Estudios previos han mostrado que la estimulación en la reabsorción de NaCl mediada por AMPc se debe a un incremento en la cantidad de NKCC2 ubicado en la membrana plasmática apical. Además, la estimulación de receptores de ADH (V2) utilizando un análogo de ADH (ddAVP) aumenta la expresión apical de NKCC2 *in vivo* en ratones. Estudios realizados por Ortiz mostraron que este incremento de NKCC2 en la membrana plasmática pudo ser bloqueado por medio del clivaje de proteínas vesiculares que median la exocitosis (VAMPs) así como también el aumento en la reabsorción de NaCl mediado por NKCC2. Estos estudios sugieren que la estimulación de la reabsorción del NaCl por AMPc podría deberse a un aumento en la tasa de exocitosis de NKCC2. Hasta el momento, estos datos ponen en evidencia que hay una correlación directa entre la cantidad de NKCC2 en la membrana plasmática apical y la reabsorción de NaCl. Aunque en estos estudios sólo se midieron los cambios en



**Figura 4** Esquema representativo de la relación existente entre la cascada de señalización y el tráfico de NKCC2.

la cantidad de NKCC2 en la membrana plasmática, sin evaluar cuál es el proceso de tráfico afectado por AMPc. Recientes estudios corroboran que el aumento en la cantidad de NKCC2 en la membrana plasmática apical mediado por AMPc se debe a un estímulo en la tasa de exocitosis de NKCC2. Sin embargo, en estos estudios no se ha podido discriminar si la estimulación de los niveles de expresión de NKCC2 en la membrana plasmática se debe a un estímulo de inserción de vesículas provenientes del aparato de Golgi o de vesículas de reciclamiento. Además, queda por estudiar si el incremento de NKCC2 en la membrana plasmática causado por AMPc también puede deberse a una inhibición del proceso de endocitosis que ocurre simultáneamente con el estímulo de la exocitosis (**Figura 4**). Opuesto a los efectos del AMPc, un aumento de los niveles intracelulares del segundo mensajero guanosina monofosfato cíclico (GMPc) inhibe la reabsorción de NaCl en la rama gruesa ascendente del asa de Henle. Estudios realizados por Ortiz y cols. muestran que la inhibición en la reabsorción de NaCl mediada por GMPc se debe a una disminución en la cantidad de NKCC2 en la membrana plasmática apical. Sin embargo, el proceso (exocitosis, endocitosis o reciclamiento) por el cual GMPc disminuye la cantidad de NKCC2 en la membrana plasmática no se ha estudiado todavía. Estos datos indican que tanto un aumento como así también una disminución de la cantidad de NKCC2 en la membrana plasmática apical tienen una relación directa con la reabsorción de NaCl en la rama gruesa del asa de Henle. De esta manera la regulación del tráfico de NKCC2 cumple un rol importante en la reabsorción de NaCl en la rama gruesa ascendente del asa de Henle.

## Regulación por fosforilación

La localización de los sitios de fosforilación en NKCC2 está bastante conservada en rata, ratón, conejo y humanos, lo cual varía en unos pocos aminoácidos entre estas especies, permitien-

do así la correlación de datos entre especies. Estudios realizados por Dimke y cols.<sup>6</sup> han mostrado que el nivel de fosforilación en la porción NH-terminal del cotransportador NKCC2 en condiciones basales es bajo o nulo. Luego de la administración de la hormona del crecimiento, se observa un aumento en la fosforilación solamente de NKCC2 (secuencia de rata, posiciones Thr<sup>96</sup> y Thr<sup>101</sup>) pero no de otras proteínas como aquosporina-2. Estos estudios indican que la señalización producida por la hormona del crecimiento produce un estímulo específico en NKCC2 y no en otras proteínas involucradas en el mantenimiento de la presión arterial. Sin embargo, la proteína efectora de la fosforilación de NKCC2 o sus mediadores permanecen aún desconocidos. Otros estudios realizados por Forbush y cols.<sup>10</sup> mostraron que la administración aguda de ADH en ratones, produce un aumento en la fosforilación de NKCC2 en el fragmento amino-terminal (secuencia de ratón, Thr<sup>99</sup>, Thr<sup>104</sup>, Thr<sup>111</sup>) y un aumento en la cantidad de NKCC2 en la membrana apical. Sin embargo, la expresión total de NKCC2 no se vio afectada por el tratamiento. Esto indica que el efecto agudo de la ADH produce la fosforilación del cotransportador NKCC2 sin aumentar la expresión total de la proteína.<sup>10</sup> Sin embargo, la proteína quinasa involucrada en la fosforilación de NKCC2 por la ADH no fue comunicada en este estudio. Además, estos estudios no indican cuál es el proceso involucrado por el que se produce un aumento en la cantidad de NKCC2 en la membrana plasmática. En resumen, está claro que estos estímulos hormonales aumentan la actividad como también la fosforilación de NKCC2, así como también la cantidad de NKCC2 en la membrana, pero no se sabe cuáles son las proteínas involucradas ni el proceso afectado por estas hormonas.

