

TESI DOCTORAL

ESTUDI DE TRANSPORTADORS  
DE SODI I AQUAPORINES  
RENALS EN TRASTORNS DEL  
BALANÇ HIDROSALÍ

Cristina Esteva Font  
*Juny 2008*



# ESTUDI DE TRANSPORTADORS DE SODI I AQUAPORINES RENALS EN TRASTORNS DEL BALANÇ HIDROSALÍ

Memòria presentada per  
Cristina Esteva Font  
per optar al grau de  
Doctor en Biologia



Tesi realitzada sota la direcció de la Dra. Patricia Fernández-Llama  
i la Dra. Elisabet Ars Criach i la codirecció de la Dra. Rosa Miró  
Ametller al Laboratori de Biologia Molecular de la Fundació  
Puigvert, Barcelona

Tesi adscrita al Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i  
Immunologia, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de  
Barcelona

Dra. Patricia Fernández-Llama  
*Directora de la tesi*

Dra. Elisabet Ars Criach  
*Directora de la tesi*

Dra. Rosa Miró Ametller  
*codirectora de la tesi*

Cristina Esteva Font  
*Doctoranda*  
*Barcelona, 2008*



Si véns amb mi, no demanis un camí planer,  
ni estels d'argent, ni un demà ple de promeses, sols  
un poc de sort, i que la vida ens doni un camí ben llarg.  
I així pren, així pren tot el fruit que et pugui donar  
el camí que, poc a poc, escrius per a demà,  
que demà, que demà mancarà el fruit de cada pas;  
per això, malgrat la boira, cal caminar.

(Lluís Llach)

*Als meus pares,*



## **Agraïments**

Papes, vosaltres sou els que realment mereixeríeu tot un capítol a part dins aquest apartat. Des del suport que sempre em vàreu donar perquè anés a estudiar a Barcelona fins a acompanyar-me a Århus a portar-me l'equipatge, i de passada veure si em deixàveu en bones mans. Si algú ha hagut d'aguantar-me el mal humor quan les coses no sortien com jo creia que havien de sortir aquests heu estat vosaltres. Vull agrair-vos sobretot aquests últims mesos en què he pogut escriure des de casa i m'heu facilitat al màxim el treball diari. Moltes gràcies per ser-hi sempre.

D'altra banda, em sento privilegiada d'haver pogut conèixer gent com la del Labexp (Patricia, Elisabet, Bárbara, Merche, Lourdes, Sheila, Esther, Elena, Moisès, Manel, Lidia, Deborah...). Crec que no tothom té la sort de poder anomenar amics a la gent que t'envolta mentre treballes, i és que puc dir que heu passat a formar part de la meua vida i n'estic molt orgullosa. En primer lloc vull et vull donar les gràcies a tu, Patricia, per haver-me donat l'oportunitat d'endinsar-me en aquest món. Per haver confiat en mi en tot moment i per haver compartit també molt bones estones, i sinó, només cal mirar les fotos dels congressos que hem anat. Sempre t'estaré molt agraïda per tot! Elisabet, t'haig de reconèixer que és fàcil millorar com a investigadora al teu costat. Moltíssimes gràcies pel teu suport en tot moment, per haver trobat sempre temps per ajudar-me en tot i pels teus consells, tan a nivell professional, com en viatges! Patricia, l'as de la pastisseria, sempre disposada a ajudar en tot...quin projecte s'hagués pogut acabar sense la teua perseverança a extraccions? Mer, des del moment en què vam coincidir al passadís de la Puigvert ja vaig veure que tindria una gran amiga al lab i això que encara no sabia les llargues estones de converses transcendents que ens esperaven al "cuartillo". No canviïs mai la teua indecisa manera de veure les coses! (*el suyo*). Barbaruca, aquella noia del català perfecte de Santander que no he deixat d'admirar des del primer dia que et vaig conèixer. Gràcies per haver compartit tants moments, mai oblidaré els capdes a Caldes ni l'increïble

concert d'U2. Xei, tu vas donar el toc *fashion* al lab i en un moment ja eres la XeiXu, una més amb qui he compartit estones de tot. Era Xu de xula o de xunga? Lou, gràcies per ajudar-me sempre quan eres al lab, buscant protocols de *northern* per tot arreu, preguntant-me sempre com m'anava...per cert, sempre recordaré l'entrepà que em vas pujar el meu primer dia al lab. Elena hem coincidit menys del que hauria volgut, tot i això, per mi ja ets una gran amiga. La teva arribada amb idees fresques i sempre mirant el cantó positiu de les coses m'ha ajudat moltíssim a encarar la part final d'aquesta tesis. Gràcies per haver-me ajudat tantíssim en tot sense dubtar-ho. Esther, la "recadera" de l'Autònoma" moltes gràcies per tots els favors que m'has fet...per cert, encara tens les tapes dels Danone? Moi, gràcies per tantes discussions que hem mantingut en tots els temes possibles, de vegades oblidem que al món hi passen moltes altres coses. No puc deixar de mencionar les meves amigues de Sant Pau, especialment la Cristina i la Sonia, que tantes ultres m'han aguantat!

Gràcies als amics de Caldes, de la Facu i família per haver-me ajudat a desconnectar tant amb excursions, viatges, sopars i cafès i "tocs" a l'Enre amb llargues estones xerramenta. Per acabar, no voldria oblidar-me d'en Søren, qui em va donar l'oportunitat de viure una experiència increïble i inoblidable com és la de poder treballar i viure en un petit gran país com és Dinamarca i conèixer *friends for life* com la Nastaran, Claudia, Muwan, Fabia, Canan o Aasa.

Aquest treball ha estat realitzat principalment gràcies als projectes: Fondo de Investigación Sanitaria (FIS-21547 concedit a PFL) i Fundació Marató de TV3 (N-2000-TV-0210 concedit a PFL).



<b>ABREVIATURES.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓ.....</b>	<b>3</b>
<b>ANATOMIA DEL RONYÓ.....</b>	<b>5</b>
Nefrona.....	5
Glomèrul.....	6
Túbul proximal.....	7
Nansa de Henle.....	7
Túbul distal.....	10
Túbul connector.....	11
Túbul col·lector.....	11
<b>FISIOLOGIA DEL RONYÓ.....</b>	<b>12</b>
Filtració glomerular.....	12
Funcionalisme tubular.....	13
Mecanisme de multiplicació a contracorrent.....	13
Altres funcions del ronyó.....	14
<b>TRANSPORTADORS RENALS DE SODI I AQUAPORINES.....</b>	<b>16</b>
Transportadors renals de sodi apicals.....	17
Intercanviador sodi-protons tipus 3 (NHE-3).....	17
Cotransportador sodi-fosfat tipus II (NaPiII).....	19
Cotransportador de sodi-potassi-2clors (NKCC2).....	19
Cotransportador sodi-clor (NCC).....	21
Canal epitelial de sodi (ENaC).....	22
Canals d'aigua o aquaporines renals.....	24
Aquaporina-1.....	25
Aquaporina-2.....	27
<b>EXCRECIÓ DE PROTEÏNES APICALS RENALS A L'ORINA.....</b>	<b>30</b>
<b>MALALTIES MONOGÈNIQUES O MENDELIANES QUE CAUSEN</b>	
<b>HIPERTENSIÓ O HIPOTENSIÓ PER MUTACIONS EN ELS GENS</b>	
<b>DELS TRANSPORTADORS RENALS DE SODI.....</b>	<b>35</b>
Síndrome de Bartter.....	35
Síndrome de Gitelman.....	35
Pseudohipoaldosteronisme tipus I.....	36

Síndrome de Liddle o pseudoaldosteronisme.....	36
<b>PATOLOGIES QUE S'ACOMPANYEN D'ALTERACIONS DEL</b>	
<b>BALANÇ HIDROSALÍ.....</b>	<b>37</b>
Hipertensió arterial.....	38
Hipertensió i sensibilitat a la sal.....	42
Hipertensió arterial secundària a l'acció dels anticalcineurínics.....	43
Cirrosi hepàtica.....	44
<b>OBJECTIUS.....</b>	<b>49</b>
<b>MATERIALS I MÈTODES.....</b>	<b>55</b>
<b>1. EXPERIMENTACIÓ AMB ANIMALS.....</b>	<b>57</b>
<b>2. EXTRACCIÓ DE PROTEÏNES.....</b>	<b>57</b>
<b>3. MESURA DE LA CONCENTRACIÓ DE PROTEÏNES.....</b>	<b>58</b>
<b>4. IMMUNOBLOT.....</b>	<b>59</b>
4.1. Preparació de les mostres.....	59
4.2. Electroforesi en SDS PAGE.....	60
4.3. Transferència de proteïnes.....	61
4.4. Immunodetecció.....	62
4.5. Revelat.....	63
<b>5. GENERACIÓ D'ANTICOSSOS POLICLONALS.....</b>	<b>64</b>
<b>6. PURIFICACIÓ D'ANTICOSSOS POLICLONALS PER</b>	
<b>CROMATOGRAFIA D'AFINITAT.....</b>	<b>65</b>
<b>7. PURIFICACIÓ DE L'RNA.....</b>	<b>68</b>
7.1. Homogeneïtzació del teixit.....	69
7.2. Extracció de l'RNA.....	69
7.3. Quantificació i valoració de la qualitat de l'RNA mitjançant	
l'espectrofotòmetre.....	70
<b>8. NORTHERN BLOT.....</b>	<b>71</b>
8.1. Integritat de l'RNA: electroforesi en gel d'agarosa.....	71
8.2. Selecció de sondes.....	73
8.3. Transferència.....	74
8.4. Hibridació.....	75
8.5. Detecció immunològica.....	76

<b>9. REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) I TÈCNIQUES</b>	
<b>AFINS.....</b>	<b>77</b>
9.1. Retrotranscripció: síntesi de DNAc.....	77
9.2. Marcatge de les sondes per PCR.....	78
<b>10. RECOL·LECCIÓ I PROCESSAMENT DE MOSTRES D'ORINA.....</b>	<b>80</b>
10.1. Emmagatzematge.....	80
10.2. Processament de les mostres d'orina.....	81
10.2.1. Ultrafiltració.....	81
10.2.2. Ultracentrifugació.....	81
<b>11. MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA DE TRANSMISSIÓ (MET).....</b>	<b>83</b>
11.1. Fixació.....	84
11.2. Crioprotecció.....	84
11.3. Criosubstitució.....	84
11.4. Ultramicrotomia.....	85
11.5. Immunomarcatge.....	85
11.6. Tinció.....	85
<b>RESULTATS.....</b>	<b>87</b>
<b>EXPRESSIÓ DELS TRANSPORTADORS RENALS DE SODI</b>	
<b>I AQUAPORINES EN UN MODEL EXPERIMENTAL DE RATA</b>	
<b>D'HIPERTENSIÓ ARTERIAL INDUÏDA PER CICLOSPORINA.....</b>	<b>89</b>
Efecte de la ciclosporina sobre la PA i caracterització	
del model animal.....	89
Anàlisi dels nivells d'expressió dels transportadors de sodi i	
aquaporines.....	89
Regulació transcripcional del transportador de sodi de la nansa gruixuda	
ascendent (NKCC2).....	93
<b>ESTUDI DE L'EXCRECIÓ URINÀRIA DE LES AQUAPORINES-1</b>	
<b>I -2 EN PACIENTS AMB CIRROSI HEPÀTICA.....</b>	<b>94</b>
Característiques demogràfiques i bioquímiques de la població	
estudiada.....	94
Caracterització dels anticossos anti-AQP-1 i anti-AQP-2 en mostres	
d'orina.....	94
Excreció d'aquaporina-1 i aquaporina-2 a l'orina.....	97

<b>LOCALITZACIÓ ULTRAESTRUCTURAL DELS TRANSPORTADORS DE SODI I AQUAPORINES EN RONYÓ HUMÀ I EXOSOMES URINÀRIS.....</b>	<b>102</b>
Immunolocalització dels transportadors renals i aquaporines en ronyó humà.....	102
Immunolocalització de les proteïnes renals a l'orina ultracentrifugada..	103
<b>EXCRECIÓ DELS TRANSPORTADORS RENALS DE SODI NKCC2 I NCC EN EXOSOMES URINARIS DE PACIENTS HIPERTENSOS EN RELACIÓ AMB LA INGESTA DE SAL.....</b>	<b>105</b>
Característiques demogràfiques, bioquímiques i dades de la MAPA de la població estudiada.....	105
Excreció dels transportadors renals de sodi NKCC2 i NCC en exosomes urinaris i relació amb la pressió arterial.....	108
<b>DISCUSSIÓ.....</b>	<b>111</b>
<b>EXPRESSIÓ DELS TRANSPORTADORS RENALS DE SODI I AQUAPORINES EN UN MODEL EXPERIMENTAL DE RATA D'HIPERTENSIÓ ARTERIAL (HTA) INDUÏDA PER CICLOSPORINA.....</b>	<b>113</b>
<b>ESTUDI DE L'EXCRECIÓ URINÀRIA DE LES AQUAPORINES-1 I -2 EN PACIENTS AMB CIRROSI HEPÀTICA.....</b>	<b>117</b>
<b>LOCALITZACIÓ ULTRAESTRUCTURAL DELS TRANSPORTADORS DE SODI I AQUAPORINES EN RONYÓ HUMÀ I EXOSOMES URINÀRIS.....</b>	<b>124</b>
<b>EXCRECIÓ DELS TRANSPORTADORS RENALS DE SODI NKCC2 I NCC EN EXOSOMES URINARIS DE PACIENTS HIPERTENSOS EN RELACIÓ AMB LA INGESTA DE SAL.....</b>	<b>129</b>
<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>133</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>137</b>
<b>ANNEX.....</b>	<b>149</b>
<i>Aquaporin-1 and aquaporin-2 urinary excretion in cirrhosis: relationship with ascites and hepatorenal syndrome.....</i>	<i>153</i>
<i>Cyclosporine-induced hypertension is associated with increased sodium transporter of the loop of Henle (NKCC2).....</i>	<i>163</i>

**Transportadores de sodio y aquaporinas: ¿futuros  
biomarcadores renales?.....171**

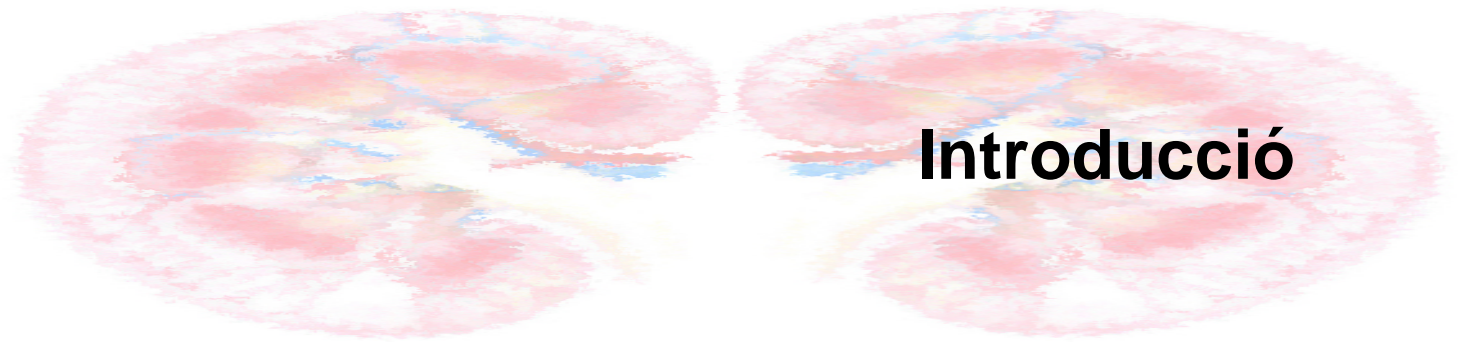


A	adenina
AINEs	antiinflamatoris no esteroïdals
AMPc	monofosfat d'adenosina cíclic
AQP	aquaporina
ARP	activitat renina plasmàtica
ATP	adenosina-tri-fosfat
AVP	vasopressina
BSA	albúmina de sèrum de vedella
BSC1	<i>bumetanide-sensitive cotransporter</i> , NKCC2
C	citosina
CRE	element de resposta al cAMP ( <i>cAMP-response element</i> )
CREB	proteïna d'unió als elements de resposta al cAMP ( <i>CRE-binding protein</i> )
CH	cirrosi hepàtica
DDAVP	1-desamina-8-D-arginina vasopressina
DIG	digoxigenina
DNA	àcid desoxiribonucleic
DNAC	DNA complementari
dNTPs	desoxinucleòtids trifosfat
D.O.	densitat òptica
DR	<i>Dahl salt-resistant rats</i>
DS	<i>Dahl salt-sensitive rats</i>
DTT	ditiotreitòl
ECL	potenciador quimioluminiscent ( <i>enhanced chemiluminescence</i> )
EDTA	àcid etilendiaminotetracètic
Eq, mEq	equivalents, mil·liequivalents
Fw	forward o directe
g	gravetat
G	guanina
h	hora
HTA	hipertensió arterial
Ig	Immunoglobulines
Kb, pb	kilobase, parell de bases
kDa	kilodàlton
kg, g, mg, µg, ng, pg	kilogram, gram, mil·ligram, microgram, nanogram, picogram
KLH	hemocianina de llepassa californiana ( <i>keyhole limpet hemocyanin</i> )
l, dl, ml, µl	litre, decilitre, mil·lilitre, microlitre
m, mm, nm	metre, mil·limetre, nanòmetre
M, mM, µM	molar, mil·limolar, micromolar
mA	mil·liamper
MAPK	proteïnes cinases activades per mitògens ( <i>mitogen-activated protein kinase</i> )
MET	microscòpia electrònica de transmissió
MHS	<i>Milan hypertensive rats</i>
Min	minut
mmHg	mil·limetre de mercuri
mmol, µmol, nmol, pmol	mil·limol, micromol, nanomol, picomol
N <sub>2</sub>	nitrogen líquid
NCC	cotransportador sodi-clor
NHE-3	intercanviador sodi protons tipus 3
NHERF	factor regulador de NHE
NKCC2	cotransportador sodi-potassi-2clors

---

Osm, mOsm	osmols, mil·liosmols
PA	pressió arterial
PAGE	electroforesi en gel de poliacrilamida
PAM	pressió arterial mitjana
PBS	fosfat salí tamponat
PGE <sub>2</sub>	prostaglandina E2
PKA	proteïna cinasa A
PKC	proteïna cinasa C
PM	pes molecular
PCR	reacció en cadena de la polimerasa
PMSF	fluorur de fenil-metil sulfonat
RNA	àcid ribonucleic
RNA <sub>m</sub>	RNA missatger
RT	transcripció reversa
Rv	revers
SDS	sodidodecil sulfat
seg	segon
SEM	error estàndar de la mitja ( <i>standard error of the mean</i> ).
SGK	serines-treonines cinases ( <i>serum/glucocorticoid regulated kinase</i> )
SHR	<i>spontaneous hypertensive rats</i>
T	timina
TAL	nansa gruixuda ascendent ( <i>thick ascending limb</i> )
TC	túbul col·lector
TP	túbul proximal
V	volt
VHC	virus de l'hepatitis C
WNK	serina-treonina (sense lisina) quinasa ( <i>with no lysine kinase</i> )





## **Introducció**



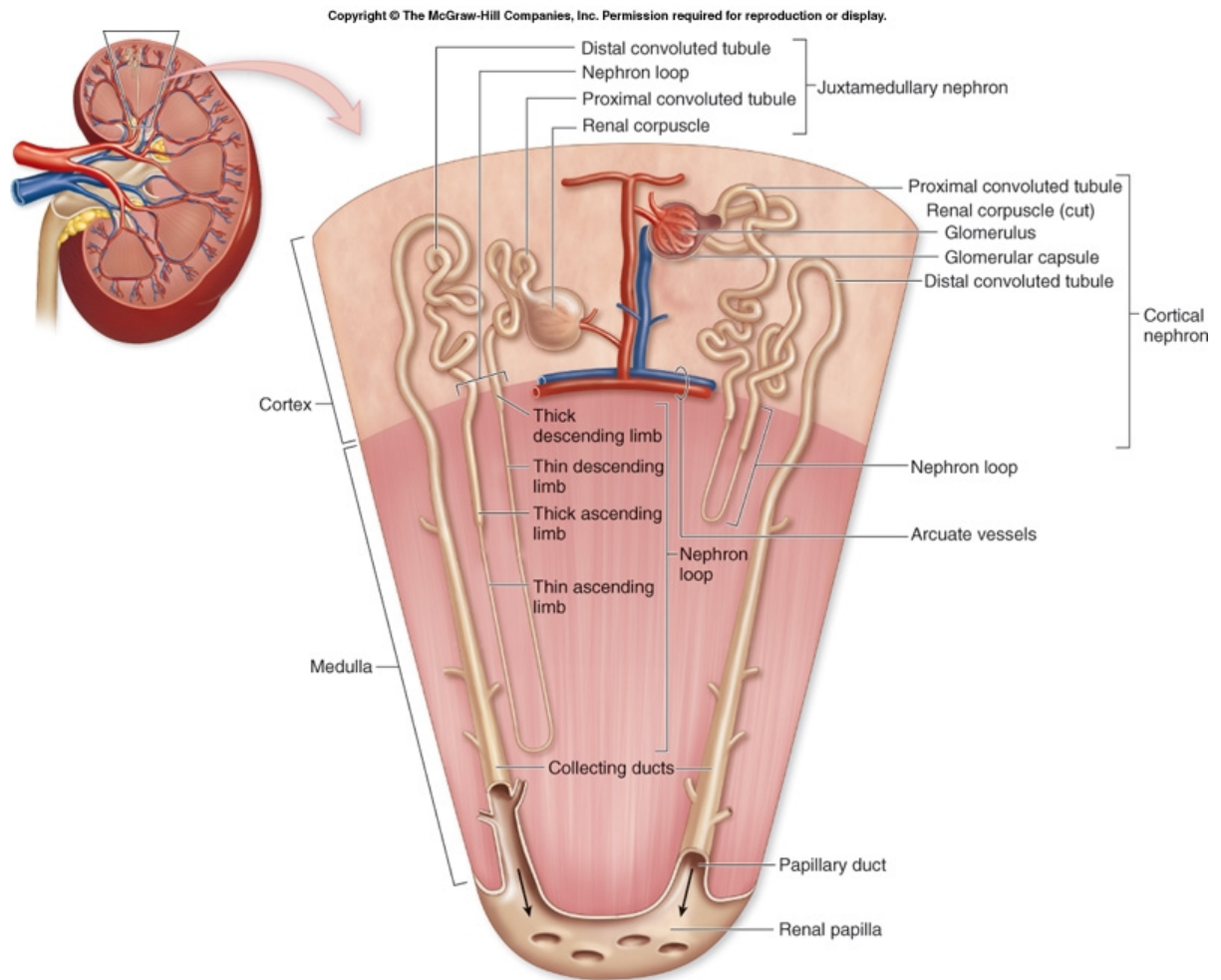
## **ANATOMIA DEL RONYÓ**

Els ronyons són òrgans aparellats retroperitoneals, és a dir, ubicats a la part posterior de l'abdomen a banda i banda de la columna vertebral. El ronyó humà adult pesa entre 115 i 170 g. Presenta una allargada d'11-12 cm, una amplada de 5-7,5 cm i uns 2,5-3 cm de gruix i estan embolcallats per una càpsula fibrosa. A la zona mitja de cada ronyó hi ha l'*hilum*, que és una fenedura a través de la qual hi passen la pelvis renal, l'artèria i vena renals, els vasos limfàtics i el plexe nerviós. Cada ronyó està irrigat per una artèria renal que s'acaba subdividint per formar les branques anterior i posterior. (Brenner, 2008). En un ronyó disseccionat s'observen dues regions diferenciades: una regió pàl·lida, que correspon al còrtex i conté bàsicament els glomèruls renals i capil·lars sanguinis, i una regió interna més fosca que correspon a la medul·la i conté unes masses còniques estriades anomenades piràmides renals. En humans trobem de 8 a 18 piràmides renals que presenten una aparença estriada per la presència dels túbuls de les nefrones ubicats de forma paral·lela, principalment túbuls col·lectors (Brenner, 2008).

### **Nefrona**

La unitat funcional del ronyó és la nefrona. Cada ronyó humà conté entre 0,6 i 1,4 milions de nefrones. La nefrona es forma per l'estreta relació anatòmica i funcional del glomèrul (un vas renal especialitzat) i el túbul. Els components essencials de la nefrona inclouen els glomèruls, la càpsula de Bowman, el túbul proximal, les branques prima i gruixuda de la nansa de Henle, el túbul distal i el túbul col·lector.

En el ronyó trobem dues poblacions diferents de nefrones: les que presenten una nansa de Henle curta i les que tenen una nansa de Henle més allargada.



**Figura 1.** Esquema de la relació dels diferents segments de la nefrona amb el ronyó (McKinley M i col. 2006).

### Glomèrul

El glomèrul o corpuscle renal està format per una xarxa de capil·lars embolcallats per una fina capa de cèl·lules endotelials, una membrana basal i finalment una capa d'unes cèl·lules epitelials especialitzades, anomenades podòcits. Les cèl·lules endotelials que recobreixen els capil·lars presenten nombrosos porus, pel que s'anomena endoteli fenestrat. Aquesta capa no es considera que formi part de la barrera de filtració, ja que permet el pas de molècules relativament grans. La membrana basal glomerular està formada per cèl·lules que presenten un superfície carregada negativament com a conseqüència de la presència de glicosaminoglicans i glicoproteïnes sintetitzades per aquestes mateixes cèl·lules, formant així, la barrera

inicial per evitar la pèrdua de components sanguinis des del lumen dels capil·lars a l'espai de Bowman. A continuació els podòcits, o cèl·lules epitelials visceral, formen una estreta xarxa mitjançant unes extensions pronunciades que presenten anomenades pedicels. Es forma unes estructures semblants a les unions adherents, els diafragmes de filtració, que juntament amb la càrrega negativa que presenten la superfície d'aquestes cèl·lules condiciona l'última barrera del procés de filtració glomerular.

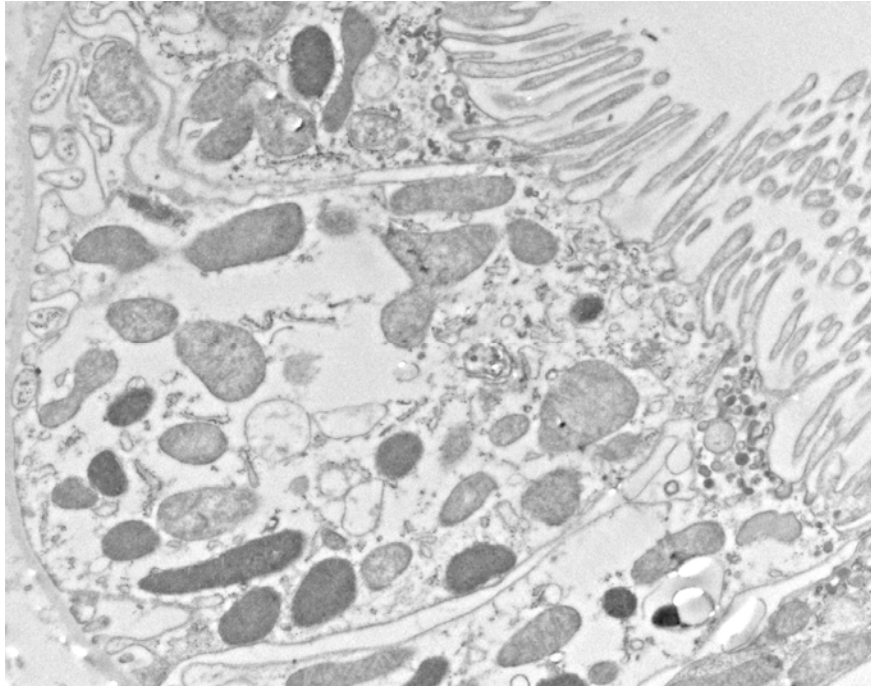
### **Túbul proximal**

La llargada del túbul proximal és d'uns 14 mm i uns 40 µm de diàmetre en els humans. Consta de 3 segments morfològicament diferents: S1, S2 i S3. L'S1 el trobem a la porció inicial del túbul just després del glomèrul i constitueix aproximadament 2/3 parts de la *pars convoluta*. Aquest segment conté una llarga vora en raspall, alhora que presenta un sistema vacuolar-lisosomal ben desenvolupat. D'altra banda la membrana basolateral mostra unes pronunciades invaginacions laterals (Figura 2). El segment S2 inclou des del tram final de la *pars convoluta* a la part inicial de la *pars recta*. Estructuralment és molt semblant al S1, tot i presentar una vora en raspall més curta i unes invaginacions basolaterals menys pronunciades. Al segment S3 no s'observen invaginacions de la membrana i els mitocondris són força petits.

### **Nansa de Henle**

#### **Branca prima descendent**

La branca prima descendent presenta una composició cel·lular bastant heterogènia. A mesura que el túbul penetra a cap a la medul·la interna l'epiteli va canviant. Les cèl·lules no presenten interdigitacions i estan unides per unions hermètiques. Contenen força quantitat de microvilli i mitocondris.



**Figura 2.** Imatge obtinguda amb microscòpia electrònica de cèl·lules epitelials del túbul proximal de ronyó humà. Destaca la presència de la vora en raspall i les grans invaginacions basolaterals (Esteva-Font).

### **Branca prima ascendent**

La branca prima ascendent només es troba a les nefrones de nansa llarga. Les unions entre cèl·lules presenten marcades interdigitacions acompanyades normalment per només una única unió hermètica llarga i superficial. Aquesta zona és molt permeable als ions.

### **Branca gruixuda ascendent**

Distingim entre la branca gruixuda ascendent medul·lar i cortical. La medul·lar presenta cèl·lules epitelials altes amb interdigitacions molt extenses tant a la membrana basal com a la lateral amb les cèl·lules veïnes. Aquesta zona es caracteritza per una reduïda permeabilitat a l'aigua afavorida per la presència d'unions hermètiques. Aquestes cèl·lules contenen força vesícules, mitocondris i prominents aparells de Golgi. La branca gruixuda ascendent cortical està

conformada per cèl·lules no tan altes com les medul·lars, però que presenten unes interdigitacions encara més pronunciades (Figura 3).

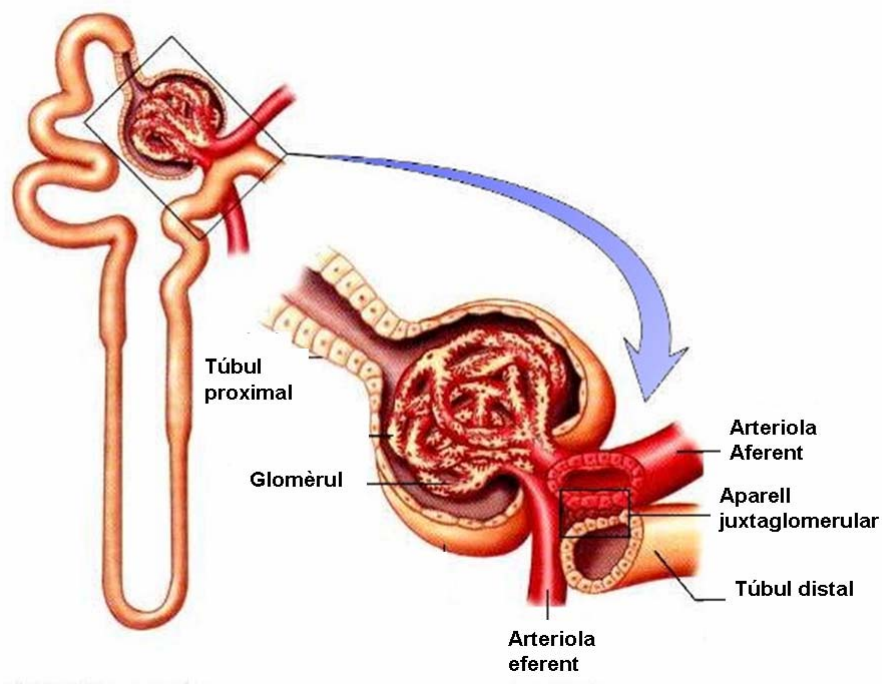


**Figura 3.** Imatge obtinguda amb microscòpia electrònica de cèl·lules epitelials de la branca gruixuda ascendent de ronyó humà. Destaca la llargada de les cèl·lules i la presència d'un gran nombre d'orgànuls (Esteva-Font).

### **Aparell juxtaglomerular**

Les cèl·lules epitelials de la branca gruixuda ascendent en un punt es troben en contacte amb les arterioles aferent i eferent del corpuscle renal, és en aquesta zona tan concreta on trobem una placa de cèl·lules de la paret de la branca gruixuda ascendent anomenades *macula densa* (Figura 4). Aquestes cèl·lules presenten unes característiques diferents a les que les envolten, com ara que són molt estretes raó per la qual els nuclis estan molt junts (Brenner, 2008). Així, juntament amb la *macula densa*, la terminació de l'arteriola aferent que entra al corpuscle renal, l'inici de l'arteriola eferent que surt del mateix corpuscle renal i la regió extraglomerular formada per cèl·lules mesangials constitueix l'anomenat aparell juxtaglomerular. Aquest aparell permet l'alliberament de determinats mediadors que regulen possibles canvis en la concentració d'ions, com el sodi o el clor, al fluid tubular en el pas per aquest punt. Així, quan en aquest punt es detecta

un augment de la perfusió de sodi, clor o potassi es modifica la taxa de filtració glomerular de forma que hi ha una vasoconstricció de l'artèria aferent. Mentre que si el que es detecta és una disminució de la concentració tubular de sodi es produeix una vasodilatació de l'artèria aferent (Vallon, 2003). Aquest mecanisme s'anomena retroalimentació tubuloglomerular. S'han realitzat alguns estudis *in vitro* que recolzen l'existència d'aquest sistema capaç de regular la taxa de filtració glomerular.



**Figura 4.** Esquema on s'observa la localització de l'aparell juxtaglomerular a la nefrona.

### Túbul distal

El túbul distal està constituït per cèl·lules bastant allargades que presenten més microvilli que les cèl·lules de la branca gruixuda ascendent, tub connector o les cèl·lules principals del túbul col·lector. Presenta el nucli desplaçat a la part apical degut a les nombroses interdigitacions laterals i grans mitocondris ubicats a la zona basolateral de la cèl·lula.

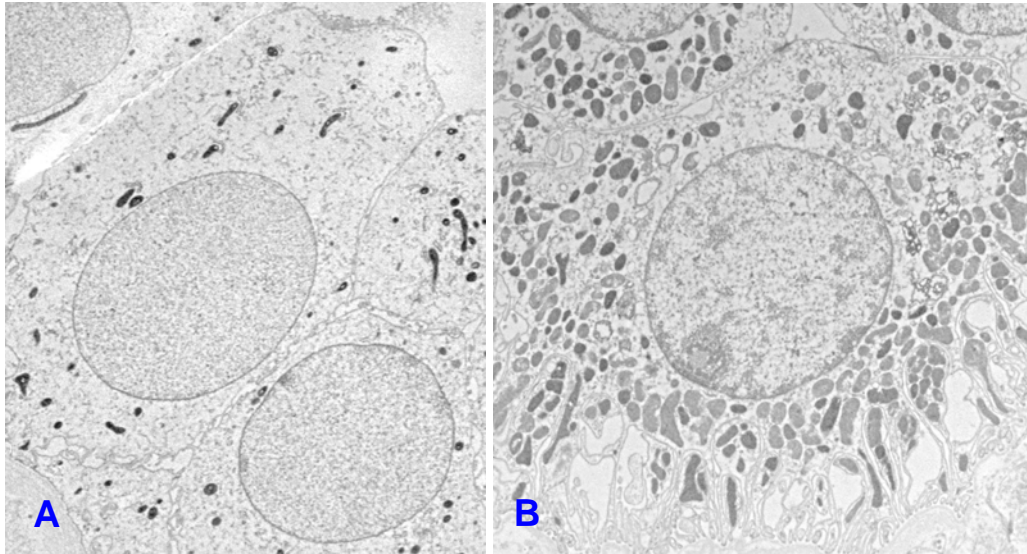


### **Túbul connector**

El túbul connector comprèn la zona de la nefrona entre el túbul distal i el túbul col·lector. És per això que presenta característiques similars a aquestes zones tubulars. Conté grans replegaments de la membrana basal que penetren profundament en el citoplasma on s'observen petits mitocondris sobre aquestes estructures. D'altra banda, no acostumen a presentar microvilli a la membrana apical.

### **Túbul col·lector**

El túbul col·lector s'estén des del túbul connector, travessant la medulla externa i interna fins a alliberar el fluid que conté a les papil·les renals. Les cèl·lules epitelials del túbul col·lector ubicades a la zona més cortical presenten una morfologia diferent a la que presenten les cèl·lules que s'endinsen a la zona medullar més interna. Aquestes últimes són més allargades, amb un major nombre d'unions hermètiques i amb una disminució en el nombre de mitocondris i dels replegaments a la zona basal en comparació a les localitzades a la zona cortical (Figura 5). En aquest tram de la nefrona hi trobem dos tipus cel·lulars: les cèl·lules principals i les cèl·lules intercalars. Les primeres mostren una forma cuboidal en els humans, pocs orgànuls i mitocondris i el nucli es localitza a la zona mitja de la cèl·lula. Presenten alhora una part basal amb importants plegaments. Aquestes són les cèl·lules que varien la seva permeabilitat ja que són sensibles a l'acció de la vasopressina. Les cèl·lules intercalars, també anomenades cèl·lules fosques, presenten una gran heterogeneïtat estructural fins i tot entre cèl·lules de la mateixa zona.



**Figura 5.** Imatge de microscòpia electrònica de cèl·lules epitelials del túbul col·lector medul·lar (A) i cortical (B) de ronyó humà. Destaca l'allargada de les cèl·lules epitelials medul·lars i la presència de grans invaginacions membrana basal en les cèl·lules epitelials corticals (Esteva-Font).

## **FISIOLOGIA DEL RONYÓ**

El ronyó intervé en nombrosos mecanismes vitals per l'organisme com la regulació de l'homeostasi dels fluids corporals, la composició d'electròlits, el balanç àcid-base o l'eliminació de productes de rebuig. Aquests processos es realitzen bàsicament a la nefrona i acaben donant lloc a la formació de l'orina.

### **Filtració glomerular**

En condicions normals el volum de fluid filtrat pels capil·lars glomerulars a la càpsula de Bowman per unitat de temps, és a dir, el filtrat glomerular, és d'uns 120 ml/min. Això representa que en un dia els ronyons poden filtrar prop de 180 l de sang per acabar produint uns 2 l d'orina. La barrera de filtració glomerular pràcticament no permet el pas de molècules majors de 70 kDa, d'aquesta forma evita la pèrdua de proteïnes a l'orina. La taxa de filtració glomerular és un paràmetre que sovint és emprat per a determinar la funció renal.

### **Funcionalisme tubular**

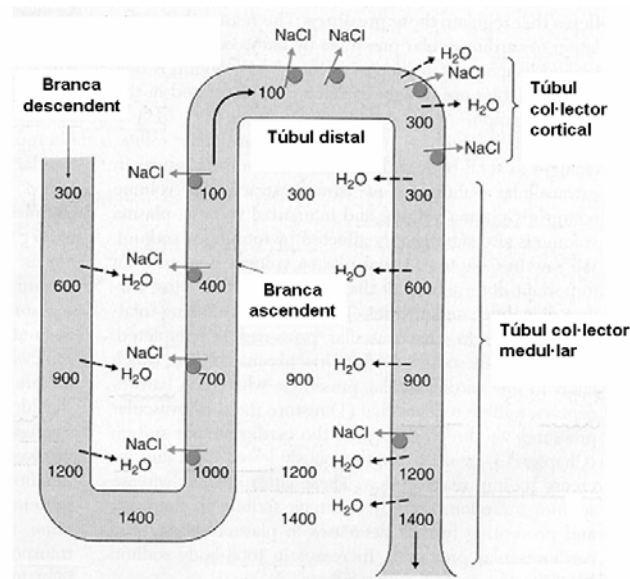
El ronyó realitza una funció important en la regulació de l'equilibri àcid-base. La reabsorció de bicarbonat en el túbul proximal n'és un factor clau. En aquest primer tram del túbul es reabsorbeix prop del 85% del bicarbonat, mentre que la resta es reabsorbeix al túbul distal.

La regulació de l'homeostasi dels fluids corporals es realitza principalment a través de l'equilibri hidrosalí, mitjançant el control de l'excreció de sodi i aigua pel ronyó. Tal i com s'ha esmentat anteriorment, el túbul renal consta de diferents trams en els que es reabsorbeix una proporció determinada de sodi i aigua procedent de l'ultrafiltrat glomerular. Així, en el túbul proximal es reabsorbeix prop del 70% del sodi i pràcticament tota la glucosa procedent del filtrat glomerular. Aquest tram és també important en la reabsorció de fosfats, aminoàcids, aigua i bicarbonat. A la branca gruixuda ascendent hi ha una reabsorció de sodi de prop del 25%, mentre que aquest tram es mostra impermeable a l'aigua, fet que afavoreix la creació d'una medul·la hipertònica o amb una osmolaritat elevada. Al túbul distal es reabsorbeix al voltant del 5% del sodi filtrat, al túbul connector un 2% i finalment en el túbul col·lector aproximadament un 1%. En aquests trams finals del túbul la reabsorció d'aigua depèn en gran part de la presència de l'hormona vasopressina (Greger 2000). En la reabsorció tubular de sodi i aigua hi estan implicats els transportadors renals de sodi i canals d'aigua o aquaporines que es localitzen a la membrana apical i basolateral de les cèl·lules epitelials al llarg dels túbuls renals.

### **Mecanisme de concentració a contracorrent**

La hipertonicitat o augment de l'osmolaritat de l'espai luminal augmenta a mesura que la nefrona penetra dins la medul·la. Així, es considera el mecanisme de multiplicació a contracorrent com el procés mitjançant el qual té lloc aquest increment de l'osmolaritat de la medul·la renal. Aquesta hipertonicitat es dona per la

disposició dels túbuls i vasos sanguinis en paral·lel i per les diferències funcionals entre les branques descendents i ascendents (Sands i col. 1990).



**Figura 6.** Sistema de multiplicació a contracorrent en el ronyó humà. La reabsorció de sodi a la branca gruixuda ascendent produeix una disminució de l'osmolaritat a la llum tubular i un augment de l'osmolaritat a l'espai intersticial, de forma que hi ha una sortida d'aigua de la branca descendent per arribar, així, a una concentració equilibrada. Al túbul col·lector es produeix una reabsorció d'aigua, per la hiperosmolaritat de la medul·la, en presència de l'hormona vasopressina. Valors expressats en mOsm/l.

La branca gruixuda ascendent té una funció essencial en aquest procés degut a la seva impermeabilitat a l'aigua i al transport de sodi, essencialment pel transportador  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ , que produeix un marcat augment de l'osmolaritat a la medul·la renal. D'aquesta forma el fluid tubular que es transporta cap al túbuls distals i col·lectors resulta hipotònic, és a dir, presenta una baixa osmolaritat (Eaton i col. 2004). Al túbul col·lector l'hormona antidiürètica o vasopressina regula la reabsorció d'aigua. En presència de vasopressina s'activa la reabsorció d'aigua i en absència disminueix, d'aquesta forma es modula la concentració final de l'orina (Figura 6).

### Altres funcions del ronyó

A part de les funcions relacionades amb la formació d'orina el ronyó té una important funció endocrina intervenint en:

- Secreció de renina: s'allibera de les cèl·lules juxtaglomerulars, que rodegen les arterioles dels glomèruls. Aquestes cèl·lules funcionen com a baroreceptors, així quan es produeix una disminució de la PA augmenten l'alliberament de renina i d'aquesta forma intervé en el manteniment de la pressió i volum sanguinis.

- Secreció d'eritropoetina: les cèl·lules peritubulars de l'escorça renal en són les principals productores. Intervé en la proliferació i maduració dels precursors dels glòbuls vermells.

- Metabolisme de la vitamina D: mitjançant un enzim activa la vitamina D afavorint l'absorció intestinal de calci.

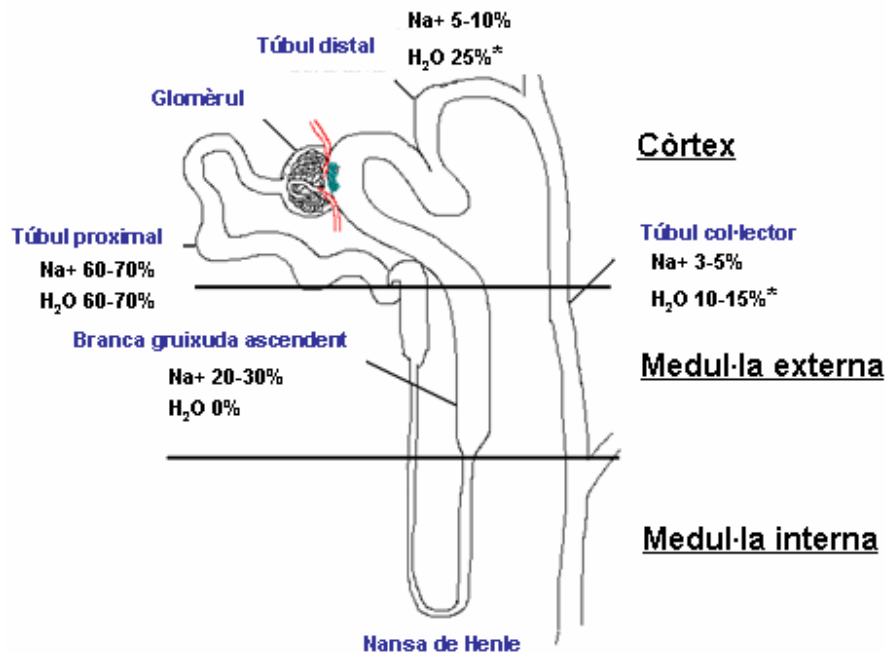
- Producció de prostaglandines: el ronyó és un òrgan important en la síntesi de prostaglandines. Aquestes intervenen en diversos processos fisiològics del ronyó com el manteniment del flux sanguini o l'excreció renal de sodi i aigua a través de la seva acció vasodilatadora o vasoconstrictora.

- Regulació del sistema calicreïna-cinina: implicat en el manteniment del flux sanguini i excreció urinària de sodi. De totes les hormones que regulen la funció renal, aquest sistema és el menys conegut.

- Catabolisme de proteïnes: contribució en el catabolisme o escissió de les cadenes polipeptídiques, de proteïnes de baix pes molecular.

## TRANSPORTADORS RENALS DE SODI I AQUAPORINES

Tal i com s'ha comentat en la secció anterior, el túbul renal consta de diferents trams en els que es reabsorbeix una proporció determinada de sodi i aigua procedent de l'ultrafiltrat glomerular (Figura 7). En la reabsorció tubular de sodi i aigua hi estan implicades unes proteïnes anomenades transportadors renals de sodi i canals d'aigua o aquaporines, que es localitzen a les membranes apicals i basolaterals de les cèl·lules epitelials al llarg dels túbuls renals. Els principals transportadors de sodi i canals d'aigua apicals de la nefrona són: l'intercanviador sodi-protons tipus 3 (NHE-3) que reabsorbeix la majoria del sodi provinent del filtrat glomerular, el cotransportador sodi-fosfat tipus II (NaPiII) i l'aquaporina-1, tots ells localitzats en el túbul proximal; el cotransportador de sodi-potassi-2 clors (NKCC2), clau en la reabsorció de sodi a la branca gruixuda ascendent de la nansa de Henle; el cotransportador sodi-clor (NCC) en el túbul distal i el canal epitelial de sodi (ENaC) i l'aquaporina-2 ubicats en el túbul col·lector.



**Figura 7.** Reabsorció de sodi i aigua als diferents segments del túbul renal.

\* La reabsorció d'aigua als túbuls distal i col·lector depèn del nivell de vasopressina.

### **Transportadors renals de sodi apicals**

Els transportadors renals de sodi reabsorbeixen gairebé el 99% del sodi filtrat. A banda dels transportadors apicals, dels que es parlarà a continuació, a les cèl·lules epitelials també s'hi ubica la bomba  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$  a la membrana basal. Aquesta realitza l'intercanvi de 3 ions de sodi per 2 de potassi amb la hidròlisi d'una molècula d'ATP (adenosina-tri-fosfat), d'aquesta forma el sodi intracel·lular reabsorbit pels transportadors apicals surt de la cèl·lula epitelial tubular cap a la sang.

#### **Intercanviador sodi-protons tipus 3 (NHE-3)**

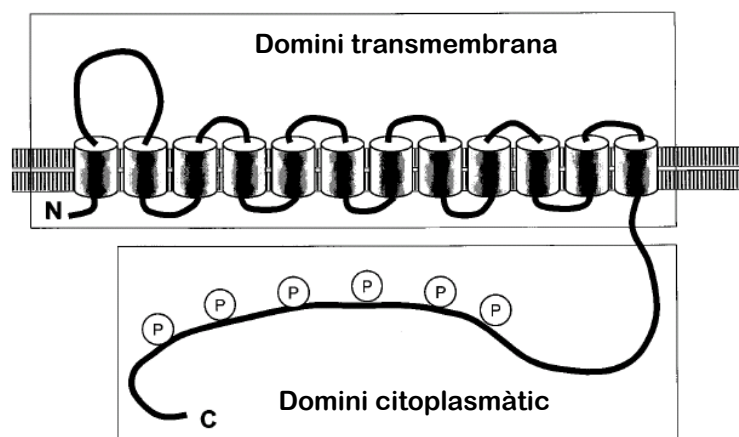
L'intercanviador NHE-3 es localitza principalment al túbul proximal. Pertany a la família de proteïnes NHE, de les quals s'han descrit fins a 6 isoformes en mamífers. Totes les isoformes de l'intercanviador NHE extreuen protons a l'exterior de la cèl·lula, mentre que incorporen ions sodi a l'interior. Consten d'un extrem amino-terminal amb 12 dominis transmembrana i d'un extrem carboxi-terminal que és el que modula l'activitat d'aquest intercanviador interactuant amb proteïnes quinases i diversos factors reguladors (Burckhardt i col. 2002) (Figura 8).

L'NHE-3 s'ubica principalment a la membrana apical de les cèl·lules epitelials del túbul proximal, a la vora en raspall present en aquestes cèl·lules, tot i que també es troba, en menor proporció, a la branca prima descendent i branca gruixuda ascendent de la nansa de Henle (Moe, 1999). S'expressa també en l'epiteli gastrointestinal i en nivells molt baixos en d'altres teixits. Aquest transportador és el principal implicat en la reabsorció de sodi a nivell del túbul proximal, alhora que juga un paper clau en la regulació de l'equilibri àcid-base a nivell renal participant principalment en la reabsorció de bicarbonat.

Regulació. Existeixen una sèrie de factors reguladors del NHE-3 (*NHE-3 regulator factors*, NHERF) necessaris per a modular l'activitat d'aquest transportador. Una de les vies de regulació de l'activitat de l'NHE-3 és la seva fosforilació, essent fosforilada per

la proteïna quinasa A (PKA) i la proteïna quinasa C (PKC). També una àmplia varietat d'hormones i paràmetres fisiològics, com el pH luminal, intervenen en l'activació i inhibició de l'activitat de l'NHE-3. Així, l'angiotensina II o l'endotelina afavoreixen un increment de l'abundància d'aquest transportador a la membrana apical de les cèl·lules epitelials tubulars, augmentant la reabsorció de sodi a nivell proximal (Kwon i col. 2003, Prabhakar, 2004). Mentre que hormones com la dopamina o la hormona paratiroidea inhibeixen l'activitat de l'NHE-3 (Wiederkehr i col. 2001, Burckhardt i col. 2002).

Els inhibidors de l'anhidrasa carbònica bloquegen l'anhidrasa carbònica de forma que de es disminueix indirectament l'activitat de l'NHE-3. A més, el polisacàrid manitol actua com un diürètic osmòtic inhibint la reabsorció de sodi i aigua al túbul proximal.



**Figura 8.** Estructura dels intercanviadors NHE (Moe, 1999).

Fisiopatologia. En humans no s'han descrit alteracions en aquest transportador. Els ratolins deficientes del gen *nhe-3* presenten una gran disminució de la reabsorció de carbonat, que porta a un augment del pH de la llum tubular, és a dir, l'alcalinització de l'espai luminal. No obstant, aquests ratolins només presenten diarrea, fet per la qual cosa es creu que la disminució de la reabsorció de sodi a nivell proximal es compensaria en altres trams del túbul (Nakamura i col. 1999). Diversos estudis han associat un increment de l'activitat d'aquest transportador amb diferents models



animals d'hipertensió espontània en rata (Sonalker i col. 2004, LaPointe i col. 2002, Aldred i col. 2000). Lapointe i col. van observar, a banda d'un augment de l'activitat de l'NHE-3, una major expressió d'aquest transportador al ronyó de les rates hipertenses a nivell post transcripcional que conduiria a un increment de la retenció renal de sodi i consegüentment a una elevació de la pressió arterial.

### **Cotransportador sodi-fosfat tipus II (NaPiII)**

El cotransportador NaPiII participa, juntament amb l'intercanviador NHE-3, en la reabsorció proximal de sodi.

Regulació. Factors com l'ingesta de fosfat a la dieta o les hormones paratiroidea i dopamina afavoreixen la degradació d'aquest cotransportador (Bacic i col. 2006).

Els diürètics proximals bloquegen de forma indirecta aquest transportador.