Otros estudios muestran que *With No lysine (K) Kinase* (WNK) emergen como importantes reguladoras de la reabsorción del NaCl, el volumen extracelular y la presión sanguínea.<sup>22,23</sup>

Estudios realizados por Gamba y cols.<sup>22</sup> muestran que la disminución del Cl<sup>-</sup> intracelular *in vitro* en oocitos de rana produce un aumento de la actividad del cotransportador NKCC2. Básicamente, en condiciones en la cual se produce una disminución del Cl<sup>-</sup> intracelular dado por estrés hipotónico se estimula la fosforilación de NKCC2 llevando a un posterior aumento de su actividad. En dicho proceso los autores muestran que la proteína involucrada es *With No lysine (K) Kinase-3* (WNK3). Esta quinasa fosforila NKCC2 en la porción NH<sub>2</sub>-terminal (secuencia de rata, Thr<sup>96</sup> y Thr<sup>101</sup>) produciendo un aumento de su actividad. Este estudio sugiere que WNK3 censa cambios en la concentración del Cl<sup>-</sup> intracelular, el cual produce la interacción con SPAK promoviendo la fosforilación de NKCC2 en la porción NH<sub>2</sub>-terminal (Thr<sup>96</sup>, Thr<sup>101</sup>). Debido a que SPAK no co-inmunoprecipita con WNK3 en oocitos de rana, esto indica que SPAK interactúa con WNK3 formando un complejo. SPAK entonces sería necesaria para que WNK3 pueda interactuar con NKCC2, sin embargo, SPAK no interactúa directamente con NKCC2. Esto sugiere que SPAK tiene un efecto indirecto positivo sobre la regulación de NKCC2 en oocitos de rana.

Estudios realizados por Power y cols.<sup>8</sup> identificaron un sitio de activación en la porción NH<sub>2</sub>-terminal de NKCC2, más precisamente en la Ser<sup>126</sup>. Este sitio fue fosforilado por la enzima AMPK (*AMP-activated protein kinase*) en condiciones basales (sin estímulo). La enzima AMPK es una serina/treonina quinasa involucrada en la regu-

lación de la actividad metabólica celular. Esta enzima es estimulada por un aumento del AMP intracelular que proviene de la degradación del ATP o del AMPc.

## Regulación por interacción proteína-proteína

Las interacciones proteína-proteína tienen gran importancia en prácticamente todos los procesos que ocurren en una célula. La interacción proteína-proteína podría considerarse heterogénea (cuando NKCC2 interactúa con diversas proteínas), como también homogénea (NKCC2 interactúa con NKCC2), proceso conocido como dimerización. Varias proteínas están involucradas en la reabsorción de NaCl en la rama gruesa del asa de Henle por medio de la interacción con el cotransportador NKCC2. Sin embargo, pocos estudios se han enfocado en dilucidar cuáles son aquellas proteínas que tienen una interacción directa con NKCC2. Entre las proteínas que podemos mencionar están: AMPK (*AMP-activated protein kinase*), SPAK (*Ste20-related, proline-alanine-rich kinase*), OSR1 (*oxidative stress response 1*), WNK (*with no lysine (K) kinase*) y aldolasa B. Como prerrequisito, para establecer una interacción física entre dos proteínas, ambas deben ser expresadas en la misma célula, además de ubicarse en un mismo compartimento celular. En general, los métodos que establecerían una interacción proteína-proteína serían *yeast two-hybrid screening*, *GST pull-down* y coimmunoprecipitación.

Estudios realizados por Power y cols.<sup>8</sup> mostraron que la enzima AMPK interactúa directamente con la porción NH<sub>2</sub>-terminal de NKCC2. Esta interacción produce la fosforilación de NKCC2 en la Ser<sup>126</sup> (la cual se discutió anteriormente). En este estudio, los autores utilizan células de mácula densa de ratón (MMDD1) para realizar los estudios de inmunoprecipitación. Luego los autores usaron células embrionarias humanas de riñón HEK 293 para estudios de transfección de la porción NH<sub>2</sub>- o COOH-terminal. Para finalizar, los estudios de actividad de NKCC2 (en presencia y ausencia de AMPK) fueron realizados en oocitos de rana. Dada la amplia variabilidad que puede haber al cambiar los sistemas de estudios, estos datos deben ser tomados con precaución. Además, esta interacción entre NKCC2 y AMPK debería ser corroborada en donde las proteínas se expresen endógenamente como en la rama gruesa ascendente del asa de Henle.

Mediante el uso de *yeast two hybrid screening*, Delpire y cols.<sup>20</sup> han identificado que *Ste20-related, proline-alanine-rich kinase* (SPAK) y *oxidative stress response 1* (OSR1) interactúan directamente con la porción NH<sub>2</sub>-terminal de NKCC2 (más precisamente, el sitio de interacción consta de 9 aminoácidos). Estas dos serinas/treoninas poseen una homología estructural del 67% entre ellas. Estos estudios son bastante convincentes con respecto a la interacción con NKCC2, sin embargo, se necesitan estudios donde se evalúe la actividad de NKCC2 para entender cuál es la función de estas proteínas. En estos estudios, los autores realizan la técnica de *yeast two hybrid* y ven una interacción positiva entre NKCC2 y SPAK. Sin embargo, los autores no mencionan la procedencia de la secuencia de NKCC2 utilizada ni tampoco la secuencia insertada en levaduras (conocido como *bait*) la cual evaluarían mediante *yeast two hybrid screening* permitiéndoles concluir acerca de la interacción positiva entre NKCC2, SPAK y OSR1.

Estudios realizados por Laghmani y cols.<sup>2</sup> muestran que la aldolasa B (una enzima glicolítica involucrada en el metabolismo de la fructosa y la gluconeogénesis) interactúa directamente con NKCC2 en la porción COOH-terminal. Los autores muestran que el aumento de expresión de la aldolasa B produce una disminución de la cantidad de NKCC2 en la membrana plasmática sin afectar el pool total. Como es de esperarse, esta disminución en la membrana plasmática se acompaña de una reducción de la actividad. Sin embargo, dado que estos estudios fueron realizados en cultivo celular, y que la expresión de NKCC2 no es endógena, queda por demostrar esta interacción en un sistema más integrado/fisiológico.

Otros mecanismos de regulación molecular (como dimerización, ubiquitinación, degradación, palmitilación, entre otros), necesitan mayor investigación.

### Glicosilación/maduración

La glicosilación es un proceso bioquímico en el que se adiciona un hidrato de carbono a otra molécula. Cuando esta molécula es una proteína, el proceso se llama *glicosilación proteica*. Ésta es una de las modificaciones en la síntesis de proteínas en una célula. Esta modificación ocurre tanto en la etapa cotraslacional como postraslación. La mayoría de las proteínas almacenadas en el retículo endoplasmático rugoso experimentan glicosilación.

El peso molecular deducido de la secuencia de aminoácidos de NKCC2 sugiere una proteína de aproximadamente 120 kDa. Sin embargo, mediante el uso de la técnica de Western blot, NKCC2 presenta un peso molecular de 160 kDa. Estudios realizados por Hebert y cols.<sup>19</sup> mostraron que NKCC2 luego de ser incubado con la enzima oligosacáril transferasa (enzima que participa en la glicosilación proteica) se produce un aumento en el peso molecular indicando que el cotransportador NKCC2 es glicosilado. NKCC2 posee dos sitios de *N*-glicosilación ubicados entre el segmento de transmembrana 7 y 8, los cuales están expuestos al lado extracelular.