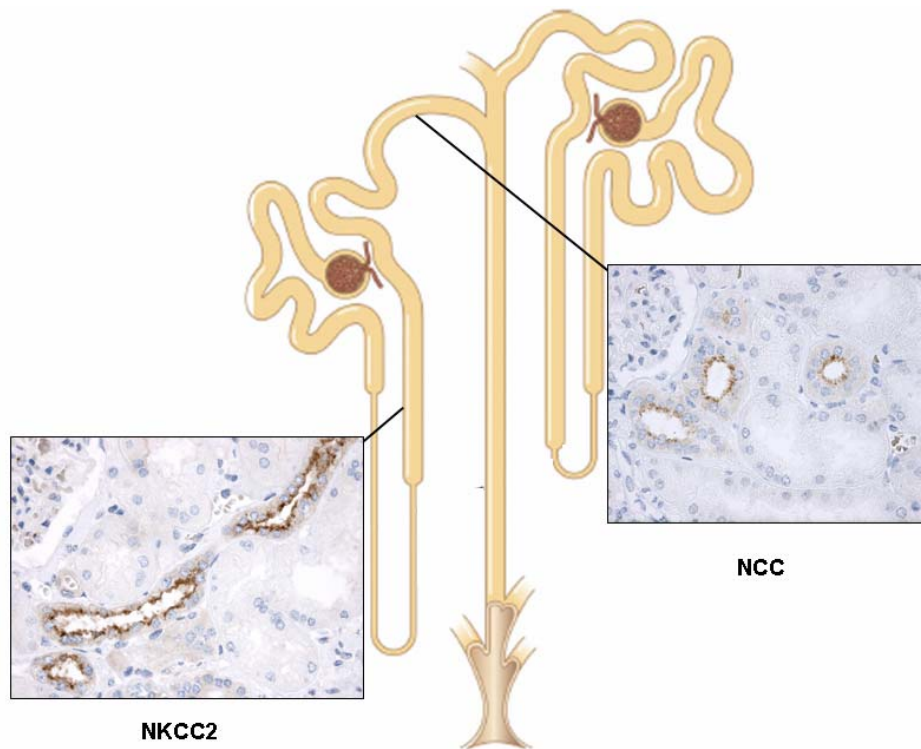
Fisiopatologia. En humans s'han descrit mutacions en el gen que codifica per aquest transportador que causen una pèrdua renal de fosfat que comporta l'aparició de hipofosfatèmia (Bergwitz i col. 2006).

### **Cotransportador de sodi-potassi-2clors (NKCC2)**

El cotransportador NKCC2\* es troba a la membrana apical de les cèl·lules epitelials de la branca gruixuda ascendent de la nansa de Henle, així com a la màcula densa (Figura 9) (Russell, 2000). La localització d'aquest transportador a l'aparell juxtaglomerular comporta que anomalies en la proteïna poden alterar el mecanisme de retroalimentació tubuloglomerular. NKCC2 realitza el cotransport de sodi, clor i potassi des del lumen fins a l'interior de la cèl·lula. Degut a la impermeabilitat a l'aigua d'aquest segment del túbul on es troba l'NKCC2, la reabsorció de sodi (20-30%) i clor per part d'aquest cotransportador contribueix a la formació d'una medul·la hipertònica, afavorint així el mecanisme de concentració a contracorrent. Aquest transportador pertany a la família de transportadors  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ , amb 12 dominis transmembrana, i

\* Anomenat també BSC1, *bumetanide-sensitive cotransporter*.

concretament aquesta isoforma tipus 2 es troba de forma específica al ronyó. A nivell ultraestructural, s'ha observat en rates que aquest transportador és molt abundant a la membrana apical de les cèl·lules de la branca gruixuda i la màcula densa, però també es troba en vesícules intracel·lulars, les quals podrien representar un reservori d'NKCC2 (Nielsen i col. 1998). Hi ha tres isoformes resultants d'*splicing*\* alternatiu anomenades F, A i B, cada una de les quals presenta una distribució determinada a la branca gruixuda i una afinitat lleugerament diferent pels tres ions que transporta. Així, la F es localitza principalment a la part interna de la medul·la externa, la A a la zona més externa i al còrtex, mentre que la B s'ubica bàsicament a la màcula densa (Giménez i col. 2007).



**Figura 9.** Immunohistoquímiques en ronyó humà en què s'observa la localització de l'NKCC2 a la membrana apical de les cèl·lules de la branca gruixuda ascendent i de l'NCC a la membrana apical de les cèl·lules del túbul distal (Esteva-Font).

Regulació. Sembla que la fosforilació d'uns residus de treonina ubicats a l'extrem amino-terminal és important per a l'activació de l'NKCC2, tot i que s'han realitzat pocs estudis fins el moment i no es coneixen massa bé els mecanismes moleculars que

intervenen en l'activació d'aquest transportador (Giménez i col. 2005). Diverses hormones regulen l'expressió i l'activitat d'aquest transportador. S'ha observat que la vasopressina incrementa el transport de sodi i clor a la branca gruixuda ascendent. Així, en rates sotmeses a un període de restricció hídrica s'ha observat un augment de la quantitat d'NKCC2 al ronyó (Ecelbarger i col. 2001), mentre que el tractament amb un antagonista del receptor de la vasopressina causa l'efecte contrari (Bertuccio i col. 2002). L'acció de l'angiotensina II augmenta l'expressió apical de l'NKCC2 produint un augment en la reabsorció de sodi a la branca ascendent de la nansa de Henle (Kwon i col. 2003). També augmenta la reabsorció de sodi quan aquest transportador incrementa la seva activitat per l'acció de l'hormona paratiroidea (Kim i col. 1999, Greger 2000). D'altra banda, es produeix una disminució de la reabsorció de sodi a aquest nivell per l'acció de la prostaglandina E2 o de l'òxid nítric, que disminueixen l'activitat d'aquest cotransportador (Greger 2000, Fernandez-Llama i col. 1999).

Els diürètics de nansa: furosemida, torasemida i bumetanida són els antagonistes més coneguts d'aquest transportador.

Fisiopatologia. S'han descrit diverses mutacions en el gen *NKCC2* que causen una pèrdua de funció del transportador, i com a conseqüència es desenvolupa la síndrome de Bartter (Starremans i col. 2003). Aquesta síndrome es caracteritza per una gran pèrdua de sal a l'orina i per hipotensió (Lang i col. 2005). Diversos estudis experimentals en animals apunten a una associació entre l'augment de l'activitat d'aquest transportador i la hipertensió (Hoagland i col. 2004, Sonalker i col. 2004).

### **Cotransportador sodi-clor (NCC)**

El cotransportador NCC\* es localitza a la membrana apical de les cèl·lules del túbul distal del ronyó, on es produeix una reabsorció del 5 al 10% del sodi que prové del filtrat glomerular, contribuint d'aquesta forma en el manteniment de l'homeostasi hidrosalina (Figura 9).

\* Anomenat també cotransportador sodi-clor sensible a les tiacides.

Regulació. En la seva regulació hi intervé una cascada de proteïnes de la família de les serina-treonina (sense lisina) quinases (*with no lysine* [K]: WNK). Les hormones aldosterona, estradiol i vasopressina augmenten la quantitat d'NCC a la membrana apical de les cèl·lules del túbul distal afavorint així un increment en la reabsorció de sodi en aquest nivell (Kim i col. 1998, Verlander i col. 1998, Ecelbarger i col. 2001). La regulació mitjançant l'hormona aldosterona està àmpliament estudiada. Així, s'ha observat en rates que quan hi ha una restricció de sal a la dieta augmenten els nivells d'aldosterona en sèrum i incrementa alhora l'expressió d'aquest transportador. A més, infusions d'aldosterona durant uns dies en rates causen el mateix efecte en l'expressió de l'NCC (Abdallah i col. 2001). També s'ha observat un augment en l'expressió d'aquest transportador quan s'administren altres hormones mineralocorticoides sintètiques (Kim i col. 1998). L'angiotensina II afavoreix el transport de proteïna NCC a la membrana apical, i per tant, n'augmenta també la seva expressió (Sandberg i col. 2007).

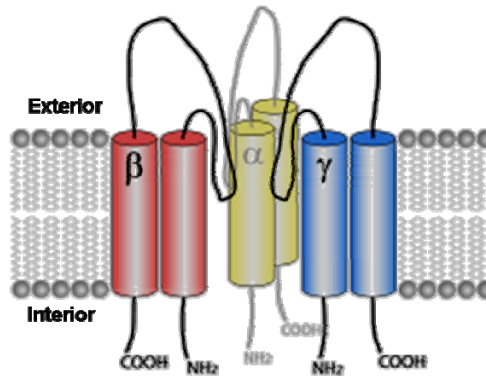
Les tiacides són els antagonistes per excel·lència d'aquest transportador.

Fisiopatologia. A la síndrome de Gitelman s'han descrit diverses mutacions en els gens que codifiquen per l'NCC i les WNK quinases que causen la inactivació d'aquest cotransportador (Reissinger i col. 2003). Hipotensió, hipocalèmia i alcalosi metabòlica són alguns dels símptomes clínics que caracteritzen aquesta síndrome. D'altra banda, s'han descrit mutacions en els gens de les WNK quinases que alteren l'activitat de les corresponents proteïnes, fet que dona lloc a una hiperactivitat de l'NCC (síndrome de Gordon o pseudohipoaldosteronisme de tipus II) (Gamba, 2005). En aquest cas es manifesta hipertensió, hipercalèmia i acidosi metabòlica.

### **Canal epitelial de sodi (ENaC)**

El canal epitelial de sodi està format per tres subunitats: alfa, beta i gamma. Cada subunitat consta de dos segments transmembrana, un llarg domini extracel·lular i

els dos extrems carboxil i amino terminals citoplasmàtics (Figura 10). S'ubica a la membrana apical de les cèl·lules epitelials del túbul col·lector, on es reabsorbeix entre un 3 i un 5% del sodi que prové del filtrat glomerular. Es localitza també en el pulmó i al colon distal.



**Figura 10.** Esquema dels dominis de les subunitats del ENaC.

Regulació. L'aldosterona sembla incrementar els nivells d'unes proteïnes anomenades serines-treonines quinases (SGK)\*, les quals no actuen directament sobre ENaC sinó que fosforilen una sèrie de proteïnes que estan implicades en la internalització i degradació d'aquest canal. Així, les lligases anomenades Nedd que reconeixen un domini de la part carboxi-terminal de les tres subunitats de l'ENaC i afavoreixen la internalització i posterior degradació de la proteïna. Per tant, l'acció de les SGK fosforilant aquestes proteïnes estaria impedit la degradació de l'ENaC (Schafer, 2002). La insulina i la vasopressina afavoreixen la reabsorció de sodi a través del canal epitelial de sodi en el túbul col·lector (Ecelbarger i col. 2001, Masilamani i col. 1999).

L'amilorida o el triamterè poden inhibir de forma directa aquest transportador. Els antialdosterònics (espironolactona i eplerenona) inhibeixen indirectament l'activitat d'aquest transportador.

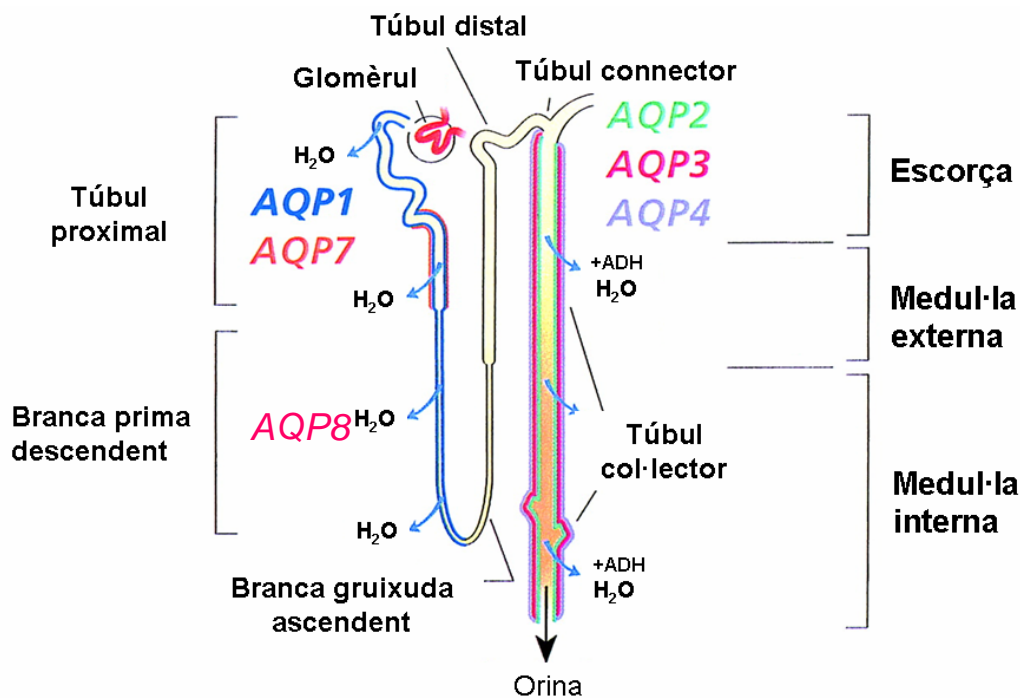
Fisiopatologia. S'han descrit mutacions a les subunitats beta i gamma del canal epitelial de sodi que produeixen un augment de l'activitat de l'ENaC i causen la

\* Caracteritzada inicialment com a quinasa induïble pel sèrum i els glucocorticoides, essent el seu acrònim SGK (serum/glucocorticoid regulated kinase).

síndrome de Liddle, que és una malaltia autosòmica dominant caracteritzada per la presència d'hipertensió i alcalosi metabòlica (Snyder i col. 1995). S'han descrit mutacions en totes les subunitats de l'ENaC que causen el pseudohipoaldosteronisme tipus I (PHA-I) (Arai i col. 1999). Aquesta malaltia es caracteritza per hipotensió secundària a una disminució en la reabsorció de sodi en el túbul col·lector per la disminució de l'activitat del transportador (Chang i col. 1996).

### Canals d'aigua o aquaporines renals

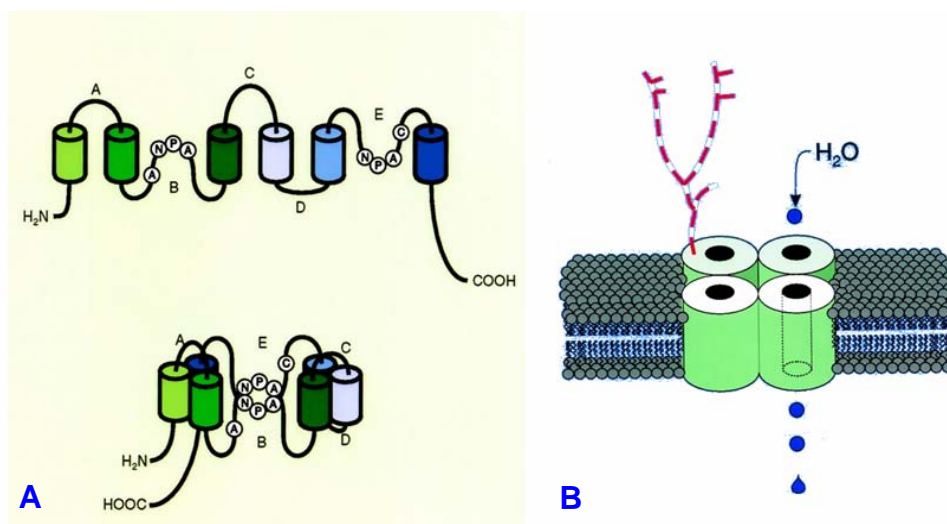
Les aquaporines són unes proteïnes que poden transportar grans quantitats d'aigua, participant d'aquesta forma en la regulació de l'homeostasi hídrica. Existeixen almenys 7 aquaporines al ronyó (Figura 11). Les aquaporines-1, -2, -3 i -4 són les més estudiades fins al moment. L'aquaporina-6 sembla expressar-se només a nivell intracel·lular i se'n desconeix la funció, mentre que les aquaporines-7 i -8 han estat descrites més recentment i no es tampoc gaire informació sobre la seva funció (Nielsen i col. 2002).



**Figura 11.** Localització a la nefrona de les principals aquaporines renals (Nielsen i col. 2002).

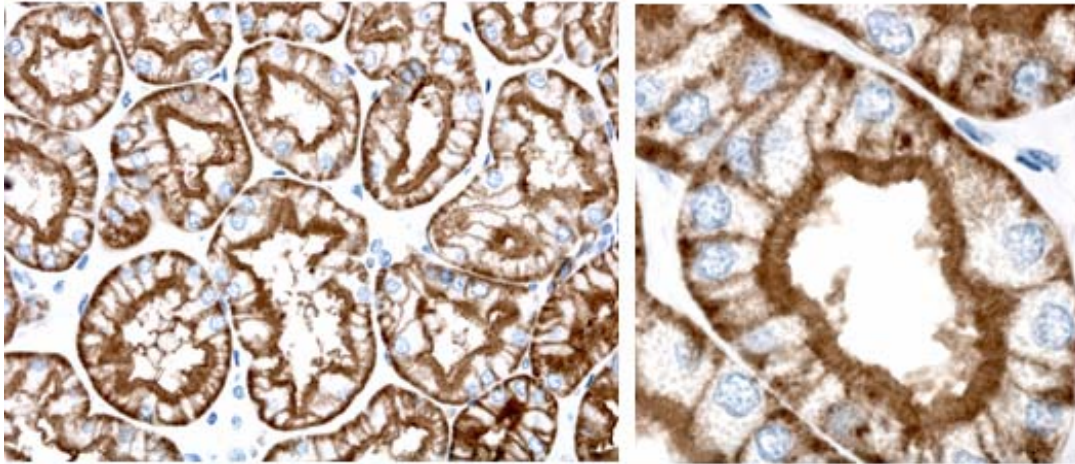
## Aquaporina-1

L'aquaporina-1\* és el primer canal d'aigua que es va descriure de la família de les aquaporines. Es localitza a ronyó, còrnia, peritoneu o pleura i fou descrita per primera vegada en glòbuls vermells. L'aquaporina-1, així com la majoria d'aquaporines, és una proteïna de membrana que s'organitza en tetràmers. Cada un dels monòmers que la conformen consta de 6 dominis transmembrana amb les terminacions amino i carboxil intracel·lulars (Figura 12). És l'aquaporina més abundant en ronyó, on es troba tant a la membrana apical com a la basolateral de les cèl·lules endotelials i epitelials del túbul proximal i branca prima descendent de la nansa de Henle (Figura 13). També s'ubica a la vasa recta descendent. Aquesta aquaporina és la principal responsable de la reabsorció isosmòtica d'aigua a nivell proximal facilitant, alhora, el mecanisme de concentració de l'orina. D'altra banda, aquest canal pot facilitar la migració cel·lular mitjançant un mecanisme que afavoreix el transport d'aigua a través d'unes expansions cel·lulars, anomenades lamel·lopodis i també pot actuar facilitant la regeneració cel·lular quan tenen lloc fenòmens de necrosi tubular (Hara-Chikuma i col. 2006).



**Figura 12.** (A) Esquema dels monòmers d'aquaporina-1 que consten de 6 dominis transmembrana. (B) Estructura dels homotetràmers d'aquaporina-1 a la membrana cel·lular (Nielsen i col. 2002).

\* En primera instància s'anomenà CHIP28 (*channel-forming integral protein* o proteïna integral formadora de canals).



**Figura 13.** Immunohistoquímica en ronyó humà en què s'observa la localització de l'aquaporina-1 a la membrana apical i basolateral a les cèl·lules epitelials proximals (Esteve-Font).

Regulació. La regulació d'aquest canal encara és bastant desconeguda. Alguns estudis apunten que la hipertonicitat de la medul·la podria condicionar un augment de l'expressió d'aquaporina-1 mitjançant l'activació d'una sèrie de quinases, les MAPK (proteïnes quinases activades per mitògens\* o *mitogen-activated protein kinase*) (Chen i col. 2005).

Fisiopatologia. La importància de l'aquaporina-1 en la concentració urinària es posà de manifest en observar que en humans que presenten una manca de funcionalitat de la proteïna aquaporina-1 en situació de restricció hídrica eren incapaçs de concentrar l'orina, malgrat que en condicions normals no s'observen conseqüències clíniques importants (King i col. 2001). Aquesta observació ja havia estat descrita prèviament en ratolins deficients del gen *aquaporina-1* (Ma i col. 1998). Per tant, la manca d'aquaporina-1 impedeix la creació d'una medul·la hipertònica pel mecanisme de concentració a contracorrent, essent així aquest canal necessari per a la formació d'una orina concentrada. En la poliquistosi autosòmica dominant (*autosomal dominant polycystic kidney disease, ADPKD*)\*\* l'aquaporina-1 podria està facilitant l'entrada i l'acumulació d'aigua dins els quists (Bachinsky i col. 1995).

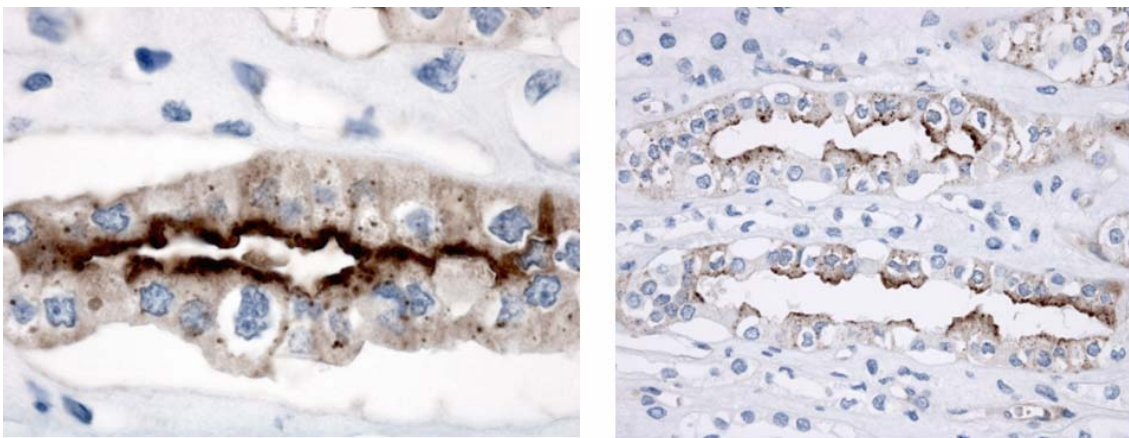
\* Proteïnes que afavoreixen la divisió cel·lular, condueixen a la mitosi.

\*\* Malaltia renal hereditària que es caracteritza per la presència de quists aquosos en ronyó, encara que de vegades també apareixen en fetge o pàncreas. Es una malaltia crònica progressiva incurable fins al moment.



## Aquaporina-2

L'aquaporina-2 és el canal d'aigua regulat per la vasopressina i es localitza exclusivament en ronyó, concretament a les cèl·lules principals dels túbuls connector i col·lector. Fou el segon membre de la família de les aquaporines que es va descriure després de l'aquaporina-1. Es troba en gran quantitat, tant en vesícules intracitoplasmàtiques com a la membrana apical d'aquestes cèl·lules on s'encarrega de la reabsorció d'aigua, essent la seva presència clau pel mecanisme de concentració de l'orina (Figura 14). Com l'aquaporina-1, també s'organitza en forma de tetràmers a la membrana i consta de 6 dominis transmembrana amb les terminacions amino i carboxil intracel·lulars (Figura 12). S'ha estudiat àmpliament la funció i regulació d'aquest canal, sobretot amb models animals de rata, més que qualsevol altra aquaporina.



**Figura 14.** Immunohistoquímica de ronyó humà en què s'observa la localització de l'aquaporina-2 a la membrana apical i a vesícules intracel·lulars de les cèl·lules epitelials principals del túbul col·lector (Esteva-Font).

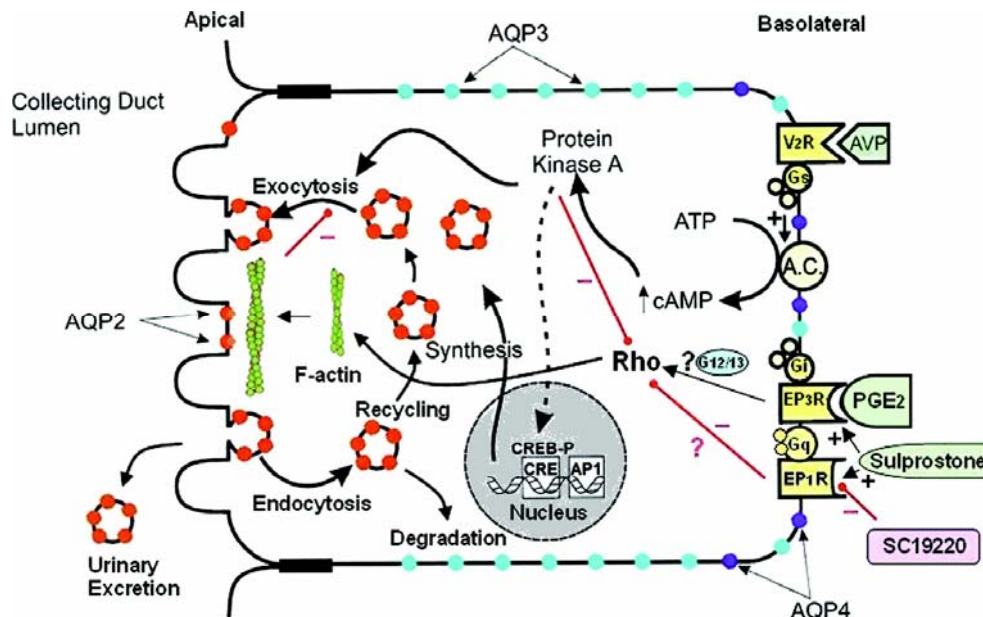
Regulació. La regulació d'aquest canal per l'hormona vasopressina està molt ben caracteritzada. A la membrana basolateral de les cèl·lules principals s'hi localitzen els receptors V2 que són proteïnes integrals de membrana acoblades a l'enzim adenilat ciclasa a través d'una proteïna G. L'activació d'aquesta proteïna G actua sobre l'adenilat ciclasa el qual catalitza la producció de monofosfat d'adenosina cíclic (AMPc)

a partir d'ATP. L'increment de l'AMPc intracel·lular activa la proteïna quinasa A (PKA). Aquesta quinasa fosforila una sèrie de substrats entre els quals hi ha una regió de l'extrem carboxil de l'aquaporina-2 que facilitarà el seu transport a la membrana apical, augmentant-ne la permeabilitat a l'aigua. La fosforilació de la serina 256 sembla tenir una funció clau en la translocació de la proteïna a la membrana (Nielsen i col. 2002). Sembla que existeixen altres factors que també intervenen en el transport d'aquesta proteïna a la membrana (Figura 15). Aquesta seria la regulació a curt termini que té lloc ràpidament (en minuts) en resposta a l'acció de la vasopressina i comporta l'exocitosi i fusió amb la membrana plasmàtica de les vesícules internes que contenen aquaporina-2 (Nielsen i col. 2002). D'altra banda, a la regulació a llarg termini, la unió de la vasopressina amb el receptor V2 desencadena la mateixa cascada de senyals que s'acaba d'explicar, però en aquest cas PKA fosforila el factor de transcripció CREB\* que s'uneix a una regió específica, CRE\*\*, del promotor del gen *AQP-2*, estimulando així la transcripció d'aquest gen i finalment la síntesi de nova proteïna (Chen i col. 2005) (Figura 15). La regulació a llarg termini es dona quan es mantenen elevats els nivells de vasopressina durant un període perllongat de temps (hores o dies). La prostaglandina E2 disminueix la quantitat d'aquaporina-2 a la membrana apical disminuint els nivells intracel·lulars d'AMPc.

Els aquarètics o antagonistes del receptor V2 de la vasopressina actuen bloquejant l'acció de l'hormona antidiürètica, de forma que indirectament s'inhibeix la síntesi d'aquaporina-2. El liti també produeix una disminució de l'expressió d'aquest canal alterant la via de síntesi de la proteïna.

\* proteïna d'unió als elements de resposta al AMPc [CRE (*cAMP-response element*)-binding protein].

\*\* element de resposta al AMPc (*cAMP-response element*).

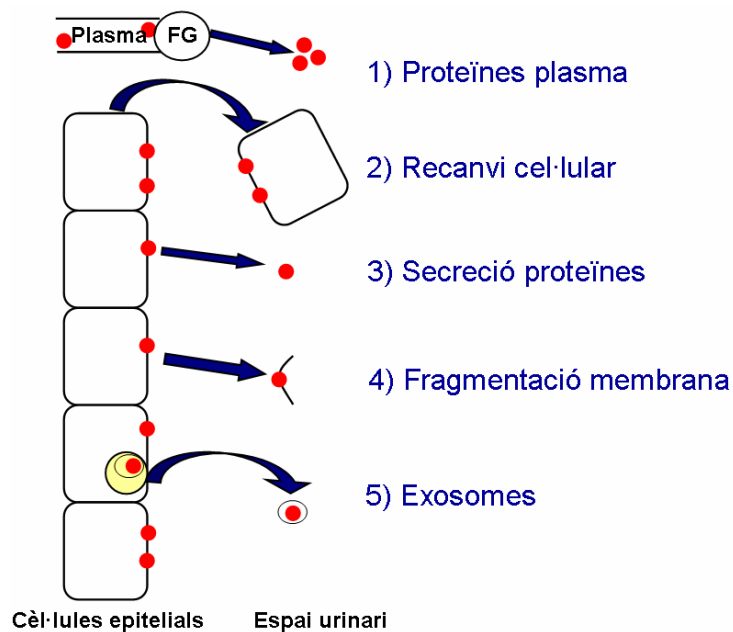


**Figura 15.** Transport i síntesi de l'aquaporina-2 a les cèl·lules principals del túbul col·lector (Chen i col. 2005).

Fisiopatologia. Mutacions localitzades a l'extrem carboxil de l'aquaporina-2 causen la forma dominant de la diabetis insípida nefrogènica (Morello i col. 2001). De la mateixa forma, el tractament crònic amb liti en animals experimentals i en humans (pel tractament de depressió) sovint també acaba causant aquest tipus de diabetis (Marple i col. 1995). Es produeix una disminució de la permeabilitat a l'aigua del túbul col·lector per l'aquaporina-2 mutada o bloquejada, que en els individus que tenen aquesta malaltia causa una elevada poliúria, o eliminació d'un elevat volum d'orina, acompanyada de polidipsia, és a dir, un augment anormal de set que porta a la ingesta de grans quantitats de líquid. S'han observat alteracions en l'activitat o expressió d'aquest canal d'aigua en altres patologies com la síndrome nefrítica, la cirrosi o la insuficiència cardíaca congestiva i trastorns associats a un defecte en la concentració urinària.

## EXCRECIÓ DE PROTEÏNES APICALS RENALS A L'ORINA

La biòpsia de ronyó és un procediment invasiu no indicat, en general, en la majoria de malalties renals lleus, per la qual cosa s'han buscat alternatives per la investigació d'alteracions en proteïnes renals com l'estudi de la seva excreció en orina. Les proteïnes que van a parar a l'orina poden ser proteïnes que es troben al plasma, proteïnes que són secretades directament a l'espai urinari per les cèl·lules epitelials, proteïnes procedents del recanvi cel·lular o del fraccionament de la membrana o proteïnes de l'epiteli tubular que s'excreten en petites vesícules de membrana anomenades exosomes (Pisitkun i col. 2006) (Figura 15). Cal estudiar profundament si alguna d'aquestes vies correlaciona millor la quantitat de proteïna expressada al ronyó amb l'excretada a l'orina.



**Figura 15.** Principals vies per les quals poden eliminar-se proteïnes a l'orina. FG, filtració glomerular.

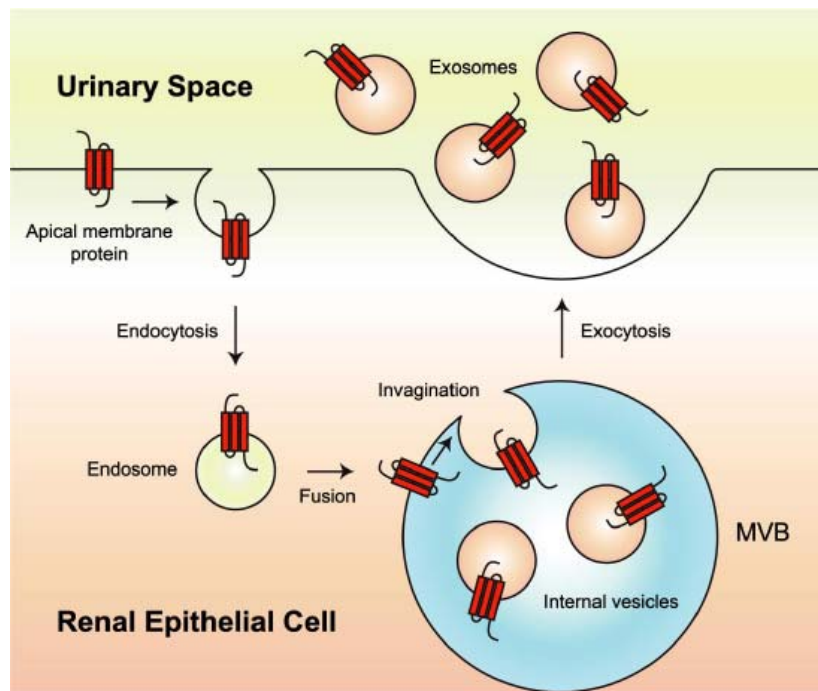
Per estudiar en humans els nivells d'expressió d'una determinada proteïna a l'orina el més adequat seria recollir una orina de 24 hores, malgrat la dificultat que comporta aquesta recollida, per tal d'evitar els efectes que pugui tenir el cicle circadià sobre l'excreció d'algunes proteïnes. L'alternativa quan no es pot obtenir una

orina de 24 hores és la recollida de mostres puntuals i la posterior normalització per la concentració de creatinina que presenten. S'utilitza aquest compost orgànic per la normalització ja que s'excreta a l'orina d'una forma gairebé constant. No obstant, cal tenir en compte que la creatinina que s'excreta procedeix de la degradació de la creatina que es troba als músculs, raó per la qual existiran certes variacions interindividuals en l'excreció de creatinina en funció del sexe o edat. Un altre factor a tenir en compte alhora de realitzar estudis amb proteïnes urinàries és la recollida i emmagatzematge de l'orina. Sembla important l'addició d'inhibidors de proteases i emmagatzemar les mostres a  $-80^{\circ}\text{C}$  i no a temperatures superiors (Zhou i col. 2006).

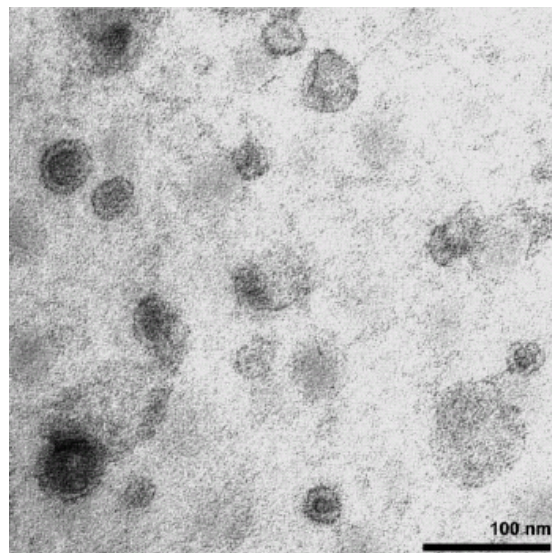
McKee i col. (2000) van detectar per primera vegada alguns transportadors renals de sodi i canals d'aigua a l'orina de rata. El canal d'aigua aquaporina-2, per la seva abundància al ronyó i perquè es coneix força bé la seva regulació, és una de les proteïnes que més s'ha estudiat per quina via s'excreta majoritàriament a l'orina. Així, en diversos estudis s'ha observat una correlació entre l'aquaporina-2 excretada en orina i l'aquaporina-2 expressada en ronyó, els nivells de vasopressina o l'osmolaritat urinària (Wen i col. 1999, Knepper 2002). Sembla que l'excreció d'aquest canal d'aigua per recanvi cel·lular és molt minoritària. La principal forma per la qual l'aquaporina-2 arriba a l'orina sembla ser per la via dels exosomes, és a dir, les proteïnes presents a la membrana apical primer s'endociten, un cop dins la cèl·lula s'agrupen diferents vesícules endocitades dins unes estructures endosomals anomenades cossos multivesiculars\*. Posteriorment aquests cossos es fusionen amb la membrana apical, alliberant d'aquesta forma les vesícules que contenen a l'espai urinari, en aquest punt les vesícules alliberades s'anomenen exosomes (Pisitkun i col. 2006) (Figura 16). Els cossos multivesiculars es formen quan la membrana d'un endosoma tardà s'invagina introduint així en el seu interior vesícules que es troben al lumen cel·lular. Aquestes vesícules que conté presenten un diàmetre inferior a 100 nm i una orientació única (Figura 17). Una monoubiqüinització podria ser el senyal que conduiria la proteïna

\* els cossos multivesiculars o MVB (*multivesicular bodies*) són unes estructures rodones o ovalades i d'origen endosomal que contenen diferent nombre de vesícules a l'interior.

plasmàtica cap als cossos multivesiculars, a diferència de la poliubiquïtització que portaria la proteïna a la seva degradació (Van Niel i col. 2006).



**Figura 16.** Esquema que mostra l'excreció de proteïnes apicals del túbul renal mitjançant la via dels exosomes (Pisitkun i col. 2006).



**Figura 17.** Imatge de microscòpia electrònica de la distribució i mida dels exosomes urinaris (Pisitkun i col. 2004).

Els exosomes s'han descrit en altres tipus cel·lulars com limfòcits, cèl·lules dendrítiques, neurones o cèl·lules tumorals on poden actuar com a estimuladors de

senyals immunològiques o biològiques (Keller i col. 2006). S'han aïllat aquests exosomes en diversos fluids corporals com l'orina, la sang o el líquid ascític (Keller i col. 2006). No es coneix encara el significat biològic de l'excreció dels exosomes a l'orina ja que no sembla que en aquest fluid puguin actuar com a estimuladors de senyals, tanmateix podrien resultar una forma de comunicació entre els diferents trams del túbul renal. Si la seva excreció en orina no tingués cap rellevància biològica una via més simple d'eliminació d'aquestes proteïnes podria ser la fusió dels cossos multivesiculars amb els lisosomes, per la qual cosa caldrà aprofundir en l'estudi d'aquestes vesícules. Existeixen una sèrie de proteïnes que es detecten de forma constant als exosomes com són: algunes proteïnes del citoesquelet, proteïnes presentadores d'antígens o molècules d'adhesió entre d'altres (Février i col. 2004). Aquests exosomes, per tant, poden ser caracteritzats morfològicament mitjançant microscòpia electrònica, única forma de visualitzar-los per la seva mida, i per la presència d'aquestes proteïnes marcadores.

Hi ha diferents formes de detectar les proteïnes de la membrana apical de l'epiteli tubular renal a l'orina. Donat que moltes proteïnes renals es troben a una concentració molt baixa a l'orina per a poder ser detectades directament, cal primerament concentrar-les. L'ultrafiltració i l'ultracentrifugació són les tècniques més emprades per aquesta fi (Valenti i col. 2000, Pisitkun i col. 2004). Amb la utilització de la ultracentrifugació es purifiquen bàsicament les proteïnes excretades per la via dels exosomes, mentre que emprant una tècnica més senzilla com és la ultrafiltració (prèvia centrifugació per eliminar-ne les restes cel·lulars i debris), mitjançant columnes amb una membrana d'un porus determinat, també es retenen proteïnes que provenen d'altres formes d'excreció com són la secreció i la fragmentació de petites fraccions de membrana, a banda dels exosomes. En aquest moment encara s'està optimitzant la millor forma de detectar i quantificar aquestes proteïnes renals d'origen apical en orina (Cheruvanky i col. 2007). Degut a la major abundància de les aquaporines -1 i -2 en el

ronyó respecte els transportadors renals de sodi, és relativament fàcil detectar els canals d'aigua en orina concentrant poc aquesta font o, fins i tot, directament sense haver-la de concentrar. D'altra banda, per a la detecció dels transportadors de sodi, menys abundants al ronyó, es necessita concentrar bastant més l'orina. És per això, que fins a l'actualitat la detecció dels transportadors de sodi s'ha realitzat a partir de mostres d'orina ultracentrifugada, mentre que per a la detecció de les aquaporines s'ha utilitzat la ultrafiltració (Hoorn i col. 2005, Pisitkun i col. 2004, Valenti i col. 2000).



## **MALALTIES MONOGÈNIQUES O MENDELIANES QUE CAUSEN HIPERTENSÍO O HIPOTENSÍO CAUSADES PER MUTACIONS EN ELS GENS DELS TRANSPORTADORS RENALS DE SODI**

S'han identificat diverses patologies en què alteracions en diferents transportadors de sodi causen quadres d'hipotensió, és a dir, valors de pressió arterial per sota dels normals (Lang i col. 2005).

### **Síndrome de Bartter**

Mutacions en el gen *NKCC2* poden causar una de les formes autosòmiques recessives de la síndrome de Bartter, concretament la tipus I (Simon i col. 1996). Mutacions en aquest gen causen alteracions en el cotransportador *NKCC2*, fet que afecta principalment a les cèl·lules de la nansa gruixuda ascendent i de la màcula densa (Obermüller i col. 1996). Una de les principals característiques de la síndrome de Bartter és l'elevada pèrdua de sal a l'orina causada per la reduïda capacitat en reabsorció de sodi a la branca gruixuda ascendent de la nansa de Henle (Hebert 2003). Els símptomes com la poliúria (augment del volum d'orina excretat) o la deshidratació apareixen ja en la infantesa i també es presenta una disminució de la pressió arterial, o hipotensió, i una disminució dels nivells de potassi en sang o hipocalèmia. També s'associa a vòmits, febre o diarrea que s'atribueixen a l'estimulació de l'activitat de la prostaglandina E2 (Kleta i col. 2006).

### **Síndrome de Gitelman**

La síndrome de Gitelman és un trastorn hereditari autosòmic recessiu causat per mutacions en el gen que codifica pel transportador renal de sodi distal *NCC* (Simon i col. 1996). Aquestes mutacions al gen *NCC* causen, com en la síndrome de Bartter, una elevada pèrdua de sodi fet que pot comportar un descens de la pressió arterial (Sabath i col. 2004). Aquesta síndrome presenta unes característiques clíniques

semblants a les de la síndrome de Bartter, com la hipocalèmia, a més de hipocalciúria i hipomagnesèmia. Els pacients amb aquesta síndrome també manifesten episodis de debilitat muscular (Davidson i col. 2005).

### **Pseudohipoaldosteronisme tipus I**

La forma autosòmica recessiva del Pseudohipoaldosteronisme tipus I pot ser causada per mutacions en les subunitats  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$  del canal epitelial de sodi (ENaC) (Rossier i col. 2002). Aquest trastorn és sever i es caracteritza per una elevada pèrdua de sal per l'orina causant hipotensió (Luft, 2003). Presenta nivells elevats de potassi en sang (hipercalèmia), nivells baixos de sodi en sang (hiponatrèmia) i un pH de la sang per sota de la normalitat (acidosi metabòlica) (Bonny i col. 2000).

D'altra banda, també s'han identificat patologies en què alteracions en alguns transportadors renals de sodi donen com a resultat l'aparició d'hipertensió.

### **Síndrome de Liddle o pseudoaldosteronisme**

La síndrome de Liddle és un trastorn autosòmic dominant causat per una activació constitutiva de l'ENaC. Mutacions en les subunitats  $\beta$  i  $\gamma$  del canal epitelial de sodi poden causar aquest síndrome. Es caracteritza per una severa hipertensió acompanyada per hipocalèmia i alcalosi metabòlica, és a dir, el pH de la sang augmenta respecte la normalitat (Bonny i col. 2000).

Aquests trastorns monogènics són poc freqüents, però demostren alteracions en el transport tubular de sodi tenen com a conseqüència trastorns en la PA.

---

## **PATOLOGIES QUE S'ACOMPANYEN D'ALTERACIONS DEL BALANÇ HIDROSALÍ**

Existeixen diverses patologies que s'associen amb alteracions en el balanç de sodi i aigua i que presenten una retenció de fluid a l'espai intersticial. Així, la insuficiència cardíaca congestiva, la cirrosi hepàtica, la síndrome nefròtica o algunes formes d'hipertensió arterial en són alguns exemples.

- En la insuficiència cardíaca congestiva el cor disminueix la seva capacitat per a bombejar la sang. En una fase evolucionada de la insuficiència cardíaca congestiva s'observa un augment en la retenció de sodi i aigua a l'espai intersticial (Brenner, 2008). En estudis experimentals en animals s'ha observat una associació entre l'increment de l'expressió de l'aquaporina-2 al túbul col·lector i la severa retenció renal d'aigua observada en aquesta patologia (Nielsen i col. 2007). En diversos estudis s'ha observat un augment de l'excreció urinària d'aquaporina-2 en pacients amb aquesta patologia (Pedersen i col. 2003, Schrier i col. 2001, Funayama i col. 2004). L'increment d'aquaporina-2 estaria facilitant la reabsorció d'aigua a nivell del túbul col·lector i d'aquesta forma s'afavoriria la retenció d'aigua observada en aquests pacients.

- La cirrosi hepàtica és una patologia que en fases avançades s'acompanya d'ascites (Gines i col. 2007). En aquesta etapa s'observa una marcada retenció renal de sodi, que sembla tenir una implicació clau en la formació de l'edema associat a aquesta patologia. S'han realitzat diversos estudis en què s'investiga la possible implicació de les aquaporines renals amb aquesta retenció de fluid peritoneal havent-se obtingut resultats divergents (Fernandez-Llama i col. 2000, Asahina i col. 1995, Fernandez-Llama i col. 2000, Jonassen i col. 2003). La cirrosi hepàtica es tracta amb més profunditat més endavant.

- La síndrome nefròtica és la conseqüència clínica de l'augment de la permeabilitat dels capil·lars glomerulars, que comporta proteïnúria i hipoalbuminèmia, i s'acompanya d'edema, hiperlipèmia i lipidúria (Alcázar i col. 2003). Per tant, es caracteritza entre altres per una elevada pèrdua de proteïnes per l'orina, per l'expansió del volum extracel·lular i una reabsorció renal excessiva de sodi i aigua. En models

experimentals s'ha observat una disminució de l'expressió de les aquaporines-2 i -3 en el túbul col·lector, fet que podria resultar ser una resposta per a compensar l'expansió del volum extracel·lular (Nielsen i col. 2007, Fernandez-Llama i col. 1998 ). Fernandez-Llama i col. (1998) també han detectat una disminució dels transportadors de sodi NHE-3 i NKCC2.

- La hipertensió arterial (HTA) es defineix com una elevació crònica de la pressió arterial sistòlica i/o diastòlica. Entre d'altres trastorns es produeix un augment del volum del líquid extracel·lular, el qual és causat per un increment de la retenció hidrosalina a nivell del ronyó. És per això que el tractament de la hipertensió acostuma a incloure algun diürètic per a disminuir la retenció renal de sodi (Botey i col. 1992). La HTA es tracta amb més profunditat en el següent apartat.

### **Hipertensió arterial**

La hipertensió arterial és una elevació crònica de la pressió arterial (PA) sistòlica i / o diastòlica. La PA sistòlica és la pressió màxima que s'assoleix en la sístole quan el flux sanguini que surt del ventricle és màxim, mentre que la PA diastòlica és la pressió mínima que exerceix la sang contra les artèries i succeeix durant la diàstole. A major augment de la PA major morbiditat i mortalitat cardiovascular en els individus. La repercussió orgànica de la HTA inclou a l'afectació de diversos òrgans i sistemes com són el sistema vascular, el cor, el cervell i el ronyó.

La distinció entre nivell de PA normals i patològics no és senzilla, per això s'han establert uns valors arbitraris per a distingir entre normotensió i hipertensió. Així, la Organització Mundial de la Salut defineix que un adult, ja sigui home o dona, presenta una PA normal quan els valors que presenta per la PA sistòlica són iguals o menors a 140 mmHg i per la PA diastòlica iguals o menors a 90 mmHg (Caramelo i col. 1997). Aquests valors s'han establert per conveni segons els criteris de risc cardiovascular i renal de la població.

Les dificultats per a mesurar la PA en un individu fan que sigui una tècnica poc reproducible. La tècnica de referència per a la mesura de la PA és mitjançant l'esfigmomanòmetre de mercuri. Aquesta mesura pot variar segons l'activitat que estigui realitzant l'individu, factors ambientals o la reacció d'alerta a la mesura de la PA, conegut com a fenomen de la bata blanca. Per evitar aquestes variacions han sorgit noves estratègies o tècniques com la mesura repetida de la PA en diferents intervals de temps, l'automesura de la PA a domicili o la monitorització ambulatoria de la PA (MAPA) de 24 o 48 hores. La introducció de la MAPA ha confirmat una millora de la correlació amb els paràmetres de lesió dels òrgans diana respecte les mesures de PA realitzades a la consulta. Aquesta tècnica permet l'obtenció de mesures de la PA cada 20 min durant el dia i cada 30 min durant la nit, pel que permet analitzar el ritme circadià de cada individu. Els paràmetres que s'obtenen de la MAPA són:

- Pressió arterial mitjana (PAM), que resulta de la suma de la PA diastòlica més  $\frac{1}{3}$  de la pressió del pols. S'obtenen els registres de la PAM de dia, PAM de nit i PAM de 24 hores.
- Pressió del pols que es defineix com la diferència entre la PA sistòlica i la diastòlica.
- Freqüència cardíaca.

La hipertensió presenta una elevada prevalença en els països industrialitzats i tendeix a incrementar amb l'edat. La HTA essencial es considera el resultat de la interacció de múltiples factors genètics i ambientals. Tot i la publicació de nombroses investigacions que han aconseguit aclarir molts dels mecanismes implicats en la regulació de la PA, els determinants primaris de la HTA essencial (que representa entre el 90 y 95% de la població hipertensa) no es coneixen. La HTA és una malaltia poligènica, en la que múltiples gens contribueixen al desenvolupament d'un fenotip individual; fet per el qual el seu estudi és molt més complex que el de les malalties monogèniques. Una altra característica d'aquesta patologia és la heterogeneïtat:

mentre que un cert nombre de gens poden ser responsables de la malaltia en un individu, un altre conjunt diferent de gens ho poden ser en un altre individu. L'anàlisi dels trets poligènics es complica pel fet que generalment són trets quantitius. Per tant, és difícil definir clarament el fenotip-malaltia i cal elevar de forma exponencial el nombre d'individus que es necessiten per a realitzar un anàlisi estadístic adequat (Lindpaintner, 1992). A més, és multifactorial mostrant una complexa interacció amb els factors ambientals. Aquests efectes poden ser semblants en individus afectes i no afectes o varis factors ambientals poden mostrar efectes totalment oposats sobre un determinat gen o, fins i tot, un factor ambiental concret pot interactuar individualment amb diferents gens i augmentar-ne o atenuar-ne els seus efectes sobre el fenotip.

Actualment es coneixen diversos gens que predisposen al desenvolupament d'HTA. En estudis amb grans poblacions, així com amb bessons i nens adoptats han permès mostrar l'existència d'una forta component genètica en els mecanismes de regulació de la PA (Miall i col. 1956). S'ha observat, a més, que entre germans biològics els valors de la PA són més semblants que entre germans adoptats. Aquests tipus d'estudis permeten investigar de forma directe el grau de contribució que tenen els gens i l'ambient en l'evolució de la PA.

Només es coneix l'etiologia de la HTA en un 10% dels pacients hipertensos, són les anomenades hipertensions secundàries (Kaplan, 2002). Entre les causes més freqüents d'hipertensió secundària trobem: les patologies renals, vasculorenals, tumors productors de renina, endocrines, embaràs o ingesta de fàrmacs [com els antiinflamatoris no esteroïdals (AINEs), ciclosporina, eritropoietina,...] (Davison i col. 2005).

Anteriorment s'han repassat algunes de les malalties monogèniques que cursen amb hipertensió causades per mutacions en algun dels gens que codifica per algun transportador renal de sodi. A més d'aquestes anteriorment esmentades, és conegut també que alteracions en gens com el protooncogen *RET*, el gen supressor de tumors *VHL* o el gen *PKD1* entre d'altres poden causar formes hereditàries d'hipertensió.

Existeixen quatre sistemes fonamentals en el control de la PA (Botey i col. 1992):

- Els baroreceptors arterials

Els baroreceptors arterials es troben situats al cor, grans artèries i a les artèries renals aferents. Aquests responen a canvis en la tensió de la paret vascular i intervenen en la regulació del volum plasmàtic i del líquid extracel·lular mitjançant la secreció d'hormones com la renina, la vasopressina o l'aldosterona.

- Metabolisme hidrosalí

L'augment del volum del líquid extracel·lular comporta un augment de la despesa cardíaca i un increment de les resistències perifèriques. En individus normals un augment de la PA comporta un increment en l'excreció renal de sodi i aigua, que s'anomena natriuresi de pressió.

- Sistema renina-angiotensina-aldosterona

La renina en sí no té cap efecte fisiològic directe, ara bé, aquesta actua sobre el seu substrat, la alfa-2-glicoproteïna, generant l'angiotensina I. L'angiotensina I alhora actua com a prohormona generant l'angiotensina II quan és hidrolitzada per l'enzim convertasa. Les principals accions del sistema renina-angiotensina-aldosterona les porta a terme l'angiotensina II. Aquesta és un potent vasoconstrictor de les artèries de forma que augmenta la PA (Laragh, 1993). Actua potenciant la secreció de l'aldosterona, que afavoreix la reabsorció de sodi a nivell dels túbuls distal i col·lector. A més, l'angiotensina II pot estimular el centre de la set i la secreció de vasopressina. Els mecanismes que controlen l'alliberació de la renina de l'arteriola aferent són, per una banda, els baroreceptors, que s'han descrit anteriorment, els quimiorceptors ubicats a nivell de la màcula densa i altres receptors intrarenals.

- Autoregulació vascular

És la capacitat que tenen els vasos per a mantenir constant el flux sanguini. Així quan té lloc una disminució en la distensibilitat arterial s'observarà un augment de la PA i viceversa.

Existeix una àmplia varietat de models animals experimentals hipertensos, essent la rata l'animal més utilitzat. Alguns dels models més utilitzats són les rates amb hipertensió espontània (SHR, *spontaneous hypertensive rats*), rates Milan hipersensibles (MHS, *Milan hypertensive rats*) o les rates Dahl susceptibles o resistents a la sal (DS o DR) (Kiprof, 1980).

### **Hipertensió i sensibilitat a la sal**

Des de fa molt temps es coneix l'associació entre una elevada ingesta de sal a la dieta i un increment de la PA. La resposta de la PA a la ingesta de sal és bastant heterogènia (Pecker i col. 1991). Així, es pot classificar la població en sal sensibles o sal resistents en funció de l'increment en la PA que presenten en resposta a una dieta rica en sal. Un dels criteris més emprats per a definir la sensibilitat de la PA a la sal és quan es produeix un augment de més del 10% de la PAM de 24 h en ingerir una dieta rica en sal respecte una dieta pobre en sal (Kawasaki i col. 1978).

La sal sensibilitat s'observa més freqüentment en individus amb hipertensió, en ancians i en la població de raça negra en comparació amb la població general. La regulació de la PA es troba estretament lligada a la capacitat del ronyó per excretar sodi i clor (Blumenfeld i col. 2004). Diversos estudis apunten que els transportadors renals de sodi podrien tenir una funció important en la etiopatogènia de la hipertensió sal sensible. Així, Alvarez-Guerra i col. (2002) van trobar un increment en l'activitat del NKCC2, en rates Dahl sal sensibles. Tot i així, aquestes rates presentaven una expressió d'aquest transportador disminuïda en el ronyó en comparació a les rates Dahl sal resistents. Sonalker i col. (2004) també van apuntar en un estudi amb rates SHR a una associació entre l'increment de NKCC2 i la sensibilitat de la PA a la sal. Variacions en la ingesta de sal a la dieta poden condicionar canvis en l'abundància proteica i en la distribució intracel·lular en el ronyó del transportador de sodi NCC i del canal epitelial de sodi ENaC (Sandberg i col. 2006, Masilamani i col. 2002, Loffing i col. 2000). D'aquesta forma una restricció de sal en la dieta incrementa l'expressió del



NCC, mentre que aquest transportador disminueix la seva expressió en el ronyó durant una dieta rica en sal (Sandberg i col. 2006, Masilamani i col. 2002). En un altre estudi Li i col. (2007) observaren un augment de l'activitat dels transportadors NKCC2 i NCC en rates amb una degeneració dels nervis sensorials i una dieta rica en sal, mentre que no observaven canvis en l'activitat del ENaC. Lapointe i col. (2002) van estudiar en rates SHR l'expressió i activitat del NHE-3, observant un augment tant de l'activitat com de la quantitat de proteïna en ronyó d'aquestes rates amb hipertensió. Aquest increment de l'expressió proteica es podria explicar per modificacions post transcripcionals, ja que no van observar canvis en el nivell de RNA d'aquest transportador. Chioloro i col. (2000) van estudiar la reabsorció proximal de sodi, intervinguda principalment pel transportador NHE-3, en humans sal sensibles i sal resistents mitjançant la tècnica de l'aclariment de liti. En aquest treball els individus sal sensibles presentaven una major reabsorció proximal de sodi que podria indicar un increment de l'activitat i/o expressió de l'NHE-3. Glorioso i col. (2001) basant-se en un estudi previ en rates Dahl (Herrera i col. 2001) van estudiar la interacció de diverses variants genètiques dels gens que codifiquen per la Na-K-ATPasa i el transportador NKCC2 un grup de població hipertensa de Sardenya. Observaren que la interacció d'aquests 2 gens incrementava la susceptibilitat de tenir HTA essencial en aquest grup de població.

Tots els estudis anteriors resulten interessants ja que en tots s'intenta detectar alguna relació entre alteracions en els transportadors i HTA sal sensible.

### **Hipertensió arterial secundària a l'acció dels anticalcineurínics**

Els anticalcineurínics són fàrmacs àmpliament utilitzats en la prevenció del rebuig de l'empelt i en el tractament de malalties autoimmunes. Des de la introducció de l'anticalcineurínic ciclosporina a mitjans dels 80, com a agent immunosupressor en els trasplantaments renals, ha millorat significativament la supervivència de l'empelt (> 80%). Malgrat aquesta millora, hi ha hagut un augment molt significatiu de la

hipertensió post-trasplant. En l'època pre-ciclosporina, la prevalença de la hipertensió en la població trasplantada era del 50%, i des de la introducció d'aquest fàrmac, aquesta ha augmentat fins al 75% (Shirley i col. 2005). El control de la PA hauria de ser un objectiu prioritari, ja que és un dels factors de risc de malaltia cardiovascular més importants essent aquesta malaltia la causa més freqüent de mort en la població trasplantada, afavorint, a més, a la disminució progressiva de la funcionalitat de l'empelt.

El mecanisme fisiopatològic que porta a la hipertensió induïda per ciclosporina no és ben conegut, malgrat que existeixen nombroses evidències que suggereixen que la retenció de sodi i aigua en són factors clau (Ciresi i col. 1992). Diversos estudis apunten a una relació entre la ingesta de sal i la HTA induïda per ciclosporina (Pere i col. 2000, Mervaala i col. 1999), fet que podria associar-se a una retenció renal de sodi. Wu i col. (2000) van estudiar en cultius cel·lulars, derivats de cèl·lules de la branca gruixuda ascendent de ratolí, l'activitat del transportador NKCC2 després del tractament amb ciclosporina. Van observar que la ciclosporina estimulava l'activitat de l'NKCC2.

### **Cirrosi hepàtica**

La cirrosi és una malaltia hepàtica crònica, difusa i irreversible. Es caracteritza per la presència de fibrosi i nòduls de regeneració al fetge, que es formen per una acumulació de teixit no funcional. Hi ha una reducció de la massa funcional hepàtica que condiciona l'aparició d'hipertensió portal i insuficiència hepàtica, i s'associa també a alteracions en la regulació del balanç del sodi i l'aigua.

El diagnòstic patognomònic d'aquesta malaltia es realitza a partir d'un examen histològic del fetge, encara que també pot diagnosticar-se per criteris clínics, biològics i radiològics.

La cirrosi hepàtica es pot classificar de diverses formes. Segons la severitat en la retenció de sodi i aigua, es pot diferenciar la compensada i la descompensada. La

cirrosi compensada té lloc a la fase primerenca de la malaltia, quan encara és asimptomàtica i no presenta ni ascites, ni hemorràgia digestiva o icterícia. Mentre que la cirrosi descompensada es presenta en estadis més avançats amb l'aparició d'edema i s'associa a la presència d'algunes de les complicacions que s'acaben d'esmentar. La cirrosi descompensada es pot subdividir en dos grups: cirròtics amb ascites i cirròtics amb síndrome hepatorenal, diferenciant-se per la presència d'insuficiència renal en el segon grup (Arroyo i col. 1996). La classificació Child-Pugh valora el grau de funció hepàtica dels pacients cirròtics. Tot i així, aquesta classificació no sempre permet definir clarament les alteracions progressives de les retencions de sodi i aigua (Pandey i col. 2002).

L'etiologia més freqüent de la cirrosi és el consum excessiu d'alcohol o etilisme, seguida de les infeccions cròniques pels virus de l'hepatitis B i C.

#### Fisiopatologia

- Ascites. L'ascites és l'acumulació de líquid a la cavitat peritoneal. Tot i que es desconeix encara el mecanisme exacte que provoca l'aparició d'ascites, la hipertensió portal i la retenció renal de sodi en són les causes més importants. L'increment patològic de la pressió a nivell de la vena portal té com a conseqüència una vasodilatació arterial esplàcnica, és a dir dels òrgans interns, que és un factor important en la fisiopatologia de l'ascites. S'observa alhora una hipersecreció de l'hormona antidiürètica o vasopressina que podria estar afavorint la retenció d'aigua en aquest estat. La retenció de sodi és l'alteració de la funció renal més característica dels pacients cirròtics amb ascites. Així, quan els cirròtics excreten en orina menys sodi del que ingereixen acaben acumulant fluid extracel·lular (ascites) (Gines i col. 2007). Es sap que la retenció de sodi és causa i no conseqüència de l'aparició d'ascites, ja que s'han realitzat alguns estudis amb pacients cirròtics amb ascites en què només amb la restricció de l'ingesta de sodi a la dieta s'ha aconseguit reduir, i fins i tot fer desaparèixer, l'ascites que presentaven (Arroyo, 2002, Kuiper i col. 2007). També s'ha observat que el tractament amb diürètics redueix notablement l'ascites en

aquests pacients, mentre que la suspensió d'aquest tractament empitjora el grau d'ascites (Arroyo, 2002).

A la cirrosi també existeix una alteració de la capacitat d'excretar aigua. A mesura que avança l'estat patològic d'aquesta patologia la retenció d'aigua es troba tan incrementada que pràcticament retenen tota l'aigua que ingereixen, de forma que dilueixen tant el medi intern que acaben generant el que s'anomena hiponatrèmia dilucional. Aquest tipus d'hiponatrèmia té com a causa l'excés d'aigua que hi ha al medi i no el dèficit de sodi, ja que el contingut de sodi en el medi intern és elevat. Es considera hiponatrèmia quan els valors del sodi en sèrum són menors a 130 mEq/L. Aproximadament el 30% dels cirròtics amb ascites presenten alhora hiponatrèmia.

- Insuficiència renal. A mesura que la malaltia progressa es desenvolupa una vasoconstricció renal que causa una disminució del filtrat glomerular i finalment acaba apareixent l'insuficiència renal funcional, també anomenada síndrome hepatorenal (Fernandez-Llama i col. 2005). Totes aquestes alteracions contribueixen significativament a l'elevada morbiditat i mortalitat característica de la cirrosi evolucionada.

La rata és l'animal més utilitzat com a model experimental de cirrosi. El lligament del conducte biliar i el tractament amb tetraclorur de carboni (CCl<sub>4</sub>) són dos dels models experimentals més emprats per induir cirrosi hepàtica (Claria i col. 2005). Diversos treballs apunten a una possible associació entre alteracions en l'expressió de les aquaporines-1 i -2 i la retenció de sodi i aigua en la cirrosi amb resultats divergents segons el model experimental emprat (Asahina i col. 1995, Fernandez-Llama i col. 2000, Fernandez-Llama i col. 1999, Jonassen i col. 2003). Així, mentre Asahina i col. observaren un increment de tant a nivell de la proteïna com de l'mRNA de l'aquaporina-2 a les rates cirròtiques, Fernandez-Llama i col. (2000) no van detectar cap increment de la proteïna al ronyó de les rates cirròtiques, però sí que van observar

un augment del tràfic d'aquesta proteïna des de les vesícules intracel·lulars cap a la membrana apical.

Després de les evidències observades en models experimentals respecte la possible implicació de les aquaporines renals en la fisiopatologia de la cirrosi hepàtica, s'han realitzat alguns treballs en humans estudiant l'excreció d'aquestes proteïnes a l'orina (Pedersen i col. 2003, Ivarsen i col. 2003). Pedersen i col. van realitzar el primer treball amb pacients cirròtics en què s'estudiava l'excreció de l'aquaporina-2 a l'orina. Observaren que en els pacients cirròtics no augmentava l'excreció urinària de l'aquaporina-2, malgrat tenir augmentats els nivells de vasopressina respecte els controls sans (Pedersen i col. 2003). En canvi, Ivarsen i col. (2003) van observar un increment de l'excreció urinària de l'aquaporina-2 en els pacients amb cirrosi respecte als controls.





**Objectius**





## **1. Estudi d'alteracions en l'expressió dels transportadors renals de sodi i aquaporines renals en la hipertensió arterial induïda per ciclosporina.**

Diversos estudis indiquen l'existència d'una relació entre l'augment de la pressió arterial (PA) induïda per la ciclosporina i la retenció renal de sodi i aigua. Els transportadors renals de sodi i les aquaporines participen de forma clau en la reabsorció de sodi i aigua en el ronyó. L'objectiu principal d'aquest estudi és investigar el paper d'una possible desregulació dels transportadors renals de sodi i/o aquaporines en l'augment de la PA induïda per ciclosporina en un model experimental de rata.

Els objectius concrets d'aquest treball són:

- Reproduir un model animal d'hipertensió arterial induïda per ciclosporina.
- Confirmar la presència d'una retenció renal de sodi com a factor patogènic implicat en l'augment de la PA.
- Relacionar l'increment en l'expressió d'algun transportador renal de sodi amb un augment en la PA en rates tractades amb ciclosporina.

## **2. Estudi de l'excreció urinària de les aquaporines-1 i -2 en pacients amb cirrosi hepàtica.**

En diversos treballs anteriors s'ha posat de manifest la importància de les aquaporines en l'aparició d'ascites en les fases avançades de la cirrosi hepàtica. L'objectiu principal d'aquest treball és investigar en humans amb cirrosi hepàtica l'excreció urinària de les aquaporines-1 i -2 en diferents fases de la retenció de sodi i aigua (cirrosi sense ascites, cirrosi amb ascites i síndrome hepatorenal).

Els objectius concrets del treball són:

- Aportar noves dades de l'excreció urinària d'aquaporina-2 en pacients cirròtics, ja que s'han trobat resultats divergents en els estudis realitzats fins al moment.

- Estudiar l'excreció urinària de l'aquaporina-1 en pacients amb cirrosi, ja que fins el moment s'ha estudiat només en models experimentals animals.

### **3. Localització ultraestructural dels transportadors de sodi i aquaporines en ronyó humà i exosomes urinaris.**

Existeixen evidències sobre una possible correlació entre l'excreció a l'orina de les proteïnes renals apicals i la seva expressió en el ronyó. Aquesta excreció pot donar-se per diverses vies, essent l'excreció en forma d'exosomes urinaris la via que sembla majoritària en l'excreció de proteïnes renals a l'orina. L'objectiu principal d'aquest treball és la localització dels transportadors renals de sodi i aquaporines en vesícules intracel·lulars a les cèl·lules tubulars renals i en els exosomes corresponents a l'orina.

Els objectius concrets d'aquest treball són:

- Localitzar per primera vegada els transportadors renals de sodi i aquaporines associats a cossos multivesiculars en seccions de ronyó humà.
- Localitzar aquestes proteïnes associades a exosomes en mostres d'orina humana ultracentrifugada mitjançant l'immunomarcatge ultraestructural.

### **4. Excreció dels transportadors renals de sodi NKCC2 i NCC en exosomes urinaris de pacients hipertensos en relació amb la ingesta de sal.**

Diversos estudis experimentals apunten a una associació entre alteracions en l'expressió d'alguns transportadors renals de sodi i la PA sal sensible. L'objectiu principal d'aquest treball és relacionar l'excreció dels transportadors de sodi en exosomes urinaris amb l'augment de la PA associada a la ingesta de sal.

Els objectius concrets d'aquest treball són:

- Investigar l'existència de canvis en l'excreció urinària dels transportadors de sodi (NKCC2 i NCC) en exosomes urinaris en funció del canvi en la reabsorció renal de sodi condicionada per la ingesta de sal.
- Detectar un perfil d'excreció urinària dels transportadors renals de sodi associat a la variació de la PA en passar d'una dieta pobre en sal a una dieta rica en sal.





## **Materials i Mètodes**



## MATERIALS I MÈTODES

### 1. Experimentació amb animals

Per a l'estudi de la hipertensió arterial induïda per ciclosporina s'han utilitzat rates mascle Wistar adultes que s'han mantingut a l'estabulari de l'IDIBAPS (Institut d'Investigacions Biomèdiques Agustí Pi i Sunyer, Barcelona). En el manteniment i utilització dels animals s'ha procurat minimitzar al màxim tant el patiment dels animals com el nombre d'exemplars utilitzats segons la *European Communities Council Directive* (86/609/EEC). Tots els animals han tingut accés *ad libitum* a aliment sintètic (A04, Panlab) i aigua.

Per aquest estudi s'han utilitzat dotze rates que s'han dividit en dos grups: control i tractades amb ciclosporina. Tots els animals s'han col·locat en gàbies metabòliques per a controlar-ne el balanç hidrosalí. A les sis rates tractades amb ciclosporina se'ls ha injectat diàriament ciclosporina via intraperitoneal a una dosi de 25 mg/kg durant una setmana, mentre que a les rates control se'ls hi ha injectat vehicle. S'han realitzat prèviament mesures de la PA per habitar els animals. La PA de tots els animals s'ha mesurat els dies 1, 3 i 6 de l'experiment, mitjançant un maneguet a la cua. Al final d'aquest període totes les rates han estat sacrificades per decapitació. Se n'ha recollit la sang per a separar-ne posteriorment el sèrum per centrifugació, i se n'han extret ràpidament els ronyons per a l'aïllament de proteïnes (ronyó dret) o s'ha congelat a -80°C per a extreure'n l'RNA (ronyó esquerra).

### 2. Extracció de proteïnes

#### Material

- Solució d'aïllament
  - 10 mM Trietanolamina
  - 250 mM Sucrosa
  - Ajustar pH a 7.6
- Inhibidors de proteases per afegir a la solució d'aïllament
  - 3.34 mM fluorur de fenil-metil sulfonat (PMSF)

0.67  $\mu$ M Leupeptina

- Homogeneïtzador mecànic
- Portaobjectes
- Placa tèrmica

### Procediment

Es col·loca el ronyó fresc en un recipient en gel que conté la solució d'aïllament amb els inhibidors de proteases. Per a realitzar un homogeneïtzat total de ronyó s'extreu la membrana capsular que envolta el ronyó i tallem el ronyó en trossos petits (menys de 1 mm) sobre un portaobjectes amb un bisturí. Homogeneïtzem amb l'homogeneïtzador els trossos de ronyó en 10 ml de solució d'aïllament prèviament refredada amb inhibidors de proteases. Per homogeneïtzar, posem els trossos petits de ronyó en un recipient, col·locat sobre gel i apliquem l'homogeneïtzador durant uns 15 segons per no escalfar massa la mostra. Repetim la operació dues o més vegades fins que veiem que la mostra queda ben homogeneïtzada. Després mesurem la concentració de proteïnes de les mostres. Ara ja es poden preparar les mostres per a fer-ne l'immunoblot.

### **3. Mesura de la concentració de proteïnes d'una mostra**

La valoració de la concentració de proteïnes es realitza mitjançant el mètode de Bradford (Bradford 1976). Aquest mètode es basa en el canvi de coloració del blau brillant de Coomassie en funció de la concentració de proteïna. En presència del colorant que s'acobla a les proteïnes l'absorbància d'aquestes proteïnes passa de 465 a 595 nm.

### Material

- DC protein assay® (Bio-Rad)
- BSA 2 mg/ml en aigua destil·lada
- Espectrofotòmetre



- Cubetes de plàstic

### Procediment

El reactiu *Bio-Rad protein assay*® (Bio-Rad) es dilueix ¼ amb aigua destil·lada i es dispensa a raó d'1 ml per cada cubeta de plàstic. S'afegeix un volum variable d'entre 2 i 6 µl de mostra proteica i s'homogeneïtza. Addicionalment, es prepara una recta patró amb albúmina a concentracions de 0, 2, 5, 10 i 15 µg/ml. Per extrapolació dels valors d'absorbància amb la recta patró de concentració coneguda es pot calcular la concentració de proteïna de la mostra d'interès. La determinació de l'absorbància es realitza amb un espectrofotòmetre a una longitud d'ona de 595 nm.

## **4. Immunoblot**

L'immunoblot o *Western blot* s'utilitza per a identificar i semiquantificar proteïnes basant-se en la capacitat dels anticossos d'unir-se a proteïnes específiques. També proporciona informació sobre la mida de la proteïna d'interès. En aquesta tesi, aquesta tècnica s'ha utilitzat per la posada a punt dels diferents anticossos contra els transportadors renals de sodi i els canals d'aigua o aquaporines renals que s'han desenvolupat en el nostre laboratori i per a la mesura semiquantitativa dels nivells d'expressió d'aquestes proteïnes als diferents estudis.

### **4.1. Preparació de les mostres**

#### Material

- Tampó de càrrega (5X)
  - 7,5% SDS
  - 30% Glicerol
  - 50 mM TRIS (1 M, pH 6,8)
  - 0,05% Blau de bromofenol

S'afegeixen 4 mM Ditiotrietol (DTT)

## Procediment

Es descongelen les mostres i se'ls hi afegeix el volum adequat de tampó de càrrega 5X atemperat per a obtenir una concentració final de tampó de càrrega 1X. S'escalfen les mostres a 60°C durant 15 min. A continuació ja es pot dur a terme l'electroforesi.

### **4.2. Electroforesi en SDS PAGE**

El dodecil sulfat sòdic (SDS) és un detergent iònic que s'uneix a les proteïnes i els hi confereix una càrrega negativa, de forma que aquestes proteïnes un cop carregades en el gel corren cap el pol positiu sota l'acció d'un camp elèctric. Així, la seva mobilitat electroforètica depèn només de la seva grandària o pes molecular.

## Material

- Gel concentrador. Conté un 4% d'acrilamida i serveix per alinear les proteïnes. Es prepara amb:

520 µl solució que conté 30% acrilamida, 0,8% bisacrilamida

500 µl TRIS-HCl 1M a pH 6,8

40 µl SDS 10%

2,74 ml aigua destil·lada

200 µl persulfat amònic al 3,5% en aigua destil·lada

4 µl TEMED

- Gel separador. Permet separar les proteïnes en funció del seu pes molecular.

### Gel separador

1,5 o 2,4 ml solució que conté 30% acrilamida, 0,8% bisacrilamida en funció de si es prepara un gel del 7,5 o 12% d'acrilamida.

1,12 ml TRIS-HCl 1M a pH 6,8

60 µl SDS 10%

3,12 o 2,22 ml aigua destil·lada en funció de si el gel és del 7,5 o 12%

200 µl persulfat amònic al 3,5% en aigua destil·lada

4 µl TEMED

- Tampó d'electroforesi (1X)

25 mM TRIS

0,2 M glicina

0,1% SDS

- Estàndard de pes molecular. Utilitzem l'estàndard pretenyit d'ampli rang de Bio-Rad® amb marcadors de pes molecular que oscil·len des de 7,5 kDa a 250 kDa.

- Sistema per electroforesi Mini-Protean 3 Bio-Rad®

- Placa tèrmica

### Procediment

Normalment es carreguen entre 10-30 µg de proteïna de cada mostra en funció de l'anticòs que utilitzem. Abans de carregar les mostres, les escalfem a 37°C a la placa tèrmica durant 10-15 min. Preparem els vidres sobre el seu suport i preparem el gel separador tal i com hem esmentat anteriorment. L'aboquem entre els dos vidres deixant uns 2 cm a la part superior dels vidres pel gel concentrador. Afegim aigua destil·lada fins a dalt per afavorir que polimeritzi de forma recta. Un cop aquest gel ha polimeritzat descartem l'aigua que el cobreix i hi aboquem el gel concentrador. Ràpidament hi col·loquem la pinta per formar els pous i la retirem un cop polimeritzat el gel. A continuació muntem l'aparell per a córrer el gel, l'omplim amb tampó d'electroforesi i ja es poden carregar les mostres i el marcador de pes molecular. Llavors connectem la font a la corrent i correm primer 5 min. a 100 V per alinear el front i seguidament 45 min. a 200 V.

### **4.3. Transferència de proteïnes**

#### Material

- Tampó de transferència

20 mM TRIS

6 mM acetat sòdic

1 mM EDTA  
0,02% SDS

- Sistema mini protean 3 Bio-Rad®
- Membrana de nitrocel·lulosa de porus 0,45 µm
- Paper de filtre Whatman 3MM

### Procediment

Tallem un tros de membrana i sis trossos de paper Whatman de forma rectangular i de les mides del gel i ho cobrim amb tampó de transferència. Seguidament realitzem el muntatge per a la transferència dins la cubeta amb tampó de transferència col·locant en primer lloc l'esponja, sobre el suport pel sandvitx, a continuació posem tres papers Whatman i a continuació hi col·loquem el gel. En aquest punt cal situar la membrana sobre el gel evitant la formació de bombolles, la formació de les quals impediria una transferència correcta. Ara ja podem col·locar els altres 3 papers Whatman, l'esponja i ja podem tancar el suport del sandvitx. Ho posem a la cubeta per a realitzar la transferència, el connectem a un amperatge constant de 250 mA i ho deixem córrer 1 h submergit tot el muntatge en gel.

### **4.4. Immunodetecció**

La immunodetecció és un procediment que es basa en la detecció indirecta de la interacció entre un antígen i un anticòs primari. Aquesta interacció es detecta mitjançant la reacció de la peroxidasa de rave que està conjugada a l'anticòs secundari en afegir el seu substrat, el peròxid d'hidrogen.

### Material

- TBS-T
  - 50 mM NaPO<sub>4</sub> (500 mM, pH 7,5)
  - 150 mM NaCl
  - 0,05% tween-20
- Solució de bloqueig. Conté 5% de llet descremada en pols dissolta en TBS-T.

- Tampó per a diluir l'anticòs primari.

0,1% BSA

50 mM NaPO<sub>4</sub> (500 mM, pH 7,5)

150 mM NaCl

0,05% tween-20

0,01% azida sòdica

- Anticòs secundari (Pierce). És un anticòs de cabra dirigit contra conill i conjugat amb peroxidasa de rave.

### Procediment

Un cop finalitzada la transferència observem que el marcador de pes molecular s'ha transferit correctament i totalment a la membrana. Col·loquem la membrana en una safata i la incubem a temperatura ambient amb solució de bloqueig durant 30-60 min. en agitació. El volum necessari per a les incubacions en aquestes safates de 12 cm per 10 cm és entre 8-10 ml. Un cop finalitzat el bloqueig rentem amb TBS-T dues vegades durant 10 seg. i ho incubem tota la nit en agitació a la cambra freda amb l'anticòs primari tapant la capsa amb paper de plàstic per evitar-ne l'evaporació, alternativament també es pot incubar l'anticòs primari una hora a temperatura ambient. Al dia següent, reciclem o descartem l'anticòs i fem dos rentats amb TBS-T de 10 seg., 2 rentats de 15 min. i 2 rentats de 5 min. amb solució de rentat. A continuació incubem amb l'anticòs secundari diluït 1:5000 en solució de bloqueig durant una hora en agitació a temperatura ambient. L'anticòs secundari és un anticòs dirigit contra el primari. Tornem a realitzar els mateixos rentats que hem fet anteriorment.

### **4.5. Revelat**

El revelat utilitzant el mètode de l'ECL (*enhanced chemiluminescence*) permet visualitzar mitjançant la detecció quimioluminiscent d'antígens específics immobilitzats i conjugats a anticossos marcats amb peroxidasa de rave.

### Material

- Reactiu de revelat ECL (GE Healthcare)

- *Cassette* per a l'exposició de les pel·lícules de radiografia
- Films d'alta sensibilitat (GE Healthcare)
- Màquina de revelat
- Cambra fosca

### Procediment

Es prepara en un tub la solució comercial de revelat, barrejant 5 ml del reactiu A i 5 ml del reactiu B, i ja es pot abocar sobre la membrana. S'incuba 1 min. i seguidament s'agafa la membrana amb compte amb les pinces i s'asseca al màxim tocant amb paper absorbent una punta de la membrana. Després s'embolcalla la membrana amb el plàstic evitant la formació d'arrugues o bombolles. Es col·loca la membrana dins el *cassette* subjectada amb cinta adhesiva i en la cambra fosca ja es pot exposar una pel·lícula de radiografia entre 30 seg. i 10 min. A continuació es revela la pel·lícula. Per a la digitalització de les imatges s'ha utilitzat l'aparell *Gel Doc 2000* (Bio-Rad) i per a l'anàlisi de les densitometries el software *Quantity one* (Bio-Rad).

## 5. Generació d'anticossos policlonals

Aquests anticossos han estat generats contra pèptids sintètics corresponents a la part hidrofílica de les proteïnes: NKCC2, NCC, i aquaporines-1 i -2 conjugades a *keyhole limpet hemocyanin* (KLH) (Taula 1).

**Taula 1.** Característiques dels anticossos utilitzats per a l'immunoblot en aquesta tesi.

Anticòs primari	Pes molecular (kDa)	Concentració (µg/ml)	Dilució immunoblot	Dilució anticòs secundari	Generació original de l'anticòs
NKCC2	161	400	1:2000-1:500	1:5000	Ecelbarger i col. 1996
NCC	110-165	100	1:200	1:5000	Kim i col. 1998
NHE-3	85	200	1:1000	1:5000	Amemiya i col. 1995
AQP-1	29 / 35-40	70	1:1000	1:5000	Terris i col. 1996
AQP-2	28 / 35-40	400	1:2000	1:5000	DiGiovanni i col. 1994

## 6. Purificació d'anticossos policlonals per cromatografia d'afinitat

Utilitzant el kit comercial Sulfolink (Pierce) purifiquem de forma específica els anticossos policlonals que s'han generat en conills després de la immunització utilitzant un determinat pèptid que s'utilitza alhora per a realitzar la purificació. Per a la purificació de cada anticòs es requereix la preparació d'una columna de resina on s'hi conjuga el pèptid utilitzat en la immunització dels conills. A partir d'aquest punt ja es poden purificar els sèrums.

### Material

- Kit Sulfolink (Pierce, ref. 44895)
- PBS desgasificat
- Tampó d'elució Immunopure IgG (Pierce)
- PBS 1X (Gibco)
- TRIS-HCl 1M a pH 8
- Azida sòdica 100 mM
- Tampó d'alta astringència OCEAN
  - 63 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
  - 7 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
  - 0,15 M NaCl
  - 0,01% azida sòdica
  - 0,1% BSA
  - 0,05% Tween 20
  - Ajustar el pH fins a 7,4
- Agitador orbital
- Balança de precisió
- Espectrofotòmetre
- Cubeta de quars
- Bany a 37°C

---

- Reducció del pèptid i equilibrament de la columna de desalament Sulfolink

Es resuspenen 3 mg de pèptid amb el que s'ha immunitzat l'animal en 1 ml de tampó de mostra (Sulfolink) i s'afegeixen a un vial que conté 6 mg de l'agent reductor 2-mercaptoetilamina·HCl. Es deixa a 37°C amb agitació al bany d'aigua durant 1 h i 30 min. Mentrestant, s'equilibra la columna de *desalting*, rentant-la amb 20 ml de tampó d'acoblament. Finalitzada la incubació del pèptid, i ja atemperat a temperatura ambient, s'afegeix el pèptid reduït a la columna de *desalting* que retindrà l'excés d'agent reductor. Seguidament s'afegeixen 3 ml de tampó d'acoblament i es recullen en un vial net les gotes procedents de la columna, ja que contenen bàsicament el pèptid reduït. A continuació, es renta la columna amb 20 ml de tampó d'acoblament amb 0,5% d'azida sòdica 100 mM.

- Acoblament del pèptid a la columna d'acoblament

S'equilibra la columna d'acoblament a temperatura ambient, es col·loca en una proveta, se'n treu el tap superior i a continuació l'inferior de forma que s'elimina el tampó d'emmagatzement. Es renta la columna amb 12 ml de tampó d'acoblament. Quan deixa de degotar es col·loca el tap inferior i s'hi afegeixen els 3 ml de pèptid reduït. Es tapa la columna amb el tap superior i s'agita amb l'agitador orbital durant 15 min. Llavors es deixa reposar la columna 30 min. sense agitació. Es treuen els taps superior i inferior de la columna i en un tub nou es recull el pèptid que no s'hagi unit a la columna. Es renta la columna amb 6 ml de tampó d'acoblament.

- Bloqueig de les unions inespecífiques del gel

Es posa el tap inferior a la columna i s'hi afegeix una solució de L-cisteïna-HCl 0,05 M de Sulfolink en 2 ml de tampó d'acoblament. Es torna a tapar i s'agita tal i com s'ha fet amb el pèptid. Finalment, es renta la columna amb 12 ml de solució de rentat Sulfolink i 12 ml de PBS desgasificat amb 1 mM d'azida sòdica. A continuació, es tapa la columna amb el tap inferior i s'hi afegeixen 2 ml més de PBS desgasificat. Es



col·loca una volandera a la columna, i amb l'ajuda d'un èmbol s'empeny fins que toqui el gel. En aquest punt ja es troba la columna preparada per a la purificació de l'anticòs.

- Purificació dels anticossos per afinitat a partir de sèrum de conill

Mentre s'equilibra la columna amb 6 ml de PBS, s'agafen 2 ml de sèrum de l'animal immunitzat i es dilueixen amb 2 ml de PBS. S'apliquen 1,7 ml del sèrum diluït a la columna i s'observa que el gel vira de color blanc a groc – rosat quan el sèrum entra en contacte amb el gel. Es col·loca el tap inferior i s'afegeixen 0,3 ml més de sèrum i es torna a tapar. S'incuba durant 15 min. sense agitació. Es treu una altra vegada el tap superior i l'inferior i s'hi apliquen 1.7 ml més de sèrum. Es repeteix el mateix procés. Es renta la columna amb 6 ml de PBS, 12 ml d'OCEAN i 8 ml més de PBS. Es marquen 8 tubs de 15 ml del 0 al 7 i es col·loquen en gel. S'hi afegeixen 200 µl de tampó TRIS a pH 8,1 per a neutralitzar el pH àcid de la solució d'elució. A continuació es posa 1 ml de tampó d'elució a la columna i es recull al tub 1, es posa un altre ml a la columna i recollim el tampó al tub 2 i així successivament fins a arribar al tub 7. Al tub 0, s'hi afegeix directament tampó d'elució. Es col·loquen tots els tubs en gel i ja se'n pot mesurar l'absorbància a 280 nm. Per a calcular la concentració d'IgGs s'aplica la següent fórmula:

$$[ \text{IgG } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) ] = \frac{\text{Abs } 280\text{nm}}{\epsilon} * \text{fD}$$

**fD** = Factor de dilució

**ε** = Factor de correcció (1,44)

S'afegeixen a cada tub 10 µl d'azida sòdica i 1 ml de glicerol i es pot guardar aquest anticòs ja purificat en alíquotes a – 20°C. D'altra banda es pot regenerar la columna rentant-la amb 6 ml de PBS desgasificat amb 0,05% d'azida sòdica.

## 7. Purificació de l'RNA

La manipulació de l'RNA requereix unes precaucions espacials degut a que les RNases són uns enzims molt estables, termo-resistents i difícils d'inactivar, que en quantitats ínfimes són capaços de degradar l'RNA. Les RNases es troben presents en els fluids corporals (saliva, suor), a les superfícies del laboratori exposades a l'ambient en general (superfícies fàcilment contaminades per espores de fongs i bacteries a part de cèl·lules mortes de la pell humana), a les mostres amb les que es pretén treballar (RNases endògenes), en el talc dels guants del laboratori, etc. Per tot això, és necessari treballar amb guants sense talc, amb material apartat pel treball amb RNA, amb superfícies descontaminades i amb material específicament lliure de RNases sempre que sigui possible.

L'RNA total obtingut després de la purificació està format majoritàriament per RNA ribosomal (80-85%), RNA de transferència (10-15%) i RNA missatger (1-5%). L'RNA ribosomal està format per les subunitats 28S (3808-6333 bases), 18S (1898-1976 bases) i 5S (~120 bases).

### Material

- TRIZOL<sup>®</sup> (Invitrogen, ref. 15596-018)
- *Eppendorfs* lliures d'RNAsas
- RNase AWAY<sup>®</sup> (Invitrogen, ref. 10328-011)
- Morter (Vidrafoc, ref. 1279/7)
- Mà de morter (Vidrafoc, ref. 1280/7)
- Nitrogen líquid (N<sub>2</sub>) (mín. una bombona plena)
- Espàtules i pinces esterilitzades
- Xeringues i agulles (de 19, 21 i 23 gauges)
- Cloroform
- Centrifuga per a *eppendorf* refrigerada (4°C, 12000 x g)
- Isopropanol
- Etanol 75%

- Espectrofotòmetre
- Cubeta de quars

### **7.1. Homogeneïtzació del teixit**

Es renta el morter i la mà de morter, primer amb sabó, seguit d'aigua i etanol. S'agafen les espàtules esterilitzades i es fan lliures d'RNAsas tractant-les amb RNase AWAY<sup>®</sup>, solució que es deixa actuar 10 min. i després es renta amb abundant aigua destil·lada. Es prepara sobre la taula una safata a sobre la qual s'hi posa paper d'alumini i després el morter. Es preparen tubs de 50 ml on es posarà el teixit pols. Es tara el primer tub que s'utilitzarà i es deixa la balança tarada. Es posa N<sub>2</sub> dins el morter i s'espera fins que es suavitzca la seva ebullició. També se'n posa una mica en el tub tarat. Es treuen els teixits de -80°C i es deixen en N<sub>2</sub>. S'agafa el teixit i es posa en el morter amb una mica de N<sub>2</sub>. Es donen cops secs amb la mà de morter i quan es troba bastant trossejat, es va fent rodar la mà de morter fins aconseguir pols fina (Important: sempre amb N<sub>2</sub>). Després es decanta al tub tarat amb l'ajuda d'una espàtula. Un cop decantat tot el teixit i evaporat el N<sub>2</sub> es pesa el tub ràpidament i s'hi afegeix 1 ml de TRIZOL per aproximadament cada 100 mg de teixit (millor que hi hagi més TRIZOL que menys) sota la campana i s'homogeneïtza bé amb la pipeta. Es passa per agulles de diferents diàmetres amb una xeringa per acabar de disgregar totalment el teixit i llavors ja es pot guardar a -80°C fins que s'hagi d'extreure l'RNA de la mostra.

### **7.2. Extracció de l'RNA**

Existeixen una gran varietat d'alternatives per a l'extracció d'RNA a partir de diferents mostres. En el nostre cas utilitzem el protocol del reactiu TRIZOL, que és el que s'utilitza al nostre laboratori i és un mètode que permet obtenir gran quantitat d'RNA.

Es posa la centrífuga a 4°C i es treuen les mostres de -80°C deixant-les 5 min. a temperatura ambient. S'afegeixen 0,2 ml de cloroform per cada ml de TRIZOL utilitzat.

Es tanquen els tubs amb compte i s'agiten per inversió vigorosament durant uns 15 seg. Es deixen reposar 3 min. a temperatura ambient. A continuació es centrifuguen les mostres a 12.000 x g durant 15 min. a 4°C. Un cop finalitzada la centrifugació s'observen 3 fases. S'agafa la fracció aquosa (capa superior) tot recolzant la pipeta a la paret de l'*ependorf* aspirant lentament intentant no agafar l'interfase. Es transfereix a un altre *ependorf* i s'hi afegeixen 0,5 ml d'isopropanol (per precipitar l'RNA). Es barreja per inversió i es posa 10 min. a -20°C (el fred ajuda a precipitar). Seguidament es centrifuga a 12.000 x g 10 min. a 4°C. Després es decanta el sobrenedant a un contenidor de residus per alcohols i s'afegeixen 2 ml d'Etanol 75% (-20°C). S'agita suaument, només per desenganxar el precipitat. Es centrifuguen 5 min. a 7.500 x g a 4°C i s'elimina el sobrenedant amb la pipeta evitar que caigui el precipitat. Es centrifuga 1 min. a 2.500 x g a 4°C i s'eliminen les restes d'etanol amb una pipeta. Ara ja s'observa l'RNA com un precipitat blanc al fons de l'*ependorf*. Es deixa l'*ependorf* obert perquè s'assequi el precipitat i quan aquest es torna transparent ja es pot resuspendre en 20 – 40 µl d'aigua estèril, en funció de la grandària del precipitat i ja se'n pot mesurar la concentració i qualitat a l'espectrofotòmetre.

### **7.3. Quantificació i valoració de la qualitat de l'RNA mitjançant l'espectrofotòmetre**

Els àcids nucleics presenten un màxim d'absorció a 260 nm, mentre que les proteïnes, possibles contaminants d'una mostra d'àcids nucleics, presenten un màxim d'absorció a 280 nm. La relació entre les absorbàncies a les dues longituds d'ona proporciona informació tant de la integritat com de la puresa de la mostra. La concentració d'RNA pot calcular-se mitjançant un espectrofotòmetre, ja que és proporcional a l'absorbància o densitat òptica (D.O.) de la mostra a una longitud d'ona de 260 nm. Segons el valor de D.O. obtingut a aquesta longitud d'ona s'aplica la llei de Beer-Lambert (veure al procediment).

---

### Material

- Espectrofotòmetre
- Cubeta de quars
- Aigua estèril
- DEPC

### Procediment

Es dilueix 1 µl de mostra en 60 µl d'aigua i es mesura l'absorbància a 260 i 280 nm en una cubeta de quars. La relació DO260/DO280 indica la qualitat de l'RNA i ha de tenir un valor entre 1,6 i 2, mentre que l'absorbància a 260 nm dóna la concentració d'àcids nucleics, utilitzant la llei de Beer-Lambert detallada a continuació:

$$\text{D.O. total } (\mu\text{g/ml}) = \epsilon * 1 * [\text{RNA}]$$

on:

**D.O. total** = D.O. 260 nm \* factor de dilució (1/60).

$\epsilon$  = coeficient d'extinció molar, és a dir, capacitat d'una substància per absorbir radiació electromagnètica. Per l'RNA és: 1 D.O. / 40 µg/ml.

1 (cm) = gruix de la cubeta de medició de l'espectrofotòmetre (normalment 1 cm).

## **8. Northern blot**

### **8.1. Integritat de l'RNA: electroforesi en gel d'agarosa**

L'electroforesi en gel d'agarosa de l'RNA ha de mostrar dues bandes corresponents als RNA ribosòmics 28S i 18S. Si s'observen les bandes difoses o apareixen altres bandes significa que l'RNA està degradat. La relació de la intensitat entre la banda 28S i 18S ha de ser al voltant de 2. Una relació inferior a 2 indica l'existència de degradació de l'RNA, però la qualitat de l'RNA per a realitzar un *Northern blot* es considera acceptable fins a un quocient de 1,5. Un cop corregut el gel

i tenyit amb bromur d'etidi, a part d'observar en el transil·luminador la presència de les dues bandes ribosòmiques es pot fer una densitometria per comprovar-ne la relació.

### Material

- MOPS 10 X
  - 400mM MOPS
  - 100mM Acetat sòdic (pH 5.2, 3M)
  - 10mM EDTA (0.5M, pH 8)
  - Ajustar el pH a 7
  - Filtrar-ho amb porus de 0.45 µm i guardar-ho protegit de la llum
- Formaldehid
- Gel d'agarosa 1,2%, 5% formaldehid / MOPS
- Tampó de càrrega (2X)
  - 50% glicerol
  - 1 mM EDTA (0,5M, pH 8,0)
  - 0,4% blau de bromofenol
  - 0,4% xilen cianol
- Solució diluïda de bromur d'etidi (1 µg/ml)
- Sistema per electroforesi, pinta, cubeta (Bio-Rad)

### Procediment

S'agafa paper d'alumini i un tub de 15 ml i s'hi afegeix:

- 2,5 ml MOPS 10 X
- 1,25 ml Formaldehid

Es col·loca el tub tapat amb paper d'alumini a l'estufa a 55°C. Mentrestant es prepara el gel d'agarosa a l'1,2% en aigua estèril. Per a dissoldre l'agarosa es posa al microones vigilant que no bulli. Un cop dissolta ja es pot treure i es posa a l'estufa a 55°C, així s'anirà refredant poc a poc i també s'evitarà la solidificació del gel. Es barreja a la campana el contingut del tub de 15 ml i l'agarosa que estan a l'estufa a 55°C. Ràpidament es posa al portagels amb les pintes i es deixa polimeritzar. Mentrestant, es treuen les mostres d'RNA de -80°C i es posen en gel perquè es vagin descongelant. Es calcula el volum que s'ha de posar de la mostra d'RNA per tal de

carregar 1 µg d'RNA i el volum que s'ha d'afegir d'aigua (fins a 8 µl). Primer s'afegeix l'aigua, a continuació 2 µl del tampó de càrrega i per últim l'RNA (volum total 10 µl). Es posen les alíquotes al bany sec a 75°C durant 10 min. i després en gel. Es treu la pinta del gel amb compte i es col·loca el gel a la cubeta d'electroforesi amb el tampó MOPS (1X). Es carreguen les mostres als pous. Es posa la font a 65 V (voltatge constant) durant unes 2,5 hores i després es tenyeix amb solució de bromur d'etidi diluïda a 1 µg/ml durant 15 min. Es destenyeix el gel posant-lo 1 h amb aigua i posteriorment es fa una foto per comprovar que la relació de la intensitat entre la banda 28S i 18S sigui aproximadament de 2.

## 8.2. Selecció de sondes

En el nostre cas ens vam basar en la bibliografia (Becker i col. 2003) per a l'elecció dels encebadors per a la síntesi de la sonda per a detectar l'mRNA de *NKCC2*. En la taula 2 s'adjunta el número d'accés del Genbank per obtenir la seqüència del gen utilitzada per a la selecció dels encebadors, així com els encebadors utilitzats en la reacció de PCR.

**Taula 2.** Sonda utilitzada per a la realització del *Northern blot*.

Proteïna	Gen	Codi Genbank	Encebador 5' → 3'	Mida amplicó
<b>NKCC2</b>	<b>SLC12A1</b>	BC087017	Fw: GAG GAA AAA TCA ACC GCA TTG Rv: CAC GCC ATG TAC AAC AAA TC	382 nt

Fw = *forward* o directe

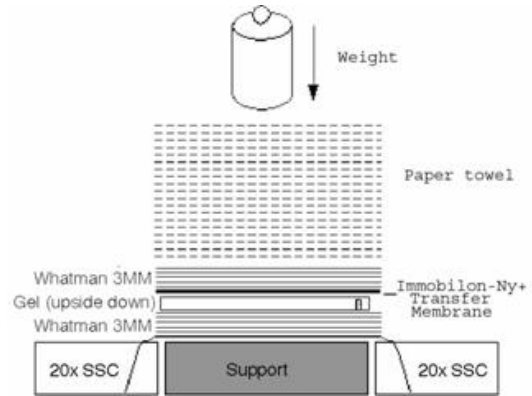
Rv = revers

**Pel marcatge de les sondes per PCR (veure apartat 9.2)**

### 8.3. Transferència

#### Material

- Membrana de *nylon* carregada positivament (S & S)
- 1 Vidre (suport per la transferència)
- Paper Whatman (3MM)
- Estufa 80°C
- 20X SSC (Solució de transferència)
  - 3 M NaCl
  - 0,3 M Citrat de trisodi
  - Ajustem el pH a 7



#### Procediment

Es talla un tros de membrana de *nylon* de les mateixes dimensions que el gel i es submergeix en aigua. Es posa el gel en 200 ml d'aigua en una safata durant 1 h i aproximadament 10 min. abans de fer la transferència es posa en tampó de transferència (20X SSC). Es tallen unes 20 fulles de paper de filtre i 2 trossos de paper Whatman 3MM de les dimensions del gel. També es talla un tros de paper Whatman 3MM d'amplada que arribi a contactar amb la solució de transferència des del vidre i d'allargada de les dimensions del gel. Per al muntatge es col·loca en primer lloc 1 tros de paper Whatman, prèviament submergit en 20X SSC, sobre el vidre, seguidament es col·loca el tros llarg de Whatman i es submergeix amb 20X SSC (un volum proporcional de 20 ml per 100 ml de gel). El gel es col·loca cara avall sobre el paper Whatman, es marca i es treuen les bombolles. S'envolta el gel amb abundant plàstic i es cobreix tota la safata per evitar l'evaporació de la solució de transferència. Es posa la membrana sobre el gel, es marca i se'n treuen també les bombolles. Es col·loca l'altre tros de paper Whatman sobre la membrana i s'hi col·loquen força papers de filtre. Finalment es disposa a sobre de tot el muntatge un vidre que cobreixi la superfície dels papers de filtre i un pes d'1kg aproximadament i es deixa transferint



tota la nit. Al dia següent es desmunta la transferència i es fixa l'RNA a la membrana posant-la al forn a 80°C durant 1h.

#### 8.4. Hibridació

##### Material

- Solució d'hibridació (50% solució Formamida)
  - 50% formamida
  - 4X SSC
  - 0.1% N-lauroysarcosine
  - 0.02% SDS
  - 2X solució bloquejant 10X (Roche)
- 2X SSC, 0.1% SDS
- 0.1X SSC, 0.1% SDS
- Segellador de bosses
- Sonda marcada amb digoxigenina (DIG) (Roche)

##### Procediment

S'utilitzen entre 40 i 50 ml de solució d'hibridació per membrana. S'escalfa la solució d'hibridació a la temperatura de fusió (*Temperature of melting (T<sub>m</sub>)*) que és particular de cada sonda (en el nostre cas 65°C). Es posen uns 25 ml a la bossa amb la membrana i s'incuba de 30 min. a 1 h en agitació a 65°C.

$$T_m = 49,82 + 0,41 (\%G+C) - (600/l)$$

l= longitud de l'híbrid en pb

T<sub>m</sub> NKCC2=65°C

Es desnaturalitza la sonda marcada amb DIG 5 min. a 95°C i després es posa en gel. S'afegeixen 2 µl de sonda per ml de solució de prehibridació escalfada. Es descarta la solució de prehibridació de la bossa i s'hi afegeix la d'hibridació. Es deixa incubant tota la nit a la temperatura de fusió (65°C). Al dia següent es treu la membrana de la bossa i es guarda la solució d'hibridació en un tub de 50ml a -20°C. Es col·loca la membrana

en una safata i es renta 2 vegades durant 5 min. amb 100 ml de 2X SSC, 0,1% SDS (preescalfada) a temperatura ambient en agitació. Després es renta 2 vegades durant 15 min. amb 100 ml de 0,1X SSC, 0,1% SDS (preescalfat) a 68°C amb agitació constant.

## 8.5. Detecció immunològica

### Material

- Solució bloquejant
  - 1X àcid maleic (Roche)
  - 1X solució de bloqueig (Roche)
- Conjugat anti – DIG – conjugat a AP (Fragments Fab) (dilució 1:10.000) / solució de bloqueig
- 1X solució de rentat (Roche)
- 1X tampó de detecció
- Solució substrat quimioluminiscent 1/100 CSPD\* (Roche) / tampó de detecció
- Paper Whatman 3MM

### Procediment

S'atempera el CSPD a temperatura ambient. Es bloqueja la membrana incubant-la de 30 a 60 min. amb 100 ml de solució bloquejant amb agitació. Es dilueix el conjugat anti – DIG – AP (1:10.000) en solució bloquejant i s'incuba amb la membrana durant uns 30 min. A continuació es renta 2 vegades durant 15 min. amb 100 ml de solució de rentat. Llavors s'incuba amb 2 ml de solució de substrat quimioluminiscent durant 5 min. en una bossa petita sense segellar, ja que amb tan poca quantitat de líquid no arriba a sobreixir. A continuació es segella la bossa amb la membrana humida i s'incuba 15 min. a 37°C per a potenciar la reacció quimioluminiscent. Ara ja es pot exposar de 15 a 30 min. a temperatura ambient en un film i revelar.

\* [disodium 3-(4-methoxy Spiro[1, 2-dioxetane-3, 2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1.3.7]decan]-4-yl)phenyl phosphate] chemiluminescent substrate, C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>ClO<sub>7</sub>PNa<sub>2</sub>.

## 9. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR) i tècniques afins

La reacció en cadena de la polimerasa o PCR (*Polimerase Chain Reaction*) és un mètode *in vitro* per a la síntesi enzimàtica de seqüències definides de DNA. La reacció utilitza dos oligonucleòtids (encebadors) que hibriden a cada una de les dues cadenes complementàries i que flanquegen la seqüència a amplificar. Donat que els productes de l'extensió dels encebadors sintetitzats a cada cicle poden servir com a motlle en el següent cicle, el nombre de còpies de la seqüència a amplificar aproximadament es duplica a cada cicle.

### 9.1. Retrotranscripció: síntesi de DNAc

Un mètode per a analitzar l'expressió d'un determinat gen és detectar el seu RNAm o transcrit. Tanmateix, l'RNA no serveix com a motlle de la reacció de PCR, per tant, és necessari retrotranscriure'l a DNAc. La síntesi de DNAc pot utilitzar com a motlle RNA total o missatger. L'ús de RNAm purificat és útil en el cas de la detecció de gens poc abundants, ja que la proporció d'RNAm en una preparació d'RNA total és aproximadament de l'1%. Els principals enzims utilitzats en la retrotranscripció de l'RNA provenen del virus de la leucèmia murina de Moloney o del virus de la mieloblastosi d'aus. A l'hora d'escollir l'enzim més indicat pel nostre assaig s'han de tenir en compte diversos factors. La reacció guanya en especificitat en augmentar l'astringència, sobretot quan treballem amb seqüències riques en G/C. D'altra banda, l'activitat RNasa H present en alguns enzims degrada específicament els híbrids RNA:DNA, el que pot suposar un problema si la degradació de l'RNA motlle competeix amb la síntesi del DNAc.

La reacció de retrotranscripció requereix d'uns encebadors o *primers*, l'elecció dels quals afecta a la mida i l'especificitat de l'DNAc obtingut. Existeixen tres tipus d'encebadors que poden ser utilitzats per a la retrotranscripció:

- Oligo(dT)<sub>12-18</sub>: s'uneix a la cua de poli(A) endògena de l'extrem 3' dels RNAm dels mamífers. Acostuma a produir DNAc complets (*full-length*).

- Hexanucleòtids aleatoris: s'uneixen a diversos llocs de l'RNA i generen DNAC curts. Són ideals per tal d'evitar estructures secundàries al motlle. A més, transcriuen de forma més eficaç les regions 5' dels RNAm.
- Oligonucleòtids específics: s'uneixen únicament al RNAm d'interès.