Estudios realizados por Gamba y cols.<sup>19</sup> mostraron que NKCC2 se encuentra glicosilado en la membrana plasmática de oocitos de rana y que impidiendo la glicosilación de NKCC2 se produce una disminución en la cantidad del cotransportador en la membrana plasmática y en la actividad. Estos datos indican que la glicosilación es necesaria para la maduración correcta del NKCC2 así como también para su posterior expresión en la membrana plasmática.

Sin embargo, con los estudios/protocolos realizados no se puede afirmar que la pérdida de la glicosilación no afecta el proceso de transcripción de NKCC2, y tampoco se puede asegurar que se produce una acumulación en el retículo endoplasmático debido a una maduración defectuosa con una consecuente degradación de NKCC2. Todas estas incógnitas necesitan ser estudiadas.

### Modificaciones estructurales

Estudios realizados por Forbush y cols.<sup>4</sup> muestran que una región del cotransportador NKCC2 en la porción carboxi-terminal (aminoácidos 807-884) posee información para dirigir la proteína y expresarla en la membrana apical. En este estudio, los autores logran producir quimeras entre NKCC1 y NKCC2. Dado que las dos isoformas del cotransportador (NKCC1 y NKCC2) comparten un 60% de homología,

por medio del reemplazo de la porción COOH-terminal entre NKCC1 y NKCC2 los autores demuestran que esta porción es la que posee información para producir el tráfico de la proteína a la membrana (ya sea basolateral o apical). Esta secuencia carboxi-terminal presente en NKCC2 pone en evidencia su importancia para la correcta expresión en la membrana apical. Sin embargo, esta secuencia no está involucrada en la maduración, ni tampoco en la salida de NKCC2 del retículo endoplasmático. En el mismo artículo, los autores muestran que otra mutación puntual (en la posición Y998X) disminuye la cantidad de NKCC2 en la membrana plasmática debido a una maduración defectuosa, con la consecuente acumulación en el retículo endoplasmático. A pesar del gran aporte de estos estudios, los autores no hacen mención de cuál es el destino final de las quimeras.

Nuevos estudios realizados por Lagmani y cols.<sup>27</sup> muestran que NKCC2 posee un sitio conservado ubicado en la porción carboxi-terminal. Este sitio constituido por tres aminoácidos hidrofóbicos (<sup>1081</sup>LLV<sup>1083</sup>) es importante para la correcta maduración y la tasa de salida de NKCC2 del retículo endoplasmático hacia la membrana plasmática. Dado que la maduración de NKCC2 es defectuosa, éste se acumula en el retículo endoplasmático y luego es degradado por el sistema proteasomal.

En resumen, esto indica que la porción carboxi-terminal posee información que es indispensable para la maduración, correcta expresión y funcionalidad del cotransportador NKCC2 en la rama gruesa del asa de Henle.

### Relación entre el cotransportador NKCC2 y la hipertensión

La reabsorción de NaCl en este segmento es primariamente mediada por el cotransportador apical NKCC2, que permite la entrada de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> a la célula. La importancia de NKCC2 en la regulación de la presión sanguínea y el balance de NaCl ha sido evidenciada en desórdenes causados por mutaciones en el gen que lo codifica (*SLC12A1*) resultando en una disminución o ausencia de su actividad (síndrome de Bartter tipo 1).<sup>25</sup> Una mutación en el gen que codifica para NKCC2 en humanos<sup>24,25</sup> y ratones produce el síndrome de Bartter, una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por alcalosis metabólica, hipokalemia, hipercalciuria y severa pérdida de volumen acompañada de reducción de la presión arterial.<sup>26</sup> Por otro lado, en un alto porcentaje de la población (15-20%) referido como hipertensos sensibles a la carga de sal, el consumo de sal los lleva al desarrollo de hipertensión. Este porcentaje de la población presenta inhabilidad para excretar el exceso de sal consumido. En animales modelo de hipertensión sensible a la carga de sal se ha encontrado mayor absorción de NaCl en la rama gruesa ascendente del asa de Henle. Es importante destacar que esta anomalía en el cotransportador parece ser uno de los motivos de la hipertensión y otros estados edematosos en el ser humano. Drogas tales como diuréticos del asa utilizan como blanco a NKCC2.<sup>13,21</sup> En la rama gruesa ascendente del asa de Henle, tanto AMPc como también GMPc median los efectos de varias hormonas y autacoides sobre la reabsorción del NaCl. Estos estudios discutidos anteriormente evidencian la relación existente entre la cantidad de NKCC2 ubicado en la membrana plasmática y la reabsorción de NaCl. Los mecanismos que mo-