### Material

- Kit SuperScript™ II Rnase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase (Invitrogen)  
Enzim SuperScript™ II  
5X First-Strand Buffer  
0,1 M DTT
- dNTPs (10 mM)
- Oligo-dT (500µg/ml)
- Termociclador

### Procediment

Es descongelen les mostres d'RNA en gel. Es treuen del congelador tots els reactius necessaris per a la retrotranscripció, excepte la SuperScript, que és l'enzim de la retrotranscriptasa, que només es traurà en el moment just d'utilitzar-lo. Es posen 1 o 2 µg d'RNA a un tub de PCR i la resta fins a 10,5 µl d'aigua. S'afegeix també 1 µl d'Oligo dT i es col·loca al termociclador 5 min. a 70°C. Després es posa ràpidament en gel i s'hi afegeix 4 µl de tampó 5X, 2 µl de DTT, 1 µl de dNTPs i finalment 1 µl de l'enzim SuperScript. Es tapen els tubs de nou i es barreja bé abans de posar-ho de nou al termociclador a 42°C, 1h.

## **9.2. Marcatge de les sondes per PCR**

El marcatge de les sondes per a la realització del *Northern* vam utilitzar el *kit PCR DIG Probe Synthesis* (Roche, 11.636.090.910), que és un sistema no radioactiu que utilitza la digoxigenina (DIG), un haptè esteroide, per a marcar sondes de DNA per a la realització d'hibridacions tipus *Northern* o *Southern*. Els d'UTPs marcats es poden incorporar fàcilment per la síntesis enzimàtica dels àcids nucleics utilitzant DNA

polimerases i la PCR. La presència de DIG en el DNA fa que corri més lentament en un gel respecte el DNA no marcat. Després de l'amplificació per PCR, la sonda no marcada hauria de ser de la mida esperada, mentre que la sonda marcada hauria de migrar més lentament per la incorporació de les molècules DIG.

### Material

- PCR DIG Probe synthesis kit (Roche, 11.636.090.910)
- Master Mix (2X) (Promega)
  - 50 u Taq/ml
  - Tampó pH=8,5
  - 400 µM dNTPs
  - 3 mM MgCl<sub>2</sub>
- Microcentrífuga
- Termociclador
- Encebadors (Quiagen)

### Procediment

Es descongelen els reactius a utilitzar en gel i s'agiten i centrifuguen abans d'utilitzar. Es prepara el necessari per fer dues PCR, una per obtenir la sonda marcada amb DIG i una altra per obtenir la mateixa sonda però no marcada.

	<b>DIG-labeled (µl/tub)</b>	<b>Control (µl/tub)</b>
H <sub>2</sub> Od estèril	35,25	35,25
PCR <i>buffer</i> + MgCl <sub>2</sub>	5	5
PCR DIG mix dNTPs	5	-
Control dNTP dNTPs	-	5
Enzyme mix (unitats)	0,75	0,75
cDNA (producte PCR)	3	3
Encebadors d + r	5 (mix d-r, 10 µM)	5 (mix d-r, 10 µM)
<b>Total</b>	<b>50</b>	<b>50</b>

Es barregen els reactius i es centrifuguen ràpidament per a concentrar la mostra al fons del tub. Posem els tubs al termociclador:

a 94°C	5min.	} X 30 cicles
a 94°C	45seg.	
a 60°C	1min.	
a 72°C	2min.	
a 72°C	7min.	
a 4°C	∞	

En el nostre estudi tots els encebadors s'han utilitzat a 0,5 µM.

Per a comprovar el marcatge correcte de les sondes es fa un gel d'agarosa i hi posem el marcador de pes molecular, la mostra de sonda no marcada i la mostra de sonda marcada de forma que observarem que la sonda no marcada ens apareix al pes molecular que li correspon, mentre que la marcada ens apareix amb un pes molecular lleugerament superior degut a les molècules DIG que ha incorporat.

## 10. Recol·lecció i processament de mostres d'orina

En els estudis de la sensibilitat a la sal i la cirrosi hepàtica s'ha treballat amb mostres d'orina de 24 hores recollida pels propis pacients en un recipient estèril.

### 10.1. Emmagatzematge

#### Material

Inhibidors de proteases

0,1 mg/ml PMSF

5 µg/ml leupeptina

#### Procediment

A partir de l'orina de 24 hores recollida s'agafen alíquotes de 50 ml a les que s'afegeixen 4,22 ml de la barreja d'inhibidors de proteases i immediatament es guarden a -80°C.

## 10.2. Processament de les mostres d'orina

### 10.2.1. Ultrafiltració

La ultrafiltració és una tècnica que permet concentrar proteïnes que es troben en poca abundància a la mostra original. S'utilitza per a concentrar proteïnes excretades a l'orina i d'aquesta forma es poden detectar per exemple les aquaporines-1 i -2. Malgrat la relativa rapidesa d'aquesta tècnica resulta poc apropiada per a la detecció de proteïnes menys abundants que les aquaporines, com poden ser els transportadors renals de sodi. El fet de concentrar totes les proteïnes presents a l'orina (proteïnes associades a petits fragments de membrana, proteïnes solubles,...) pot dificultar-ne la seva detecció.

#### Material

- Columnes *Amicon Ultra-4 centrifugal filter device*, 10 kDa *cutoff* (Millipore)

#### Procediment

Es descongelen les orines a temperatura ambient. Es realitza una centrifugació a 1000 x g durant 5 min. per eliminar-ne els detritus cel·lulars. S'agafa el sobrenedant i es carrega una quantitat determinada de creatinina a les columnes Amicon. A continuació es centrifuguen aquestes columnes a 4.000 x g durant 15 min. i el volum retingut ja es pot utilitzar per a la realització d'un immunoblot. Carreguem aquestes mostres per creatinina (quantitat de creatinina inicial / volum final retingut).

### 10.2.2. Ultracentrifugació

La ultracentrifugació és un sistema que permet la concentració de petites proteïnes que es troben en poca quantitat en la mostra original. S'ha utilitzat aquesta tècnica per a l'aïllament dels exosomes urinaris i posterior detecció dels transportadors renals de sodi NKCC2 i NCC. Ultracentrifugant s'aconsegueix aïllar una fracció

(exosomes) de totes les proteïnes que s'excreten a l'orina. Això facilita la detecció de proteïnes poc abundants a l'orina (transportadors de sodi) i que es troben als exosomes urinaris, mentre que amb la tècnica d'ultrafiltració es concentren totes les proteïnes excretades a l'orina i això pot resultar en un emmascarament de la proteïna que pretenem detectar.

### Material

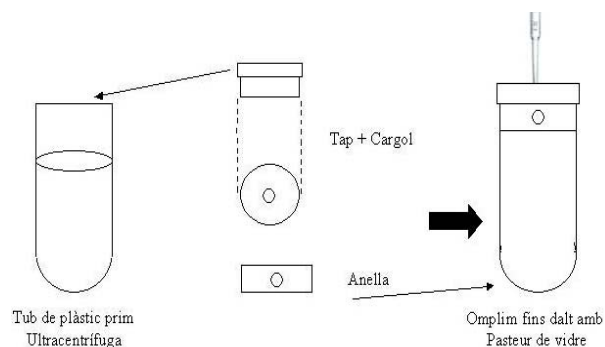
Ultracentrífuga (Ultra Beckman Coulter Optima™ L-90K)

Rotor (TFT 55.38)

Solució d'aïllament

### Procediment

Es descongelen a temperatura ambient les orines i s'agiten amb un vòrtex entre 30 i 60 segons. A continuació es centrifuguen 15 min. a 17.000 x g. S'aspira el sobrenedant amb delicadesa amb una pipeta *pasteur* de vidre i es posa en un tub prim especial per ultracentrifugar. El mecanisme d'aquests tubs és una mica especial:



1. S'omple el tub una mica més de la meitat amb el sobrenedant d'orina (uns 30-35 ml).
2. Es posa el tap sense el cargol petit de dalt.
3. Es col·loca l'anella per sota del tub de forma que quedi l'volandera a baix.
4. S'acaba d'omplir fins a dalt amb més mostra amb una pipeta de punta fina.



Aquests tubs ja omplerts s'equilibren en una balança i llavors ja es poden tapar amb el cargol i col·locar en el rotor TFT 55.38. S'ultracentrifuguen les mostres durant 2 h a 200.000 x g. Passades les dues hores es col·loquen els tubs en gel i cal obrir-los curosament per a evitar-ne la disgregació del precipitat. Es descarta el sobrenedant i es resuspen el precipitat amb la solució d'aïllament amb inhibidors de proteases. En aquest punt ja es pot preparar la mostra per a quantificar-ne la concentració de proteïnes i realitzar-ne l'immunoblot.

### **11. Microscòpia electrònica de transmissió (MET)**

La MET és una de les eines bàsiques per a l'estudi de la ultraestructura de mostres biològiques o materials. Es va utilitzar aquesta tècnica per a l'estudi a nivell ultraestructural de la localització dels transportadors i aquaporines renals que s'han estudiat en aquesta tesi tant en mostra de teixit renal humà com en mostra d'orina.

#### Material

Ultramicròtom (Reichert Ultracut FCS)

Microscopi electrònic (Philips EM208)

Reixes (suport per a la mostra)

Lowicril HM20

Solució fixadora: 4% paraformaldehid (PFA) / 0,1 M cacodilat sòdic

Solució crioprotectora 2,3 M sucrosa

10% gelatina

Acetat d'urinil saturat (7,7%)

Citrat de plom

Solució de preincubació: 0,05 M glicina / 0,1% llet / 0,01 M PBS

Solució de bloqueig: 0,1% llet / 0,01 M PBS

Solució d'anticòs secundari: 1% gelatina de peix / 0,06% polietilè glicol (PEG) / 0,01 M PBS

Anticòs secundari (IgGs de cabra anti-conill conjugades a partícules de 10 nm d'or col·loïdal)

## Procediment

### **11.1. Fixació**

En primer lloc es porta a terme la fixació del teixit que té com a finalitat protegir-lo de qualsevol tractament posterior, com ara la inclusió amb la resina corresponent o el procés de realització dels talls en l'ultramicrotòtom. Es fixa la mostra que es vol incloure amb PFA al 4% de 20 a 25 min. A continuació es renta 5 min. amb tampó 0,1 M cacodilat sòdic.\*

### **11.2. Crioprotecció**

A continuació el teixit es col·loca en un *ependorf* amb una solució 2,3 M de sucrosa durant tota la nit a 4°C per a la crioprotecció de la mostra. La crioprotecció té com a finalitat evitar la formació de cristalls de gel en la mostra en el moment de la descongelació que malmetrien les cèl·lules. L'endemà es poden congelar les mostres en nitrogen líquid per a la seva conservació.

### **11.3. Criosubstitució**

En aquest punt es pot realitzar ja la criosubstitució, que consisteix en el reemplaçament del gel de la mostra per un solvent orgànic i acaba amb la inclusió de la mostra en la resina adequada. En aquest cas s'ha utilitzat la resina acrílica lowicril (HM20) per la seva idoneïtat per a tècniques d'immunolocalització. Aquest pas d'inclusió de la mostra en un bloc sòlid té una importància capdal per a la posterior obtenció de talls ultrafins.

\* Si la mostra a incloure és aquosa cal afegir-hi gelatina a 37°C i deixar-ho solidificar per a poder continuar amb el següent pas.

#### 11.4. Ultramicrotomia

A continuació es tallen seccions ultrafines (uns 80 nm) amb l'ultramicrotòtom que són col·locades sobre unes reixetes i llavors ja es pot realitzar-ne la tinció i l'immunomarcatge.

#### 11.5. Immunomarcatge

En primer terme es preincuben les reixetes i es bloquegen durant 10 min. amb un tampó 0,05 M glicina / 0,1% llet / 0,01 M PBS i seguidament es renten dues vegades durant 5 min. amb 0,1% llet / 0,1 M PBS. A continuació s'incuben amb l'anticòs primari d'interès diluït amb 0,1% llet / 0,01 M PBS tota la nit a 4°C (Taula 3). El dia següent es deixa 1 h a temperatura ambient i es renta dues vegades, tal i com s'ha realitzat anteriorment. Seguidament s'incuba amb l'anticòs secundari diluït amb 1% gelatina de peix / 0,06% PEG / 0,1% llet / 0,01 M PBS durant 2 h. A continuació es renten les seccions primer 3 o 4 vegades amb 0,01 M PBS i llavors 5 vegades amb aigua.

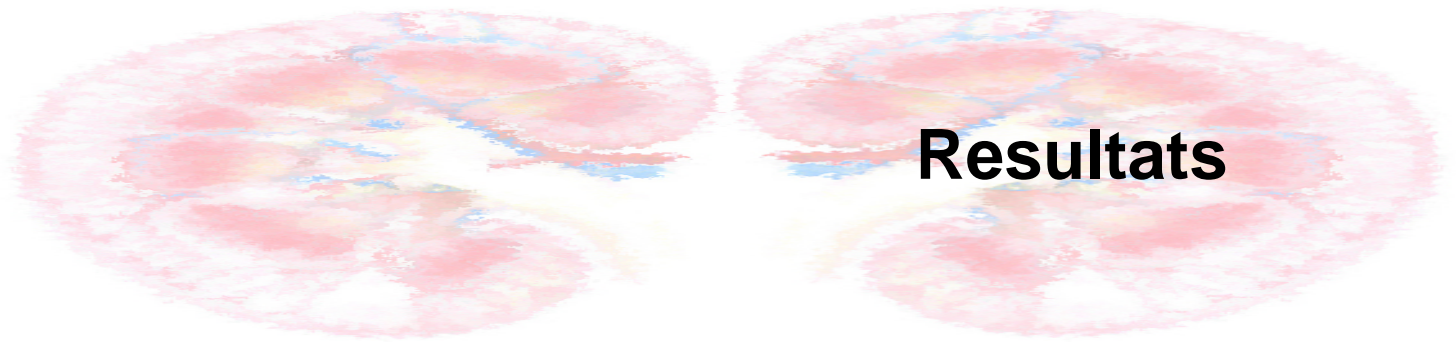
**Taula 3.** Condicions dels anticossos utilitzats en MET

Anticòs primari	Concentració (µg/ml)	Dilució	Dilució anticòs secundari
NKCC2	400	1:25	1:50
pNKCC2	300	1:20	1:50
AQP-1	70	1:20	1:50
AQP-2	400	1:20	1:50
P256-AQP-2	400	1:10	1:50

#### 11.6. Tinció

En aquest pas es tenyeixen les reixes col·locant-les 10 min. sobre una gota d'acetat d'urinil saturat. A continuació es renten les reixes amb 10 gotes d'aigua traient-ne l'excés amb un paper de filtre. Finalment es deixen 10 seg. amb citrat de plom i es renta amb 15 gotes d'aigua. Un cop assecades les reixes ja es poden observar en el MET. Aquest tipus de tinció permet observar les ultraestructures de la

mostra per a poder distingir després de l'immunomarcatge on es localitzen les proteïnes d'interès.



## Resultats



---

## **EXPRESSIÓ DELS TRANSPORTADORS RENALS DE SODI I AQUAPORINES EN UN MODEL EXPERIMENTAL DE RATA D'HIPERTENSIÓ ARTERIAL INDUÏDA PER CICLOSPORINA (Veure article a l'annex)**

### **Efecte de la ciclosporina sobre la PA i caracterització del model animal**

Les primeres dades obtingudes del model animal foren que les rates tractades amb ciclosporina presentaven un increment significatiu de la pressió arterial mitjana de  $20 \pm 8$  mm Hg del dia 1 al dia 6 del tractament en comparació a les rates control ( $8 \pm 6$  mm Hg,  $p < 0,05$ ), tal i com prèviament havia estat descrit en aquest model experimental (Orijj i col. 1998). En segon terme, varem confirmar una vegada finalitzat el protocol experimental que les rates tractades amb ciclosporina desenvolupaven una retenció de sodi (Taula 4 i figura 16). Aquesta retenció no era secundària a les diferències en l'ingesta de sodi, ja que no s'observaren divergències entre les rates control i les tractades en quant a l'aliment ingerit. Al dia 6 de l'experiment, s'observà un balanç de sodi positiu en les rates tractades amb ciclosporina (Figura 16). El balanç d'aigua era positiu als dies 3, 4 i 6 en les rates tractades (Figura 17). No s'observaren diferències en els valors de creatinina sèrica entre els dos grups de rates. Així, tot apuntava a que la disminució en l'excreció de sodi era majoritàriament deguda a un increment en la reabsorció tubular del sodi, i probablement, no per la reducció del filtrat glomerular. No obstant, en aquest treball no s'ha estudiat de forma específica la taxa de filtració glomerular, ja que l'objectiu principal era l'estudi de l'expressió de les proteïnes tubulars transportadores de sodi i aigua. Finalment, al final de l'experiment, les rates tractades amb ciclosporina mostraven una disminució de l'osmolaritat urinària en comparació a les controls (Taula 4).

### **Anàlisi dels nivells d'expressió dels transportadors de sodi i aquaporines**

Nivells d'expressió dels transportadors de sodi del túbul proximal i de la nansa gruixuda ascendent. S'observaren lleugers canvis no significatius entre la quantitat de

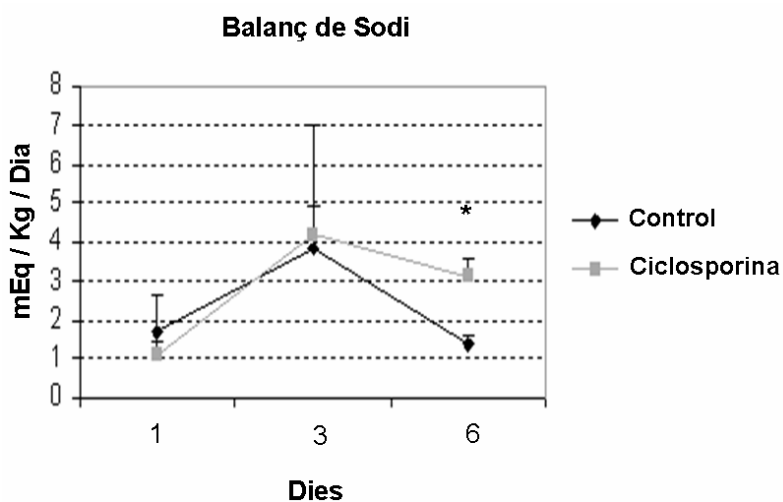
NHE-3 en els ronyons de les rates tractades amb ciclosporina i les controls (Figura 18, taula 5). En canvi, es va detectar un increment estadísticament significatiu en els nivells d'expressió de la proteïna NKCC2 en els ronyons de les rates tractades amb ciclosporina respecte les controls (Figura 18, taula 5).

**Taula 4.** Anàlisi de sang i orina dels animals al dia 6 de l'experiment.

		Control	Ciclosporina
Orina	Na (mmol/l)	227 ± 32	77 ± 22*
	Na (mmol/dia)	1,9 ± 0,1	1,1 ± 0,1*
	Osmolaritat (mOsm/Kg)	1905 ± 356	793 ± 245*
	Diürèsi (ml/dia)	9,8 ± 1,6	18,4 ± 4,9
Sang	Creatinina (µmol/l)	62 ± 0,004	71 ± 0,04
	Osmolaritat (mOsm/Kg)	285 ± 1,4	287 ± 2,4
	Na (mmol/l)	142 ± 0,6	139 ± 0,9*

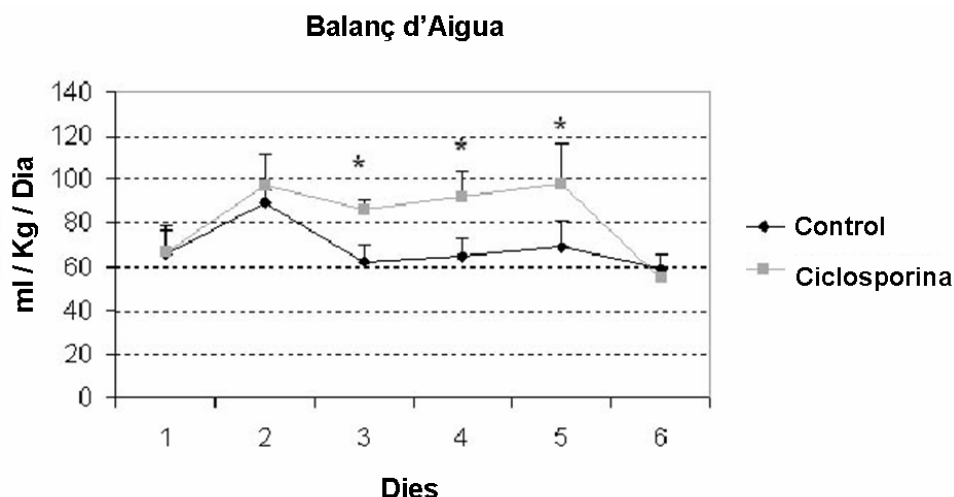
Resultats expressats com a mitjanes ± SEM.

\*P < 0,05 versus rates control.

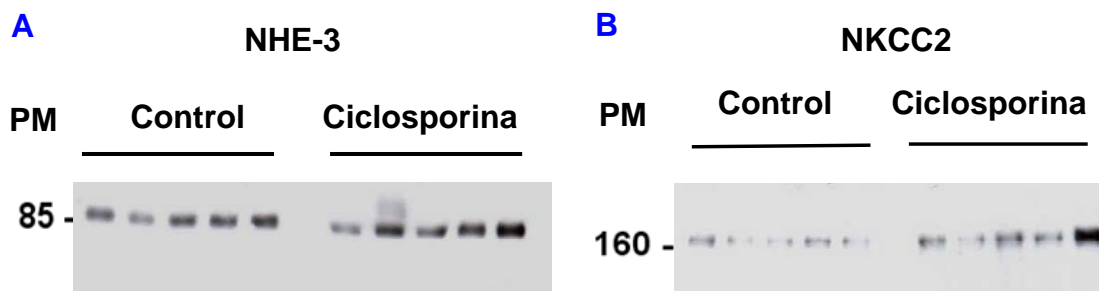


**Figura 16.** Balanç de sodi (sodi ingerit menys sodi excretat en relació al pes de les rates) de les rates control i les tractades amb ciclosporina durant l'experiment. \*P < 0,05.





**Figura 17.** Balanç d'aigua (ingesta d'aigua menys el volum de diürèsi respecte el pes) de les rates control respecte les tractades amb ciclosporina durant l'experiment. \*P < 0,05.



**Figura 18.** (A) Immunoblot per a detectar el transportador NHE-3 en homogeneïtzat total de ronyó de les rates control i les tractades. L'immunoblot fou incubat amb l'anticòs purificat per afinitat anti-NHE-3 (H7656 a una concentració de 0,195 µg/ml) i s'observà una banda de 85 kDa (15 µg de proteïna total foren carregats a cada carril). (B) Immunoblot del NKCC2 en homogeneïtzat total de ronyó de les rates control i les tractades. S'incubà amb l'anticòs purificat per afinitat anti-NKCC2 (L320 a una concentració de 0,12 µg/ml) i s'observà una banda de 160 kDa (20 µg de proteïna total foren carregats a cada carril).

**Taula 5.** Anàlisi densitomètrica dels immunoblots de ronyó dels transportadors de sodi.

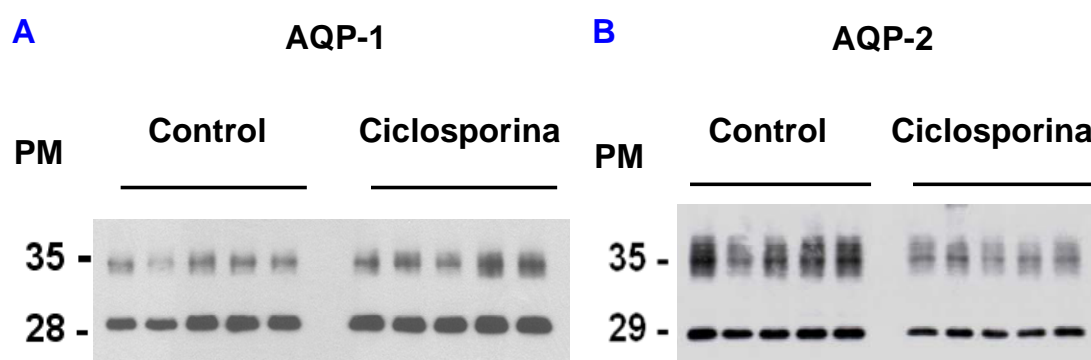
Nom	Localització	Abundància Proteica a les Rates Control	Abundància Proteica a les Rates Ciclosporina
NHE-3	TP	100% ± 9.7%	136% ± 21%
NKCC2	TAL	100% ± 18%	178% ± 36%*

TP, túbul proximal; TAL, nansa gruixuda ascendent

Els valors representen els resultats de les densitats de les bandes expressats com a percentatge de la mitjana dels control.

Resultats expressats com a mitjanes ± SEM. \* p<0.05 versus rates control

Nivells d'expressió de les aquaporines dels túbuls proximal i col·lector. Els immunoblots de les aquaporines mostren dues bandes corresponents a les formes glicosilada i no glicosilada d'aquests canals d'aigua. Nosaltres varem quantificar la suma de les dues bandes per densitometria i en varem normalitzar els valors respecte la mitjana del grup control. La quantitat d'aquaporina-1 es trobava elevada en els ronyons de les rates tractades amb ciclosporina respecte les control (Figura 19 i taula 6). La quantitat d'aquaporina-2, d'altra banda, es trobava disminuïda en les rates tractades amb ciclosporina respecte a les control (Figura 19 i taula 6).



**Figura 19.** (A) Immunoblot per a detectar aquaporina-1 en homogeneïtzat total de ronyó de les rates control i les tractades. L'immunoblot fou incubat amb l'anticòs purificat per afinitat anti-aquaporina-1 (EUB9 a una concentració de 0,033 µg/ml). S'observaren dues bandes: una a 35 kDa que corresponia a la proteïna glicosilada i un altra a 28 kDa corresponent a la no glicosilada (8 µg de proteïna total foren carregats a cada carril). (B) Immunoblot de l'aquaporina-2 en homogeneïtzat total de ronyó de les rates control i les tractades (EUB1 a una concentració de 0,058 µg/ml) en què apareixien dues bandes corresponents a la fracció de proteïna glicosilada i no glicosilada, tal i com succeïa per l'aquaporina-1 (10 µg de proteïna total foren carregats a cada carril).

**Taula 6.** Anàlisi densitomètrica dels immunoblots de ronyó de les aquaporines.

Nom	Localització	Abundància Proteica a	Abundància Proteica a les
		les Rates Control	Rates Ciclosporina
AQP-1	TP	100% ± 6%	119% ± 6%*
AQP-2	TC	100% ± 8%	41% ± %*

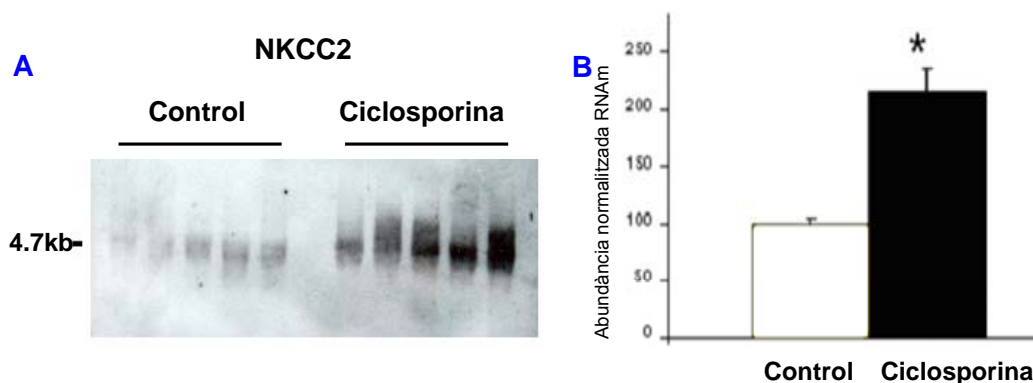
TP, túbul proximal; TC, túbul col·lector

Els valors representen els resultats de les densitats de les bandes expressats com a percentatge de la mitjana dels control.

Resultats expressats com a mitjanes ± SEM. \* p<0.05 versus rates control

## Regulació transcripcional del transportador de sodi de la nansa gruixuda ascendent (NKCC2)

Per estudiar la regulació de l'NKCC2 varem investigar, mitjançant *Northern blot*, els nivells d'expressió de l'RNAm de l'NKCC2 en ronyó tant de les rates control, com les tractades amb ciclosporina. Aquesta anàlisi va identificar una sobre-expressió de més de dues vegades de l'RNAm de l'NKCC2 en el ronyó de les rates tractades amb ciclosporina respecte les control (Rates control  $100\% \pm 6\%$ ; rates tractades amb ciclosporina  $228\% \pm 20\%$ ;  $p < 0.05$ ) (Figura 20).



**Figura 20.** (A) *Northern blot* de RNA total de les rates control i les tractades amb ciclosporina utilitzant sondes fluorescentes per a detectar NKCC2. Es mostra una banda d'unes 4,7 Kb corresponent a l'allargada d'aquest RNAm. (B) Anàlisi densitomètrica que mostra una sobre-expressió significativa de l'RNAm NKCC2 en les rates tractades respecte les control ( $100 \pm 6$  versus  $218 \pm 20$ , respectivament). \*P < 0,05.

---

## **ESTUDI DE L'EXCRECIÓ URINÀRIA DE LES AQUAPORINES-1 I -2 EN PACIENTS AMB CIRROSI HEPÀTICA (Veure article a l'annex)**

### **Característiques demogràfiques i bioquímiques de la població estudiada**

Onze controls sans i trenta-tres pacients amb cirrosi van ser inclosos a l'estudi. A la taula 7 es mostren les variables demogràfiques, les anàlisis de funcionalitat renal i hepàtica i les hormones vasoactives de controls i pacients. Els 33 pacients es van dividir en tres grups: cirròtics sense ascites, cirròtics amb ascites sense insuficiència renal i amb síndrome hepatorenal. En els pacients amb cirrosi tal i com era d'esperar es va observar un progressiu deteriorament de les funcions hepàtiques i renals, a mesura que la malaltia progressava de cirrosi compensada a cirrosi amb ascites sense insuficiència renal fins a síndrome hepatorenal (Taula 7). De la mateixa forma, s'observava una estimulació progressiva del sistema renina-angiotensina-aldosterona, sistema nerviós simpàtic i de la vasopressina, trets característics d'aquesta patologia. Tretze dels trenta-tres pacients (39%), 8 dels quals amb síndrome hepatorenal, presentaven una concentració de sodi en sèrum inferior als valors normals (135 mmol/l), 8 dels quals es podien incloure dins el criteri d'hiponatrèmia (sodi en sèrum igual o menor a 130 mmol/l). Resultava interessant el fet que els pacients amb hiponatrèmia havien estat hiponatrèmics durant un període relativament llarg de temps (amb una mitjana de 49 dies i un rang de 15 a 60 dies).

### **Caracterització dels anticossos anti-AQP-1 i anti-AQP-2 en mostres d'orina**

Especificitat dels anticossos aquaporina-1 i aquaporina-2. Les figures 21A i 22A mostren els immunoblots carregats amb mostra d'orina d'un individu control per a detectar les aquaporines-1 i -2 respectivament. Per testar l'especificitat dels anticossos anti-aquaporina-1 i anti-aquaporina-2 es van fer experiments de competència on es va veure el desplaçament de la senyal, fet indicatiu de la funcionalitat d'aquests

anticossos a l'orina (Figures 21B i 22B). Les figures 21C i 22C mostren la relació lineal entre la densitat de les bandes corresponents a l'aquaporina-1 i l'aquaporina-2 urinàries i la quantitat de creatinina urinària carregada en el gel.

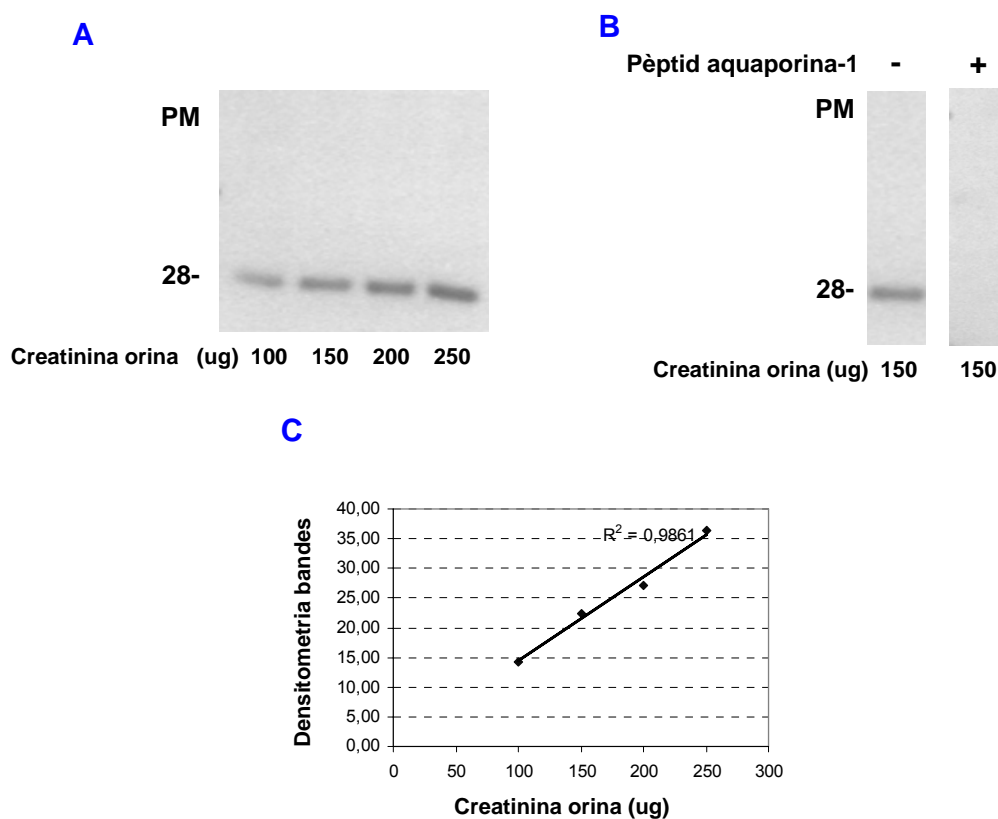
**Taula 7.** Dades demogràfiques, clíniques, bioquímiques i hormonals dels individus sans i pacients amb cirrosi.

	<b>Individus sans</b>	<b>Sense ascites</b>	<b>Ascites</b>	<b>Síndrome hepatorenal</b>
<b>Nombre</b>	11	13	11	9
<b>Edat</b>	58 ± 1,5	62 ± 2,5	55 ± 3,30	59 ± 4,4
<b>Sexe (H/D)</b>	4 / 7	7 / 6	7 / 4	8 / 1
<b>Etiologia: VHC/alcohol/altres</b>	-	10 / 2 / 1	2 / 5 / 4	4 / 2 / 3
<b>Sodi en sèrum (mmol/l)</b>	141 ± 0,8	137 ± 0,8	136 ± 1,6	126 ± 1,9
<b>Osmolaritat sèrum (mOsm/Kg)</b>	292 ± 1,5	287 ± 1,6	283 ± 3,0	279 ± 5,5
<b>Creatinina sèrica (mg/dl)</b>	0,98 ± 0,02	0,82 ± 0,04	0,73 ± 0,06	2,79 ± 0,30
<b>Bilirubina sèrica (mg/dl)</b>	0,6 ± 0,1	1,4 ± 0,2	6,1 ± 2,7	18,4 ± 4,7
<b>Temps de protrombina (%)</b>	90 ± 2	73 ± 3	51 ± 7	33 ± 4
<b>Albumina sèrica (g/l)</b>	42 ± 0,5	34 ± 1,4	29 ± 1,0	21 ± 1,1
<b>Child-Pugh (A/B/C)</b>	-	11 / 2 / 0	1 / 6 / 4	0 / 0 / 9
<b>Vasopressina (pmol/l)</b>	1,15 ± 0,3	1,15 ± 0,2	1,41 ± 0,2	4,19 ± 0,6
<b>ARP (ng/ml-h)</b>	0,4 ± 0,3	0,3 ± 0,1	2,1 ± 1,0	3,7 ± 1,0
<b>Aldosterona (ng/dl)</b>	8 ± 2	13 ± 5	68 ± 27	111 ± 21
<b>Norepineprina (pg/ml)</b>	152 ± 24	229 ± 59	407 ± 69	1001 ± 170
<b>Sodi orina (mmol/l)</b>	117,0 ± 10	68,1 ± 15	22,8 ± 8	16,1 ± 6
<b>Osmolalitat orina (mOsm/Kg)</b>	656,8 ± 47	476,0 ± 67	440,2 ± 70	374,0 ± 40
<b>Diürèsi / dia (ml)</b>	1285 ± 84	1904 ± 256	1272 ± 247	500 ± 89

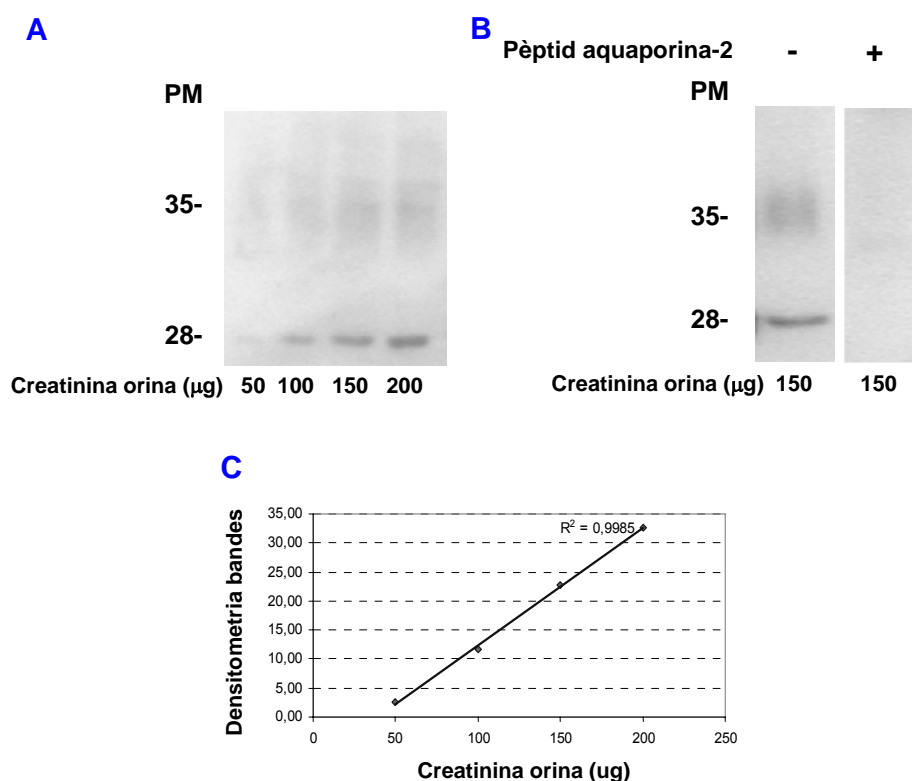
Les dades es mostren com a mitjana ± SEM

H: home; D: dona; ARP: activitat renina plasmàtica; VHC: virus de l'hepatitis C

Proves de restricció i sobrecàrrega d'ingesta d'aigua en un individu sa. La figura 23 mostra un immunoblot de l'aquaporina-2 urinària durant un període de 8 hores de restricció hídrica i durant un període de 8 hores de sobrecàrrega hídrica en un individu sa. L'abundància del canal d'aigua regulat per la vasopressina, l'aquaporina-2, estava incrementada a l'orina durant el període de restricció hídrica en comparació amb el període de sobrecàrrega hídrica. Això indica, tal i com prèviament s'havia demostrat (Agre i col. 2003, Fernandez-Llama i col. 2005), que en condicions fisiològiques l'excreció urinària d'aquaporina-2 pot ser utilitzada com a índex de l'acció de la vasopressina al ronyó.



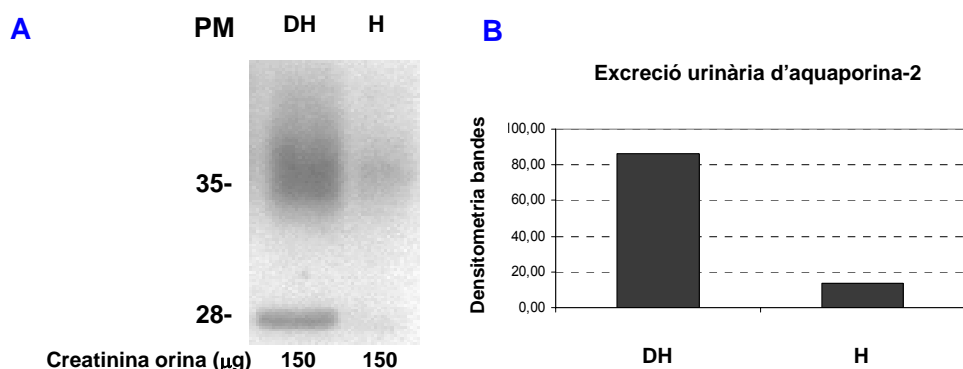
**Figura 21.** (A) Immunoblot de l'aquaporina-1 en orina d'un individu sa. L'immunoblot fou incubat amb un anticòs anti-aquaporina-1 purificat per afinitat (EUB-9 a una concentració de 0,08 µg/ml) i a concentracions creixents de creatinina urinària (100, 150, 200, 250 µg de creatinina carregada per carril). A l'immunoblot s'observa una banda de 29 kDa. (B) Control de preabsorció utilitzant anti-aquaporina-1 incubada prèviament amb el pèptid utilitzat en la immunització per a l'obtenció dels anticòssos. (C) Relació lineal entre la densitat de la banda d'aquaporina-1 urinària i els µg de creatinina urinària carregada en el gel.



**Figura 22.** (A) Immunoblot de l'aquaporina-2 en orina d'un individu sa. L'immunoblot fou incubat amb un anticòs anti-aquaporina-2 purificat per afinitat (EUB-1 a una concentració de 0,8 µg/ml) i a concentracions creixents de creatinina urinària (100, 150, 200, 250 µg de creatinina carregada per carril). A l'immunoblot s'observa una banda a 28 kDa i una banda corresponent a la proteïna glicosilada a 35 kDa. (B) Control de preabsorció utilitzant anti-aquaporina-2 incubada prèviament amb el pèptid utilitzat en la immunització per a l'obtenció dels anticossos. (C) Relació lineal entre la densitat de les bandes d'aquaporina-2 urinària i els µg de creatinina urinària carregada en el gel.

### Excreció d'aquaporina-1 i aquaporina-2 a l'orina

Vàrem analitzar l'excreció urinària d'aquaporina-1 i aquaporina-2 en individus sans. Com a controls entre immunoblots al carril 1 hi posàvem l'individu control que tenia la major excreció d'aquaporina-1 i aquaporina-2 dintre del grup de controls, mentre que al segon carril hi carregàvem el que excretava menor quantitat d'aquestes aquaporines segons resultats previs. Per tant, a tots els immunoblots posteriors amb les mostres dels pacients, també hi carregàvem aquests dos controls. Vàrem utilitzar el control 2 per a la normalització de la densitat de les bandes de les aquaporines ja que en molts immunoblots el control 1 quedava sobreexposat.



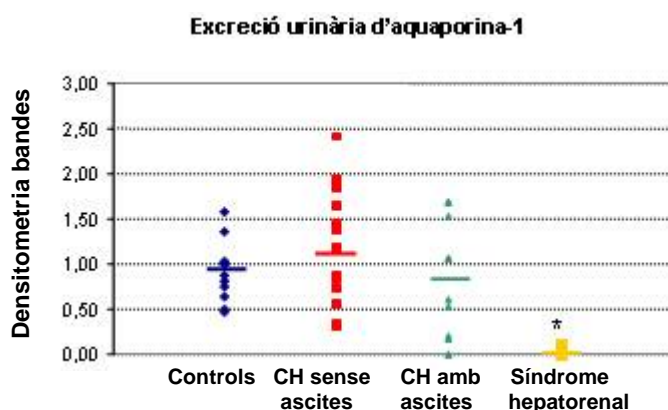
**Figura 23.** (A) Immunoblot de l'aquaporina-2 urinària durant un període de restricció hídrica o deshidratació (DH) de 8 h i un període de 8 h de sobrecàrrega hídrica (H) d'un individu sa. Un total de 150 µg de creatinina urinària foren carregats de cada període i l'immunoblot fou incubat amb l'anticòs purificat per afinitat anti-aquaporina-2 (EUB1 a una concentració de 0,8 µg/ml). (B) Anàlisi densitomètrica de l'excreció urinària d'aquaporina-2 en els períodes de DH i H.

Excreció urinària d'aquaporina-1. En pacients amb cirrosi es van quantificar les bandes corresponents a l'aquaporina-1 per densitometria i es van normalitzar els valors dividint-los pel valor densitomètric del control 2 (el control amb menor senyal d'aquaporina-1). Tal i com s'observa a la figura 24 no hi havia diferències en l'excreció urinària d'aquaporina-1 entre els individus control i els pacients cirròtics amb o sense ascites, mentre que l'excreció urinària d'aquaporina-1 es trobava fortament disminuïda en pacients amb síndrome hepatorenal. L'excreció urinària mitjana d'aquaporina-1 era de  $0,91 \pm 0,10$  en els controls,  $1,18 \pm 0,18$  en els pacients sense ascites ( $p=0,36$  comparant amb els controls),  $0,78 \pm 0,20$  en pacients amb ascites sense insuficiència renal ( $p=0,69$  comparant amb els controls) i  $0,02 \pm 0,10$  en pacients amb síndrome hepatorenal ( $p<0,0001$  comparant amb els controls).

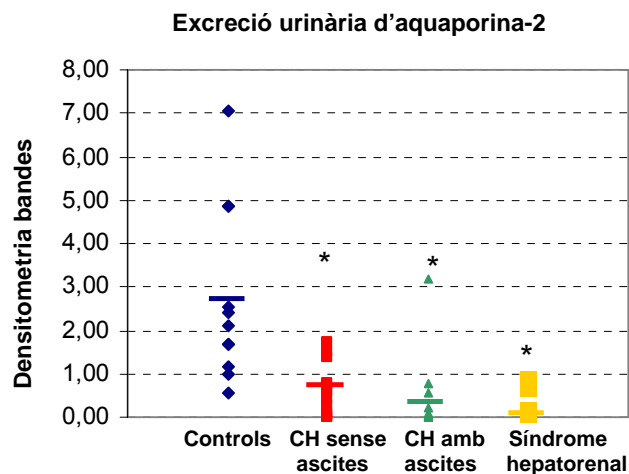
Excreció urinària d'aquaporina-2. En aquest cas es va quantificar la suma de les dues bandes que ens apareixien a l'immunoblot (corresponents a les proteïnes glicosilada i no glicosilada) per densitometria i es va normalitzar el valor dividint-lo per el valor densitomètric del control 2 (control amb menor senyal d'aquaporina-2). L'excreció urinària d'aquaporina-2 estava disminuïda en pacients amb cirrosi respecte els controls sans. Com mostra la figura 25, s'observava una disminució progressiva de



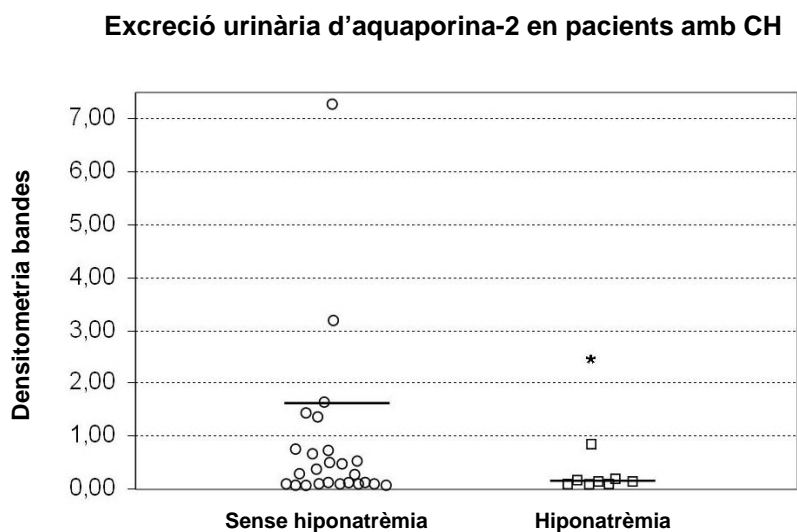
l'excreció urinària d'aquaporina-2 entre els pacients amb cirrosi a mesura que la severitat de la malaltia augmentava des de cirrosi sense ascites a cirrosi amb ascites sense insuficiència renal fins a síndrome hepatorenal. L'excreció urinària mitjana d'aquaporina-2 era de  $2,72 \pm 0,61$  en els controls,  $0,63 \pm 0,18$  en cirròtics sense ascites ( $p=0,0007$  comparant amb els controls),  $0,45 \pm 0,28$  en pacients amb ascites sense insuficiència renal ( $p=0,0004$  comparant amb els controls) i  $0,22 \pm 0,11$  en pacients amb síndrome hepatorenal ( $p<0,0001$  comparant amb els controls). Quan els pacients cirròtics es classificaven segons la concentració de sodi en el sèrum, s'observava que els pacients amb hiponatrèmia (sodi en sèrum igual o menor a 130 mmol/l) presentaven una menor excreció urinària d'aquaporina-2 en comparació als pacients sense hiponatrèmia (figura 26). S'observava també una diferència significativa quan el punt de tall per a considerar hiponatrèmia passava de 130 mmol/l a 135 mmol/l. Considerant tots els pacients, no s'observava una correlació lineal entre els nivells de vasopressina plasmàtica i l'excreció de l'aquaporina-2 en la orina (figura 27), tal i com prèviament ha estat demostrat en rates i humans sans (Agre i col. 2003, Asahina i col. 1995, Fernandez-Llama i col. 2000, Nielsen i col. 1995).



**Figura 24.** Anàlisi densitomètric de l'excreció d'aquaporina-1 en orina de 24 h en individus sans i pacients amb cirrosi classificats en: pacients sense ascites, pacients amb ascites i pacients amb síndrome hepatorenal. \*P < 0,05 comparació als individus sans. CH; cirrosi hepàtica

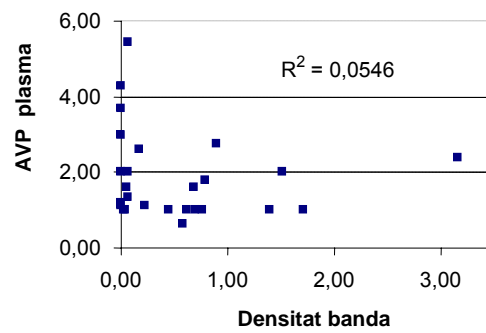


**Figura 25.** Anàlisi densitomètrica de l'excreció d'aquaporina-2 en orina de 24 h en individus sans i pacients amb cirrosi classificats en: pacients sense ascites, pacients amb ascites i pacients amb síndrome hepatorenal. \*P < 0,05 comparació als individus sans. CH; cirrosi hepàtica



**Figura 26.** Excreció urinària d'aquaporina-2 en pacients amb cirrosi classificats segons la presència o absència d'hiponatrèmia. La mitjana dels valors del sodi en sèrum en pacients amb hiponatrèmia (n=8) fou de  $124,0 \pm 1,2$  mmol/l, mentre que en els pacients sense hiponatrèmia (n=25) fou de  $136,8 \pm 0,6$  mmol/l (\*p < 0.05).

**Correlació entre els nivells de vasopressina (AVP) plasmàtica i l'excreció urinària d'aquaporina-2 en pacients cirròtics**

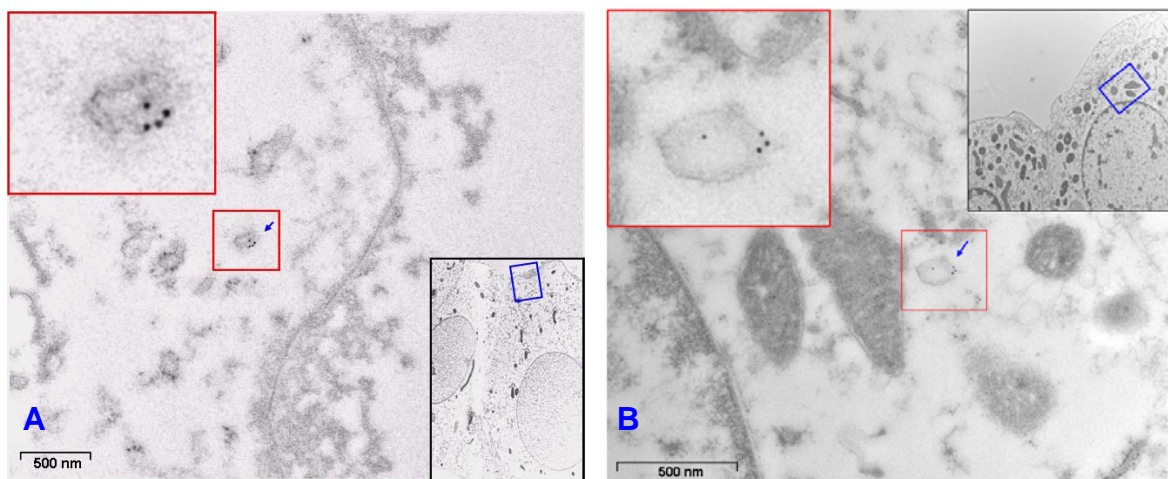


**Figura 27.** Relació entre els nivells de AVP plasmàtica i l'excreció urinària d'aquaporina-2 en tots els pacients amb cirrosi inclosos en l'estudi.

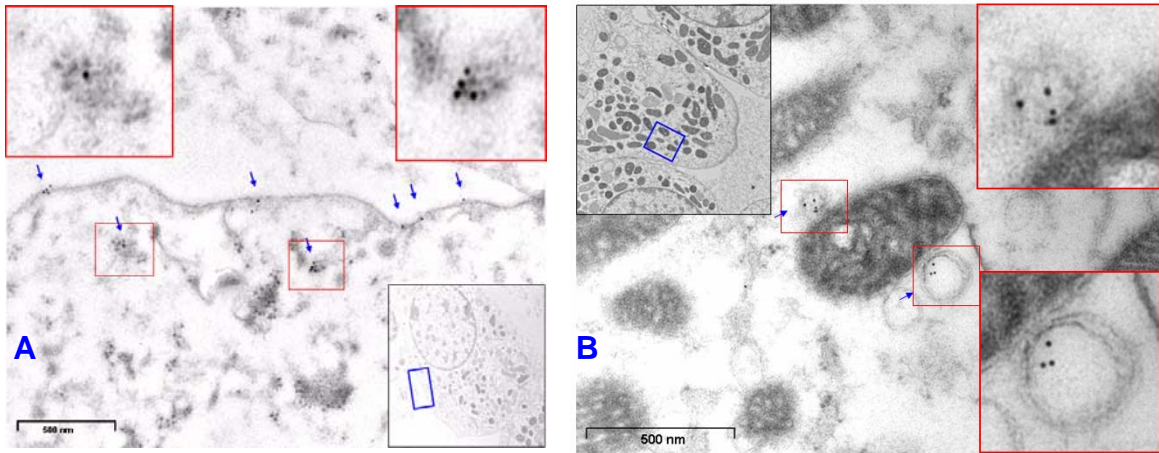
## LOCALITZACIÓ ULTRAESTRUCTURAL DELS TRANSPORTADORS DE SODI I AQUAPORINES EN RONYÓ HUMÀ I EXOSOMES URINÀRIS

### Immunolocalització dels transportadors renals i aquaporines en ronyó humà

A partir de teixit renal humà es va realitzar la immunodetecció de les proteïnes aquaporina-1, aquaporina-2 i NKCC2. A més, es van estudiar les formes fosforilades pNKCC2 i l'aquaporina-2-p256, que semblen tenir una funció important en el transport de la proteïna a la membrana apical (Christensen i col. 2000). S'observà en diferents seccions d'un mateix ronyó humà la presència d'unes estructures, que es podien correspondre als cossos multivesiculars, que contien vesícules al seu interior, tot i que amb un nombre força reduït. En diversos casos, fins i tot, podien contenir només una sola vesícula. S'observaren totes les proteïnes, excepte l'aquaporina-1, dins d'aquestes estructures (Figures 28 i 29). Tanmateix i tal com era d'esperar es va descriure la presència d'aquaporina-1 a les membranes apical i basolateral de les cèl·lules proximal, així com a la vora en raspall característica d'aquestes cèl·lules. L'aquaporina-2 s'observava, a banda de a les vesícules intracel·lulars, a la membrana apical de les cèl·lules del túbul col·lector i l'NKCC2 es detectava en abundància a la membrana apical de les cèl·lules de la branca gruixuda ascendent (Figura 29).



**Figura 28.** Immunolocalització de l'aquaporina-2 (A) i l'aquaporina-2 pS256 (B) en vesícules intracel·lulars en les cèl·lules principals del túbul col·lector de ronyó humà. El quadrat vermell mostra una ampliació de la vesícula intracel·lular, mentre que el quadrat negre mostra el tipus cel·lular d'on s'ha obtingut la imatge.

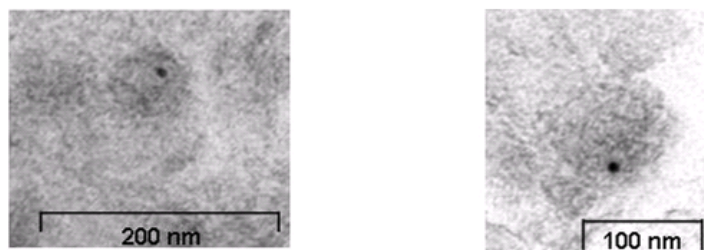


**Figura 29.** Immunolocalització del NKCC2 (A) i pNKCC2 (B) en vesícules intracel·lulars en les cèl·lules epitelials de la nansa gruixuda ascendent de ronyó humà. En la figura A també es pot apreciar la localització apical d'aquest transportador. El quadrat vermell mostra una ampliació de la vesícula intracel·lular, mentre que el quadrat negre mostra el tipus cel·lular d'on s'ha obtingut la imatge.

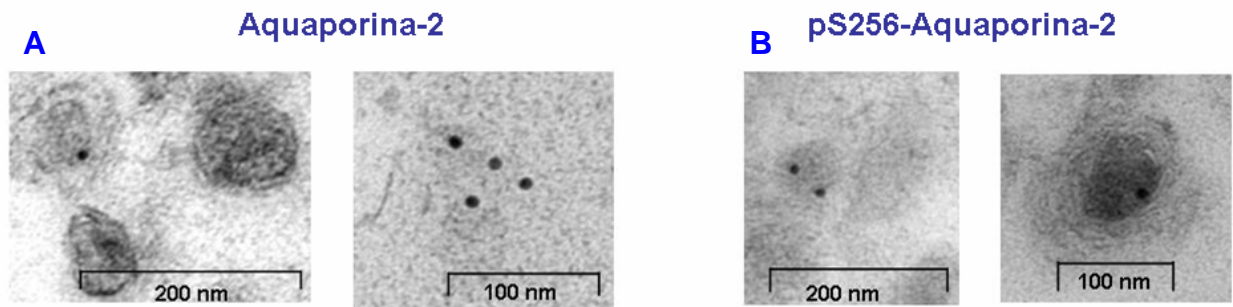
### Immunolocalització de les proteïnes renals a l'orina ultracentrifugada

A partir de mostra d'orina humana ultracentrifugada tal i com ja havien realitzat Pisitkun i col. (2004) es va realitzar la immunodetecció de les proteïnes aquaporina-1, aquaporina-2, aquaporina2-p256, NKCC2 i pNKCC2. A partir del sediment obtingut de la ultracentrifugació (200.000 x g, 2h) es va portar a terme l'immunomarcatge pels diferents transportadors de sodi i aquaporines renals i s'observà la presència d'aquestes proteïnes, inclosa l'aquaporina-1, associades a vesícules menors a 100 nm que podrien correspondre a exosomes urinaris (Figures 30, 31 i 32). Aquests exosomes presenten una morfologia força variable, tal i com ja havien observat Pisitkun i col. (2004).

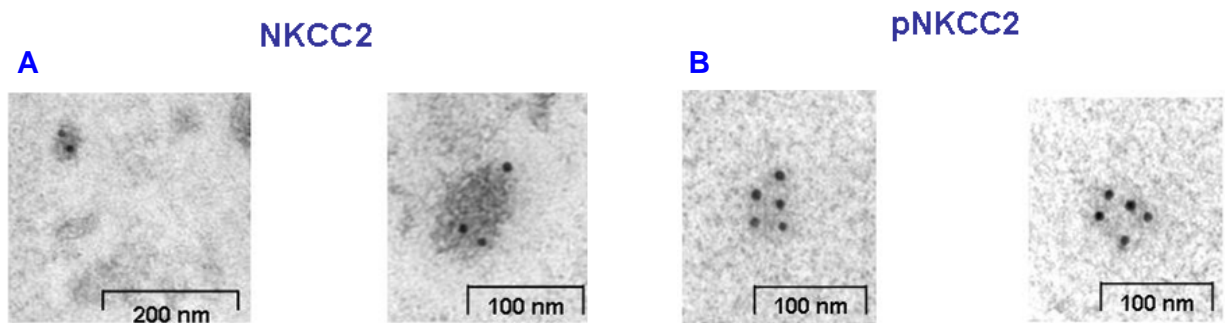
### Aquaporina-1



**Figura 30.** Immunomarcatge de l'aquaporina-1 en exosomes urinaris obtinguts per ultracentrifugació d'orina humana.



**Figura 31.** Immunomarcatge de l'aquaporina-2 (A) i l'aquaporina-2 pS256 (B) en exosomes urinaris obtinguts per ultracentrifugació d'orina humana.



**Figura 32.** Immunomarcatge del NKCC2 (A) i del pNKCC2 (B) en exosomes urinaris obtinguts per ultracentrifugació d'orina humana.

---

## **EXCRECIÓ DELS TRANSPORTADORS RENALS DE SODI NKCC2 I NCC EN EXOSOMES URINARIS DE PACIENTS HIPERTENSOS EN RELACIÓ AMB LA INGESTA DE SAL**

### **Característiques demogràfiques, bioquímiques i dades de la monitorització ambulatoria de la pressió arterial (MAPA) de la població estudiada**

En aquest estudi es van incloure inicialment 52 pacients que presentaven una HTA lleu-moderada sense tractament farmacològic i sense cap patologia que pogués alterar-ne el balanç hidrosalí. Aquests van realitzar durant una setmana una dieta pobra en sal i posteriorment durant una altra setmana una dieta rica en sal. Al final de cada període es va realitzar una anàlisi de sang, una MAPA i una recollida d'orina de 24h. Els pacients que presentaven infeccions urinàries en el moment de la recollida d'orina foren descartats. També es van descartar els pacients que no havien realitzat correctament ambdues dietes: aquells que (1) no presentaven un augment de més del doble de l'excreció del sodi urinari en la dieta rica en sal respecte a la pobra en sal i (2) el valor màxim acceptat de sodi en orina durant la dieta pobra en sal era de 100 mmol/24h. En conseqüència es van excloure onze pacients, essent 41 el nombre final de pacients inclosos en aquest estudi: 20 dones (48,8%) i 21 homes (51,2%); edat mitjana  $51 \pm 16,00$  anys; índex de massa corporal  $27,15 \pm 3,81$  kg/m<sup>2</sup>. En quant a l'estudi hormonal, tal i com era d'esperar, es va detectar un augment significatiu dels nivells de l'activitat de la renina plasmàtica (ARP) i de l'aldosterona com a conseqüència de l'activació del sistema renina-angiotensina-aldosterona al restringir la ingesta de sal a la dieta (Taula 8). L'activació d'aquest sistema estimula alhora el sistema simpàtic afavorint l'alliberació de noradrenalina, tal i com es va observar al final del període amb la dieta pobra en sal (Taula 8). Les dades obtingudes de la MAPA de 24h en els dos períodes de la dieta mostraren un increment de la pressió arterial mitjana (PAM) de 24h (3,0 mmHg), de la PAM de dia (3,2 mmHg) i de la PAM

de nit (4,2 mmHg) en passar de la dieta pobre en sal a la rica en sal (Taula 8). No es va poder disposar de les dades de PA de 24 hores i de la PA de la nit de tots els pacients, ja que en 9 pacients la MAPA va interferir amb la son i, per tant, no es va poder valorar la PA durant el període de descans nocturn. D'altra banda, no s'observaren variacions significatives de la pressió del pols ni de la freqüència cardíaca. En aquest estudi només s'han detectat 6 pacients sal sensibles (15% de la població estudiada) segons la definició arbitrària de sal sensibilitat que considera que un individu és sal sensible quan la seva PAM augmenta >10% en passar d'una dieta pobre en sal a una dieta rica en sal (Kawasaki i col. 1978).

**Taula 8.** Dades de la MAPA, hormones i paràmetres bioquímics del plasma i de l'orina (N=41) al final de cada un dels dos períodes de dieta.

	Valors de referència	Dieta pobre en sal	Dieta rica en sal	Valor p
<b>MAPA</b>				
<b>PAM 24 hores (mmHg)</b>		99,1 ± 8,3	102,0 ± 8,7	0,041*
<b>PAM dia (mmHg)</b>		103,8 ± 9,2	107,1 ± 10,9	0,048*
<b>PAM nit (mmHg)</b>		82,6 ± 9,1	86,8 ± 9,8	0,003*
<b>Pressió del pols (mmHg)</b>		49,4 ± 14,1	49,4 ± 7,9	0,997
<b>Freqüència cardíaca 24h</b>		78,7 ± 8,7	77,8 ± 9,1	0,371
<b>Hormones</b>				
<b>ARP (µg/l/h)</b>	0,4–4,0	1,0 ± 0,7	0,4 ± 0,5	<0,0001**
<b>Aldosterona (nmol/l)</b>	0,22–0,57	0,48 ± 0,20	0,24 ± 0,16	<0,0001**
<b>Quocient aldosterona/ARP</b>		30 ± 41	38 ± 39	0,042*
<b>Noradrenalina (pg/ml)</b>	135-300	374 ± 209	276 ± 199	0,001*
<b>Adrenalina (pg/ml)</b>	20-60	23 ± 12	20 ± 8	0,236
<b>Dopamina (pg/ml)</b>	10-150	27 ± 16	23 ± 14	0,297
<b>Plasma</b>				
<b>Sodi (mmol/l)</b>	137-143	138 ± 2	138 ± 2	0,57
<b>Potassi (mmol/l)</b>	3,5-4,8	4,3 ± 0,4	4,2 ± 0,4	0,054
<b>Creatinina (µmol/l)</b>	60-130	75 ± 16	73 ± 17	0,085
<b>Osmolaritat (mOsm/Kg)</b>	280-300	290 ± 3	291 ± 5	0,138



<b>Orina</b>				
<b>Sodi (mmol/24h)</b>		44 ± 17	162 ± 60	<0,0001**
<b>Potassi (mmol/24h)</b>		76 ± 25	73 ± 25	0,419
<b>Osmolaritat (mOsm/Kg)</b>		403 ± 180	567 ± 229	<0,0001**
<b>Creatinina (mmol/24h)</b>	8-18	11 ± 4	11 ± 4	0,160
<b>Albuminúria (mg/l)</b>	<30	10 ± 10	12 ± 13	0,462

Les dades estan expressades com la mitjana ± SD

ARP: Activitat renina plasmàtica; PAM: Pressió arterial mitjana

\* P<0,05; \*\* P<0,0001

La taxa de filtració glomerular de sodi, calculada de forma aproximada a partir dels valors del sodi en plasma ( $137,95 \pm 1,92$  a la dieta pobre en sal i  $138,18 \pm 2,34$  a la rica en sal), dels valors del sodi en orina ( $43,95 \pm 16,97$  en la dieta pobre en sal i  $162,43 \pm 0,07$  en la dieta rica en sal) i de l'aclariment de creatinina calculat tenint en compte que no hi havia diferències entre els valors de creatinina plasmàtica en els dos períodes ( $75,34 \pm 15,69$  a la dieta pobre en sal i  $73,03 \pm 16,63$  a la rica en sal), fou de 19.872 mmol/24h a la dieta pobre en sal i de 19.901 mmol/24h a la rica en sal. A partir d'aquests valors es va calcular el percentatge de sodi excretat i la reabsorció renal de sodi que demostraren un descens en la reabsorció renal de sodi en passar de la dieta pobre en sal a la dieta rica en sal (99,78 *versus* 99,18, respectivament) (Taula 9).

**Taula 9.** Càlcul estimat de la taxa de filtració glomerular de sodi i dels percentatges d'excreció i reabsorció de sodi al final de cada període.

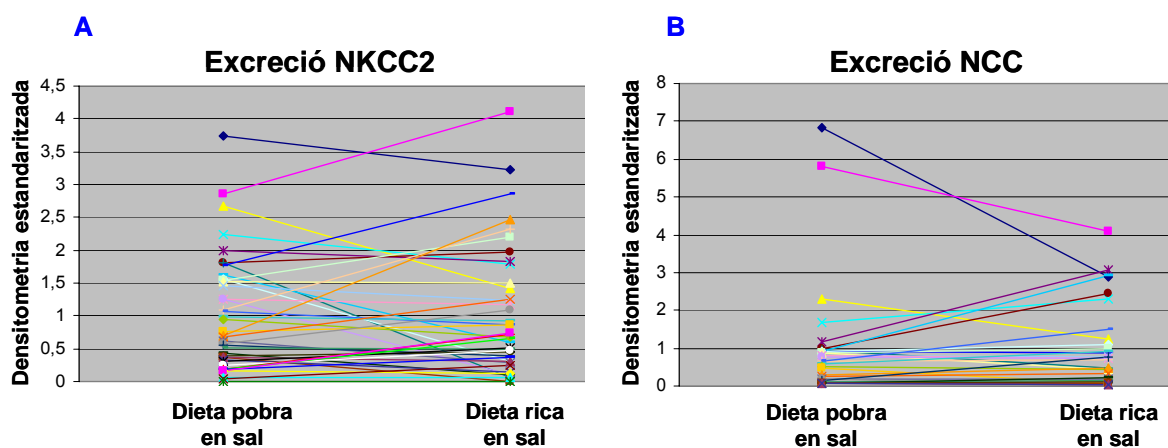
	<b>Dieta pobre en sal</b>	<b>Dieta rica en sal</b>
<b>Filtració glomerular de sodi (mmol/24h)*</b>	19.872	19.901
<b>Excreció urinària de sodi (%)</b>	0,22	0,82
<b>Reabsorció renal de sodi (%)</b>	99,78	99,18

\*Assumint que els pacients tenen un aclariment de creatinina estàndard de 100 ml/min.

Les dades estan expressades com la mitjana ± SD

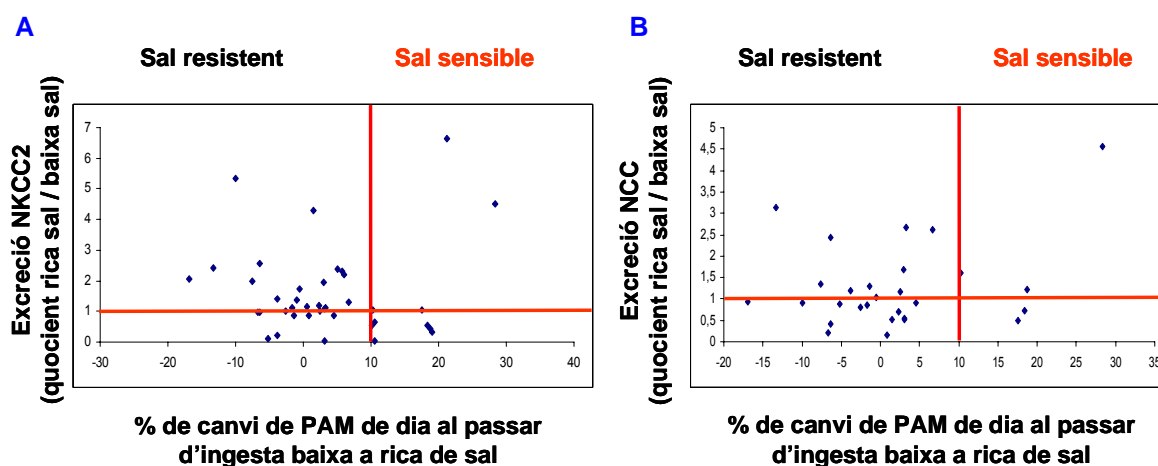
## Excreció dels transportadors renals de sodi NKCC2 i NCC en exosomes urinaris i relació amb la pressió arterial

Per a cada pacient es va analitzar l'excreció dels transportadors de sodi NKCC2 i NCC en exosomes urinaris al final de cada un dels períodes (una setmana de dieta pobre en sal i una setmana de dieta rica en sal). Per aquest fi, es va analitzar el sediment obtingut de l'ultracentrifugació de l'orina (200.000 x g, 2h) mitjançant immunoblot. A partir de l'anàlisi densitomètrica dels immunoblots es va obtenir un valor semiquantitatiu del nivell de transportador excretat en la fracció d'exosomes al final de cada dieta i per a cada pacient. Aquests valors es van estandaritzar (fent el quocient amb la mitjana de tots els valors) per tal d'homogeneïtzar les dades i representar-les gràficament. Durant el període de baixa ingesta de sal, en el qual hi havia una disminució de l'excreció urinària de sodi i un augment de la seva reabsorció tubular (Taula 9), no s'observava una major excreció en exosomes urinaris dels transportadors de sodi NKCC2 ni NCC en comparació amb el període d'elevada ingesta de sal. En el període d'elevada ingesta de sal, en què augmentava l'excreció urinària de sodi i, per tant, disminuïa la seva reabsorció tubular, l'excreció dels transportadors NKCC2 i NCC era variable (Figura 33). Alguns pacients pràcticament no mostraven diferències en l'excreció dels transportadors al final de cada un dels dos períodes, en d'altres els hi augmentava i en d'altres els hi disminuïa.



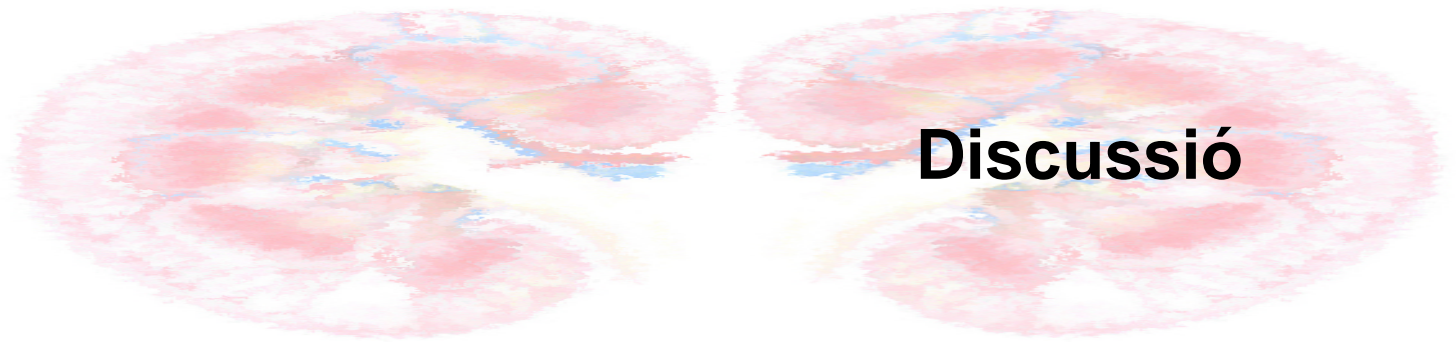
**Figura 33.** (A) Representació gràfica de l'excreció urinària del transportador NKCC2 al final de cada un dels períodes, pobre i ric en sal, per a cada pacient N=41. (B) Representació gràfica de l'excreció urinària del transportador NCC al final de cada un dels períodes, pobre i ric en sal, per a cada pacient N=31.

Per altra banda, es va estudiar com es modificava la pressió arterial i els nivells dels transportadors de sodi NCC i NKCC2 a l'orina en relació amb la ingesta de sal (Figura 34). Degut a què no es disposava dels registres de PA de 24 hores de tots els pacients es va utilitzar el valor de la PAM de dia. Segons la nostra hipòtesi de treball, els pacients sal sensibles no incrementarien suficientment l'excreció de sodi a l'orina amb l'augment d'ingesta de sal, cosa que els conduïria a incrementar la PA ja que no modificarien de manera adequada els nivells d'expressió d'algun o alguns transportadors de sodi en funció de la ingesta de sal. Per altra banda, els sal resistents presentarien una resposta adequada dels nivells dels transportadors de sodi en funció dels nivells d'ingesta de sal podent augmentar l'excreció de sodi a l'orina en augmentar-ne la ingesta, de manera que la seva PA seria independent del nivell de sal a la dieta. No obstant, a la figura 34 no s'observa una relació clara entre la diferència en l'excreció dels transportadors NKCC2 (Figura 34 A) i NCC (Figura 34 B) i la variació de la PA en funció de la ingesta de sal.



**Figura 34.** Representació gràfica que relaciona el quocient de l'excreció dels transportadors (A) NKCC2 i (B) NCC amb el canvi de pressió arterial mitjana de dia en passar d'una dieta pobra en sal a una dieta rica en sal. A l'eix de les abscisses el valor de PAM igual a 10 és el punt de tall que separa els pacients sal sensibles (>10) i els sal resistents ( $\leq 10$ ), mentre que a l'eix de les ordenades el valor del quocient 1 ens indica el punt en el qual no hi ha canvis en l'excreció urinària dels transportadors renals de sodi en els 2 períodes (>1 indicaria una major excreció del transportador en la dieta rica en sal i <1 una menor excreció del transportador en la dieta rica en sal).





## **Discussió**



## **EXPRESSIÓ DELS TRANSPORTADORS RENALS DE SODI I AQUAPORINES EN UN MODEL EXPERIMENTAL DE RATA D'HIPERTENSIÓ ARTERIAL (HTA) INDUÏDA PER CICLOSPORINA**

La hipertensió és un factor de risc per a la disminució de la supervivència de l'empelt, la insuficiència renal progressiva i el desenvolupament de malalties cardiovasculars (Ciresi i col. 1992). Kasiske i col. (2004) van mostrar el baix control de la pressió arterial (PA) després del trasplantament d'òrgans. Entendre millor la patogènesi de la HTA induïda per ciclosporina en permetria un tractament específic i una reducció de les malalties cardiovasculars associades, que actualment són la principal causa de mort en població trasplantada.

En aquesta tesi s'ha realitzat per primera vegada l'anàlisi del balanç de sodi i aigua en un model experimental animal d'HTA induïda per ciclosporina, un immunosupressor àmpliament utilitzat als trasplantaments, mitjançant l'anàlisi de l'expressió dels transportadors renals de sodi i els canals d'aigua. Aquest model ofereix una sèrie d'avantatges respecte les tècniques que clàssicament s'han emprat per estudiar el balanç de sodi al ronyó. Així, es pot explorar tot el túbul, tant a nivell de les nefrones més superficials com de les més profundes, i permet l'estudi dels balanços de sodi i aigua de forma més directa que les tècniques d'aclariment utilitzades fins al moment. D'altra banda, com es coneixen molts factors que intervenen en la regulació dels transportadors de sodi i aquaporines renals, aquesta aproximació proporciona dades no només de la reabsorció de sodi a cada segment, sinó també de possibles mecanismes que poden influir en el metabolisme renal d'aquest ió.

La reabsorció de sodi a la branca gruixuda ascendent de la nansa de Henle és facilitada per l'NKCC2 (Greger, 2000). Una de les principals observacions d'aquest estudi fou que la quantitat d'NKCC2 al ronyó de les rates amb HTA induïda per ciclosporina es trobava fortament augmentada, la qual cosa suggeriria un increment important de la reabsorció de sodi a la branca gruixuda ascendent. A la nansa de

Henle hi té lloc una reabsorció del sodi filtrat d'aproximadament 25-30% (Greger, 2000). Per tant, aquest segment representa un dels punts més importants de reabsorció de sodi, i podria ser de gran importància en la patogènesi de la retenció de sodi i pel desenvolupament d'HTA per ciclosporina. El transport de sodi a la branca gruixuda ascendent es coneix clàssicament com el transport que està implicat en la regulació del balanç d'aigua, modulats per la capacitat de concentrar i diluir l'orina. En condicions normals qualsevol variació del transport de sodi seria tamponat mitjançant el punt de control túbulo-glomerular. No obstant, l'associació entre l'augment de l'NKCC2 i l'increment de la PA observada en aquest treball és consistent amb d'altres estudis previs realitzats tant en models animals com en humans. Hoagland i col. (2004) van detectar en un model animal d'HTA sal sensible un increment de l'NKCC2 en ronyó. En dos models diferents d'HTA genètica també s'ha observat un augment de l'activitat d'aquest transportador a les fases inicials de la patologia (Manning i col. 2002, Capasso i col. 2005). A més, mutacions del gen *NKCC2* també han estat associades a hipertensió essencial en humans (Glorioso i col. 2001).

L'expressió del gen *NKCC2* està regulada, almenys en part, per la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (Fernandez-Llama i col. 1999). Les senyals intracel·lulars són facilitades pel receptor EP3, acoblant-se a l'adenil ciclase mitjançant la proteïna G inhibidora (G<sub>i</sub>) (Breyer i col. 1998). S'esperaria que la PGE<sub>2</sub> actués a la branca gruixuda ascendent disminuint els nivells d'AMPc intracel·lular (Torikai i col. 1983). La regió 5' del gen *NKCC2* conté un element regulador d'AMPc que potencia la transcripció del gen (Ecelbarger i col. 1999). És conegut que la ciclosporina disminueix la formació de PGE<sub>2</sub> al ronyó (Chang i col. 2005), per tant, es podria especular que l'eliminació de l'efecte inhibitori que el receptor EP3 exerceix sobre PGE<sub>2</sub> augmentaria la producció d'AMPc i conduiria a un increment de la transcripció de l'*NKCC2*. A més, la sobreexpressió observada de l'RNAm *NKCC2* al ronyó de les rates amb HTA induïda per ciclosporina es troba en consonància amb aquesta hipòtesi. La observació

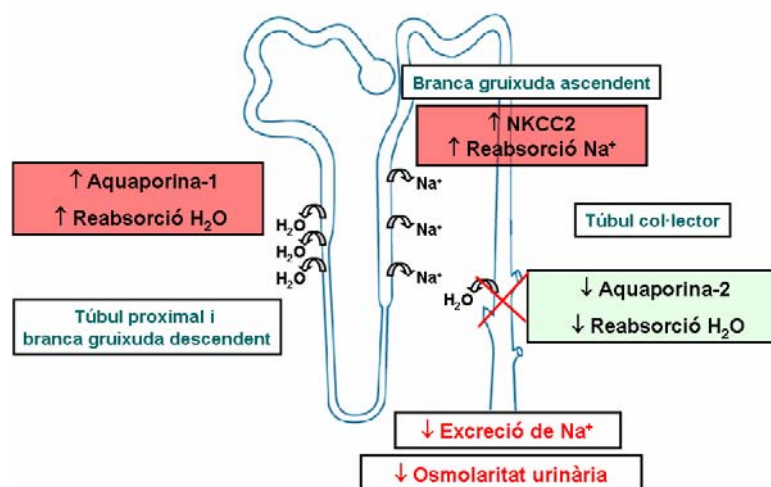


en cultius cel·lulars que la ciclosporina estimula l'activitat del transportador NKCC2 també estaria recolzant els resultats obtinguts en aquest estudi (Wu i col. 2000).

La reabsorció proximal de sodi és realitzada principalment pel transportador NHE-3 (Greger, 2000). Els resultats d'aquest treball mostren canvis sense arribar a ser significatius en la quantitat d'aquest transportador en els ronyons de les rates tractades amb ciclosporina. En treballs anteriors s'havia relacionat un augment de l'expressió i activitat del transportador proximal NHE-3 en rates hipertenses espontànies (SHR) (Aldred i col. 2000, LaPointe i col. 2002). En aquestes rates, en canvi, sí que s'observa un increment significatiu dels nivells d'aquaporina-1 al ronyó. Aquest canal d'aigua s'ubica a les membranes apicals i basolaterals de les cèl·lules epitelials proximals de la nefrona. L'osmolaritat del fluid tubular al final del túbul proximal és similar a la del plasma, apuntant a una reabsorció més o menys isosmòtica per part de les cèl·lules proximals. Per tant, un increment de l'expressió de l'aquaporina-1 en aquest nivell s'esperaria que tingués un efecte directe molt discret sobre la reabsorció d'aigua, ja que normalment hi ha present suficient quantitat d'aquest canal per permetre que l'aigua acompanyi la reabsorció de sodi de forma isosmòtica. No obstant, una disminució del gradient osmòtic necessari per la reabsorció d'aigua a nivell proximal permetria que la reabsorció de sodi en aquest nivell es produís d'una forma més eficient. Així es reduiria la possibilitat que una part d'aquest sodi reabsorbit tornés a entrar al lumen, i es potenciaría, per tant, una major reabsorció neta de sodi a nivell proximal. Per tant, un increment de l'aquaporina-1 a les rates tractades amb ciclosporina podria contribuir a un increment de la reabsorció de fluid a nivell proximal.

En condicions normals, l'orina es concentra com a resultat de la combinació de les funcions de la nansa de Henle i del túbul col·lector. La nansa de Henle genera una elevada osmolaritat a la medul·la renal mitjançant el procés de multiplicació a contracorrent. El túbul col·lector, en presència de vasopressina i aquaporina-2, permet l'equilibri osmòtic entre l'orina i l'interstici medul·lar hipertònic. La generació d'una

medul·la renal amb una elevada osmolaritat és depenent de la reabsorció de clorur de sodi principalment pel transportador NKCC2 de la branca gruixuda ascendent. L'increment observat de l'expressió d'aquest transportador en les rates tractades amb ciclosporina podria estar potenciant el mecanisme de multiplicació a contracorrent. També hem observat en aquest estudi, però, que les rates tractades amb ciclosporina presenten una orina més diluïda en comparació a les control. Una possible explicació d'aquest efecte podria ser la disminució de l'expressió d'aquaporina-2 observada als ronyons de les rates tractades, no obstant, la importància de la reducció de l'aquaporina-2 en la capacitat de concentrar l'orina ha estat demostrada en estudis previs (Deen i col. 1994). En aquest estudi no s'ha estudiat directament el mecanisme pel qual disminueix l'expressió de l'aquaporina-2, però la reducció d'aquest canal d'aigua podria ser indicativa d'una alteració de la permeabilitat a l'aigua del túbul col·lector i de la capacitat del fluid d'aquest segment tubular a equilibrar-se osmòticament amb la medul·la hipertònica. A les rates tractades amb ciclosporina, que presenten un increment tant de l'NKCC2 com de l'aquaporina-1 en el ronyó, una disminució de la permeabilitat a l'aigua del túbul col·lector podria representar una resposta compensatòria dels túbuls renals per reduir la reabsorció d'aigua i, per tant, contrarestar l'increment de la reabsorció de sodi i aigua i l'elevació de la PA (Figura 35).



**Figura 35.** Esquema en què es representen els possibles mecanismes que poden causar l'increment de la pressió arterial (NKCC2) en aquest model i la possible resposta compensatòria (aquaporina-2).

## **ESTUDI DE L'EXCRECIÓ URINÀRIA DE LES AQUAPORINES-1 I -2 EN PACIENTS AMB CIRROSI HEPÀTICA**

Les principals troballes d'aquest estudi són: 1) l'excreció de l'aquaporina-2 en orina es troba disminuïda en pacients cirròtics en comparació a controls sans; i 2) l'excreció urinària d'aquaporina-1 en pacients amb cirrosi és semblant a l'observada en els controls, mentre que es troba fortament reduïda en els pacients amb síndrome hepatorenal.

Proteïna aquaporina-2 en orina. L'aquaporina-2 és coneguda com el canal d'aigua regulat per la vasopressina. Aquesta hormona incrementa l'aquaporina-2 a la membrana de les cèl·lules principals del túbul col·lector augmentant així la permeabilitat a l'aigua d'aquestes cèl·lules. Aquesta regulació es produeix a dos nivells o terminis. L'efecte a curt termini comporta la translocació de l'aquaporina-2 que es troba en vesícules intracel·lulars a la membrana plasmàtica apical, mentre que l'efecte a llarg termini comporta un increment de la síntesi d'aquaporina-2 en les cèl·lules principals del tub col·lector (Nielsen i col. 1995, DiGiovanni i col. 1994). En estudis previs s'havia demostrat que l'excreció diària d'aquaporina-2 a la orina és aproximadament el 3-4% de l'aquaporina-2 total en el ronyó i que la principal via d'excreció urinària d'aquesta no és el recanvi cel·lular (Wen i col. 1999, Rai i col. 1997). L'aquaporina-2 present a l'orina es troba majoritàriament associada a unes vesícules amb unes membranes definides, anomenades exosomes. Aquests autors van demostrar que l'excreció urinària d'aquaporina-2 tenia lloc a través d'una via apical fortament regulada per la vasopressina. Alhora, observaren que després d'un llarg període de restricció hídrica o després de l'administració d'un anàleg de la vasopressina, la 1-desamina-8-D-arginina vasopressina (DDAVP), l'expressió d'aquaporina-2 es trobava incrementada tant a les vesícules intracel·lulars (petites vesícules subapicals i cossos multivesiculars) com a la membrana apical de les

cèl·lules principals. Això comportava un increment de la permeabilitat a l'aigua d'aquestes cèl·lules i un augment de l'excreció urinària de l'aquaporina-2. Sota condicions en les quals es suprimia l'alliberament endogen de vasopressina es produïa una reducció dels nivells d'aquaporina-2 a la membrana apical per la translocació d'aquesta cap al reservori intracel·lular. Aquest fet estaria associat amb la reducció de l'excreció urinària d'aquaporina-2, fet que indicaria l'existència d'una correlació entre els nivells plasmàtics de vasopressina, els nivells d'aquest canal d'aigua a la membrana apical i l'excreció urinària d'aquaporina-2 en models experimentals. S'han observat resultats similars en humans (Kanno i col. 1995, Saito i col. 1997, Saito i col. 1998). En aquest estudi, també es va detectar en els controls sans un increment de l'excreció d'aquaporina-2 en orina en situació de restricció en l'ingesta d'aigua, mentre que després d'una sobrecàrrega hídrica s'observava una reducció de la seva excreció, fets que recolzen els resultats obtinguts en estudis anteriors.

Una de les principals observacions d'aquest estudi és que l'aquaporina-2 a l'orina està disminuïda en els pacients amb cirrosi. S'observa una reducció progressiva de l'excreció urinària d'aquaporina-2 a mesura que la severitat de les disfuncions hepàtica i renal augmenten. De fet, la reducció de l'excreció urinària d'aquaporina-2 s'accentua en pacients amb ascites sense insuficiència renal en comparació amb els pacients sense ascites, i la quantitat d'aquaporina-2 excretada a l'orina dels pacients amb síndrome hepatorenal és fins i tot menor que als pacients amb ascites. Per tant, els resultats mostren que a banda de la marcada expansió del fluid extracel·lular, dels reduïts nivells de sodi al sèrum i dels increments a nivell plasmàtic d'aldosterona, norepinefrina i vasopressina característics de la cirrosi en estat avançat, hi ha una reducció en l'excreció d'aquaporina-2 en orina. Aquests resultats contrasten amb els obtinguts en pacients amb insuficiència cardíaca congestiva, patologia en la que també es produeix una expansió en el volum del fluid extracel·lular. En canvi, en humans amb insuficiència cardíaca congestiva descompensada s'ha observat un increment en

l'excreció de l'aquaporina-2 urinària (Funayama i col. 2004, Pedersen i col. 2003) i una estreta correlació entre l'excreció d'aquaporina-2 en orina i els nivells de vasopressina. Aquests estudis posen de manifest que l'excreció d'aquesta aquaporina a l'orina no és uniforme entre diferents estats fisiopatològics que cursen amb expansió del volum extracel·lular. En general, els pacients amb una cirrosi avançada presenten una major hiponatrèmia crònica i uns nivells de vasopressina plasmàtica més elevats que els pacients amb insuficiència cardíaca congestiva. Aquestes diferències permeten explicar, almenys en part, les divergències trobades en l'excreció urinària d'aquaporina-2 entre aquestes dues patologies.

Els resultats d'aquest estudi han de ser discutits sota els conceptes actuals de la patogènesi de l'hiponatrèmia en la cirrosi (Gines i col. 2006, Gines i col. 1998, Ishikawa i col. 2005). La hiponatrèmia és deguda a una alteració en la capacitat renal d'excretar aigua lliure de soluts. Aquesta incapacitat d'eliminar aigua lliure de soluts podria estar ja present en els cirròtics sense ascites, però és molt més comú en els pacients amb ascites i gairebé universal en els pacients amb síndrome hepatorenal (Gines i col. 2006, Gines i col. 1998, Ishikawa i col. 2005). Els principals mecanismes patogènics que condueixen a aquest trastorn són l'alteració en el transport del filtrat cap a la zona distal de la nefrona com a conseqüència de l'increment de reabsorció proximal de sodi i l'augment dels nivells plasmàtics de vasopressina degut a l'hipersecreció no osmòtica d'aquesta hormona des de la neurohipòfisis. L'increment dels nivells de vasopressina plasmàtica estimularia els receptors V2 presents en les cèl·lules principals del tub col·lector, les quals augmentarien la seva permeabilitat a l'aigua a través de l'aquaporina-2. L'aigua llavors seria reabsorbida de forma desproporcionada al sodi retingut pels ronyons i s'iniciaria una hiponatrèmia dilucional. Segons aquest concepte de patogènesi de l'hiponatrèmia en la cirrosi, s'esperaria trobar un augment de l'aquaporina-2 en l'orina i no una reducció, que és el que s'ha trobat en aquest estudi. Ara bé, si el sistema vasopressina-aquaporina-2 estigués

constantment activat a la cirrosi, la reabsorció d'aigua lliure de soluts estaria també permanentment augmentada respecte la retenció de sodi, i la concentració de sodi en el sèrum disminuiria de forma continuada fins a arribar a nivells incompatibles amb la vida. Afortunadament, això no acostuma a succeir. De fet, en molts dels pacients amb cirrosi, la hiponatrèmia es desenvolupa en relació a alguna altra complicació (infecció, hemorràgia,...), però llavors acostuma a restar estable per un període de temps que pot anar des de setmanes a mesos, com és el cas dels pacients inclosos a l'estudi. Per tant, seria com si quan es desenvolupa l'hiponatrèmia en la cirrosi s'activés un mecanisme protector per a prevenir la constant reabsorció d'aigua lliure de soluts i d'aquesta forma s'alentís l'hiponatrèmia. La reducció de l'excreció urinària de l'aquaporina-2 observada en aquest estudi podria representar tal mecanisme protector.

Sobre aquestes línies és important remarcar que la disminució de l'aquaporina-2 és un mecanisme crucial del fenomen d'escapament als efectes de la vasopressina observats en individus sans i animals experimentals. Des de fa molts anys se sap que els individus sans després d'una infusió de vasopressina, mostren inicialment uns dies de retenció d'aigua, mentre que posteriorment mostren un fenomen d'escapament caracteritzat per un increment del volum urinari i una reducció de l'osmolaritat urinària i del pes corporal, tot i la contínua administració de vasopressina (Leaf i col. 1953). Estudis recents han demostrat que aquest fenomen és degut, al menys en part, a una disminució de l'expressió del canal d'aigua aquaporina-2 en el tub col·lector, que és independent a la vasopressina i a l'osmolaritat (Verbalis i col. 2006). Els mecanismes exactes que provoquen aquest efecte no són coneguts, però podrien estar relacionats amb l'increment de la síntesi d'òxid nítric i/o prostaglandina en el ronyó (Verbalis i col. 2006). Tal i com es suggereix en les línies anteriors, la reducció de l'excreció urinària d'aquaporina-2 observada en pacients amb cirrosi avançada podria representar un mecanisme d'escapament, semblant al trobat en els individus sans sota constant administració de vasopressina, per tal d'evitar una reducció progressiva dels nivells de

sodi en sèrum. L'existència d'una reducció de l'excreció urinària de l'aquaporina-2 en els estadis inicials de la cirrosi, prèvia al desenvolupament d'hiponatrèmia, no sembla en aquest moments tenir una explicació clara, és per això que caldria realitzar més estudis en aquesta línia.

Estudis previs de l'excreció urinària d'aquaporina-2 en pacients amb cirrosi han mostrat resultats contradictoris. Ivarsen i col. (2003) van detectar un increment en l'excreció urinària d'aquaporina-2 en pacients amb cirrosi, mentre Pedersen i col. (2003) no van observar canvis en l'excreció d'aquesta aquaporina respecte a individus sans. Aquests estudis presenten diversos aspectes que podrien explicar els diferents resultats observats respecte als obtinguts el nostre estudi. En primer lloc, en aquest treball hem estudiat pacients amb cirrosi en les diferents fases de la retenció de sodi i aigua. Així, es van incloure pacients sense ascites, pacients amb ascites i pacients amb síndrome hepatorenal. L'alteració en el metabolisme del balanç de sodi i aigua és una disfunció progressiva que ha estat clarament documentada en pacients amb cirrosi i l'estadi estable aconseguit en cada una d'aquestes fases no pot ser comparat amb les altres (Fernandez-Llama i col. 2005). Pedersen i col. (2003) van estudiar catorze pacients amb cirrosi, sis dels quals tenien ascites, i van analitzar l'excreció urinària d'aquaporina-2 de tots ells com un sol grup. D'altra banda, Ivarsen i col. (2003) van utilitzar el criteri Child-Pugh per classificar els pacients. Aquest criteri estratifica els pacients segons la severitat de la clínica de la malaltia hepàtica, però és conegut que aquest criteri pot no correspondre's amb les alteracions en el metabolisme del balanç del sodi i l'aigua. En segon lloc, tots els pacients inclosos en el nostre estudi no estaven sota cap tractament, sobretot es pretenia evitar els diürètics ja que alteren l'expressió proteica d'aquaporines al ronyó i, per tant, a l'orina (Fernandez-Llama i col. 1999, Kim i col. 2004, Starklint i col. 2005). De fet, s'ha demostrat un increment de l'excreció urinària d'aquaporina-2 durant el tractament amb el diürètic de nansa furosemida (Starklint i col. 2005). A l'estudi de Pedersen, nou dels catorze pacients

amb cirrosi havien estat rebent tractament amb diürètics fins a 24 hores abans de la recol·lecció de l'orina. Finalment, tot i que la tècnica utilitzada per detectar l'aquaporina-2 urinària era diferent en els tres estudis -*dot-blot* en l'estudi d'Ivarsen, radioimmunoassaig en l'estudi de Pedersen i immunoblot en aquest estudi- no creiem que això pugui justificar les diferències observades en l'excreció de l'aquaporina-2. El procediment de la recol·lecció i processament de les mostres d'orina previs a les anàlisis de l'excreció d'aquaporina-2 foren semblants en els tres estudis. Aquest és un punt important a tenir en compte, ja que podria alterar la detecció de proteïnes en orina, tal i com recentment s'ha documentat (Zhou i col. 2006). Per tant, les diferències que hem comentat prèviament –població estudiada i selecció- podrien explicar la divergències en els resultats respecte l'excreció d'aquaporina-2 en orina.

En aquest treball hem detectat la presència d'aquaporina-1 a l'orina. Tot i que no es coneix molt bé la regulació de l'aquaporina-1, el *knock-out* d'aquesta proteïna ha demostrat que aquest canal és necessari pel procés de concentració de l'orina (King i col. 2001). En un model cirrosi en rates induït per tetraclorur de carboni s'ha observat un increment de l'aquaporina-1 en ronyó (Fernandez-Llama i col. 2000). Això estaria suggerint que a la cirrosi poden donar-se efectes importants al túbul proximal, com l'augment en la reabsorció de fluid en aquest segment. També hi ha evidències d'un increment de la reabsorció, tant de sodi com d'aigua, al tram proximal tant a pacients com a models animals de cirrosi per estudis de micropunció i eliminació de liti (Lopez-Novoa i col. 1977, Bank i col. 1975). Nosaltres, no obstant, hem observat que l'excreció urinària d'aquaporina-1 no es troba alterada als pacients cirròtics amb o sense ascites, mentre que es troba fortament disminuïda als pacients amb síndrome hepatorenal. Aquesta disminució de l'aquaporina-1 a l'orina teòricament podria estar associada a una reducció de l'aquaporina-1 a la membrana plasmàtica de les cèl·lules tubulars proximals. Cal afegir que els pacients amb síndrome hepatorenal presentaven, a més, una disminució del filtrat glomerular. Es desconeix si la



insuficiència renal podria alterar l'excreció urinària de les aquaporines, pel que caldria realitzar més estudis per a investigar com arriba l'aquaporina-1 a l'orina.

---

## LOCALITZACIÓ ULTRAESTRUCTURAL DELS TRANSPORTADORS DE SODI I AQUAPORINES EN RONYÓ HUMÀ I EXOSOMES URINÀRIS

Pisitkun i col. (2004) van detectar més de 200 proteïnes renals apicals en la fracció ultracentrifugada de l'orina i van descriure'n la via d'excreció a l'orina a través dels exosomes. Tot i que sabem que les proteïnes renals apicals poden ser excretades a l'orina per diferents vies, des del fraccionament de les membranes cel·lulars o al propi recanvi cel·lular, vam centrar-nos en l'estudi de l'excreció via exosomes pels treballs recents que apuntaven a aquesta via d'excreció com una de les principals en l'eliminació d'aquestes proteïnes a l'orina. La via d'excreció de proteïnes a través d'exosomes comença al ronyó amb la internalització de les proteïnes apicals a l'interior cel·lular. Mitjançant una via de senyalització, encara no ben coneguda, s'internalitzen aquestes proteïnes dins unes estructures necessàries per aquesta via d'excreció, anomenades cossos multivesiculars. Posteriorment aquests es fusionen amb la membrana apical i n'alliberen a l'exterior les vesícules que contenen, ara ja exosomes. Aquesta via ha estat descrita en diferents tipus cel·lulars com les cèl·lules dendrítiques, limfòcits,... (Keller i col. 2006). Com que fins al moment no s'havia estudiat en ronyó humà la presència de proteïnes renals apicals dins aquestes estructures multivesiculars, vam decidir centrar-nos en la detecció a nivell ultraestructural, mitjançant microscòpia electrònica, de proteïnes renals apicals dins de cossos vesiculars per tal de reforçar la teoria de l'excreció d'aquestes proteïnes a l'orina principalment per la via exosomal en humans.

Els principals resultats d'aquest estudi són l'observació per primera vegada en cèl·lules renals humanes d'unes estructures que es correspondrien a cossos multivesiculars que contenen les proteïnes aquaporina-2 i NKCC2, així com les formes fosforilades pNKCC2 i aquaporina-2-p256. Al mateix temps s'ha observat en orina ultracentrifugada la presència de les aquaporines-1, -2 i pS256-aquaporina-2, NKCC2 i pNKCC2 en vesícules d'un diàmetre menor a 100 nm anomenades exosomes.

Localització de proteïnes transportadores renals de sodi i aquaporines al ronyó humà.

L'aquaporina-1 s'ha detectat de forma abundant a la membrana apical de les cèl·lules proximals, així com a la vora en raspall i a la membrana basolateral de les mateixes, tal i com ja s'havia descrit prèviament en humans (Maunsbach i col. 1997). No obstant, és l'única de les proteïnes que s'han estudiat en aquest treball que no s'ha pogut localitzar dins de vesícules intracel·lulars. Malgrat això, no es pot descartar l'existència d'aquesta aquaporina dins vesícules a l'interior de les cèl·lules epitelials proximals ja que en aquestes cèl·lules és realment complex observar-ne amb claredat l'espai intracel·lular, especialment als trams S1 i S2. Les pronunciades interdigitacions presents en aquestes cèl·lules, juntament amb el fet que les mostres de ronyó humanes no es poden fixar per perfusió, fan realment difícil la identificació de qualsevol tipus de vesícules en cèl·lules proximals. Tal i com ja havia estat descrit anteriorment per Nielsen i col. (1993) l'aquaporina-2 es troba associada a cossos multivesiculars a les cèl·lules principals de rata. En humà nosaltres també hem arribat a identificar vesícules que contenen aquaporina-2 i pS256-aquaporina-2 a les cèl·lules principals del túbul col·lector. Ara bé, sempre s'han descrit els cossos multivesiculars com a estructures endosomals que contenen diverses vesícules al seu interior, mentre que al nostre estudi amb ronyó humà hem observat unes estructures semblants a les dels cossos multivesiculars a l'interior de les cèl·lules tubulars, però contràriament al que esperàvem aquests contenien en el seu interior dues o fins i tot només una vesícula. És per això que caldria plantejar-se la possibilitat d'anomenar cossos monovesiculars en comptes de cossos multivesiculars a aquestes estructures observades a les cèl·lules tubulars humanes. Vàrem observar el mateix per l'NKCC2 i la seva forma fosforilada (treonines fosforilades a la part N-terminal), pNKCC2, a les cèl·lules epitelials de la branca gruixuda ascendent. No observàrem diferències en la localització ultraestructural entre les formes fosforilades i les no fosforilades de

l'aquaporina-2 i l'NKCC2, fet que no resulta estrany ja que només s'ha treballat amb una mostra de ronyó i en condicions fisiològiques. Aquest treball aporta noves dades sobre la localització a nivell subcel·lular d'aquestes proteïnes apicals del ronyó humà. Fins al moment la majoria de treballs en què s'estudiava la localització d'aquestes proteïnes havien estat realitzats amb rata, fet que permetia una millor visualització de les ultraestructures cel·lulars i localització de les proteïnes a les cèl·lules (Wen i col. 1999, Nielsen i col. 1993, Giménez i col. 2003). La dificultat en l'obtenció de mostres òptimes de ronyó humà per a l'immunodetecció mitjançant microscòpia electrònica ha dificultat la proliferació d'estudis de localització de transportadors renals de sodi i aquaporines en humans (Maunsbach i col. 1997).

D'altra banda, seria convenient realitzar nous immunomarcats amb anticossos que reconeguessin marcadors específics de cossos multivesiculars per tal d'assegurar-nos que les estructures presents al ronyó humà són aquests cossos multivesiculars.

Exosomes amb transportadors de sodi i aquaporines en orina humana. L'excreció de proteïnes apicals renals a l'orina no és cap novetat, ara bé, el que encara està per determinar actualment és per quina via o vies principals s'excreten aquestes proteïnes a l'orina? Un treball recent sembla recolzar la hipòtesi que la principal forma d'excreció de les proteïnes apicals del ronyó a l'orina és principalment a través de la via exosomal, i no mitjançant, per exemple, el recanvi cel·lular (Adachi i col. 2006). A part de l'eliminació d'exosomes de cèl·lules renals a l'orina en diversos treballs s'ha estudiat l'excreció d'aquestes vesícules a una gran diversitat de cèl·lules com les dendrítiques, limfòcits, tumorals,... En aquests tipus cel·lulars s'ha descrit l'exosoma com a estimulador de senyals immunogèniques o biològiques (Février i col. 2004). En el cas de les cèl·lules renals a banda de conèixer el mecanisme pel qual les proteïnes arriben a l'orina cal entendre també el significat biològic d'aquesta eliminació urinària.