difican la reabsorción del NaCl en la rama gruesa ascendente del asa de Henle necesitan ser mejor estudiados. La comprensión de estos mecanismos de regulación del NKCC2 en la rama gruesa ascendente del asa de Henle puede conducir a nuevas estrategias para el tratamiento de hipertensión y contribuir al desarrollo de nuevos diuréticos del asa más específicos y efectivos.

## Bibliografía

- Ares GR, Caceres P, varez-Leefmans FJ and Ortiz PA. cGMP decreases surface NKCC2 levels in the thick ascending limb: role of phosphodiesterase 2 (PDE2). *Am J Physiol Renal Physiol* 295: F877-F887, 2008.
- Benziane B, Demaretz S, Defontaine N, Zaarour N, Cheval L, Bourgeois S, Klein C, Froissart M, Blanchard A, Paillard M, Gamba G, Houillier P and Laghmani K. NKCC2 surface expression in mammalian cells: down-regulation by novel interaction with aldolase B. *J Biol Chem* 282: 33817-33830, 2007.
- Caceres PS, Ares GR and Ortiz PA. cAMP Stimulates Apical Exocytosis of the Renal Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> Cotransporter NKCC2 in the Thick Ascending Limb: ROLE OF PROTEIN KINASE A. *J Biol Chem* 284: 24965-24971, 2009.
- Carmosino M, Gimenez I, Caplan M and Forbush B. Exon loss accounts for differential sorting of Na-K-Cl cotransporters in polarized epithelial cells. *Mol Biol Cell* 19: 4341-4351, 2008.
- Delpire E, Kaplan MR, Plotkin MD and Hebert SC. The Na-(K)-Cl cotransporter family in the mammalian kidney: molecular identification and function(s). *Nephrol Dial Transplant* 11: 1967-1973, 1996.
- Dimke H, Flyvbjerg A, Bourgeois S, Thomsen K, Frokiaer J, Houillier P, Nielsen S and Frische S. Acute growth hormone administration induces antidiuretic and antinatriuretic effects and increases phosphorylation of NKCC2. *Am J Physiol Renal Physiol* 292: F723-F735, 2007.
- Ecelbarger CA, Terris J, Hoyer JR, Nielsen S, Wade JB and Knepper MA. Localization and regulation of the rat renal Na(+)-K(+)-2Cl- cotransporter, BSC-1. *Am J Physiol* 271: F619-F628, 1996.
- Fraser SA, Gimenez I, Cook N, Jennings I, Katerelos M, Katsis F, Levidiotis V, Kemp BE and Power DA. Regulation of the renal-specific Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> co-transporter NKCC2 by AMP-activated protein kinase (AMPK). *Biochem J* 405: 85-93, 2007.
- Gamba G. Molecular physiology and pathophysiology of electroneutral cation-chloride cotransporters. *Physiol Rev* 85: 423-493, 2005.
- Gimenez I and Forbush B. Short-term stimulation of the renal Na-K-Cl cotransporter (NKCC2) by vasopressin involves phosphorylation and membrane translocation of the protein. *J Biol Chem* 278: 26946-26951, 2003.
- Gimenez I and Forbush B. Regulatory phosphorylation sites in the NH2 terminus of the renal Na-K-Cl cotransporter (NKCC2). *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F1341-F1345, 2005.
- Gimenez I and Forbush B. The residues determining differences in ion affinities among the alternative splice variants F, A, and B of the mammalian renal Na-K-Cl cotransporter (NKCC2). *J Biol Chem* 282: 6540-6547, 2007.
- Hannaert P, varez-Guerra M, Pirot D, Nazaret C and Garay RP. Rat NKCC2/NKCC1 cotransporter selectivity for loop diuretic drugs. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 365: 193-199, 2002.
- Neant F and Bailly C. Luminal and intracellular cGMP inhibit the mTAL reabsorptive capacity through different pathways. *Kidney Int* 44: 741-746, 1993.