Actualment no es coneix la funcionalitat de l'excreció dels exosomes de les cèl·lules renals, tot i que s'especula que podria ser una via de senyalització entre cèl·lules de diferents trams del túbul. D'altra banda, podria resultar que les proteïnes que s'eliminen a l'orina a través d'exosomes fossin un reflex de l'expressió d'aquestes al ronyó, o en cas contrari podria succeir que en situacions en què es necessita poca proteïna a la membrana apical se n'eliminés més per aquesta via i, per tant, quan hi hagués molta proteïna a l'orina significaria que hi hauria poca expressió de la mateixa al ronyó (Gonzales i col. 2008). Molts dels treballs que s'estan realitzant actualment es centren en l'estudi de proteòmica dels exosomes urinaris (Hoorn i col. 2005, Pisitkun i col. 2006). El nostre estudi, no obstant, pretén investigar l'excreció urinària dels principals transportadors apicals de sodi i aquaporines renals associats a exosomes i fins al moment s'han visualitzat mitjançant microscòpia electrònica les aquaporines-1, -2 i pS256-aquaporina-2, així com el transportador de sodi NKCC2 i la forma fosforilada pNKCC2 associades a aquestes vesícules. Aquestes observacions van amb concordància amb el treball de Pisitkun i col. (2004) en el qual ja van descriure els principals transportadors apicals renals de sodi i aquaporines associades a aquestes vesícules excretades a l'orina humana. De la mateixa forma es va descriure a l'orina de rata l'aquaporina-2 associada a unes vesícules o exosomes urinaris (Wen i col. 1999). En aquest estudi, a més, hem observat que les formes fosforilades de l'aquaporina-2 (pS256) i del NKCC2 (pNKCC2) també es troben en orina associats a exosomes. Aquest fet podria permetre l'estudi de patologies associades a alteracions en la fosforilació d'aquestes proteïnes amb l'únic requisit de l'obtenció d'una mostra d'orina. Resultaria interessant investigar si les formes fosforilades i no fosforilades d'una mateixa proteïna es localitzen a exosomes diferents, o bé a un mateix exosoma per a poder determinar si existeix alguna forma de la proteïna que sigui més susceptible a ser excretada. Fins el moment es coneix la funció clau de la fosforilació pS256 de l'aquaporina-2 en la translocació de la proteïna des de la vesícula a la

membrana apical on és activa, no obstant, no es coneix si el fet de trobar als exosomes aquesta proteïna encara fosforilada indica que es tracta de proteïna activa, o bé, no té cap significat biològic.

La importància d'investigar com algunes proteïnes poden excretar-se a l'orina podria permetre el descobriment de biomarcadors de forma no invasiva per a diferents patologies que en podrien permetre des del diagnòstic fins al tractament. Així, en rata ja s'han realitzat estudis dels exosomes urinaris que han permès detectar un possible biomarcador per una insuficiència renal aguda (Zhou i col. 2006).

---

## **EXCRECIÓ DELS TRANSPORTADORS RENALS DE SODI NKCC2 I NCC EN EXOSOMES URINARIS DE PACIENTS HIPERTENSOS EN RELACIÓ AMB LA INGESTA DE SAL**

Treballs anteriors ja havien demostrat l'associació entre la ingesta elevada de sal a la dieta i l'augment de la pressió arterial (PA) (Dahl 1960, Barba i col. 2007). La sensibilitat a la sal és més freqüent en la població hipertensa que en la normotensa. Així, a la nostra mostra de població hem observat que l'augment de la ingesta de sal a la dieta produeix una elevació de la pressió arterial mitjana (PAM)  $\cong$  3,0 mmHg. No obstant, analitzant la resposta de la PA a la ingesta de sal de forma individual no tots els pacients han respost de la mateixa forma. Així, aplicant de forma estricta la definició de sal sensibilitat (un individu és sal sensible quan la seva PAM augmenta més del 10% quan passa d'una dieta pobra a una dieta rica en sal) en el nostre estudi hem detectat només 6 pacients sal sensibles, és a dir, un 15% del conjunt de pacients analitzats.

Fins a l'actualitat, pocs treballs han investigat en humans la reabsorció tubular de sodi. Així, Chiolero i col. (2000) van aplicar la tècnica de l'aclariment de liti per estudiar la reabsorció proximal de sodi en pacients hipertensos sal sensibles i sal resistents. Aquesta tècnica, tanmateix, només aporta informació indirecta del grau de reabsorció proximal de sodi. Per altra banda, existeixen diversos estudis que han emprat models animals. Un estudi experimental amb rates va associar l'augment de la ingesta de sal a la dieta amb un increment de l'expressió renal del cotransportador NKCC2 (Ecelbarger i col. 1996). En aquest mateix sentit, altres estudis van detectar uns majors nivells tant de l'expressió proteica com de l'activitat del transportador NKCC2 en un model de rata Dahl sal sensible (Hoagland i col. 2004, Alvarez-Guerra i col. 2002). D'altra banda, es va demostrar que rates alimentades amb una dieta elevada en sal presentaven un descens dels nivells proteics del transportador NCC i de l'aldosterona, hormona que regula aquest transportador (Sandberg i col. 2006, Song i col. 2004). Masilamani i col.

(2002) també van demostrar que al ronyó de rates amb una restricció de la ingesta de sal augmentaven els nivells de la proteïna NCC, la qual cosa s'acompanyava d'un increment dels nivells d'aldosterona. Per tant, nombrosos treballs han relacionat alteracions de l'expressió i/o activitat dels transportadors renals de sodi NKCC2 i NCC amb variacions de la PA en relació amb la ingesta de sal en models de rata. Totes aquestes evidències ens van portar a plantejar l'estudi de com es modulaven els nivells dels transportadors renals de sodi NKCC2 i NCC en relació amb la ingesta de sal en pacients hipertensos i de com diferències en la ingesta de sal modificaven la PA.

Diversos treballs havien descrit la presència de transportadors renals apicals de sodi a l'orina, tant a rata com a humans (Gonzales i col. 2008, McKee i col. 2000, Pisitkun i col. 2004, Wen i col. 1999). Wen i col. (1999) van estudiar la correlació de l'expressió de l'aquaporina-2 a ronyó de rata amb la seva excreció a l'orina en diversos models experimentals. Van observar que quant major era l'expressió d'aquest canal al ronyó, major quantitat se'n detectava en orina, concretament a la fracció que contenia els exosomes. Si teòricament l'excreció urinària de proteïnes transportadores de la membrana apical es realitza principalment a través de la via d'excreció d'exosomes, l'estudi de la seva excreció a l'orina seria un reflex del grau de transport tubular de sodi.

En situació de baixa ingesta de sal, el ronyó incrementa la reabsorció tubular de sodi per a mantenir el volum circulant eficaç i la PA. En canvi, quan la ingesta de sal augmenta de forma significativa la reabsorció tubular de sodi ha de disminuir, és a dir, cal eliminar-ne una major quantitat per evitar que es produeixi un augment perjudicial de la PA. Aquest és el concepte de natriuresi per pressió postulat per Guyton (1989). Així, els pacients a qui no els augmenta la PA quan ingereixen una dieta rica en sal, anomenats sal resistents, serien capaços d'augmentar l'excreció renal de sodi. Contràriament, els pacients que presenten un increment >10% de la PA quan



ingereixen una dieta rica en sal, anomenats sal sensibles, presenten una alteració en el maneig tubular del sodi i no serien capaços d'augmentar-ne suficientment la seva excreció a l'orina.

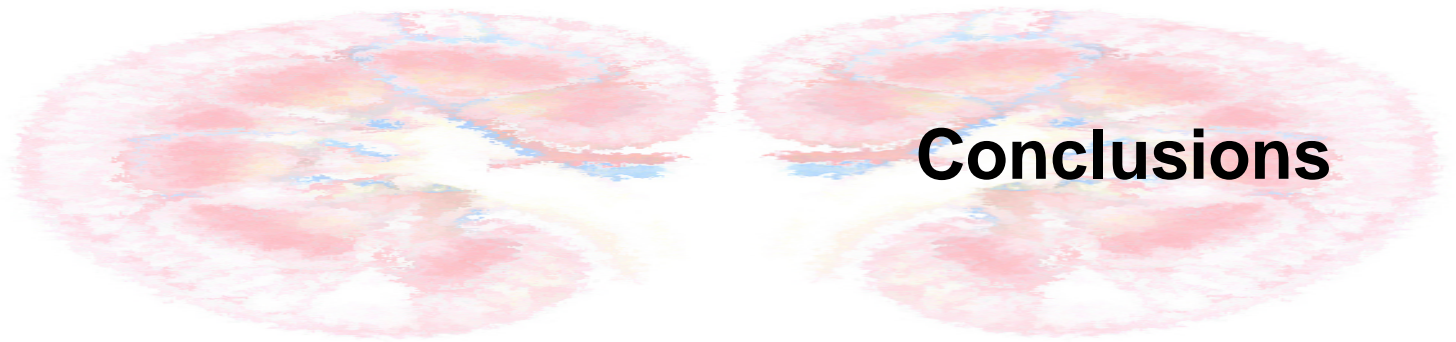
Al nostre estudi hem observat una manca de correlació entre les variacions de la reabsorció tubular de sodi i l'excreció d'exosomes que contenen NKCC2 i NCC a l'orina en funció de la ingesta de sal. Posteriorment, es va analitzar la possibilitat que pogués existir una resposta diferencial dels canvis en l'excreció dels transportadors en els dos períodes de la dieta en relació amb la resposta de la PA. Aquest anàlisi va detectar una gran heterogeneïtat en l'excreció a l'orina dels exosomes que contenen NKCC2 i NCC amb relació a la variació de la PA en funció de la ingesta de sal. Aquests resultats apuntarien a una manca d'implicació d'aquests transportadors renals de sodi amb la hipertensió i la sensibilitat a la sal. Ara bé, en aquest treball altres factors poden estar emmascarant la vinculació entre la quantitat de transportadors renals actius a la membrana apical i la sensibilitat a la sal de la PA. Així, la mostra més adequada per a realitzar aquest estudi hauria estat el teixit renal. Tanmateix, la biòpsia de ronyó és un procediment invasiu no indicat, en general, en pacients amb hipertensió arterial, per la qual cosa ens ha calgut utilitzar una font alternativa per estudiar de forma indirecta l'expressió d'aquests transportadors. No vam poder, per tant, estudiar com es correlacionava l'expressió dels transportadors de sodi en ronyó humà amb la seva excreció a l'orina. Fins al moment, no hi ha cap treball en què s'hagi investigat la possible correlació entre l'expressió d'aquests transportadors de sodi en ronyó i la seva excreció urinària. Per aquest motiu ens vam basar en l'estudi prèviament mencionat en què s'havia observat una correlació entre la quantitat d'aquaporina-2 a la membrana apical en ronyó de rata i la seva excreció en exosomes a l'orina (Wen i col. 1999).

Per altra banda, hauríem de tenir en compte la possible implicació d'altres transportadors que no s'han pogut analitzar en aquest estudi. De fet, a la bibliografia hi

ha dades que relacionen la ingesta de sal amb els transportadors renals de sodi NHE-3 o ENaC. Loffing i col. (2000) van detectar una major expressió apical de les tres subunitats de l'ENaC en rates quan els hi restringien la ingesta de sodi. Chiolero i col. (2000), en canvi, van estudiar en humans sal sensibles i sal resistents la reabsorció proximal de sodi, en la qual principalment intervé el transportador NHE-3, mitjançant la tècnica de l'aclariment de liti. Aquesta tècnica s'utilitza com a marcador de la reabsorció proximal de sodi, tot i que posteriorment s'ha observat que es pot reabsorbir liti en altres segments de la nefrona. En aquest treball els individus sal sensibles presentaven una major reabsorció proximal de sodi que podria indicar un increment de l'activitat i/o expressió de l'NHE-3. Aquests resultats suggereixen que no es pot descartar la implicació d'altres transportadors renals de sodi o de la interacció entre diferents transportadors de sodi a la sensibilitat a la sal de la PA.

Cal esmentar que la detecció dels transportadors mitjançant la tècnica de l'immunoblot és semiquantitativa i, per tant, la precisió de la tècnica podria no ser suficient per a detectar els nivells de variació en l'excreció d'aquests transportadors en funció de la ingesta de sal. Tanmateix, la quantificació de proteïna en orina emprant alguna tècnica més quantitativa com ara l'ELISA encara no està optimitzada.

També cal tenir en compte que la hipertensió és una patologia molt heterogènia amb multitud de factors tant de tipus genètic com ambiental implicats en el seu origen i desenvolupament que podrien estar interaccionant amb els transportadors de sodi aquí analitzats i dificultar la interpretació dels resultats obtinguts en el nostre estudi. Així doncs, d'aquest treball podem concloure que l'estudi de l'excreció en exosomes urinaris dels transportadors renals de sodi NKCC2 i NCC no permet preveure quin regió tubular pot estar implicada en la patogènia de la sal sensibilitat.



## **Conclusions**



## CONCLUSIONS

### **EXPRESSIÓ DELS TRANSPORTADORS RENALS DE SODI I AQUAPORINES EN UN MODEL EXPERIMENTAL DE RATA D'HIPERTENSIÓ ARTERIAL INDUÏDA PER CICLOSPORINA**

- El NKCC2, principal transportador de sodi a la nansa gruixuda ascendent de Henle, es troba significativament incrementat en rates amb hipertensió induïda per ciclosporina. Aquestes dades indicarien que el transportador NKCC2 està implicat en la retenció de sodi en la HTA induïda per ciclosporina.
- S'ha trobat un lleuger augment en els nivells de proteïna NHE-3 en les rates tractades amb ciclosporina respecte les rates control. Tot i que aquest increment no és estadísticament significatiu, no es pot descartar un possible efecte de la ciclosporina sobre l'expressió d'aquest transportador en aquest model d'HTA.
- L'augment d'aquaporina-1 detectat a les rates tractades podria estar afavorint una reabsorció més efectiva d'aigua al túbul proximal. La reducció de l'expressió d'aquaporina-2 a les rates tractades conduiria a una disminució de la permeabilitat del túbul col·lector i podria representar un mecanisme compensatori a l'increment de la reabsorció de sodi i aigua i posterior augment de la PA.

### **ESTUDI DE L'EXCRECIÓ URINÀRIA DE LES AQUAPORINES-1 I -2 EN PACIENTS AMB CIRROSI HEPÀTICA**

- S'ha detectat una disminució de l'excreció urinària d'aquaporina-2 a mesura que progressa la retenció d'aigua i sodi en la cirrosi hepàtica. La disminució de l'expressió d'aquaporina-2 en ronyó pot representar una resposta compensatòria a la hiponatrèmia i a l'expansió del fluid extracel·lular present als pacients amb cirrosi avançada.
- No s'han trobat diferències en l'excreció urinària d'aquaporina-1 entre individus controls i pacients cirròtics amb o sense ascites, tot i que aquest canal d'aigua s'ha trobat disminuït en pacients amb síndrome hepatorenal.

### **LOCALITZACIÓ ULTRAESTRUCTURAL DELS TRANSPORTADORS DE SODI I AQUAPORINES EN RONYÓ HUMÀ I EXOSOMES URINÀRIS**

- S'ha observat per primera vegada en ronyó humà la localització subcel·lular associada a vesícules que constituïrien els cossos multivesiculars del transportador renal NKCC2 i l'aquaporina-2, així com les formes fosforilades pNKCC2 i pS256-Aquaporina-2.

- S'ha confirmat en orina humana l'excreció de les proteïnes anteriorment esmentades, així com de l'aquaporina-1, associades a exosomes (vesícules menors de 100 nm).

### **EXCRECIÓ DELS TRANSPORTADORS RENALS DE SODI NKCC2 I NCC EN EXOSOMES URINARIS DE PACIENTS HIPERTENSOS EN RELACIÓ AMB LA INGESTA DE SAL**

- L'excreció en exosomes urinaris dels transportadors renals de sodi NKCC2 i NCC no permet preveure quina regió tubular pot estar implicada en la patogènia de la sal sensibilitat.



## **Bibliografia**





- Abdallah JG, Schrier RW, Edelstein C, Jennings SD, Wyse B, Ellison DH. Loop diuretic infusion increases thiazide-sensitive Na(+)/Cl(-)-cotransporter abundance: role of aldosterone. *J Am Soc Nephrol*. 2001 Jul;12(7):1335-41.
- Adachi J, Kumar C, Zhang Y, Olsen JV, Mann M. The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins. *Genome Biol*. 2006;7(9):R80.
- Agre P, King LS, Yasui M, Guggino WB, Ottersen OP, Fujiyoshi Y i col. Aquaporin water channels--from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol*. 2002 Jul 1;542(Pt 1):3-16.
- Agre P, Kozono D. Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases. *FEBS Lett* 2003 Nov 27;555(1):72-78.
- Aldred KL, Harris PJ, Eitle E. Increased proximal tubule NHE-3 and H<sup>+</sup>-ATPase activities in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2000 May;18(5):623-8.
- Alvarez-Guerra M, Garay RP. Renal Na-K-Cl cotransporter NKCC2 in Dahl salt-sensitive rats. *J Hypertens*. 2002 Apr;20(4):721-7.
- Amemiya M, Loffing J, Lötscher M, Kaissling B, Alpern RJ, Moe OW. Expression of NHE-3 in the apical membrane of rat renal proximal tubule and thick ascending limb. *Kidney Int*. 1995; Oct;48(4):1206-15.
- Arai K, Zachman K, Shibasaki T, Chrousos GP. Polymorphisms of amiloride-sensitive sodium channel subunits in five sporadic cases of pseudohypoaldosteronism: do they have pathologic potential? *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84:2434-7.
- Arroyo V, Gines P, Gerbes AL, Dudley FJ, Gentilini P, Laffi G, i col. Definition and diagnostic criteria of refractory ascites and hepatorenal syndrome in cirrhosis. *International Ascites Club. Hepatology* 1996 Jan;23(1):164-176.
- Arroyo V. Pathophysiology, diagnosis and treatment of ascites in cirrhosis. *Ann Hepatol*. 2002 Apr-Jun;1(2):72-9.
- Asahina Y, Izumi N, Enomoto N, Sasaki S, Fushimi K, Marumo F, i col. Increased gene expression of water channel in cirrhotic rat kidneys. *Hepatology* 1995 Jan;21(1):169-173.
- Alcázar R, Egido J. Síndrome nefrótico: fisiopatología y tratamiento general. In: Avendaño, L. H. *Nefrología Clínica*. Ed. Médica Panamericana. 2 ed, 2003.
- Bachinsky DR, Sabolic I, Emmanuel DS, Jefferson DM, Carone FA, Brown D i col. Water channel expression in human ADPKD kidneys. *Am J Physiol*. 1995 Mar;268(3 Pt 2):F398.
- Bacic D, Lehir M, Biber J, Kaissling B, Murer H, Wagner CA. The renal Na<sup>+</sup>/phosphate cotransporter NaPi-IIa is internalized via the receptor-mediated endocytic route in response to parathyroid hormone. *Kidney Int*. 2006;69:495-503.
- Bank N, Aynedjian HS. A micropuncture study of renal salt and water retention in chronic bile duct obstruction. *J Clin Invest* 1975 May;55(5):994-1002.
- Barba G, Galletti F, Cappuccio FP, Siani A, Venezia A, Versiero M i col. Incidence of hypertension in individuals with different blood pressure salt-sensitivity: results of a 15-year follow-up study. *J Hypertens*. 2007 Jul;25(7):1465-71.
- Becker M, Nothwang HG, Friauf E. Differential expression pattern of chloride transporters NCC, NKCC2, KCC1, KCC3, KCC4, and AE3 in the developing rat auditory brainstem. *Cell Tissue Res*. 2003 May;312(2):155-65.

- Bergwitz C, Roslin NM, Tieder M, Loredó-Ostí JC, Bastepe M, bu-Zahra H, i col. SLC34A3 mutations in patients with hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria predict a key role for the sodium-phosphate cotransporter NaPi-IIc in maintaining phosphate homeostasis. *Am J Hum Genet.* 2006;78:179-92.
- Bertuccio CA, Ibarra FR, Toledo JE, Arrizurieta EE, Martín RS. Endogenous vasopressin regulates Na-K-ATPase and Na(+)-K(+)-Cl(-) cotransporter rbsc-1 in rat outer medulla. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002 Feb;282(2):F265-70.
- Blumenfeld J, Laragh JH. Essential hypertension. In: Brenner BM, ed. *Brenner and Rector's The Kidney.* 7 ed. W.B. Saunders: Philadelphia, 2004.
- Bonny O, Hummler E. Dysfunction of epithelial sodium transport: from human to mouse. *Kidney Int.* 2000 Apr;57(4):1313-8.
- Botey A, Revert L. Hipertensión arterial. En: Farreras P, Rozman C. *Medicina Interna.* 12 ed. Doyma, 1992.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.
- Brenner BM, ed Brenner and Rector's. *The kidney.* 8 ed. Saunders, 2008.
- Breyer MD, Zhang Y, Guan YF, Hao CM, Hebert RL, Breyer RM. Regulation of renal function by prostaglandin E receptors. *Kidney Int.Suppl* 1998; 67:S88-S94.
- Burckhardt G, Di Sole F, Helmle-Kolb C. The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger gene family. *J Nephrol.* 2002 Mar-Apr;15 Suppl 5:S3-21.
- Capasso G, Rizzo M, Evangelista C i col. Altered expression of renal apical plasma membrane Na<sup>+</sup> transporters in the early phase of genetic hypertension. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 2005; 288:F1173-F1182.
- Caramelo C, Lamas S, López-Farre A, Lahera V, Díez D i col. Hipertensión Arterial. In *Nefrología Clínica.* Panamericana. 1997; 158-202.
- Chang CT, Hung CC, Yang CW, Vandewalle A, Wu MS. Cyclosporine decreases prostaglandin E2 production in mouse medullary thick ascending limb cultured cells. *Transpl.Int.* 2005; 18:871-878.
- Chang SS, Grunder S, Hanukoglu A, Rosler A, Mathew PM, Hanukoglu A, i col. Mutations in subunits of the epithelial sodium channel cause salt wasting with hyperkalaemic acidosis, pseudohypoaldosteronism type 1. *Nat Genet.* 1996;12:248-53.
- Chen YC, Cadnapaphornchai MA, Schrier RW. Clinical update on renal aquaporins. *Biol Cell.* 2005 Jun;97(6):357-71.
- Cheruvanky A, Zhou H, Pisitkun T, Kopp JB, Knepper MA, Yuen PS i col. Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration concentrator. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007 May;292(5):F1657-61.
- Chiolero A, Maillard M, Nussberger J, Brunner HR, Burnier M. Proximal sodium reabsorption: An independent determinant of blood pressure response to salt. *Hypertension.* 2000 Oct;36(4):631-7.
- Christensen BM, Zelenina M, Aperia A, Nielsen S. Localization and regulation of PKA-phosphorylated AQP2 in response to V(2)-receptor agonist/antagonist treatment. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000 Jan;278(1):F29-42.

- Ciresi, D.L., Lloyd, M.A., Sandberg, S.M., Heublein, D.M., and Edwards, B.S. 1992. The sodium retaining effects of cyclosporine. *Kidney Int.* 41:1599-1605.
- Claria J, Jimenez W. Experimental models of cirrhosis and ascites. In: Arroyo V, Gines P, Rodes J, Schrier RW, eds. *Ascites and Renal Dysfunction in Liver Disease*. 2<sup>nd</sup> ed. Malden, MA: Blackwell Science, 2005:215-226.
- Dahl LK. Possible role of salt intake in the development of essential hypertension. 1960. *Int J Epidemiol.* 2005 Oct;34(5):967-72; discussion 972-4.
- Davison AM, Cameron JS, Grünfeld JP, Ponticelli C, Ritz E, Winearls CG i col. *Oxford Textbook of Clinical Nephrology*. 3 ed. Oxford University Press, 2005.
- Deen PM, Verdijk MA, Knoers NV i col. Requirement of human renal water channel aquaporin-2 for vasopressin-dependent concentration of urine. *Science* 1994; 264:92-95.
- Deter HC, Micus C, Wagner M, Sharma AM, Buchholz K. Salt sensitivity, anxiety, and irritability predict blood pressure increase over five years in healthy males. *Clin Exp Hypertens.* 2006 Jan;28(1):17-27.
- DiGiovanni SR, Nielsen S, Christensen EI, Knepper MA. Regulation of collecting duct water channel expression by vasopressin in Brattleboro rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Sep 13;91(19):8984-8.
- Eaton DC, Pooler J, ed McGraw-Hill. *Vander's renal physiology*. 6 ed. 2004.
- Ecelbarger CA, Kim GH, Wade JB, Knepper MA. Regulation of the abundance of renal sodium transporters and channels by vasopressin. *Exp Neurol.* 2001;171:227-34.
- Ecelbarger CA, Terris J, Frindt G, Echevarria M, Marples D, Nielsen S i col. Aquaporin-3 water channel localization and regulation in rat kidney. *Am J Physiol.* 1995 Nov;269(5 Pt 2):F663-72.
- Ecelbarger CA, Terris J, Hoyer JR, Nielsen S, Wade JB, Knepper MA. Localization and regulation of the rat renal Na(+)-K(+)-2Cl<sup>-</sup> cotransporter, BSC-1. *Am J Physiol.* 1996 Sep;271(3 Pt 2):F619-28.
- Ecelbarger CA, Yu S, Lee AJ, Weinstein LS, Knepper MA. Decreased renal Na-K-2Cl cotransporter abundance in mice with heterozygous disruption of the G(s)alpha gene. *Am.J.Physiol* 1999; 277:F235-F244.
- Fernández-Llama P, Andrews P, Ecelbarger CA, Nielsen S, Knepper M. Concentrating defect in experimental nephrotic syndrome: altered expression of aquaporins and thick ascending limb Na<sup>+</sup> transporters. *Kidney Int.* 1998 Jul;54(1):170-9.
- Fernández-Llama P, Andrews P, Nielsen S, Ecelbarger CA, Knepper MA. Impaired aquaporin and urea transporter expression in rats with adriamycin-induced nephrotic syndrome. *Kidney Int.* 1998 May;53(5):1244-53.
- Fernandez-Llama P, Ecelbarger CA, Ware JA, Andrews P, Lee AJ, Turner R, i col. Cyclooxygenase inhibitors increase Na-K-2Cl cotransporter abundance in thick ascending limb of Henle's loop. *Am J Physiol.* 1999;277:F219-26.
- Fernandez-Llama P, Gines P, Schrier RW. Pathogenesis of sodium retention in cirrhosis. The arterial vasodilatation hypothesis of ascites formation. In: Arroyo V, Gines P, Rodes J, Schrier RW, eds. *Ascites and Renal Dysfunction in Liver Disease*. 2ed. Malden, MA: Blackwell Science, 2005:201-214.

- Fernandez-Llama P, Jimenez W, Bosch-Marce M, Arroyo V, Nielsen S, Knepper MA. Dysregulation of renal aquaporins and Na-Cl cotransporter in CCl<sub>4</sub>-induced cirrhosis. *Kidney Int* 2000 Jul;58(1):216-228.
- Fernandez-Llama P, Turner R, Dibona G, Knepper MA. Renal expression of aquaporins in liver cirrhosis induced by chronic common bile duct ligation in rats. *J Am Soc Nephrol* 1999 Sep;10(9):1950-1957.
- Février B, Raposo G. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr Opin Cell Biol.* 2004 Aug;16(4):415-21.
- Funayama H, Nakamura T, Saito T, Yoshimura A, Saito M, Kawakami M, et al. Urinary excretion of aquaporin-2 water channel exaggerated dependent upon vasopressin in congestive heart failure. *Kidney Int* 2004 Oct;66(4):1387-1392.
- Gamba G. Role of WNK kinases in regulating tubular salt and potassium transport and in the development of hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;288:F245-52.
- Giménez I, Forbush B. Regulatory phosphorylation sites in the NH<sub>2</sub> terminus of the renal Na-K-Cl cotransporter (NKCC2). *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005 Dec;289(6):F1341-5.
- Giménez I, 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.* 2003 Jul 18;278(29):26946-51.
- Giménez I, 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.* 2007 Mar 2;282(9):6540-7.
- Gines P, Berl T, Bernardi M, Bichet DG, Hamon G, Jimenez W, et al. Hyponatremia in cirrhosis: from pathogenesis to treatment. *Hepatology* 1998 Sep;28(3):851-864.
- Gines P, Cardenas A, Schrier RW. Liver disease and the Kidney. In: Schrier RW, ed. *Diseases of the Kidney and Urinary Tract.* 8 ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
- Glorioso N, Filigheddu F, Troffa C, Soro A, Parpaglia PP, Tsikoudakis A, et al. Interaction of alpha(1)-Na,K-ATPase and Na,K,2Cl-cotransporter genes in human essential hypertension. *Hypertension.* 2001 Aug;38(2):204-9.
- Gonzales PA, Pisitkun T, Knepper MA. Urinary exosomes: is there a future? *Nephrol Dial Transplant.* 2008 Mar 1;
- Greger R. Physiology of renal sodium transport. *Am J Med Sci.* 2000; 319: 51-62.
- Guyton AC. Dominant role of the kidneys and accessory role of whole-body autoregulation in the pathogenesis of hypertension. *Am J Hypertens.* 1989 Jul;2(7):575-85.
- Hara-Chikuma M, Verkman AS. Aquaporin-1 facilitates epithelial cell migration in kidney proximal tubule. *J Am Soc Nephrol.* 2006 Jan;17(1):39-45.
- Hebert SC. Bartter syndrome. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2003 Sep;12(5):527-32.
- Herrera VLM, Lopez LV, Ruiz-Opazo N.  $\alpha$ 1-Na,K-ATPase and Na,K,2Cl-cotransporter / D3 mit3 loci interact to increase susceptibility to salt-sensitive hypertension in Dahl SHSD rats. *Mol Med.* 2001;7:125-134.

- Hoagland KM, Flasch AK, Dahly-Vernon AJ, dos Santos EA, Knepper MA, Roman RJ. Elevated BSC-1 and ROMK expression in Dahl salt-sensitive rat kidneys. *Hypertension*. 2004 Apr;43(4):860-5.
- Hoorn EJ, Pisitkun T, Zietse R, Gross P, Frokiaer J, Wang NS i col. Prospects for urinary proteomics: exosomes as a source of urinary biomarkers. *Nephrology (Carlton)*. 2005 Jun;10(3):283-90.
- Ishikawa SE, Schrier RW. Pathogenesis of Hyponatremia: the role of Arginine-Vasopressin. In: Arroyo V, Gines P, Rodes J, Schrier RW, eds. *Ascites and Renal Dysfunction in Liver Disease*. 2 ed. Blackwell Science, 2005.
- Ivarsen P, Frokiaer J, Aagaard NK, Hansen EF, Bendtsen F, Nielsen S, i col. Increased urinary excretion of aquaporin 2 in patients with liver cirrhosis. *Gut* 2003;52:1194-1199.
- Jonassen TE, Brond L, Torp M, Graebe M, Nielsen S, Skott O, i col. Effects of renal denervation on tubular sodium handling in rats with CBL-induced liver cirrhosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003 Mar;284(3):F555-F563.
- Kanno K, Sasaki S, Hirata Y, Ishikawa S, Fushimi K, Nakanishi S i col. Urinary excretion of aquaporin-2 in patients with diabetes insipidus. *N Engl J Med*. 1995 Jun 8;332(23):1540-5.
- Kasiske BL, Anjum S, Shah R i col. Hypertension after kidney transplantation. *Am.J.Kidney Dis*. 2004; 43:1071-1081.
- Kawasaki T, Delea CS, Bartter FC, Smith H. The effect of high-sodium and low-sodium intakes on blood pressure and other related variables in human subjects with idiopathic hypertension. *Am J Med*. 1978 Feb;64(2):193-8.
- Keller S, Sanderson MP, Stoeck A, Altevogt P. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunol Lett*. 2006 Nov 15;107(2):102-8.
- Kim GH, Ecelbarger CA, Mitchell C, Packer RK, Wade JB, Knepper MA. Vasopressin increases Na-K-2Cl cotransporter expression in thick ascending limb of Henle's loop. *Am J Physiol*. 1999;276:F96-103.
- Kim GH, Lee JW, Oh YK, Chang HR, Joo KW, Na KY, i col. Antidiuretic effect of hydrochlorothiazide in lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus is associated with upregulation of aquaporin-2, Na-Cl co-transporter, and epithelial sodium channel. *J Am Soc Nephrol* 2004 Nov;15(11):2836-2843.
- Kim GH, Masilamani S, Turner R, Mitchell C, Wade JB, Knepper MA. The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter is an aldosterone-induced protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:14552-7.
- King LS, Choi M, Fernandez PC, Cartron JP, Agre P. Defective urinary-concentrating ability due to a complete deficiency of aquaporin-1. *N Engl J Med*. 2001 Jul 19;345(3):175-9.
- Kiprov D. Experimental models of hypertension. *Cor Vasa*. 1980;22(1-2):116-28.
- Klein JD, Murrell BP, Tucker S, Kim YH, Sands JM. Urea transporter UT-A1 and aquaporin-2 proteins decrease in response to angiotensin II or norepinephrine-induced acute hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006 Nov;291(5):F952-9.
- Kleta R, Bockenhauer D. Bartter syndromes and other salt-losing tubulopathies. *Nephron Physiol*. 2006;104(2):p73-80.
- Knepper MA. Proteomics and the kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13:1398.

- Kuiper JJ, van Buuren HR, de Man RA. Ascites in cirrhosis: a review of management and complications. *Neth J Med.* 2007 Sep;65(8):283-8.
- Kwon TH, Nielsen J, Kim YH, Knepper MA, Frokiaer J, Nielsen S. Regulation of sodium transporters in the thick ascending limb of rat kidney: response to angiotensin II. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003;285:F152-65.
- Kwon TH, Nielsen J, Masilamani S, Hager H, Knepper MA, Frokiaer J i col. Regulation of collecting duct AQP3 expression: response to mineralocorticoid. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002 Dec;283(6):F1403-21.
- Lang F, Capasso G, Schwab M, Waldegger S. Renal tubular transport and the genetic basis of hypertensive disease. *Clin Exp Nephrol.* 2005;9:91-9.
- LaPointe MS, Sodhi C, Sahai A, Battle D. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange activity and NHE-3 expression in renal tubules from the spontaneously hypertensive rat. *Kidney Int.* 2002 Jul;62(1):157-65.
- Laragh GH. Renin profiling for diagnosis, risk assessment, and treatment of hypertension. *Kidney Int* 1993; 44: 1163-1175.
- Leaf A, Bartter FC, Santos RF, Wrong O. Evidence in man that urinary electrolyte loss induced by pitressin is a function of water retention. *J Clin Invest* 1953 Sep;32(9):868-878.
- Li J, Wang DH. Function and regulation of epithelial sodium transporters in the kidney of a salt-sensitive hypertensive rat model. *J Hypertens.* 2007 May;25(5):1065-72.
- Lindpaintner K. Genetic linkage analysis in hypertension: principles and practice. *J Hypertension* 1992; 10: 121-124.
- Loffing J, Pietri L, Aregger F, Bloch-Faure M, Ziegler U, Meneton P i col. Differential subcellular localization of ENaC subunits in mouse kidney in response to high- and low-Na diets. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000 Aug;279(2):F252-8.
- Lopez-Novoa JM, Rengel MA. A micropuncture study of salt and water retention in chronic experimental cirrhosis. *Am J Physiol* 1977 Apr;232(4):F315-F318.
- Luft FC. Mendelian forms of human hypertension and mechanisms of disease. *Clin Med Res.* 2003 Oct;1(4):291-300.
- Ma T, Yang B, Gillespie A, Carlson EJ, Epstein CJ, Verkman AS. Severely impaired urinary concentrating ability in transgenic mice lacking aquaporin-1 water channels. *J Biol Chem.* 1998 Feb 20;273(8):4296-9.
- Manning J, Beutler K, Knepper MA, Vehaskari VM. Upregulation of renal BSC1 and TSC in prenatally programmed hypertension. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 2002; 283:F202-F206.
- Marples D, Christensen S, Christensen EI, Ottosen PD, Nielsen S. Lithium-induced downregulation of aquaporin-2 water channel expression in rat kidney medulla. *J Clin Invest.* 1995 Apr;95(4):1838-45.
- Masilamani S, Kim GH, Mitchell C, Wade JB, Knepper MA. Aldosteronemediated regulation of ENaC alpha, beta, and gamma subunit proteins in rat kidney. *J Clin Invest.* 1999;104:R19-23.
- Masilamani S, Wang X, Kim GH, Brooks H, Nielsen J, Nielsen S i col. Time course of renal Na-K-ATPase, NHE3, NKCC2, NCC, and ENaC abundance changes with dietary NaCl restriction. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002 Oct;283(4):F648-57.

- Maunsbach AB, Marples D, Chin E, Ning G, Bondy C, Agre P i col. Aquaporin-1 water channel expression in human kidney. *J Am Soc Nephrol*. 1997 Jan;8(1):1-14.
- McKee JA, Kumar S, Ecelbarger CA, Fernández-Llama P, Terris J, Knepper MA. Detection of Na(+) transporter proteins in urine. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11:2128-32.
- McKinley M, O'Loughlin VD. Human anatomy. Urinary system.1 ed. McGraw-Hill, 2006.
- Mervaala E, Lassila M, Vaskonen T, Krogerus L, Lähteenmäki T, Vapaatalo H i col. Effects of ACE inhibition on cyclosporine A-induced hypertension and nephrotoxicity in spontaneously hypertensive rats on a high-sodium diet. *Blood Press*. 1999;8(1):49-56.
- Miall WE. Follow up study of arterial pressure in the population of a Welsh mining valley. *Br Med J* 1956; ii: 1204-1208.
- Moe OW. Acute regulation of proximal tubule apical membrane Na/H exchanger NHE-3: role of phosphorylation, protein trafficking, and regulatory factors. *J Am Soc Nephrol*. 1999 Nov;10(11):2412-25.
- Morello JP, Bichet DG. Nephrogenic diabetes insipidus. *Annu Rev Physiol*. 2001;63:607-30.
- Nakamura S, Amlal H, Schultheis PJ, Galla JH, Shull GE, Soleimani M. HCO<sub>3</sub> reabsorption in renal collecting duct of NHE-3-deficient mouse: a compensatory response. *Am J Physiol* 1999 Jun;276(6 Pt 2):F914-F921.
- Nielsen S, Chou CL, Marples D, Christensen EI, Kishore BK, Knepper MA. Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 Feb 14;92(4):1013-1017.
- Nielsen S, DiGiovanni SR, Christensen EI, Knepper MA, Harris HW. Cellular and subcellular immunolocalization of vasopressin-regulated water channel in rat kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Dec 15;90(24):11663-7.
- Nielsen S, Frøkiaer J, Marples D, Kwon TH, Agre P, Knepper MA. Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. *Physiol Rev*. 2002 Jan;82(1):205-44.
- Nielsen S, Kwon TH, Frøkiaer J, Agre P. Regulation and dysregulation of aquaporins in water balance disorders. *J Intern Med*. 2007 Jan;261(1):53-64.
- Nielsen S, Maunsbach AB, Ecelbarger CA, Knepper MA. Ultrastructural localization of Na-K-2Cl cotransporter in thick ascending limb and macula densa of rat kidney. *Am J Physiol*. 1998 Dec;275(6 Pt 2):F885-93.
- Norman M.Kaplan. Hipertensión Clínica. Lippincott Williams & Wilkins. 2002.
- Obermüller N, Kunchaparty S, Ellison DH, 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*. 1996 Aug 1;98(3):635-40.
- Orijj GK, Keiser HR. Role of nitric oxide in cyclosporine A-induced hypertension. *Hypertension*. 1998 Nov;32(5):849-55.
- Pandey CK, Singh N, Kumar V, Agarwal A, Baronia AK, Gaur A, i col. Hepatorenal syndrome: pathophysiology and treatment. *J Assoc Physicians India*. 2002 Jun;50:819-25.
- Pecker MS, Laragh JH. Dietary salt and blood pressure. A perspective. *Hypertension*. 1991 Jan;17(1 Suppl):I97-9.

- Pedersen RS, Bentzen H, Bech JN, Nyvad O, Pedersen EB. Urinary aquaporin-2 in healthy humans and patients with liver cirrhosis and chronic heart failure during baseline conditions and after acute water load. *Kidney Int.* 2003 Apr;63(4):1417-25.
- Pere AK, Krogerus L, Mervaala EM, Karppanen H, Ahonen J, Lindgren L. Beneficial effects of dietary magnesium and potassium on cardiac and renal morphologic features in cyclosporin A-induced damage in spontaneously hypertensive rats. *Surgery.* 2000 Jul;128(1):67-75.
- Pisitkun T, Johnstone R, Knepper MA. Discovery of urinary biomarkers. *Mol Cell Proteomics.* 2006 Oct;5(10):1760-71.
- Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:13368.
- Prabhakar SS. Regulatory and functional interaction of vasoactive factors in the kidney and extracellular pH. *Kidney Int.* 2004 Nov;66(5):1742-54.
- Rai T, Sekine K, Kanno K, Hata K, Miura M, Mizushima A i col. Urinary excretion of aquaporin-2 water channel protein in human and rat. *J Am Soc Nephrol.* 1997 Sep;8(9):1357-62.
- Reissinger A, Ludwig M, Utsch B, Promse A, Baulmann J, Weisser B, i col. Novel NCCT gene mutations as a cause of Gitelman's syndrome and a systematic review of mutant and polymorphic NCCT alleles. *Kidney Blood Press Res.* 2002;25:354-62.
- Rossier BC, Pradervand S, Schild L, Hummler E. Epithelial sodium channel and the control of sodium balance: interaction between genetic and environmental factors. *Annu Rev Physiol.* 2002;64:877-97.
- Russell JM. Sodium-potassium-chloride cotransport. *Physiol Rev.* 2000 Jan;80(1):211-76.
- Sabath E, Meade P, Berkman J, de los Heros P, Moreno E, Bobadilla NA i col. Pathophysiology of functional mutations of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter in Gitelman disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004 Aug;287(2):F195-203.
- Saito T, Ishikawa SE, Ando F, Okada N, Nakamura T, Kusaka i col. Exaggerated urinary excretion of aquaporin-2 in the pathological state of impaired water excretion dependent upon arginine vasopressin. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 Nov;83(11):4034-40.
- Saito T, Ishikawa SE, Sasaki S, Nakamura T, Rokkaku K, Kawakami A i col. Urinary excretion of aquaporin-2 in the diagnosis of central diabetes insipidus. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 Jun;82(6):1823-7.
- Sandberg MB, Maunsbach AB, McDonough AA. Redistribution of distal tubule Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter (NCC) in response to a high-salt diet. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006 Aug;291(2):F503-8.
- Sandberg MB, Riquier AD, Pihakaski-Maunsbach K, McDonough AA, Maunsbach AB. ANG II provokes acute trafficking of distal tubule Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter to apical membrane. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007 Sep;293(3):F662-9.
- Sands JM, Kokko JP. Countercurrent system. *Kidney Int.* 1990 Oct;38(4):695-9.
- Schafer JA. Abnormal regulation of ENaC: syndromes of salt retention and salt wasting by the collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002 Aug;283(2):F221-35.



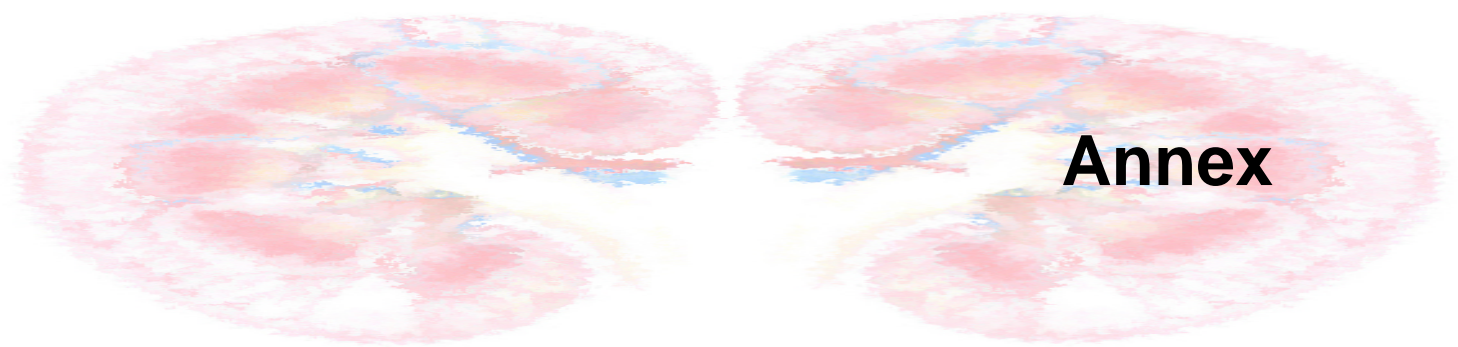
- Schrier RW, Cadnapaphornchai MA, Umenishi F. Water-losing and water-retaining states: role of water channels and vasopressin receptor antagonists. *Heart Dis* 2001 May;3(3):210-214.
- Shirley D, Unwin RJ. The structure and function of tubules. In *Oxford Textbook of Clinical Nephrology*. Helen Liepman. 2005.
- Simon DB, Karet FE, Hamdan JM, DiPietro A, Sanjad SA, Lifton RP. Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nat Genet*. 1996 Jun;13(2):183-8.
- Snyder PM, Price MP, McDonald FJ, Adams CM, Volk KA, Zeiher BG, i col. Mechanism by which Liddle's syndrome mutations increase activity of a human epithelial Na<sup>+</sup> channel. *Cell*. 1995;83:969-78.
- Sonalker PA, Tofovic SP, Jackson EK. Increased expression of the sodium transporter BSC-1 in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004 Dec;311(3):1052-61.
- Song J, Hu X, Shi M, Knepper MA, Ecelbarger CA. Effects of dietary fat, NaCl, and fructose on renal sodium and water transporter abundances and systemic blood pressure. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004 Dec;287(6):F1204-12.
- Starklint J, Bech JN, Pedersen EB. Urinary excretion of aquaporin-2 after furosemide and felodipine in healthy humans. *Scand J Clin Lab Invest* 2005;65(3):249-261.
- Starremans PG, Kersten FF, Knoers NV, Van den Heuvel LP, 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*. 2003;14:1419-26.
- Terris J, Ecelbarger CA, Nielsen S, Knepper MA. Long-term regulation of four renal aquaporins in rats. *Am J Physiol*. 1996 Aug;271(2 Pt 2):F414-22.
- Torikai S, Kurokawa K. Effect of PGE<sub>2</sub> on vasopressin-dependent cell cAMP in isolated single nephron segments. *Am.J.Physiol* 1983; 245:F58-F66.
- Townsend RR, Kapoor S, McFadden CB. Salt intake and insulin sensitivity in healthy human volunteers. *Clin Sci (Lond)*. 2007 Aug;113(3):141-8.
- Valenti G, Laera A, Pace G, Aceto G, Lospalluti ML, Penza R, i col. Urinary aquaporin 2 and calciuria correlate with the severity of enuresis in children. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:1873-1881.
- Vallon V. Tubuloglomerular feedback and the control of glomerular filtration rate. *News Physiol Sci*. 2003 Aug;18:169-74.
- Van Niel G, Porto-Carreiro I, Simoes S, Raposo G. Exosomes: a common pathway for a specialized function. *J Biochem*. 2006 Jul;140(1):13-21.
- Verbalis JG. Whole-body volume regulation and escape from antidiuresis. *Am J Med* 2006;119(7 Suppl 1):S21-S29.
- 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*. 1998;101:1661-9.
- Wen H, Frokiaer J, Kwon TH i col. Urinary excretion of aquaporin-2 in rat is mediated by a vasopressin-dependent apical pathway. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10:1416.
- Wiederkehr MR, Di SF, Collazo R, Quinones H, Fan L, Murer H, i col. Characterization of acute inhibition of Na/H exchanger NHE-3 by dopamine in

opossum kidney cells. *Kidney Int* 2001 Jan;59(1):197-209.

Wu MS, Yang CW, Bens M, Peng KC, Yu HM, Vandewalle A. Cyclosporine stimulates Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransport activity in cultured mouse medullary thick ascending limb cells. *Kidney Int.* 2000; 58: 1652–1663.

Zhou H, Pisitkun T, Aponte A, Yuen PS, Hoffert JD, Yasuda H i col. Exosomal Fetuin-A identified by proteomics: a novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury. *Kidney Int.* 2006 Nov;70(10):1847-57.

Zhou H, Yuen PS, Pisitkun T, Gonzales PA, Yasuda H, Dear JW, i col. Collection, storage, preservation, and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery. *Kidney Int* 2006 Apr;69(8):1471-1476.



**Annex**



## ANNEX

D'aquest treball han sorgit dos articles originals i una revisió:

1. *Aquaporin-1 and aquaporin-2 urinary excretion in cirrhosis: Relationship with ascites and hepatorenal síndrome*, *Hepatology*. Dec;44(6):1555-63 (2006).
2. *Ciclosporin-induced hypertension is associated with increased sodium transporter of the loop of Henle (NKCC2)*, *Nephrol Dial Transplant*. Oct;22(10):2810-6 (2007).
3. *Transportadores de sodio y aquaporinas: ¿futuros biomarcadores renales?*, *Med Clin (Barc)*: Sep 29;129(11):433-7 (2007).



# Aquaporin-1 and Aquaporin-2 Urinary Excretion in Cirrhosis: Relationship With Ascites and Hepatorenal Syndrome

Christina Esteva-Font,<sup>1</sup> Maria E. Baccaro,<sup>2</sup> Patricia Fernández-Llama,<sup>3</sup> Laia Sans,<sup>3</sup> Monica Guevara,<sup>2</sup> Elisabet Ars,<sup>1</sup> Wladimiro Jiménez,<sup>4</sup> Vicente Arroyo,<sup>2</sup> Jose A. Ballarín,<sup>3</sup> and Pere Ginès<sup>2</sup>

Several experimental models of cirrhosis have shown dysregulation of renal aquaporins in different phases of liver disease. We investigated the urinary excretion of both aquaporin-1 and aquaporin-2 in patients with cirrhosis at different stages of the disease. Twenty-four-hour urine was collected from 11 healthy volunteers, 13 patients with compensated cirrhosis (without ascites), and 20 patients with decompensated cirrhosis (11 with ascites without renal failure and 9 with hepatorenal syndrome). Aquaporin-1 and aquaporin-2 excretion was analyzed by immunoblotting. Urinary aquaporin-2 excretion was reduced in patients with cirrhosis compared to healthy subjects. A progressive decrease in urinary aquaporin-2 excretion was observed as the severity of cirrhosis increased, from compensated cirrhosis to cirrhosis with ascites and hepatorenal syndrome. Patients with hyponatremia had lower urinary aquaporin-2 excretion than patients without hyponatremia. Vasopressin plasma level did not correlate with aquaporin-2 excretion. There were no differences between healthy subjects and patients with cirrhosis with or without ascites in urinary excretion of aquaporin-1, but urinary aquaporin-1 excretion of those with hepatorenal syndrome was extremely low. **In conclusion**, patients with cirrhosis appear to exhibit a decreased abundance of renal aquaporin-2 and therefore lower water permeability in the collecting tubules. This may represent an adaptive renal response to sodium retention, with expansion of extracellular fluid volume and dilutional hyponatremia observed in those who have cirrhosis with ascites. Finally, aquaporin-1 does not appear to play a role in the progressive dysregulation of extracellular fluid volume in cirrhosis. (HEPATOLOGY 2006;44:1555-1563.)

Cirrhosis is associated with altered regulation of sodium and water metabolism. During the natural course of cirrhosis, progressive impairment of kidney function occurs, with the kidneys no longer able to maintain the volume of extracellular fluid within normal limits. This mainly occurs because of an abnormal in-

crease in tubular sodium, which leads to an inability to adjust the amount of sodium excreted by the kidneys to the amount of sodium ingested with the diet. Sodium retention is often associated with an impaired ability to eliminate solute-free water, which may lead to dilutional hyponatremia from a disproportionate increase in total body water relative to total sodium content. As the disease progresses, vasoconstriction of renal circulation may develop, which causes renal hypoperfusion, a reduced glomerular filtration rate, and, eventually, renal failure (the so-called hepatorenal syndrome).<sup>1</sup>

The kidney plays a central role in regulating the balance of salt and water. Disordered regulation of sodium and water transport in the kidneys is responsible for altered salt and water balance in several pathophysiological states, including cirrhosis. Water reabsorption in the kidneys occurs mainly through renal water channels, or aquaporins, which are membrane proteins localized along the renal tubules. Several aquaporins are expressed in the kidney.<sup>2</sup> Aquaporin-1 is expressed in the apical and basolat-

From the <sup>1</sup>Molecular Biology Laboratory, Fundació Puigvert, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Liver Unit, Hospital Clinic, Barcelona and Departament de Medicina, Universitat de Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain; <sup>3</sup>Renal Unit and Hypertension, Fundació Puigvert, Barcelona, Spain; <sup>4</sup>Hormonal Laboratory, Hospital Clinic, Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain.

Received June 21, 2006; accepted September 19, 2006.

Supported by the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS-05-1562 to P.F.-L., FIS 05-0246 to P.G., FIS 01-3045 to M.G.); Fundació Marató TV3 (N-2000-TV-0210 to P.F.-L.); and the Instituto de Salud Carlos III (C03/2 and C03/3 to P.G.).

Address reprint requests to: Patricia Fernández-Llama, M.D. Ph.D., Renal Unit and Hypertension, Fundació Puigvert, Cartagena 340-350, 08025 Barcelona, Spain. E-mail: pfernandezllama@fundacio-puigvert.es; fax: (34) 93-4169730.

Copyright © 2006 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI 10.1002/hep.21414

Potential conflict of interest: Nothing to report.

eral membranes of the proximal tubule and the descending limb of Henle's loop cells, and aquaporin-2, recognized as the vasopressin-regulated water channel, is expressed in the apical membrane of the collecting-duct cells.<sup>3</sup> Aquaporin-3 and aquaporin-4 are localized in the basolateral membrane of the collecting ducts. The water permeability of the renal tubules is mainly dependent on the amount of aquaporins at the membranes of epithelial tubular cells.

Several studies using experimental models of cirrhosis have reported contrasting results about aquaporin-2 expression in the kidney. Asahina et al. reported increases in aquaporin-2 following repetitive intraperitoneal injections of carbon tetrachloride.<sup>4</sup> In contrast, in a previous study we were unable to demonstrate increased abundance of aquaporin-2 protein in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis.<sup>5</sup> However, the rats with cirrhosis with ascites showed increased trafficking of aquaporin-2 to the plasma membrane and, interestingly, increased aquaporin-1 in the kidneys. Studies of cirrhosis induced by common bile duct ligation have reported decreased expression of aquaporin-2 in the kidneys of rats with ascites.<sup>6,7</sup> These differences confirm that the physiological states reached in the 2 models are very different, even though both are associated with salt and water retention. The differences reemphasize the complexity of the mechanisms that regulate salt and water balance and point to the necessity of further research, including studies of the molecular pathophysiology of patients with cirrhosis in order to determine how the principles defined in animal studies apply to human disease.

Aquaporin protein research in humans has focused on urinary aquaporin excretion because of the availability of urine and the conflict about whether it is ethical to obtain kidney tissue. To our knowledge, only 2 studies have so far been reported investigating urinary aquaporin excretion in patients with cirrhosis, again with contrasting results.<sup>8,9</sup> Our study had 2 objectives. The first objective was to investigate urinary aquaporin-2 excretion during the progressive impairment of sodium and water metabolism in cirrhosis. To address this, we studied patients in different phases of sodium and water balance disorder. The second objective was to extend the investigation to aquaporin-1 because some experimental data suggested it could contribute to the sodium and water balance disorder present in cirrhosis.<sup>5</sup>

## Patients and Methods

### Study Population

The exclusion criteria for the healthy controls were: (1) a history of clinical signs of disease of the heart, lungs, liver, kidneys, or endocrine organs; (2) neoplastic disease;

(3) arterial hypertension; (4) alcohol or drug abuse; (5) treatment with any type of drugs.

The diagnosis of cirrhosis was based on a liver biopsy or classical clinical, biochemical, and ultrasonographic findings. Exclusion criteria for patients with cirrhosis were: (1) history of clinical signs of heart or lung disease, arterial hypertension, or parenchymal renal failure; (2) gastrointestinal bleeding or active infection 7 days prior to the study; (3) treatment with cyclooxygenase inhibitors or other nephrotoxic drugs 30 days prior to the study; and (4) treatment with diuretics 5 days prior to the study. Patients were classified into 1 of 3 groups according to the severity of renal dysfunction: patients with compensated LC (patients without ascites), patients with ascites without renal failure, and patients with hepatorenal syndrome. Hepatorenal syndrome was diagnosed using widely accepted criteria.<sup>10</sup>

Informed consent was obtained from all participants. The study was approved by the ethics committee of the institution.

### Experimental Procedure

**Water Deprivation and Water Loading Test in Control Subjects.** Two control subjects were submitted to an 8-hour period of water deprivation and 3 days later to an 8-hour period of water loading (400 mL/hour). Urine was collected during these periods. Then 10 mL of each urine sample was frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until assayed.

**General Procedure.** All subjects were allowed to drink freely during the experiment. A 24-hour urine was collected from each subject the day before the blood sample was drawn. Then 10 mL of each urine sample was frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until assayed.

### Blood and Urine Analyses

Plasma and urine osmolarity were determined from the osmometric depression of the freezing point (Osmometer 3300; Advanced Instruments, Needham Heights, MA), and sodium, creatinine, bilirubin, prothrombin time, and albumin were determined by standard analytical methods. Plasma renin activity and plasma concentration of aldosterone, vasopressin, and norepinephrine were determined by radioimmunoassay (Clinical Assays, Cambridge, MA; Diagnostic and Products Corporation, Los Angeles CA; Bühlman Laboratories AG, Basel Switzerland; and CAIBL Laboratories, Hamburg, Germany, respectively).

### Measurement of Urinary Aquaporin-1 and Aquaporin-2

Urinary aquaporin-1 and aquaporin-2 were measured using a method described in detail elsewhere.<sup>11</sup> Briefly,



**Table 1. Demographic, Clinical, Biochemical, and Hormonal Data of Healthy Subjects and Patients With Cirrhosis**

	Healthy Subjects	Patients Without Ascites	Patients With Ascites	Patients With Hepatorenal Syndrome	ANOVA P
Number	11	13	11	9	
Age	58 ± 1.5	62 ± 2.5	55 ± 3.30	59 ± 4.4	.32
Gender (M/F)	4/7	7/6	7/4	8/1	
Etiology (HCV/alcohol/others)	—	10/2/1	2/5/4	4/2/3	
Serum sodium (mmol/L)	141 ± 0.8	137 ± 0.8	136 ± 1.6	126 ± 1.9	<.0001*
Serum osmolality (mOsm/kg)	292 ± 1.5	287 ± 1.6	283 ± 3.0	279 ± 5.5	.0110*
Serum creatinine (mg/dL)	0.98 ± 0.02	0.82 ± 0.04	0.73 ± 0.06	2.79 ± 0.30	<.0001*
Serum bilirubin (mg/dL)	0.6 ± 0.1	1.4 ± 0.2	6.1 ± 2.7	18.4 ± 4.7	<.0001*
Prothrombin time (%)	90 ± 2	73 ± 3	51 ± 7	33 ± 4	<.0001*
Serum albumin (g/L)	42 ± 0.5	34 ± 1.4	29 ± 1.0	21 ± 1.1	<.0001*
Child-Pugh class (A/B/C)	—	11/2/0	1/6/4	0/0/9	
Vasopressin (pmol/L)	1.15 ± 0.3	1.15 ± 0.2	1.41 ± 0.2	4.19 ± 0.6	<.0001*
Plasma renin activity (ng/mL · h)	0.4 ± 0.3	0.3 ± 0.1	2.1 ± 1.0	3.7 ± 1.0	.0041*
Aldosterone (ng/dL)	8 ± 2	13 ± 5	68 ± 27	111 ± 21	<.0001*
Norepineprine (pg/mL)	152 ± 24	229 ± 59	407 ± 69	1001 ± 170	<.0001*
Urine sodium (mmol/L)	117.0 ± 10	68.1 ± 15	22.8 ± 8	16.1 ± 6	<.0001*
Urine osmolality (mOsm/kg)	656.8 ± 47	476.0 ± 67	440.2 ± 70	374.0 ± 40	.0166*
Diuresis/day (mL)	1285 ± 84	1904 ± 256	1272 ± 247	500 ± 89	.0004*

NOTE. Data are mean ± SEM.

Abbreviations: M, male; F, female; HCV, hepatitis C virus.

\*Significant difference.

urine samples were thawed and centrifuged at 1000×g for 5 minutes at 4°C to remove cellular debris. A total of 150 μg of creatinine equivalent of each sample was then concentrated by ultrafiltration using Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Devices (Millipore, Bedford, MA) with a 10,000-Da cutoff according to the protocol provided by the manufacturer. Concentrated urine samples were then prepared as previously described and subjected to immunoblot analysis in order to semiquantify the amount of aquaporin-1 and aquaporin-2 in the sample.

#### **Electrophoresis and Immunoblotting of Proteins.**

Electrophoresis was run for the entire set of samples on 12% polyacrylamide/SDS gels. Immunoblots were run as previously described.<sup>5</sup> The densitometry values were normalized to the mean of the control group to facilitate comparisons.

**Polyclonal Antibodies.** Affinity-purified, peptide-derived polyclonal antibodies to aquaporin-1 and aquaporin-2 were used for immunoblotting.<sup>5</sup> The specificity of the antibodies was tested by competition experiments.

#### **Presentation of Data and Statistical Analyses**

Quantitative data are presented as mean ± standard error of the mean (SEM). Statistical comparisons were done using ANOVA, the unpaired *t* test (when variances were the same), the Mann-Whitney rank-sum test (when variances were significantly different between groups), and the chi-square test. *P* values less than .05 were considered statistically significant.

## **Results**

### **Subjects**

Eleven healthy controls and 33 patients with cirrhosis were included in the study. Table 1 shows the demographic characteristics and liver and renal function test and vasoactive hormone data of the healthy subjects and patients with cirrhosis in the study divided into 3 groups: patients without ascites, patients with ascites without renal failure, and patients with hepatorenal syndrome. Patients with cirrhosis showed progressive impairment of liver and renal function according to test results as the disease progressed from compensated cirrhosis to cirrhosis with ascites without renal failure to hepatorenal syndrome. Likewise, progressive stimulation of the renin-aldosterone system, sympathetic nervous system, and vasopressin was observed. Thirteen of the 33 patients (39%; 8 with hepatorenal syndrome) had serum sodium concentrations below normal (135 mmol/L), and 8 of them (24%) met the criterion for hyponatremia (serum sodium ≤ 130 mmol/L). Interestingly, patients with hyponatremia had been so for a relatively long time (average 49 days, range 15-60 days).

### **Characteristics of Immunoblot Technique With Urinary Proteins**

#### **Aquaporin-1 and Aquaporin-2 Proteins in Urine.**

Figure 1A and Fig. 2A show immunoblots loaded with urine sample from a healthy subject in order to detect aquaporin-1 and aquaporin-2, respectively. To test for the

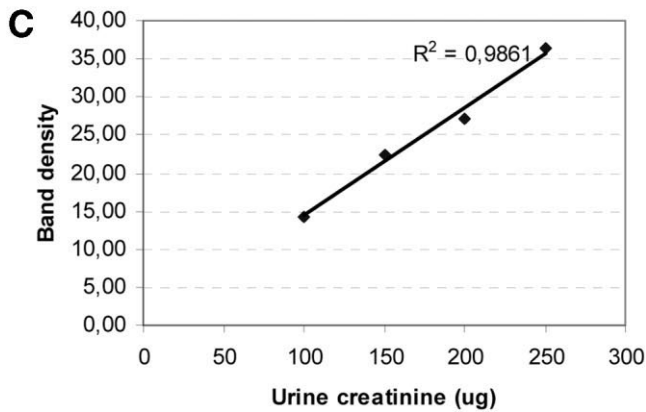
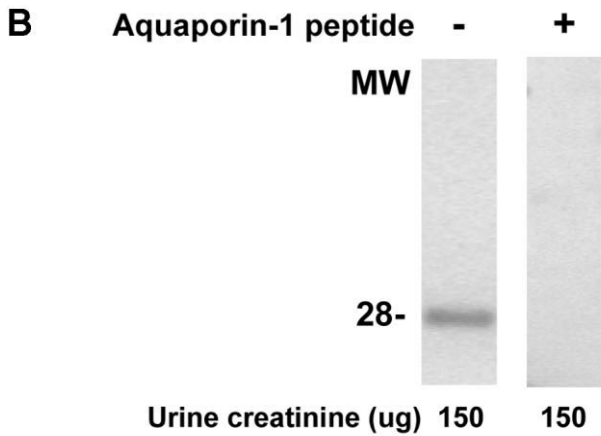
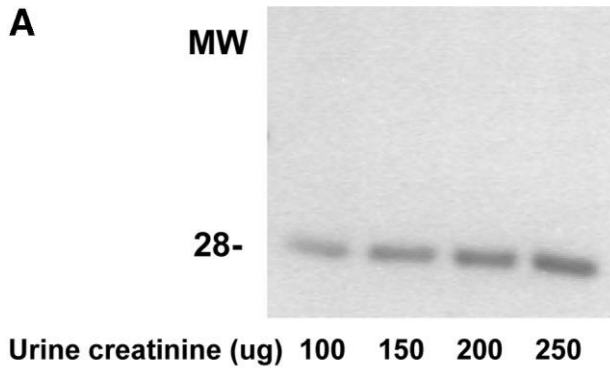


Fig. 1. (A) Immunoblot of aquaporin-1 in urine sample from a healthy subject. The immunoblot was incubated with affinity-purified anti-aquaporin-1 (EUB-9 at a concentration of 0.08  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), and an increasing amount of urine creatinine (100, 150, 200, 250  $\mu\text{g}$ ) was loaded per lane. The immunoblot revealed 1 band of 29 kDa. (B) Preabsorption control performed with anti-aquaporin-1 previously incubated with the immunizing aquaporin-1 peptide. (C) Relationship between urinary aquaporin-1 band density and urine creatinine (in micrograms) loading in the gel.

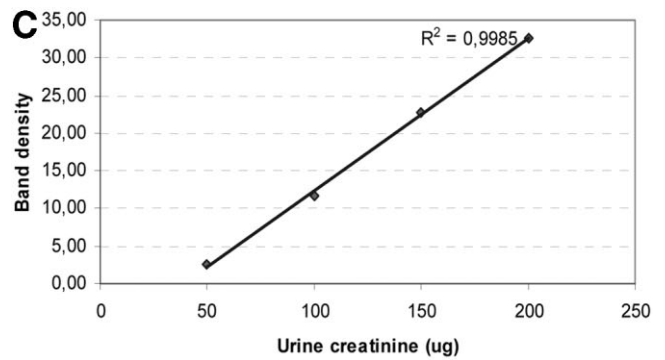
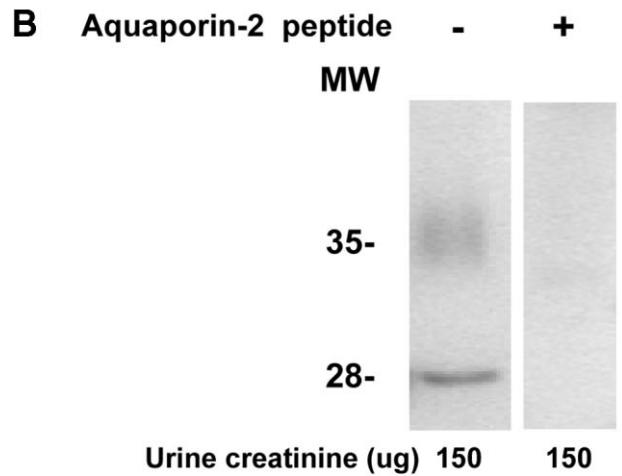
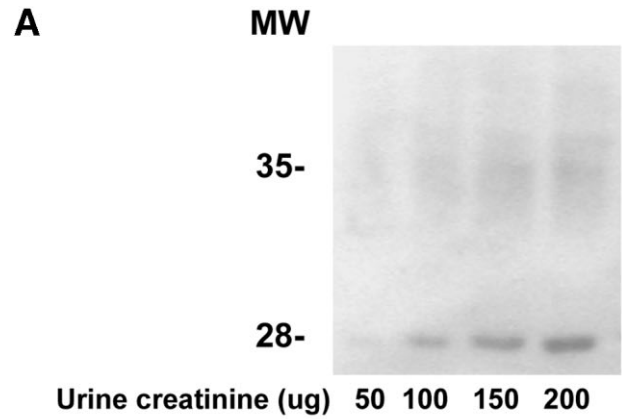


Fig. 2. (A) Immunoblot of aquaporin-2 in urine sample from a healthy subject. The immunoblot was incubated with affinity-purified anti-aquaporin-2 (EUB-1 at a concentration of 0.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), and an increasing amount of urine creatinine (50, 100, 150, 200  $\mu\text{g}$ ) was loaded per lane. The immunoblot revealed 2 bands: one of 29 kDa and a broad band around 35 kDa. (B) Preabsorption control performed with anti-aquaporin-2 previously incubated with the immunizing aquaporin-2 peptide. (C) Relationship between urinary aquaporin-2 band density and urine creatinine (in micrograms) loading in the gel.

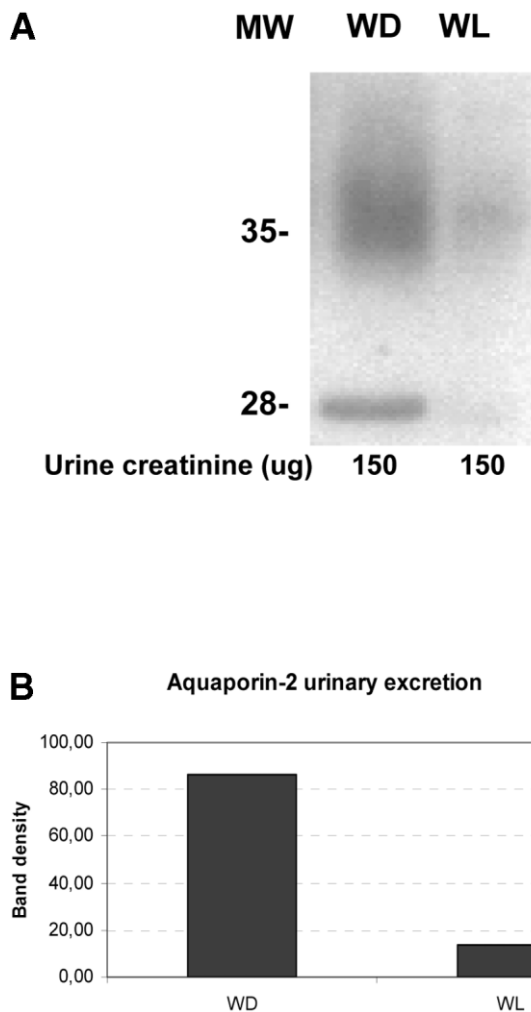


Fig. 3. (A) Immunoblot of urinary aquaporin-2 during an 8-hour period of water deprivation (WD) and an 8-hour period of water loading (WL) from a healthy control. A total of 150  $\mu$ g of urine creatinine was loaded from each period, and the immunoblot was incubated with affinity-purified anti-aquaporin-2 (EUB-1 at a concentration of 0.8  $\mu$ g/mL). (B) Densitometric analysis of aquaporin-2 urinary excretion during the WD and WL periods.

specificity of the antibody labeling, competition experiments were carried out (Fig. 1B and Fig. 2B). Figure 1C and Fig. 2C show a linear relationship between urinary aquaporin-1 and aquaporin-2 band density and urinary creatinine loading in the gel.

**Water Deprivation and Water Loading Test in Healthy Subject.** Figure 3 shows an immunoblot of urinary aquaporin-2 during an 8-hour period of water deprivation and an 8-hour period of water loading in a healthy subject. The abundance of the vasopressin-regulated water channel aquaporin-2 in the urine during the water deprivation test increased over that during the loading test. This suggests, as previously demonstrated,<sup>12,13</sup> that under physiological conditions urinary aquaporin-2 ex-

cretion can be used as an index of the action of vasopressin in the kidneys of healthy subjects.

#### *Aquaporin-1 and Aquaporin-2 Excretion*

We analyzed the urinary excretion of aquaporin-1 and aquaporin-2 of healthy subjects. Subject 1 had the highest aquaporin-1 and aquaporin-2 urinary excretion of those in the control group, whereas subject 2 had the lowest aquaporin-1 and aquaporin-2 urinary excretion (data not shown). Therefore, we loaded the urine from these 2 control subjects in all immunoblots, and we used the densitometric values of control subject 2 to normalize the aquaporin band density.

**Urinary Aquaporin-1 Excretion.** We quantified the aquaporin-1 bands of patients with cirrhosis by densitometry and normalized the values by dividing them by the densitometric value of control subject 2 (the control subject with the lowest aquaporin-1 signal). As shown in Fig. 4, there were no differences between healthy subjects and patients with cirrhosis with or without ascites in urinary excretion of aquaporin-1, whereas it was markedly reduced in patients with hepatorenal syndrome. The mean urinary excretion of aquaporin-1 was:  $0.91 \pm 0.10$  in healthy subjects,  $1.18 \pm 0.18$  in patients without ascites ( $P = .36$  compared to healthy subjects),  $0.78 \pm 0.20$  in patients with ascites ( $P = .69$  compared to healthy subjects), and  $0.02 \pm 0.10$  in patients with hepatorenal syndrome ( $P = .0001$  compared to healthy subjects).

**Urinary Aquaporin-2 Excretion.** We quantified the sum of both bands (glycosylated and nonglycosylated) shown in the immunoblot by densitometry and normalized the values by dividing them by the densitometric value of control subject 2 (the control subject with the lowest aquaporin-2 signal). The urinary excretion of aquaporin-2 in patients with cirrhosis was lower than that in healthy subjects. As shown in Fig. 5, a progressive de-

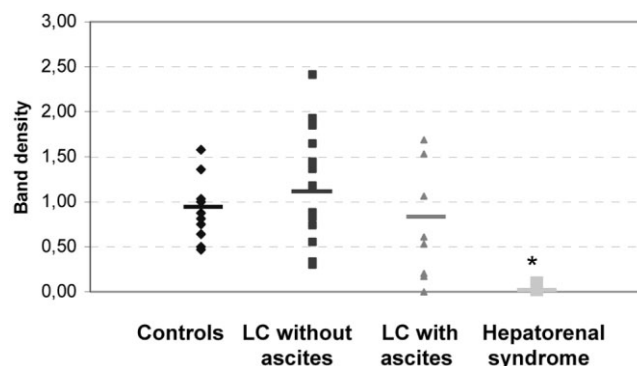


Fig. 4. Densitometric analysis of 24-hour urine excretion of aquaporin-1 of healthy subjects and in patients with cirrhosis stratified as follows: patients without ascites, patients with ascites, and patients with hepatorenal syndrome ( $*P < .05$  compared to healthy subjects).

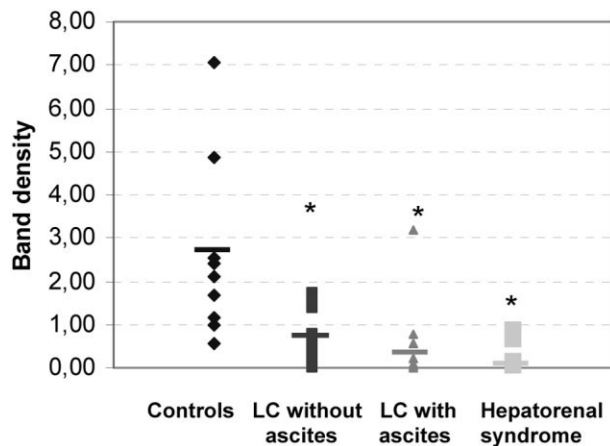


Fig. 5. Densitometric analysis of 24-hour urine excretion of aquaporin-2 of healthy subjects and of patients with cirrhosis stratified as follows: patients without ascites, patients with ascites, and patients with hepatorenal syndrome (\* $P < .05$  compared to healthy subjects).

crease in urinary aquaporin-2 excretion was observed among patients with cirrhosis as the severity of the disease increased from cirrhosis without ascites to cirrhosis with ascites without renal failure to hepatorenal syndrome. The mean urinary aquaporin-2 excretion was:  $2.72 \pm 0.61$  in healthy subjects,  $0.63 \pm 0.18$  in patients without ascites ( $P = .0007$  compared to healthy subjects),  $0.45 \pm 0.28$  in patients with ascites without renal failure ( $P = .0004$  compared to healthy subjects), and  $0.22 \pm 0.11$  in patients with hepatorenal syndrome ( $P < .0001$  compared to healthy subjects). When patients with cirrhosis were categorized according to serum sodium concentration, it was observed that patients with hyponatremia (serum sodium  $\leq 130$  mmol/L) had significantly lower urinary aquaporin-2 excretion than patients without hyponatremia (Fig. 6). A significant difference was also ob-

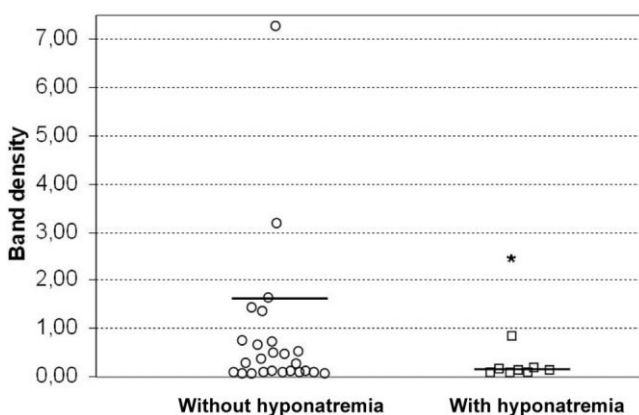


Fig. 6. Urinary excretion of aquaporin-2 of patients with cirrhosis classified according to the presence or absence of hyponatremia. Mean ( $\pm$  SE) serum sodium of patients with hyponatremia ( $n = 8$ ) was  $124.0 \pm 1.2$  mmol/L compared to  $136.8 \pm 0.6$  mmol/L of patients without hyponatremia ( $n = 25$ ); \* $P < .05$ .

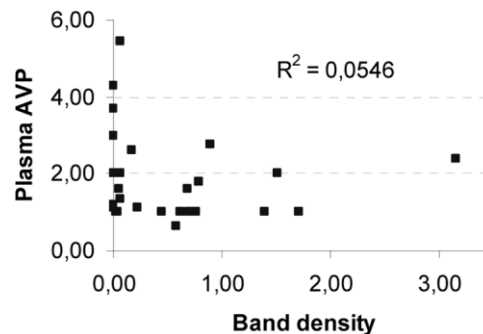


Fig. 7. Relation between vasopressin (AVP) plasma level and aquaporin-2 urine excretion in all patients with cirrhosis in the study.

served when a serum sodium cutoff of 135 mmol/L instead of 130 mmol/L was used (data not shown). Overall, there was no significant relationship between plasma vasopressin level and urinary aquaporin-2 excretion among the patients in the study (Fig. 7), as previously found in rats and healthy humans.<sup>13-16</sup>

## Discussion

The main findings of our study were: (1) excretion of urinary aquaporin-2 of patients with cirrhosis was lower than that of healthy subjects; and (2) urinary excretion of aquaporin-1 of patients with cirrhosis was similar to that of healthy subjects but was markedly reduced in patients with hepatorenal syndrome.

**Aquaporin-2 Protein in Urine.** Aquaporin-2 is recognized as the vasopressin-regulated water channel. Vasopressin regulates aquaporin-2 to increase principal cell water permeability in 2 ways. Its short-term effect is to trigger translocation of aquaporin-2-containing intracellular vesicles to the apical plasma membrane, and its long-term effect is to increase synthesis of aquaporin-2 in the principal cells of the collecting duct.<sup>3,17</sup> Previous studies have demonstrated that the daily excretion of aquaporin in the urine is approximately 3%-4% of the total amount of aquaporin-2 in the kidneys,<sup>14,18</sup> indicating that the main excretion of aquaporin-2 is not a result of shedding whole cells and that the aquaporin-2 in the urine is associated with membrane structures: vesicles with defined membranes, also called exosomes; multivesicular bodies; large membrane fractions that represent luminal plasma membrane fragments; and vesicle debris. These previous studies demonstrated that urinary excretion of aquaporin-2 is mediated by an apical pathway tightly regulated by vasopressin. After long-term water deprivation or the administration of 1-desamin-8-D-arginine vasopressin, expression of aquaporin-2 is increased in intracellular vesicles and the apical plasma membrane (small subapical vesicles and multivesicular bodies) of principal cells, re-

sulting in increased water permeability of these cells and in increased aquaporin-2 urinary excretion. Under conditions known to suppress the endogenous release of vasopressin, aquaporin-2 levels in the plasma membrane are reduced by translocation into an intracellular reservoir. In experimental models this has been shown to be associated with decreased urinary excretion of aquaporin-2, indicating a correlation between vasopressin plasma level, level of aquaporin-2 from the apical plasma membrane, and aquaporin-2 urinary excretion. Similar results have been observed in humans.<sup>13,15,16</sup> In the current study, we also detected in healthy subjects an increase in urinary aquaporin-2 excretion under water deprivation conditions and a marked decrease in urinary aquaporin-2 after a water-loading period, further supporting this correlation.

One of the main findings of our study was that patients with cirrhosis had reduced aquaporin-2 in the urine. A progressive decrease in urinary aquaporin-2 excretion was observed as the severity of the abnormal regulation of fluid balance and renal dysfunction increased. In fact, the reduction in urinary aquaporin-2 excretion was greater in patients with ascites without renal failure than in patients without ascites, and patients with hepatorenal syndrome excreted even less aquaporin-2 than did patients with ascites. Therefore, the results show that with marked expansion of the volume of extracellular fluid, a reduced level of serum sodium, and increased plasma levels of aldosterone, norepinephrine, and vasopressin, all characteristic of advanced cirrhosis, there is reduced urinary excretion of aquaporin-2. These results contrast with those obtained in patients with congestive heart failure, another state of expanded extracellular fluid volume. Studies of humans with decompensated congestive heart failure have shown increased aquaporin-2 excretion<sup>9,19</sup> and a close correlation between urinary aquaporin-2 and vasopressin levels. Thus, the findings show that urinary aquaporin-2 excretion is not uniform across the pathophysiological states of extracellular volume expansion. At this point, it is unclear why the 2 states differ in the effect on urinary aquaporin-2 excretion. In general, patients with advanced cirrhosis more frequently have chronic hyponatremia and their plasma vasopressin levels are higher than those with congestive heart failure. These differences may explain, at least in part, the different findings for urinary aquaporin-2 excretion.

The results of our study have to be discussed in light of the current concepts about the pathogenesis of hyponatremia in cirrhosis.<sup>20-22</sup> Hyponatremia results from impairment of the kidneys' capacity to excrete solute-free water. Impairment of solute-free water excretion may already be occurring in patients without ascites, but is very common in patients with ascites and is almost universal in

patients with hepatorenal syndrome.<sup>20-22</sup> The main pathogenic mechanisms leading to this disorder are impaired delivery of filtrate to the distal nephron because of increased proximal sodium reabsorption and increased plasma levels of vasopressin as a result of nonosmotic hypersecretion of vasopressin from the neurohypophysis. Increased plasma vasopressin would stimulate the V2 receptors on the capillary side of the principal cells of the collecting duct, which would result in increased permeability to water through an aquaporin-2-mediated process. Water would then be reabsorbed in an amount disproportionate to the amount of sodium retained by the kidneys, and dilutional hyponatremia would develop. According to this pathogenic concept of hyponatremia in cirrhosis, urinary aquaporin-2 would be expected to be increased, not reduced, as was found in our study. Nevertheless, if the AVP-aquaporin-2 system were persistently activated in cirrhosis, solute-free water reabsorption would be permanently increased relative to sodium retention, and serum sodium concentration would decline steadily to levels incompatible with life. However, this is usually not the case in clinical practice. In fact, in most patients with cirrhosis, hyponatremia develops in relation to some complication (infection, bleeding, etc.) but then is usually stable for weeks or a few months, as was true in patients in our study. Therefore, when hyponatremia develops in those with cirrhosis, it is likely that a protective mechanism is set in motion to prevent constant solute-free reabsorption of water in the kidneys and unrelenting hyponatremia. The reduction in urinary excretion of aquaporin-2 observed in our study may be such a mechanism.

Along these lines, it is important to point out that downregulation of aquaporin-2 is a crucial mechanism of the phenomenon of escaping the effects of vasopressin observed in healthy subjects and experimental animals. It has long been known<sup>23</sup> that healthy individuals who have been given an infusion of vasopressin will initially retain water for several days and then show an escape phenomenon characterized by an increased volume of urine and a reduction in urine osmolality and body weight, despite continued administration of vasopressin. Recent studies have demonstrated that this phenomenon at least in part is a result of decreased expression of aquaporin-2 water channels in the renal collecting duct, which occurs independently of vasopressin and osmolality.<sup>24</sup> The exact mechanism or mechanisms underlying this effect are not known but may be related to increased nitric oxide and/or prostaglandin synthesis in the kidney.<sup>24</sup> As already noted, the reduced urinary excretion of aquaporin-2 found in patients with advanced cirrhosis may represent an escape mechanism similar to that found in healthy subjects re-

ceiving vasopressin to prevent progressive reduction in serum sodium levels. The finding of reduced urinary excretion of aquaporin-2 in the early stages of cirrhosis, prior to the development of overt hyponatremia, is intriguing and deserves further confirmation and investigation.

**Comparison of the Results on Urinary Aquaporin-2 Excretion in Those With Cirrhosis With Those of Previous Studies.** Previous studies of urinary aquaporin-2 excretion in patients with cirrhosis reported contrasting results. Ivarsen et al. detected an increase in urinary aquaporin-2 excretion in patients with cirrhosis, whereas Pedersen et al. observed no changes in aquaporin-2 excretion.<sup>8,9</sup> Several aspects of these studies could explain the differences between their findings about aquaporin-2 urine excretion with those of our study. First, in the present work we studied patients with cirrhosis in different phases of sodium and water retention, that is, patients without ascites, patients with ascites, and patients with hepatorenal syndrome. Alteration in sodium and water balance metabolism is a progressive disorder that has been clearly documented to occur in patients with cirrhosis, and the steady states achieved in these different phases cannot be compared.<sup>1</sup> Pedersen et al. studied 14 patients with cirrhosis, 6 of whom had ascites, analyzing aquaporin-2 urinary excretion in the patients as a single group. In contrast, Ivarsen et al. used the Child-Pugh score to stratify patients according to the clinical severity of their liver disease. However, it is known this score may not correspond to alterations in sodium and water balance metabolism. Second, all patients in this study were free of treatment (specifically diuretic drugs) known to alter the abundance of aquaporin protein in the kidneys and therefore in urine.<sup>25-27</sup> Indeed, increased excretion of urinary aquaporin-2 has been demonstrated during furosemide treatment.<sup>27</sup> In the Pedersen study, 9 of 14 patients with cirrhosis received diuretics up to 24 hours prior to urine collection, and in the Ivarsen study all patients were receiving diuretic treatment at the time of urine collection. Finally, although the technique used to detect urine aquaporin-2 differed among the 3 studies—dot-blot analysis in the Ivarsen study, radioimmunoassay in the Pedersen study, and immunoblot in our study—we do not think this can explain the differences found in aquaporin-2 urinary excretion. The 3 studies had similar procedures for urine collection and similar processing of the urine samples prior to analysis of the aquaporin-2. This is an important point—altering protein detection in urine—which has recently been documented.<sup>28</sup> Therefore, the differences in the population studied and in the selection of study participants could explain the different results for aquaporin-2 urine excretion.

**Aquaporin-1 Protein in Urine.** Results from our study detected aquaporin-1 protein in urine, demonstrating that human urine contains this water channel. Little is known about regulation of aquaporin-1. Knocking out aquaporin-1 demonstrated that this proximal water channel is necessary for the urinary concentration process.<sup>29</sup> Aquaporin-1 has been shown to increase in the kidneys of rats with cirrhosis induced by carbon tetrachloride, pointing to potentially important effects of having cirrhosis on the proximal tubules, which may account for the increased fluid absorption in this segment. Micropuncture and lithium clearance studies have also found evidence of increased sodium and water reabsorption in the proximal tubules of animals with cirrhosis and of patients.<sup>30,31</sup> We observed, however, that the urinary excretion of aquaporin-1 was not altered in patients with cirrhosis with or without ascites. By contrast, urinary excretion of aquaporin-1 was extremely reduced in patients with hepatorenal syndrome. The decreased aquaporin-1 in the urine could theoretically be associated with decreased aquaporin-1 at the plasma membrane level. At this point, it is not known how the possible decrease in aquaporin-1 in the kidney could affect fluid reabsorption of the proximal tubule segment because it is known that aquaporin-1 is normally expressed at high levels in the proximal tubule. In addition, patients with hepatorenal syndrome had a decreased glomerular filtration rate. It is not known if renal insufficiency could alter the urinary excretion of aquaporins. Further studies are needed in humans to specifically investigate the origin of aquaporin-1 in urine.

**Limitations of the Study.** This study had several limitations. First, the number of patients in the study was relatively small. Therefore, further studies with a larger number of patients, particularly those with ascites and hyponatremia without hepatorenal syndrome, would be important. Second, the patients with hyponatremia had had this condition for an average of 7 weeks. Therefore, it would be worthwhile to study patients with cirrhosis who are just developing hyponatremia or have developed it very recently in order to assess whether urinary aquaporin-2 excretion in this group differs from that of patients with more chronic hyponatremia. Third, patients were studied at a single point in time; it would be interesting to study patients at several time points in order to find out whether urinary aquaporin-1 or aquaporin-2 excretion change over time. Finally, it would also be important to study aquaporin-2 excretion in patients with cirrhosis whose serum sodium concentration has been normalized by the administration of V2 receptor antagonists, drugs that increase solute-free water excretion and improve serum sodium levels.<sup>32,33</sup>

In conclusion, patients with cirrhosis, particularly those with hyponatremia and hepatorenal syndrome, have decreased urinary aquaporin-2 excretion relative to healthy subjects, which suggests there is down-regulation of aquaporin-2 expression in the kidneys of those with cirrhosis. This may be a compensatory response to the hyponatremia and extracellular fluid volume expansion that patients with cirrhosis have. In addition, unlike with healthy subjects and patients with decompensated congestive heart failure, the vasopressin plasma levels of patients with cirrhosis do not correlate with urinary aquaporin-2 excretion. Finally, aquaporin-1 does not appear to play a role in the progressive abnormalities of fluid balance and renal function in patients with cirrhosis.

## References

- Fernandez-Llama P, Gines P, Schrier RW. Pathogenesis of sodium retention in cirrhosis. The arterial vasodilatation hypothesis of ascites formation. In: Arroyo V, Gines P, Rodes J, Schrier RW, eds. *Ascites and Renal Dysfunction in Liver Disease*. 2nd ed. Malden, MA: Blackwell Science, 2005:201-214.
- Agre P, Kozono D. Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases. *FEBS Lett* 2003;555:72-78.
- Nielsen S, Chou CL, Marples D, Christensen EI, Kishore BK, Knepper MA. Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:1013-1017.
- Asahina Y, Izumi N, Enomoto N, Sasaki S, Fushimi K, Marumo F, et al. Increased gene expression of water channel in cirrhotic rat kidneys. *HEPATOLOGY* 1995;21(1):169-173.
- Fernandez-Llama P, Jimenez W, Bosch-Marce M, Arroyo V, Nielsen S, Knepper MA. Dysregulation of renal aquaporins and Na-Cl cotransporter in CCl<sub>4</sub>-induced cirrhosis. *Kidney Int* 2000;58(1):216-228.
- Fernandez-Llama P, Turner R, Dibona G, Knepper MA. Renal expression of aquaporins in liver cirrhosis induced by chronic common bile duct ligation in rats. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:1950-1957.
- Jonassen TE, Brond L, Torp M, Graebe M, Nielsen S, Skott O, et al. Effects of renal denervation on tubular sodium handling in rats with CBL-induced liver cirrhosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;284:F555-F563.
- Ivarsen P, Frokiaer J, Aagaard NK, Hansen EF, Bendtsen F, Nielsen S, et al. Increased urinary excretion of aquaporin 2 in patients with liver cirrhosis. *Gut* 2003;52:1194-1199.
- Pedersen RS, Bentzen H, Bech JN, Nyvad O, Pedersen EB. Urinary aquaporin-2 in healthy humans and patients with liver cirrhosis and chronic heart failure during baseline conditions and after acute water load. *Kidney Int* 2003;63:1417-1425.
- Arroyo V, Gines P, Gerbes AL, Dudley FJ, Gentilini P, Laffi G, et al. Definition and diagnostic criteria of refractory ascites and hepatorenal syndrome in cirrhosis. *International Ascites Club. HEPATOLOGY* 1996;23(1):164-176.
- Valenti G, Laera A, Pace G, Aceto G, Lospalluti ML, Penza R, et al. Urinary aquaporin 2 and calciuria correlate with the severity of enuresis in children. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:1873-1881.
- Ishikawa S. Urinary excretion of aquaporin-2 in pathological states of water metabolism. *Ann Med* 2000;32(2):90-93.
- Kanno K, Sasaki S, Hirata Y, Ishikawa S, Fushimi K, Nakanishi S, et al. Urinary excretion of aquaporin-2 in patients with diabetes insipidus. *N Engl J Med* 1995;332:1540-1545.
- Wen H, Frokiaer J, Kwon TH, Nielsen S. Urinary excretion of aquaporin-2 in rat is mediated by a vasopressin-dependent apical pathway. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:1416-1429.
- Saito T, Ishikawa SE, Sasaki S, Nakamura T, Rokkaku K, Kawakami A, et al. Urinary excretion of aquaporin-2 in the diagnosis of central diabetes insipidus. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1823-1827.
- Saito T, Ishikawa SE, Ando F, Okada N, Nakamura T, Kusaka I, et al. Exaggerated urinary excretion of aquaporin-2 in the pathological state of impaired water excretion dependent upon arginine vasopressin. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:4034-4040.
- DiGiovanni SR, Nielsen S, Christensen EI, Knepper MA. Regulation of collecting duct water channel expression by vasopressin in Brattleboro rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:8984-8988.
- Rai T, Sekine K, Kanno K, Hata K, Miura M, Mizushima A, et al. Urinary excretion of aquaporin-2 water channel protein in human and rat. *J Am Soc Nephrol* 1997;8:1357-1362.
- Funayama H, Nakamura T, Saito T, Yoshimura A, Saito M, Kawakami M, et al. Urinary excretion of aquaporin-2 water channel exaggerated dependent upon vasopressin in congestive heart failure. *Kidney Int* 2004;66:1387-1392.
- Gines P, Berl T, Bernardi M, Bichet DG, Hamon G, Jimenez W, et al. Hyponatremia in cirrhosis: from pathogenesis to treatment. *HEPATOLOGY* 1998;28:851-864.
- Gines P, Cardenas A, Schrier RW. Liver disease and the kidney. In: Schrier RW, ed. *Diseases of the Kidney and Urinary Tract*. 8th ed. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams & Wilkins, 2006.
- Ishikawa SE, Schrier RW. Pathogenesis of hyponatremia: the role of arginine-vasopressin. In: Arroyo V, Gines P, Rodes J, Schrier RW, eds. *Ascites and Renal Dysfunction in Liver Disease*. 2nd ed. Malden, MA: Blackwell Science, 2005:315-328.
- Leaf A, Bartter FC, Santos RF, Wrong O. Evidence in man that urinary electrolyte loss induced by pitressin is a function of water retention. *J Clin Invest* 1953;32:868-878.
- Verbalis JG. Whole-body volume regulation and escape from antidiuresis. *Am J Med* 2006;119(7 Suppl 1):S21-S29.
- Fernandez-Llama P, Ecelbarger CA, Ware JA, Andrews P, Lee AJ, Turner R, et al. Cyclooxygenase inhibitors increase Na-K-2Cl cotransporter abundance in thick ascending limb of Henle's loop. *Am J Physiol* 1999;277(2 Pt 2):F219-F226.
- Kim GH, Lee JW, Oh YK, Chang HR, Joo KW, Na KY, et al. Antidiuretic effect of hydrochlorothiazide in lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus is associated with upregulation of aquaporin-2, Na-Cl co-transporter, and epithelial sodium channel. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:2836-2843.
- Starklint J, Bech JN, Pedersen EB. Urinary excretion of aquaporin-2 after furosemide and felodipine in healthy humans. *Scand J Clin Lab Invest* 2005;65:249-261.
- Zhou H, Yuen PS, Pisitkun T, Gonzales PA, Yasuda H, Dear JW, et al. Collection, storage, preservation, and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery. *Kidney Int* 2006;69:1471-1476.
- King LS, Choi M, Fernandez PC, Cartron JP, Agre P. Defective urinary-concentrating ability due to a complete deficiency of aquaporin-1. *N Engl J Med* 2001;345:175-179.
- Lopez-Novoa JM, Rengel MA. A micropuncture study of salt and water retention in chronic experimental cirrhosis. *Am J Physiol* 1977;232:F315-F318.
- Bank N, Aynedjian HS. A micropuncture study of renal salt and water retention in chronic bile duct obstruction. *J Clin Invest* 1975;55:994-1002.
- Gerbes AL, Gulberg V, Gines P, Decaux G, Gross P, Gandjini H, et al. Therapy of hyponatremia in cirrhosis with a vasopressin receptor antagonist: a randomized double-blind multicenter trial. *Gastroenterology* 2003;124:933-939.
- Wong F, Blei AT, Blendis LM, Thuluvath PJ. A vasopressin receptor antagonist (VPA-985) improves serum sodium concentration in patients with hyponatremia: a multicenter, randomized, placebo-controlled trial. *HEPATOLOGY* 2003;37:182-191.





## Original Article

## Cyclosporine-induced hypertension is associated with increased sodium transporter of the loop of Henle (NKCC2)

Cristina Esteva-Font<sup>1</sup>, Elisabet Ars<sup>1</sup>, Elena Guillen-Gomez<sup>1</sup>, Josep Maria Campistol<sup>2</sup>, Laia Sanz<sup>3</sup>, Wladimiro Jiménez<sup>4</sup>, Mark Alan Knepper<sup>5</sup>, Ferran Torres<sup>6</sup>, Roser Torra<sup>3</sup>, José Aurelio Ballarín<sup>3</sup> and Patricia Fernández-Llama<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Molecular Biology Laboratory, Fundació Puigvert, Universitat Autònoma de Barcelona, <sup>2</sup>Renal Transplant Unit, Hospital Clínic, Barcelona <sup>3</sup>Renal and Hypertension Units, Fundació Puigvert, <sup>4</sup>Hormonal Laboratory, Hospital Clínic, Barcelona, Spain, <sup>5</sup>Laboratory of Kidney and Electrolyte Metabolism, NIH, Bethesda, MD, USA and <sup>6</sup>Laboratory of Biostatistics and Epidemiology (Universitat Autònoma de Barcelona) and Clinical Pharmacology Unit, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

### Abstract

**Background.** Hypertension induced by cyclosporine is associated with renal sodium and water retention. Using immunoblotting of kidney homogenates, we investigated the regulation of sodium and water transport proteins in a rat model of cyclosporine-induced hypertension.

**Methods.** Rats were treated with cyclosporine (25 mg/kg/day intraperitoneally) during 7 days. Control rats received vehicle.

**Results.** Cyclosporine-treated rats had an increase in blood pressure with a decrease in renal sodium excretion compared with control rats. There were no differences either in sodium intake or in plasma creatinine levels between the two groups of rats. These data suggest that the decrease in sodium excretion in the cyclosporine-treated rats was due to an increase in renal sodium absorption. The densitometric analysis of the renal immunoblot showed an increase in the Na-K-2Cl cotransporter of the loop of Henle (NKCC2) in cyclosporine-treated rats (178% ± 36) compared with control rats (100% ± 18;  $P < 0.05^*$ ). This protein rise was associated with an increase in the NKCC2 mRNA pointing to a transcriptional regulation of this sodium transporter. There were no statistically significant changes in the sodium proton exchange (NHE-3) of the proximal tubule although in this renal segment, aquaporin-1 was increased in cyclosporine-treated rats compared with control rats (control 100% ± 6 vs cyclosporine 119% ± 6;  $P < 0.05^*$ ).

**Conclusions.** Our results pointed to the thick ascending limb of the loop of Henle as an important site of sodium retention in cyclosporine-induced hypertension. This data may have potential clinical implications for the treatment of hypertension induced by cyclosporine.

**Keywords:** aquaporins; cyclosporine; hypertension; NHE-3; NKCC2; renal sodium transporters

### Introduction

Anticalcineurinic drugs are among the most widely used immunosuppressants for preventing graft rejection and autoimmune diseases. Since the introduction of cyclosporine for solid organ transplants, long-term survival after transplantation has significantly improved; however, cyclosporine treatment produces important side effects like high blood pressure. The pathogenesis of this hypertension is not completely clear. There is evidence suggesting that sodium and water retention is associated with the development of cyclosporine-induced hypertension [1].

The kidney plays a central role in the regulation of body salt and water balance. Disordered regulation of transport in the kidney is responsible for altered salt and water balance in several pathophysiological states, including hypertension. Regulation of salt and water excretion depends on an array of solute and water transporters in renal tubules and of vascular elements in the various regions of the kidney. Renal sodium absorption in the proximal tubule and in the thick ascending limb is mediated by sodium transporters. In the proximal tubule, the main protein that facilitates sodium transport in the apical or luminal plasma membrane is the sodium/hydrogen exchanger isoform 3 (NHE-3) [2]. In the thick ascending limb of

Correspondence and offprint requests to: Patricia Fernández-Llama, Renal Unit and Hypertension, Fundació Puigvert, Cartagena 340-350, 08025 Barcelona, Spain. Email: pfernandezllama@fundacio-puigvert.es

the loop of Henle, apical sodium transport is facilitated mainly by the sodium two-chloride potassium cotransporter (NKCC2) [2]. The transport of sodium in the basolateral plasma membrane along the renal tubules is facilitated by sodium potassium ATPase (NaKATPase) [2]. Aquaporins are a family of transmembrane proteins that function as molecular water channels [3]. Several aquaporins are known to be expressed in the kidney where they facilitate osmotic water transport across water-permeable epithelia and play critical roles in the urinary concentrating and diluting process. Aquaporin-1 is expressed in the apical and basolateral membrane of the proximal tubule and descending limb of Henle's loop cells, while aquaporin-2 is expressed in the apical membrane of the collecting duct cells.

Over the past decade, these sodium transporters and aquaporins have been cloned and sequenced. This has allowed the possibility of obtaining polyclonal antibodies against these proteins and the development of approaches based on protein analysis of renal sodium and water transport in pathophysiological conditions [4]. This approach assesses the abundance of each renal tubule transporter protein as an estimation of the degree of sodium and water reabsorption in the different nephron segments.

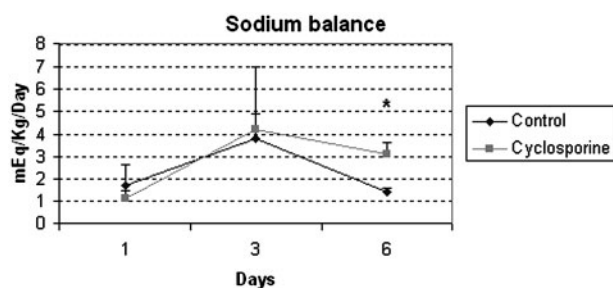
In the current study, this specific type of approach was used for the first time to investigate the pathogenesis of cyclosporine-induced hypertension. Specifically, this work mainly focuses on proximal tubule and thick ascending limb sodium transporters, since preliminary data using *in vitro* studies point to these renal segments as important parts of the effect of cyclosporine [5].

## Methods

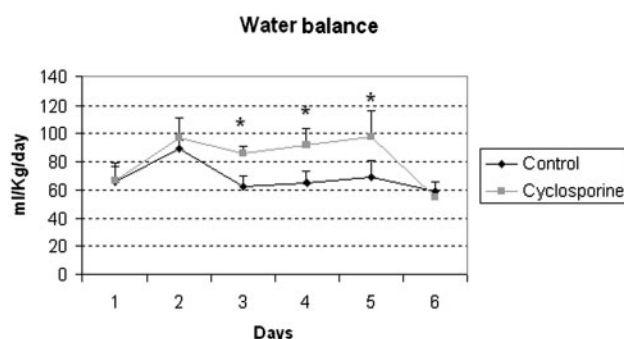
### *Hypertension model and experimental protocol*

Experiments were done in 10 adult Wistar rats (Charles River Breeding Laboratories, Saint Aubin les Elseuf, France). The hypertension model was induced by cyclosporine. Treated rats ( $n=5$ ) received a daily intraperitoneal injection of cyclosporine at a dose of 25 mg/kg for a week, while control rats ( $n=5$ ) received vehicle [6]. Rats were individually placed in metabolic cages in order to control water and sodium balance. All rats had free access to synthetic food (0.083 mmol/g Na, Formula A04, Panlab, Barcelona, Spain) and water. In order to calculate the intake of food and liquid we supplied a surplus of it everyday and we measured the remaining food and water every following day. Rats were weighed daily. Resting blood pressure was measured with a tail cuff at Day 1, 3 and Day 6.

Rats were euthanized by decapitation at Day 7. Blood was collected from the neck immediately after sacrifice and serum was separated by centrifugation. The kidneys were frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  for later processing. The protocols were performed according to the criteria of the Investigation and Ethics Committee of the Hospital Clinic in Barcelona.



**Fig. 1.** Sodium balance (sodium intake minus sodium excretion in relation to rats' weight) of control and cyclosporine-treated rats during the experiment.



**Fig. 2.** Water balance (water intake minus diuresis volume in relation to rats' weight) of control and cyclosporine-treated rats during the experiment.

### *Sodium and water balance*

Sodium balance was calculated as the net difference between sodium intake and urine sodium excretion in relation to rats' weight on Days 1, 3 and 6 (Figure 1). Water balance was estimated each day of the experiment by the difference between water intake and urine volume, corrected by the animals' weight (Figure 2).

### *Blood and urine analysis*

Serum and urine osmolality were determined by osmometric depression of the freezing point (Osmometer 3300; Advanced Instruments, Needham Heights, MA), and sodium by flame photometry (IL 943; Instrumentation Laboratory, Lexington, MA). Serum creatinine levels were determined by standard methods.

### *Polyclonal antibodies*

Affinity-purified, peptide-derived polyclonal antibodies to sodium transporters and water channels were used for immunoblotting. The antibodies used were directed to NHE-3 [4], the thick ascending limb isoform of NKCC2 [4], the aquaporin-1 [7] and the aquaporin-2 [7]. The specificity of the antibodies was tested by competition experiments [4,7].

### Preparation of kidney tissue for immunoblotting

The left kidneys from 10 rats were prepared to obtain whole-kidney homogenate. Protein preparation was performed as previously described [4].

### Electrophoresis and immunoblotting of proteins

SDS-PAGE was done using 7.5–12% polyacrylamide minigels. In all cases, to confirm equality of loading among lanes, electrophoresis was initially run for the entire set of samples on a 12% gel which was then stained with Coomassie blue. Immunoblots were performed as previously described [4]. The densitometry values were normalized to the mean of the control to facilitate comparisons.