- Neant F, Imbert-Teboul M and Bailly C. Cyclic guanosine monophosphate is the mediator of platelet-activating factor inhibition on transport by the mouse kidney thick ascending limb. *J Clin Invest* 94: 1156-1162, 1994.
- Nielsen S, Maunsbach AB, Ecelbarger CA and Knepper MA. Ultrastructural localization of Na-K-2Cl cotransporter in thick ascending limb and macula densa of rat kidney. *Am J Physiol* 275: F885-F893, 1998.
- Obermuller N, Kunchaparty S, Ellison DH and Bachmann S. Expression of the Na-K-2Cl cotransporter by macula densa and thick ascending limb cells of rat and rabbit nephron. *J Clin Invest* 98: 635-640, 1996.
- Ortiz PA. cAMP increases surface expression of NKCC2 in rat thick ascending limbs: role of VAMP. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F608-F616, 2006.
- Paredes A, Plata C, Rivera M, Moreno E, Vazquez N, Munoz-Clares R, Hebert SC and Gamba G. Activity of the renal Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporter is reduced by mutagenesis of N-glycosylation sites: role for protein surface charge in Cl<sup>-</sup> transport. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F1094-F1102, 2006.
- Piechotta K, Lu J and Delpire E. Cation chloride cotransporters interact with the stress-related kinases Ste20-related proline-alanine-rich kinase (SPAK) and oxidative stress response 1 (OSR1). *J Biol Chem* 277: 50812-50819, 2002.
- Plata C, Meade P, Hall A, Welch RC, Vazquez N, Hebert SC and Gamba G. Alternatively spliced isoform of apical Na(+)-K(+)-Cl(-) cotransporter gene encodes a furosemide-sensitive Na(+)-Cl(-)cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol* 280: F574-F582, 2001.
- Ponce-Coria J, San Cristobal P, Kahle KT, Vazquez N, Pacheco-Alvarez D, de Los HP, Juarez P, Munoz E, Michel G, Bobadilla NA, Gimenez I, Lifton RP, Hebert SC and Gamba G. Regulation of NKCC2 by a chloride-sensing mechanism involving the WNK3 and SPAK kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 8458-8463, 2008.
- Rinehart J, Kahle KT, de Los HP, Vazquez N, Meade P, Wilson FH, Hebert SC, Gimenez I, Gamba G and Lifton RP. WNK3 kinase is a positive regulator of NKCC2 and NCC, renal cation-Cl<sup>-</sup> cotransporters required for normal blood pressure homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 16777-16782, 2005.
- Simon DB, Karet FE, Hamdan JM, DiPietro A, Sanjad SA and Lifton RP. Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nat Genet* 13: 183-188, 1996.
- Starremans PG, Kersten FF, Knoers NV, van den Heuvel LP and Bindels RJ. Mutations in the human Na-K-2Cl cotransporter (NKCC2) identified in Bartter syndrome type I consistently result in nonfunctional transporters. *J Am Soc Nephrol* 14: 1419-1426, 2003.
- Takahashi N, Chernavsky DR, et al. Uncompensated polyuria in a mouse model of Bartter's syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:5434-5439, 2000.
- Zaarour N, Demaretz S, Defontaine N, et al. A highly conserved motif at the COOH terminus dictates endoplasmic reticulum exit and cell surface expression of NKCC2. *J Biol Chem* 284: 21752-21764, 2009.

# CURSO DE NEFROLOGÍA INTERVENCIONISTA

## Capítulo tercero.

### Ultrasonido en modo B y Doppler a color en riñón nativo

#### Parte II

Octavio J. Salgado<sup>1</sup>

1. Internista y Nefrólogo. Profesor Titular de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela. Con la colaboración de la Dra. Angela Vidal, Unidad de Ultrasonido Renal, Servicio de Nefrología, Hospital Universitario de Maracaibo, Venezuela.

Luego de haber descrito en nuestra entrega anterior las técnicas del examen ecográfico renal así como hallazgos normales y patológicos, nos ocuparemos de otras patologías que pueden observarse en la práctica ecográfica renal cotidiana en adultos. No se trata de una revisión exhaustiva pero sí proporcionamos una serie de imágenes que seguramente enriquecerán nuestro conocimiento en esta área del intervencionismo nefrológico.

#### Quistes simples

Son hallazgos frecuentes, cuya incidencia se incrementa con la edad; se estima que más del 30% de los mayores de 60 años pueden tener algún quiste renal simple<sup>1</sup> (Figura 1). La mayor parte son quistes solitarios<sup>2</sup> pero en ocasiones se observan dos o más en un mismo riñón (Figura 2) o son bilaterales. Suelen crecer a partir del parénquima y a veces exhiben un crecimiento exofítico (Figuras 3 y 4). En ocasiones, crecen también hacia el seno renal (Figura 5) y hay que distinguirlos de una pelvis renal muy dilatada, sobre todo cuando ésta es extrarrenal (Figura 6). Los quistes que ocupan el seno renal o zona central se conocen como quistes parapiélicos o parapelvicos (Figuras 7 y 8).

Los quistes simples son generalmente benignos pero, como tienden a crecer con el tiempo<sup>3</sup> pueden llegar a causar molestias cuando alcanzan gran tamaño. Su carácter benigno depende de que sean totalmente anecoicos en su interior, perfectamente re-

dondeados u ovalados, de contornos impecablemente definidos o demarcados, y de que, en su pared posterior, se observe una amplificación del sonido<sup>4</sup> (Figura 2).

Las imágenes quísticas que no cumplen con los criterios arriba descritos, es decir, aquellas que muestran contornos irregulares no bien definidos, pared posterior no bien demarcada, de contenido no totalmente anecoico y que presentan septa, calcificaciones y/o paredes engrosadas, se denominan quistes complejos (Figura 9). Éstos deben ser objeto de rigurosa investigación con otros métodos diagnósticos (TAC, RMN, etc.), y eventualmente deben ser sometidos a análisis histopatológico, para descartar malignidad.

Existen imágenes que pueden simular algunas características de un quiste simple como abscesos, hematomas, urinomas, tumores benignos y malignos, quistes hidatídicos, etc. En estos casos, la historia clínica, el examen físico, los datos de laboratorio y los métodos de diagnóstico invasivos y no invasivos incluido histología, cultivo, etc, harán posible el diagnóstico diferencial de la lesión.

Los quistes simples, aun cuando luzcan benignos, requieren un monitoreo rutinario, al menos bianual, para evaluar su crecimiento y eventual transformación en quistes complejos o neoplasia.

#### Enfermedad renal poliquística (ERP)

La ERP autosómica dominante (> 90% de casos) es una de las enfermedades hereditarias más comunes en humanos.<sup>5</sup> Se estima

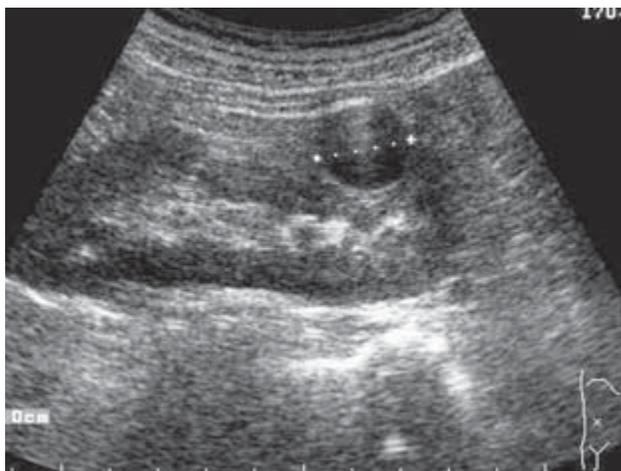


Figura 1. Pequeño quiste simple a nivel de polo inferior.



Figura 2. Riñón presentando quistes simples en ambos polos. La flecha muestra el fenómeno de amplificación o reforzamiento posterior del sonido.