### RNA isolation

Total RNA was extracted from the right kidneys of all rats. First, kidneys were pounded using pestle and mortar and, then, RNA was extracted using TRIZOL (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the specifications of the manufacturer. RNA purity and concentration were assessed spectrophotometrically (Ultrospec 3100 pro, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). RNA integrity was confirmed by inspection of 28S and 18S ribosomal RNA bands under UV illumination.

### Northern blot

**Probes synthesis.** Two micrograms of total RNA were reverse transcribed (RT) with 450 ng random hexamers and 200 U SuperScript<sup>TM</sup> II Rnase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in a 20- $\mu$ l reaction volume, under conditions recommended by the manufacturer. This RT product was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until required. Then, digoxigenin-labelled specific probe NKCC2 was synthesized by PCR using the PCR DIG probe synthesis kit (Roche Applied Science, Penzberg, Germany). The sequences of NKCC2 primers have previously been reported [8].

**Blotting, hybridization and immunological detection.** Aliquots of 11  $\mu$ g of total RNA were electrophoresed in 1% agarose gels, 40 mM morpholinopropane sulphonic acid (MOPS), 4 M formaldehyde, 10 mM sodium acetate and 1 mM EDTA. Samples were run during 3 h in MOPS running buffer. Then, the gel was transferred overnight to a positively charged nylon membrane (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) by capillarity. Blotted membranes were probed using kits provided by the manufacturer (DIG wash and the block buffer set, Anti-Digoxigenin-AP and CSPD, Roche). Probing and detection of specific mRNA bands were performed as described previously [9]. Blots were exposed to X-ray film for 4 to 20 min to visualize the labelled bands. Ribosomal 28S subunit was used as endogen control to ensure equal loading (data not shown). Relative quantification of the band densities from the northern blots was carried out by densitometry using Gel Doc 2000 (Quantity One software, Bio-Rad).

**Table 1.** Animal blood and urine data at Day 6

		Control	Cyclosporine
Urine	Na (mmol/l)	227 $\pm$ 32	77 $\pm$ 22*
	Na (mmol/day)	1.9 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1*
	Osmolarity (mOsm/Kg)	1904 $\pm$ 356	792 $\pm$ 245*
	Diuresis (ml/day)	9.8 $\pm$ 1.6	18.4 $\pm$ 4.9
Blood	Creatinine ( $\mu$ mol/l)	62 $\pm$ 0.004	71 $\pm$ 0.04
	Osmolarity (mOsm/Kg)	285 $\pm$ 1.4	287 $\pm$ 2.4
	Na (mmol/l)	142 $\pm$ 0.6	139 $\pm$ 0.9*

Results are expressed as mean  $\pm$  SEM.

\* $P < 0.05$  vs control rats.

### Presentation of data and statistical analyses

Quantitative data are presented as mean  $\pm$  SEM. Statistical comparisons were accomplished by unpaired *t*-test (when variances were the same) or by Mann–Whitney rank-sum test (when variances were significantly different between groups). *P*-values  $< 0.05$  were considered statistically significant.

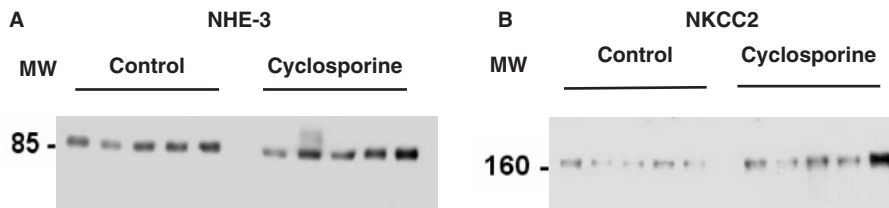
## Results

### Characteristics of animal model

The first data from the animal model was that the rats treated with cyclosporine presented an increase in their mean arterial pressure (20  $\pm$  8 mmHg) from Day 1 to Day 6 compared with control rats (8  $\pm$  6 mmHg,  $P < 0.05$ ), as has previously been shown in this experimental model [6]. Secondly, we confirmed that, at the end of the experimental protocol, cyclosporine-treated rats developed sodium retention (Table 1 and Figure 1). This retention was not secondary to differences in sodium intake, because there was no difference in food consumed by the control and cyclosporine-treated rats. At Day 6, the cyclosporine treated rats showed a positive sodium balance (Figure 1). The water balance was positive at Days 3, 4 and 5 in the cyclosporine-treated rats (Figure 2). Thirdly, there were no differences in the serum creatinine values between cyclosporine-treated rats and control rats, suggesting that the decrease in sodium excretion was predominantly due to an increase in renal tubule sodium absorption, and probably not to a decrease in glomerular filtration. However, in this study the glomerular filtration rate was not specifically measured. Finally, at the end of the experimental procedure, rats treated with cyclosporine showed a decrease in urine osmolarity compared with control rats (Table 1).

### Immunoblot analysis

**Proximal tubule and thick ascending limb sodium transporters' protein abundances.** There was no statistically significant difference in the abundance of NHE-3 protein in the kidneys of cyclosporine-treated rats compared with control rats (Figure 3, Table 2).



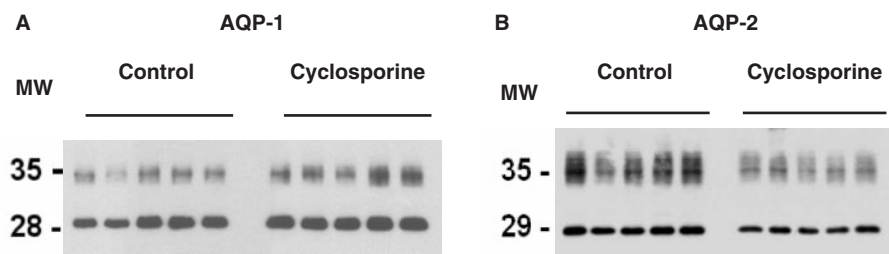
**Fig. 3.** (A) Western blot of NHE-3 in whole kidney homogenate (WKH) of control and cyclosporine-treated rats. The immunoblot was incubated with affinity-purified anti-NHE-3 (H7656 at 0.195- $\mu\text{g}/\text{ml}$  concentration) and revealed one 85 kDa band (15  $\mu\text{g}$  of total protein from the WKH was loaded per lane). (B) Western blot of NKCC2 in whole kidney homogenate of control and cyclosporine-treated rats. The immunoblot was incubated with affinity-purified anti-NKCC2 (L320 at 0.12- $\mu\text{g}/\text{ml}$  concentration) and revealed one 160-kDa band (20  $\mu\text{g}$  of total protein from the WKH was loaded per lane).

**Table 2.** Densitometric analysis of sodium transporter proteins in kidney immunoblots

Name	Identification	Location	Protein abundance in control rats	Protein abundance in cyclosporine rats
NHE-3	Type 3 $\text{Na}^+ \text{H}^+$ exchanger	PT	100% $\pm$ 9.7%	136% $\pm$ 21%
NKCC2	Type 2 $\text{Na}^+ \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$ cotransporter	TAL	100% $\pm$ 18%	178% $\pm$ 36%*

PT, proximal tubule; TAL, thick ascending limb. Values represent band density results expressed as a percent of the control mean. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM.

\* $P < 0.05$  vs control rats (100%).



**Fig. 4.** (A) Western blot of whole kidney homogenate (WKH) of control and cyclosporine-treated rats probed with the rabbit polyclonal antibody to aquaporin-1 (EUB9 at 0.033- $\mu\text{g}/\text{ml}$  concentration). Two bands were observed: a 35-kDa band which corresponds to glycosylated band and a non-glycosylated band of 28 kDa (8  $\mu\text{g}$  of total protein from the WKH was loaded per lane). (B) Western blot of aquaporin-2 (EUB1 at 0.058- $\mu\text{g}/\text{ml}$  concentration) in WKH of both groups of rats in which appear two different bands corresponding to glycosylated and non-glycosylated protein fraction, as occurs in aquaporin-1 immunoblot (10  $\mu\text{g}$  of total protein from the WKH was loaded per lane).

**Table 3.** Densitometric analysis of aquaporin proteins in kidney immunoblots

Name	Identification	Location	Protein abundance in control rats	Protein abundance in cyclosporine rats
AQP-1	Aquaporin-1	PT	100% $\pm$ 6%	119% $\pm$ 6%*
AQP-2	Aquaporin-2	CD	100% $\pm$ 8%	41% $\pm$ 8%*

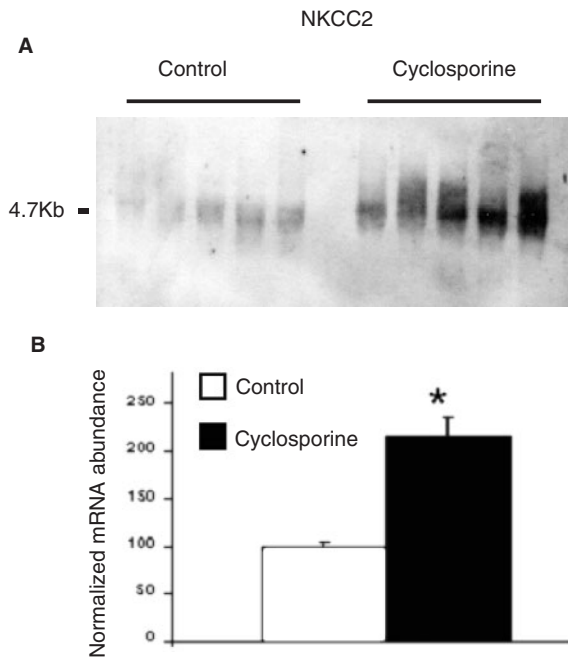
PT, proximal tubule; CD, collecting duct. Values represent band density results expressed as a percent of the control mean. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM.

\* $P < 0.05$  vs control rats (100%).

There was, however, a marked increase in the band density of the NKCC2 protein in the kidneys of rats treated with cyclosporine compared with control rats (Figure 3, Table 2).

*Proximal tubule and collecting duct aquaporins' protein abundances.* Immunoblots from aquaporins showed two bands representing the glycosylated and non-glycosylated forms of these water channels.

We quantified the sum of both bands by densitometry and normalized the values by dividing by the mean of the control group. The abundance of aquaporin-1 was elevated in the kidney of cyclosporine-treated rats compared with control rats (Figure 4, Table 3). There was, however, a marked decrease in the abundance of aquaporin-2 protein in the kidneys of cyclosporine-treated rats compared with control rats (Figure 4, Table 3).



**Fig. 5.** (A) Northern blot of total RNA of control and treated rats reacting with fluorescent NKCC2 probe, showing a 4.7-Kb band corresponding to the length of this mRNA. (B) Densitometric analysis revealed a significant over-expression of NKCC2 mRNA in treated rats compared with control rats ( $100 \pm 6$  vs  $218 \pm 20$ , respectively).  $*P < 0.05$ .

#### Northern blot data of the thick ascending limb sodium transporter (NKCC2)

To study NKCC2 regulation we investigated, using northern blot analysis, the expression level of NKCC2 mRNA in the kidney of both groups of rats. Northern blot analysis showed at least a 2-fold NKCC2 mRNA over-expression in the kidney of cyclosporine-treated rats (control rats  $100\% \pm 6\%$ ; cyclosporine-treated rats  $228\% \pm 20\%$ ;  $P < 0.05$ ) (Figure 5).

#### Discussion

Hypertension is a risk factor for shortened allograft survival, progressive renal failure [1] and the development of cardiovascular diseases. Kasiske *et al.* [10] has already shown poor blood pressure control after organ transplantation. A better understanding of the pathogenesis of immunosuppressant-induced hypertension would allow specific treatment and reduced cardiovascular diseases, which nowadays is the main cause of death in this population.

The current article reports the first study assessing sodium and water balances in a model of hypertension induced by cyclosporine using the analysis of renal sodium transporters and water channels. This method offers various advantages over the techniques used so far to study renal sodium balance. It allows for exploring the entire tubule of both superficial and deep nephrons and offers more direct evidence of sodium and water balances than clearance techniques. On the

other hand, since many factors influencing the tubular content of the different sodium transporters and water channels are well established, this approach provides not only data on segmental sodium reabsorption but also on the possible mechanisms influencing renal sodium metabolism.

Sodium chloride absorption in the thick ascending limb of the loop of Henle is facilitated by NKCC2 [2]. One of the main findings of the current study is that the amount of NKCC2 in the kidney of rats with hypertension induced by cyclosporine was markedly increased, suggesting exaggerated sodium reabsorption in the ascending limb of the loop of Henle. Approximately 25–30% of the filtered sodium is reabsorbed in the loop of Henle [2]. Therefore, this segment represents one of the major sites in sodium reabsorption and may be of great importance in the pathogenesis of sodium retention and the development of hypertension by cyclosporine. The conventional view is that thick ascending limb sodium chloride transport is mainly geared to regulation of water balance through regulation of concentrating and diluting ability. Normally, any changes in sodium transport would be buffered by the tubular glomerular feedback. However, our findings of a marked augment in NKCC2 proteins associated with increase in blood pressure are consistent with previous data both in animal models and humans. Hoagland *et al.* [11] recently reported in a model of salt-sensitive hypertension an increase in NKCC2 in the kidney. In two different models of genetic hypertension, an up-regulation of NKCC2 has been observed in the early phase of the disease [12,13]. Moreover, mutations on the NKCC2 gene have also been associated with essential hypertension in humans [14].

The gene of NKCC2 co-transporter in the thick ascending limb of the loop of Henle is regulated, at least in part, by prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) [15]. Intracellular signalling is mediated by the EP3 receptor via coupling to adenylyl cyclase through the inhibitory heterotrimeric G-protein G<sub>i</sub> [16]. PGE<sub>2</sub> would be expected to act on the thick ascending limb by decreasing intracellular cAMP levels [17]. The 5'-flanking region of the NKCC2 cotransporter gene contains a cyclic-AMP regulatory element which increases gene transcription [18]. It is well known that cyclosporine decreases the PGE<sub>2</sub> formation in the kidney [19]. Therefore, it can be speculated that elimination of an EP3-receptor-mediated tonic inhibitory effect of PGE<sub>2</sub> on cyclic AMP production will increase NKCC2 gene transcription. Moreover, the finding of NKCC2 mRNA over-expression in the kidney of cyclosporine-induced hypertension is consistent with this hypothesis. The observation that cyclosporine stimulates Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter activity in culture cells is also in keeping with our data [5].

Sodium reabsorption in the proximal tubule is facilitated mainly by NHE-3 [2]. Our results show changes without statistical significance in the content of this sodium transporter in the kidneys of cyclosporine-treated rats. In contrast, these rats showed

an increase of renal aquaporin-1. This water channel is located in the apical and basolateral plasma membrane of proximal tubule cells. Tubular fluid osmolality at the end of the proximal tubule is similar to the plasma indicating that the fluid reabsorption through the proximal tubule cells is more or less isosmotic. An increase in aquaporin-1 expression at this level would be expected to have little direct effect on proximal water absorption because there is normally enough aquaporin-1 present to permit water to follow NaCl absorption virtually isosmotically. However, a further decrease of the osmotic gradient needed to drive water absorption through the proximal tubule cells could allow NaCl absorption to occur somewhat more efficiently, by reducing NaCl back-leak in the proximal tubule, and could potentially account for greater net NaCl absorption in the proximal tubule. Therefore, an increase in aquaporin-1 in cyclosporine-treated rats could contribute to an increase in proximal fluid absorption.

In a normal state, urine is concentrated as a result of the combined functions of the loop of Henle and the collecting duct. The loop of Henle generates a high osmolality in the renal medulla by driving the counter-current multiplication process. The collecting duct, when vasopressin and aquaporin-2 are present, permits osmotic equilibrium between the urine and the hypertonic medullary interstitium. The development of high osmolality in the renal medulla is dependent on net NaCl absorption mainly through the NKCC2 cotransporter of the thick ascending limb. Increased expression of NKCC2 in the cyclosporine-treated rats would be expected to result in increased counter-current multiplication. However, cyclosporine rats showed diluted urine compared with control rats. A possible explanation of this effect is the decrease in aquaporin-2 observed in the kidney of cyclosporine-treated rats. The substantial decline in aquaporin-2 protein abundance would be indicative of a significant impairment in the water permeability of the collecting duct and in the ability of the collecting duct fluid to osmotically equilibrate with the hypertonic medullary interstitium. The significance for urinary concentration ability produced by a reduction in aquaporin-2 has been shown in previous studies [20]. In the present study, we did not directly investigate the mechanism for the decrease in aquaporin-2 expression. In cyclosporine-treated rats with an increase in NKCC2 and AQP-1 in the kidney, a possible decrease in the water permeability of the collecting duct could represent a compensatory response of the renal tubules to diminish water reabsorption and, therefore, counteract the increase in sodium and water reabsorption and also the elevation of the blood pressure.

#### Limitations of the study

The number of rats included in the study was relatively small. It would be important to perform further studies

including a large number of rats. Second, animals were studied at a single point in time; it would be interesting to study rats at several time points to find out whether renal sodium transporters expression change over time and also investigate the role of distal tubule and collecting duct sodium transporters. Third, and most important, this study has been done in animals. Therefore, future studies will be needed to assess the pathogenic role of NKCC2 in the hypertension induced by anticalcineurinic drugs in humans. These future studies may have potential therapeutic implications pointing to the loop diuretic as a specific treatment of this type of hypertension.

In conclusion, the current article shows that in rats with hypertension induced by cyclosporine there are marked changes in several of the most relevant renal tubular sodium transporters and water channels. The total amount of the most important sodium transport protein of the proximal tubule (NHE-3) was not significantly modified although we cannot rule out a cyclosporine effect in the expression of this transporter. On the contrary, the transport protein of the thick ascending limb of the loop of Henle (NKCC2) was markedly increased. These data point to the loop of Henle as a possible site of sodium retention in cyclosporine-induced hypertension.

*Acknowledgements.* Funding for this study was received from the intramural budget of the National Heart Lung and Blood Institute (National Institutes of Health, M.A.K.), Fondo de Investigación Sanitaria (FIS-21547 to P.F.LL.), Fundació Marató TV3 (N-2000-TV-0210 to P.F.-L.) and from Direcció General de Investigació Científica y Tècnica (SAF03-02597 to W.J.).

*Conflict of interest statement.* None declared.

## References

1. Ciresi DL, Lloyd MA, Sandberg SM, Heublein DM, Edwards BS. The sodium retaining effects of cyclosporine. *Kidney Int* 1992; 41: 1599–1605
2. Greger R. Physiology of renal sodium transport. *Am J Med Sci* 2000; 319: 51–62
3. Knepper MA. The aquaporin family of molecular water channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 6255–6258
4. Fernandez-Llama P, Ageloff S, Fernandez-Varo G *et al.* Sodium retention in cirrhotic rats is associated with increased renal abundance of sodium transporter proteins. *Kidney Int* 2005; 67: 622–630
5. Wu MS, Yang CW, Bens M, Peng KC, Yu HM, Vandewalle A. Cyclosporine stimulates Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransport activity in cultured mouse medullary thick ascending limb cells. *Kidney Int* 2000; 58: 1652–1663
6. Oriji GK, Keiser HR. Role of nitric oxide in cyclosporine A-induced hypertension. *Hypertension* 1998; 32: 849–855
7. Fernandez-Llama P, Jimenez W, Bosch-Marce M, Arroyo V, Nielsen S, Knepper MA. Dysregulation of renal aquaporins and Na-Cl cotransporter in CCl<sub>4</sub>-induced cirrhosis. *Kidney Int* 2000; 58: 216–228
8. Becker M, Nothwang HG, Friauf E. Differential expression pattern of chloride transporters NCC, NKCC2, KCC1, KCC3,

- KCC4, and AE3 in the developing rat auditory brainstem. *Cell Tissue Res* 2003; 312: 155–165
9. Ecelbarger CA, Nielsen S, Olson BR *et al.* Role of renal aquaporins in escape from vasopressin-induced antidiuresis in rat. *J Clin Invest* 1997; 99: 1852–1863
  10. Kasiske BL, Anjum S, Shah R *et al.* Hypertension after kidney transplantation. *Am J Kidney Dis* 2004; 43: 1071–1081
  11. Hoagland KM, Flasch AK, Dahly-Vernon AJ, dos Santos EA, Knepper MA, Roman RJ. Elevated BSC-1 and ROMK expression in Dahl salt-sensitive rat kidneys. *Hypertension* 2004; 43: 860–865
  12. Manning J, Beutler K, Knepper MA, Vehaskari VM. Upregulation of renal BSC1 and TSC in prenatally programmed hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 283: F202–F206
  13. Capasso G, Rizzo M, Evangelista C *et al.* Altered expression of renal apical plasma membrane Na<sup>+</sup> transporters in the early phase of genetic hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 288: F1173–F1182
  14. Glorioso N, Filigheddu F, Troffa C *et al.* Interaction of alpha(1)-Na,K-ATPase and Na,K,2Cl-cotransporter genes in human essential hypertension. *Hypertension* 2001; 38: 204–209
  15. Fernandez-Llama P, Ecelbarger CA, Ware JA *et al.* Cyclooxygenase inhibitors increase Na-K-2Cl cotransporter abundance in thick ascending limb of Henle's loop. *Am J Physiol* 1999; 277: F219–F226
  16. Breyer MD, Zhang Y, Guan YF, Hao CM, Hebert RL, Breyer RM. Regulation of renal function by prostaglandin E receptors. *Kidney Int Suppl* 1998; 67: S88–S94
  17. Torikai S, Kurokawa K. Effect of PGE2 on vasopressin-dependent cell cAMP in isolated single nephron segments. *Am J Physiol* 1983; 245: F58–F66
  18. Ecelbarger CA, Yu S, Lee AJ, Weinstein LS, Knepper MA. Decreased renal Na-K-2Cl cotransporter abundance in mice with heterozygous disruption of the G(s)alpha gene. *Am J Physiol* 1999; 277: F235–F244
  19. Chang CT, Hung CC, Yang CW, Vandewalle A, Wu MS. Cyclosporine decreases prostaglandin E2 production in mouse medullary thick ascending limb cultured cells. *Transpl Int* 2005; 18: 871–878
  20. Deen PM, Verdijk MA, Knoers NV *et al.* Requirement of human renal water channel aquaporin-2 for vasopressin-dependent concentration of urine. *Science* 1994; 264: 92–95

Received for publication: 7.9.06

Accepted in revised form: 24.5.07





## REVISIONES

# Transportadores de sodio y aquaporinas: ¿futuros biomarcadores renales?



Cristina Esteva-Font<sup>a</sup>, Roser Torra Balcells<sup>b</sup> y Patricia Fernández-Llama<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Biología Molecular. <sup>b</sup>Servicio de Nefrología. Fundació Puigvert. Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). Barcelona. España.

En la reabsorción tubular de sodio y agua están implicados los transportadores renales de sodio y los canales de agua o aquaporinas, que se localizan en las membranas apicales y basolaterales de las células epiteliales a lo largo de los túbulos renales. Los principales transportadores de sodio y canales de agua apicales situados a lo largo de la nefrona son: el intercambiador sodio-protones tipo 3 (NHE-3), que reabsorbe la mayoría del sodio procedente del filtrado glomerular, el cotransportador sodio-fosfato tipo II (NaPiII) y la aquaporina-1, todos ellos localizados en el túbulo proximal; el cotransportador de sodio-potasio-2 cloros (NKCC2), clave en la reabsorción de sodio en la rama gruesa del asa de Henle; el cotransportador sodio-cloro (NCC) en el túbulo distal y el canal epitelial de sodio (ENaC) y la aquaporina-2, ubicados en el túbulo colector. Hay varios estudios experimentales en los que se ha puesto de manifiesto el papel de estas proteínas en determinadas enfermedades asociadas a trastornos en el balance hidrosalino. En humanos, la orina es la fuente ideal para la obtención no invasiva de biomarcadores útiles en el diagnóstico y el seguimiento de enfermedades renales. Así, proteínas de localización apical, como algunos transportadores renales de sodio o aquaporinas que se excretan a la luz tubular, pueden detectarse en orina y podrían resultar biomarcadores de determinados trastornos en el balance hidrosalino. En la actualidad se está realizando numerosos trabajos en patología humana para definir mejor el papel de estas proteínas en la clínica.

**Palabras clave:** Biomarcadores urinarios. Aquaporina-2. Reabsorción tubular.

Sodium transporters and aquaporins: future renal biomarkers?

Renal sodium and water reabsorption is mediated by renal sodium transporters and water channels or aquaporins which are localized in the apical and basolateral membranes of tubular epithelial cells. The main apical sodium transporters and water channels located along the nephron are: sodium-proton exchanger subtype 3 (NHE-3) which reabsorbs most of the sodium coming from the glomerular filtrate, sodium-phosphate type II cotransporter (NaPiII) and aquaporin-1, all of which are located in the proximal tubule; sodium-potassium-2 chloride cotransporter (NKCC2) which plays a key role in sodium reabsorption in the thick ascending limb; the sodium-chloride cotransporter (NCC) in the distal tubule; and the epithelial sodium channel (ENaC) and aquaporin-2 located in the collecting tubule. There are some experimental studies in which the role of these proteins has been associated with the pathophysiology of several sodium and water balance disorders. In humans, urine is the perfect source to obtain biomarkers useful for the diagnosis of kidney diseases and the assessment of disease progression without the use of invasive procedures. Thus, some of the renal sodium transporters or the aquaporins located in the apical membrane which are excreted in the tubular lumen and detected in urine could become biomarkers of some sodium and water balance disorders. Nowadays there are many studies investigating the role of these proteins in humans in clinical settings.

**Key words:** Urinary biomarkers. Aquaporin-2. Renal reabsorption.

El riñón interviene en numerosos mecanismos vitales para el organismo como la regulación de la homeostasis de los fluidos corporales. Esta regulación se realiza principalmente mediante el equilibrio hidrosalino por el control de la excreción de sodio y agua por el riñón. Cada riñón está formado por

Correspondencia: Dra. C. Esteva-Font.  
Laboratorio de Biología Molecular. Fundació Puigvert.  
Cartagena, 340-350. 08025 Barcelona. España.  
Correo electrónico: [cesteva@fundacio-puigvert.es](mailto:cesteva@fundacio-puigvert.es)

Recibido el 13-2-2007; aceptado para su publicación el 21-3-2007.

aproximadamente un millón de nefronas, que son las unidades funcionales del riñón. La nefrona se forma por la estrecha relación anatómica y funcional del glomérulo (un vaso renal especializado) y el túbulo. El túbulo renal consta de distintos tramos en los que se reabsorbe una proporción determinada de sodio y agua procedente del ultrafiltrado glomerular (fig. 1). En la reabsorción tubular de sodio y agua están implicados los transportadores renales de sodio y los canales de agua o aquaporinas, que se localizan en la membrana apical y basolateral de las células epiteliales a lo largo de los túbulos renales. Numerosos trabajos en modelos experimentales de trastornos en la dinámica renal del sodio y el agua, como el síndrome nefrótico o la cirrosis hepática, han puesto de manifiesto la importancia de estas proteínas en la fisiopatología de estos trastornos<sup>1</sup>. McKee et al<sup>2</sup> detectaron por primera vez algunos canales de agua y transportadores de sodio en la orina. Únicamente se localizan en la orina los transportadores ubicados en la membrana apical de las células tubulares, es decir, los que están en contacto con la luz tubular. Recientemente, Pisitkun et al<sup>3</sup> han caracterizado una vía de secreción tubular de proteínas de membrana apical que permite la cuantificación de estas proteínas mediante técnicas de inmunodetección, como el *immunoblot*, el *dot blot* o el *enzimoinmunoanálisis*. Hasta la fecha se desconoce el papel que podría desempeñar la mayoría de estos transportadores de sodio y aquaporinas en la patología humana.

A continuación se revisarán los principales transportadores de sodio y canales de agua de localización apical a lo largo del túbulo renal (fig. 2). Se describirá brevemente su localización, fisiología y fisiopatología, así como los diferentes in-

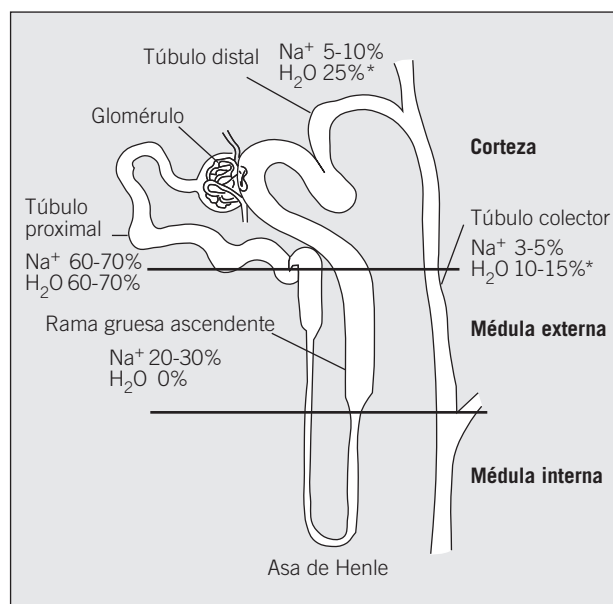


Fig. 1. Reabsorción de sodio y agua en los distintos segmentos del túbulo renal. \*La reabsorción de agua en el túbulo distal y colector depende de la concentración de vasopresina.

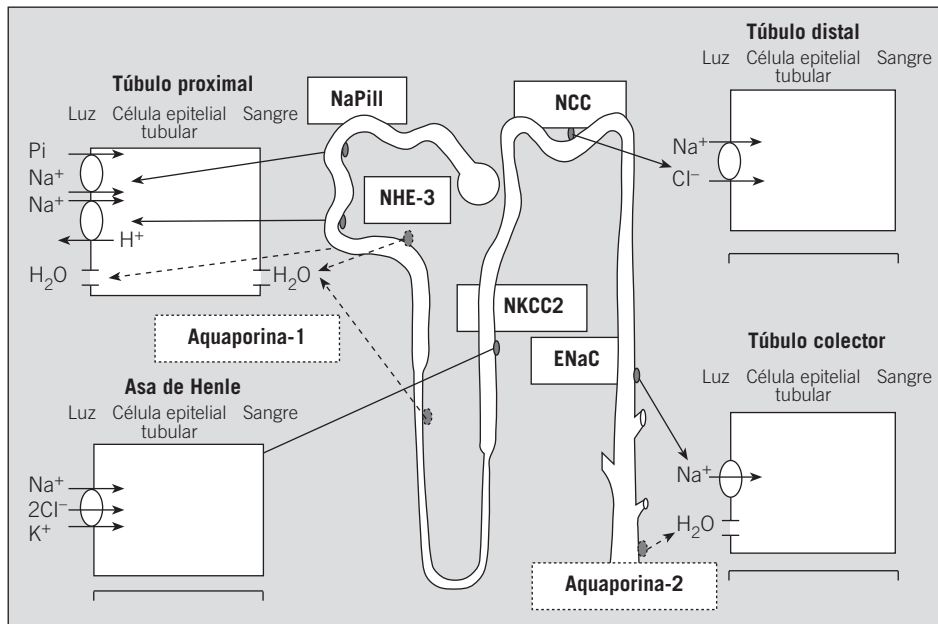


Fig. 2. Distribución de los transportadores renales de sodio (líneas continuas) y las aquaporinas (líneas discontinuas) localizadas en la membrana apical. NHE-3: intercambiador sodio-protones tipo 3; NaPiII: cotransportador sodio-fosfato tipo II; NKCC2: cotransportador de sodio-potasio-2 cloros; NCC: cotransportador sodio-cloro; ENaC: canal epitelial de sodio.

hibidores de estas proteínas. En la parte final de la revisión se comentan estudios sobre la excreción urinaria de estas proteínas en varias enfermedades en humanos.

### Transportadores de sodio y canales de agua apicales

En el tramo proximal:

#### Intercambiador sodio/protones de tipo 3 (NHE-3)

Se localiza principalmente en la membrana apical de las células epiteliales del túbulo proximal, donde realiza el intercambio de sodio-protones. En este tramo se reabsorbe cerca del 70% del sodio que proviene del filtrado glomerular (fig. 1).

**Fisiología.** Una de las vías de regulación de la actividad del NHE-3 es la fosforilación. Hay una serie de factores reguladores del NHE-3 (NHE-3 *regulator factor*: NHERF) necesarios para la modulación de la actividad de este transportador. Una amplia variedad de hormonas y parámetros fisiológicos, como el pH luminal, intervienen en la activación e inhibición de la actividad del NHE-3. Así, la angiotensina II favorece un incremento de la abundancia de este transportador en la membrana apical de las células epiteliales tubulares, aumentando la reabsorción de sodio a nivel proximal, mientras que hormonas como la dopamina o la paratiroidea inhiben la actividad del NHE-3<sup>4-7</sup>.

**Fisiopatología.** En humanos no se han descrito alteraciones en este transportador. Los ratones deficientes en el gen *nhe-3* presentan una gran disminución de la reabsorción de bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) que lleva a una alcalinización del espacio luminal. Sin embargo, estas ratas sólo presentan diarrea, por lo que se cree que la disminución de la reabsorción de sodio a nivel proximal sería compensada en otros tramos del túbulo<sup>8</sup>. **Inhibidores.** Los inhibidores de la anhidrasa carbónica bloquean este transportador. Además, el polisacárido manitol actúa como un diurético osmótico, al inhibir la reabsorción de sodio y agua en el túbulo proximal.

#### Cotransportador sodio-fosfato tipo II (NaPiII)

Participa, junto con el intercambiador NHE-3, en la reabsorción proximal de sodio.

**Fisiología.** Factores como la ingesta de fosfato en la dieta o las hormonas paratiroidea y dopamina favorecen la degradación de este cotransportador<sup>9</sup>.

**Fisiopatología.** Se han descrito mutaciones en este transportador que causan una pérdida renal de fosfato que conlleva la aparición de hipofosfatemia<sup>10</sup>.

**Inhibidores.** Los diuréticos proximales bloquean de forma indirecta este transportador.

#### Aquaporina-1

Este canal de agua se localiza en células endoteliales y epiteliales de riñón, córnea, peritoneo o pleura. En el riñón, la aquaporina-1 se ubica en la membrana apical y basolateral de las células epiteliales del túbulo proximal y de la rama delgada descendente del asa de Henle, donde facilita la reabsorción de agua en el proceso de multiplicación a contracorriente. Por otro lado, este canal parece facilitar la migración celular mediante un mecanismo que favorece el transporte de agua a través del lamelopodio o expansiones celulares. Se ha postulado que este mecanismo podría actuar facilitando la regeneración celular cuando se producen fenómenos de necrosis tubular.

**Fisiología.** La regulación renal de este canal de agua es poco conocida.

**Fisiopatología.** Se han descrito mutaciones en la aquaporina-1 en individuos que aparentemente mostraban un fenotipo normal. Sin embargo, cuando se les restringía la ingesta de agua presentaban una disminución en la capacidad para concentrar la orina<sup>11</sup>.

**Inhibidores.** Se desconoce por el momento si hay bloqueadores específicos para este canal.

En la rama gruesa ascendente del asa de Henle:

#### Cotransportador de sodio-potasio-2cloros (NKCC2)

Se encuentra en la membrana apical de las células epiteliales de la rama gruesa ascendente del asa de Henle. En este tramo, que se caracteriza por ser impermeable al agua, se reabsorbe entre un 20 y un 30% del sodio proveniente del filtrado glomerular (fig. 1). El NKCC2 realiza el cotransporte de sodio, cloro y potasio desde el lumen hacia el interior de la célula.

**Fisiología.** Distintas hormonas regulan la expresión y la actividad de este transportador. Se produce un aumento en la reabsorción de sodio en la rama ascendente del asa de Henle cuando aumenta la expresión apical del NKCC2, por ejemplo mediante la acción de la angiotensina II<sup>4</sup>, o cuando el NKCC2 incrementa su actividad por la acción de la vasopresina o de la hormona paratiroidea<sup>12,13</sup>. Por otro lado, se produce una disminución de la reabsorción de sodio a este nivel por la acción de la prostaglandina E<sub>2</sub> o del óxido nítrico, que disminuyen la actividad de este cotransportador<sup>14,15</sup>.

**Fisiopatología.** Hay varias mutaciones que se han descrito en el gen *NKCC2* que producen una pérdida de función de la proteína, causando el síndrome de Bartter<sup>16</sup>. Este síndrome se caracteriza por una gran pérdida de sal en la orina y por hipotensión<sup>17</sup>. Varios estudios apuntan a una asociación entre el aumento de la actividad de este transportador y la hipertensión<sup>18</sup>.

**Inhibidores.** Los diuréticos de asa: furosemida, torasemida y bumetanida son los antagonistas más conocidos de este transportador.

En el túbulo distal:

#### Cotransportador sodio-cloro (NCC)

Se sitúa en la membrana apical de las células del túbulo distal, donde se produce una reabsorción del 5 al 10% del sodio que proviene del filtrado glomerular (fig. 1).

**Fisiología.** En su regulación interviene una cascada de proteínas de la familia de las serina-treonina (sin lisina) cinasas (*with no lysine [K]: WNK*). Las hormonas aldosterona, estradiol y vasopresina aumentan la cantidad de NCC en la membrana apical de las células del túbulo distal favoreciendo así un incremento en la reabsorción de sodio a este nivel<sup>19-21</sup>.

**Fisiopatología.** En el síndrome de Gitelman se han descrito mutaciones en los genes que codifican para el NCC y las WNK cinasas que causan la inactivación de este cotransportador<sup>22</sup>. Hipotensión, hipocalcemia y alcalosis metabólica son algunos de los síntomas clínicos que caracterizan este síndrome. Por otro lado, se han descrito mutaciones en los genes de las WNK cinasas que alteran la actividad de las proteínas que codifican, lo que da lugar a una hiperactividad del NCC (síndrome de Gordon o pseudohiperaldosteronismo de tipo II: PHA-II)<sup>23</sup>. En este caso se manifiestan hipertensión, hipercalemia y acidosis metabólica.

**Inhibidores.** Las tiacidas son los antagonistas por excelencia de este transportador.

En el túbulo colector:

#### Canal epitelial de sodio (ENaC)

Este canal está formado por tres subunidades: alfa, beta y gamma. Se ubica en la membrana apical de las células epiteliales del túbulo colector, donde se reabsorbe entre un 3 y un 5% del sodio que proviene del filtrado glomerular (fig. 1).

**Fisiología.** La aldosterona, la insulina y la vasopresina favorecen la reabsorción de sodio a través del canal epitelial de sodio en el túbulo colector<sup>21,24</sup>.

**Fisiopatología.** Se han descrito mutaciones en las subunidades beta y gamma del canal epitelial de sodio que producen un aumento de la actividad de ENaC y causan el síndrome de Liddle, que es una enfermedad autosómica dominante que se caracteriza por hipertensión y alcalosis metabólica<sup>25</sup>. Se han descrito mutaciones en todas las subunidades de ENaC que causan el pseudohiperaldosteronismo tipo I (PHA-I)<sup>26</sup>. Esta enfermedad se caracteriza por hipotensión secundaria a una disminución en la reabsorción de sodio en el túbulo colector<sup>27</sup>.

**Inhibidores.** La amilorida o el triamtereno son algunos de los inhibidores de este transportador.

#### Aquaporina-2

Esta aquaporina se encuentra exclusivamente en las células principales del túbulo colector, concretamente en la membrana apical y en vesículas intracitoplasmáticas.

**Fisiología.** Este canal está regulado principalmente por la hormona vasopresina<sup>28</sup>. El aumento de la permeabilidad al agua del túbulo colector mediado por la vasopresina se regula de dos formas: a corto y a largo plazo. La regulación a corto plazo sucede rápidamente como respuesta a la acción de la vasopresina. Ésta favorece el aumento de la aquaporina-2 en la membrana apical mediante exocitosis y fusión con la membrana plasmática de las vesículas internas que contienen estos canales<sup>29,30</sup>. La regulación a largo plazo tiene lugar cuando se mantienen altos los valores de vasopresina durante un período prolongado; así se estimula la síntesis de nueva proteína<sup>29,30</sup>. Por otra parte, la prostaglandina E<sub>2</sub> tiene un efecto contrario al de la hormona antidiurética, de forma que disminuye la permeabilidad del tubo colector<sup>31</sup>.

**Fisiopatología.** Mutaciones localizadas en el extremo carboxiterminal de la aquaporina-2 causan la forma dominante de la diabetes insípida nefrogénica<sup>32</sup>. Se produce una disminución de la permeabilidad al agua del túbulo colector por la aquaporina-2 mutada que, en los individuos que tienen esta enfermedad, causa una elevada poliuria acompañada de polidipsia<sup>33</sup>.

**Inhibidores.** Los antagonistas de los receptores de la vasopresina de tipo 2 (V<sub>2</sub>R: *vasopressin-2 receptor*), o acuaréticos, son los antagonistas que se conocen de este canal de agua. Actúan bloqueando la acción de la hormona antidiurética, de forma que indirectamente se inhibe la síntesis de la aquaporina-2. El litio también produce una disminución de la expresión de este canal. En este caso se altera la vía de síntesis de la aquaporina-2.

En la tabla 1 se muestra la localización y los inhibidores de los transportadores renales de sodio y canales de agua que acabamos de describir, así como algunas de las enfermedades relacionadas con sus alteraciones.

TABLA 1

#### Características de los transportadores renales de sodio y agua que se detectan en la orina

	Localización tubular	Enfermedades asociadas	Inhibidores
NHE-3	Proximal	Insuficiencia renal aguda	Acetazolamida
NaPiII	Proximal	Hipofosfatemia	Diuréticos proximales
Aquaporina-1	Proximal	Cirrosis	-
NKCC2	Asa de Henle	Hipertensión, hipotensión	Furasemida, torasemida, bumetanida
NCC	Distal	Hipertensión, hipotensión	Tiacidas
ENaC	Colector	Hipertensión, hipotensión	Amilorida, triamtereno
Aquaporina-2	Colector	Cirrosis, enuresis	Antagonistas V <sub>2</sub> R

NHE-3: intercambiador sodio-protones tipo 3; NaPiII: cotransportador sodio-fosfato tipo II; NKCC2: cotransportador de sodio-potasio-2 cloros; NCC: cotransportador sodio-cloro; ENaC: canal epitelial de sodio; V<sub>2</sub>R: receptores de la vasopresina de tipo 2.

## Biomarcadores renales

El estudio de proteínas renales en humanos se ha visto siempre limitado por la dificultad en la obtención de biopsias de riñón. La orina es la fuente ideal para la obtención no invasiva de biomarcadores útiles en el diagnóstico y el seguimiento de enfermedades renales. El riñón excreta proteínas de la membrana plasmática apical de las células epiteliales renales, lo que indica que el análisis de la orina podría ofrecernos información sobre el estado de esta fracción de la membrana. Las nuevas estrategias, como el estudio del proteoma urinario, pueden llevar al descubrimiento de futuros biomarcadores para distintas enfermedades renales. El estudio en orina de proteínas renales ya conocidas, como los transportadores de sodio o canales de agua, así como de proteínas identificadas en estudios de proteómica urinaria, puede ayudar a identificar mejor las enfermedades e incluso orientar sobre su tratamiento.

Desde hace algunos años se está realizando estudios en humanos en que se investiga la excreción urinaria de aquaporinas. Los principales trabajos se centran en trastornos como la insuficiencia renal aguda, la diabetes insípida nefrogénica, la enuresis nocturna monosintomática, la cirrosis hepática o la insuficiencia cardíaca. Sin embargo, hasta el momento prácticamente no hay estudios en los que se investigue el papel de la excreción renal de los transportadores de sodio en orina en estas enfermedades, lo cual sería de gran interés para profundizar en los mecanismos fisiopatológicos que las caracterizan.

### *Insuficiencia renal aguda*

La insuficiencia renal aguda se caracteriza por un deterioro rápido de la función renal. Se produce una disminución del filtrado glomerular que conlleva una retención de agua e iones, como el sodio o el potasio. También suele caracterizarse por una disminución del volumen urinario. Du Cheyron et al<sup>34</sup> observaron un incremento de la excreción urinaria de NHE-3 a medida que aumentaba el daño tubular en la insuficiencia renal aguda, por lo cual este transportador podría resultar un nuevo biomarcador no invasivo de daño renal tubular.

### *Diabetes insípida nefrogénica*

La diabetes insípida nefrogénica está causada por la incapacidad del riñón para concentrar la orina en respuesta a la acción de la hormona antidiurética. Se han realizado varios trabajos en los que se ha estudiado la excreción urinaria de aquaporina-2 en pacientes con esta enfermedad. En los primeros trabajos que se realizaron se observó una disminución de la aquaporina-2 en la orina de los pacientes. El decremento de la expresión de este canal reduce la permeabilidad del túbulo colector, favoreciendo de esta forma la poliuria observada en estos pacientes. En estos casos puede haber varias causas: *a)* hay mutaciones en el receptor V<sub>2</sub>R que disminuyen su funcionalidad y, en consecuencia, se produce una disminución de la aquaporina-2 en la membrana apical; *b)* hay descritas varias mutaciones en el gen de la aquaporina-2 que producen una disminución de la síntesis de esta proteína funcional, y *c)* alteraciones en la vía de translocación de la aquaporina-2 vesicular hacia la membrana apical de las células tubulares también producen un decremento de la excreción urinaria de este canal de agua<sup>35,36</sup>. En algunos individuos se ha observado aumentada la excreción urinaria de aquaporina-2. Estos pacientes tienen la aquaporina-2 no funcional, por lo que, a pesar de tener incrementada la excreción de esta proteína, no au-

menta la reabsorción de agua en el túbulo colector. Aparte de la excreción en orina de aquaporina-2, Deen et al<sup>37</sup> estudiaron la excreción urinaria de aquaporina-1, y observaron que estaba incrementada en algunos pacientes<sup>37</sup>. Este hecho indicaba un incremento compensatorio de la reabsorción de agua a nivel proximal en estos pacientes.

### *Enuresis nocturna monosintomática*

La enuresis nocturna monosintomática se caracteriza por episodios de escape de orina durante el sueño, principalmente en niños. En algunos pacientes se ha observado una falta del ritmo circadiano en la producción de vasopresina que dificulta el mecanismo de concentración de la orina<sup>38</sup>. El tratamiento con un análogo de la vasopresina, DDAVP (1-desamino-8-D-arginina vasopresina), mejora la sintomatología en la mayoría de los casos. Se ha realizado estudios en que se ha detectado una disminución en la excreción de aquaporina-2 en la orina nocturna de los pacientes con enuresis respecto a los controles<sup>39</sup>. Este decremento de aquaporina-2 produce una disminución de la permeabilidad del túbulo colector y, por consiguiente, un aumento de la poliuria en estos individuos. Además, después del tratamiento con DDAVP se ha observado una normalización de la excreción de aquaporina-2 en la mayoría de estos pacientes, coincidiendo con la desaparición de la clínica. Por lo tanto, el aumento de los valores de aquaporina-2 en el túbulo colector disminuye la poliuria observada en estos individuos<sup>39</sup>. En los pacientes que no responden al tratamiento con DDAVP parece que interviene un mecanismo distinto del de la vía vasopresina-aquaporina-2, sin que hasta este momento haya sido estudiado.

### *Cirrosis hepática*

La cirrosis hepática se asocia a alteraciones en la regulación del metabolismo hidrosalino. Hasta el momento hay algunos estudios en los que se ha investigado la excreción urinaria de aquaporina-2 en pacientes con cirrosis hepática<sup>40-42</sup>. Los resultados obtenidos son discordantes. Pedersen et al<sup>40</sup> no observaron cambios en la excreción urinaria de aquaporina-2, mientras que Ivarsen et al<sup>41</sup> detectaron un incremento de la aquaporina-2 urinaria en el grupo de pacientes cirróticos que estudiaron. Este aumento de la aquaporina-2 podría estar contribuyendo en la retención de agua observada en los pacientes cirróticos. En nuestro laboratorio hemos realizado un estudio en pacientes con cirrosis hepática en diferentes fases: sin ascitis, con ascitis y pacientes con síndrome hepatorenal. Hemos observado una disminución progresiva de la excreción de aquaporina-2 a medida que aumentaba la gravedad de la enfermedad<sup>42</sup>. El decremento de aquaporina-2 estaría favoreciendo la excreción de agua, hecho que podría representar un mecanismo compensatorio como respuesta a la expansión del volumen extracelular observado en los pacientes cirróticos. La inclusión de pacientes en tratamiento con diuréticos o la clasificación de los pacientes cirróticos en subgrupos con la escala de Child-Pugh podrían explicar las diferencias observadas en los distintos estudios.

### *Insuficiencia cardíaca congestiva*

En la insuficiencia cardíaca congestiva el corazón disminuye su capacidad para bombear la sangre. Pedersen et al<sup>40</sup> observaron un aumento en la excreción urinaria de aquaporina-2 en pacientes con esta enfermedad. En otros estudios también se detectó una mayor excreción de este canal de agua en la orina de pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva respecto a los controles<sup>43,44</sup>. El incremento de

aquaporina-2 estaría facilitando la reabsorción de agua en el túbulo colector y, de esta forma, se favorecería la retención de agua observada en estos pacientes.

### Conclusiones

La posibilidad de detectar transportadores renales de sodio y canales de agua en la orina abre las puertas a un nuevo tipo de abordaje para el estudio de enfermedades con alteraciones en el balance hidrosalino. Hasta el momento, los trabajos que se han realizado en humanos son escasos y se han centrado principalmente en el estudio de proteínas que se detectaban relativamente bien en orina como las aquaporinas y el NHE-3. La importancia de este tipo de trabajos radica no sólo en profundizar en la fisiopatología de estos trastornos en el hombre de una forma no invasiva, sino también en las posibilidades terapéuticas que se pueden derivar de estos estudios, como el diagnóstico precoz de algunas enfermedades renales, su progresión o la predicción de la respuesta a un determinado tratamiento, entre otras. Además, los nuevos enfoques para el estudio del proteoma urinario, como el análisis de las proteínas mediante técnicas de espectrometría de masas, pueden permitir el descubrimiento de otros biomarcadores de enfermedad renal.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Fernández-Llama P, Andrews P, Ecelbarger CA, Nielsen S, Knepper M. Concentrating defect in experimental nephrotic syndrome: altered expression of aquaporins and thick ascending limb Na<sup>+</sup> transporters. *Kidney Int.* 1998;54:170-9.
- McKee JA, Kumar S, Ecelbarger CA, Fernández-Llama P, Terris J, Knepper MA. Detection of Na<sup>(+)</sup> transporter proteins in urine. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11:2128-32.
- Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:13368-73.
- Kwon TH, Nielsen J, Kim YH, Knepper MA, Frokiaer J, Nielsen S. Regulation of sodium transporters in the thick ascending limb of rat kidney: response to angiotensin II. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003;285:F152-65.
- Wiederkehr MR, Di SF, Collazo R, Quinones H, Fan L, Murer H, et al. Characterization of acute inhibition of Na/H exchanger NHE-3 by dopamine in opossum kidney cells. *Kidney Int.* 2001;59:197-209.
- Greger R. Physiology of renal sodium transport. *Am J Med Sci.* 2000;319:51-62.
- Burckhardt G, Di SF, Helmle-Kolb C. The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger gene family. *J Nephrol.* 2002;15 Suppl 5:S3-21.
- Nakamura S, Amlal H, Schultheis PJ, Galla JH, Shull GE, Soleimani M. HCO<sup>-3</sup> reabsorption in renal collecting duct of NHE-3-deficient mouse: a compensatory response. *Am J Physiol.* 1999;276:F914-21.
- Bacic D, Lehir M, Biber J, Kaissling B, Murer H, Wagner CA. The renal Na<sup>+</sup>/phosphate cotransporter NaPi-IIa is internalized via the receptor-mediated endocytic route in response to parathyroid hormone. *Kidney Int.* 2006;69:495-503.
- Bergwitz C, Roslin NM, Tieder M, Loredó-Osti JC, Bastepe M, bu-Zahra H, et al. SLC34A3 mutations in patients with hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria predict a key role for the sodium-phosphate cotransporter NaPi-IIc in maintaining phosphate homeostasis. *Am J Hum Genet.* 2006;78:179-92.
- King LS, Choi M, Fernandez PC, Cartron JP, Agre P. Defective urinary-concentrating ability due to a complete deficiency of aquaporin-1. *N Engl J Med.* 2001;345:175-9.
- Greger R. Physiology of renal sodium transport. *Am J Med Sci.* 2000;319:51-62.
- Kim GH, Ecelbarger CA, Mitchell C, Packer RK, Wade JB, Knepper MA. Vasopressin increases Na-K-2Cl cotransporter expression in thick ascending limb of Henle's loop. *Am J Physiol.* 1999;276:F96-103.
- Greger R. Physiology of renal sodium transport. *Am J Med Sci.* 2000;319:51-62.
- Fernandez-Llama P, Ecelbarger CA, Ware JA, Andrews P, Lee AJ, Turner R, et al. Cyclooxygenase inhibitors increase Na-K-2Cl cotransporter abundance in thick ascending limb of Henle's loop. *Am J Physiol.* 1999;277:F219-26.
- Starremans PG, Kersten FF, Knoers NV, Van den Heuvel LP, 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.* 2003;14:1419-26.
- Lang F, Capasso G, Schwab M, Waldegg S. Renal tubular transport and the genetic basis of hypertensive disease. *Clin Exp Nephrol.* 2005;9:91-9.
- Hoagland KM, Flasch AK, Dahly-Vernon AJ, Dos Santos EA, Knepper MA, Roman RJ. Elevated BSC-1 and ROMK expression in Dahl salt-sensitive rat kidneys. *Hypertension.* 2004;43:860-5.
- Kim GH, Masilamani S, Turner R, Mitchell C, Wade JB, Knepper MA. The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter is an aldosterone-induced protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:14552-7.
- 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.* 1998;101:1661-9.
- Ecelbarger CA, Kim GH, Wade JB, Knepper MA. Regulation of the abundance of renal sodium transporters and channels by vasopressin. *Exp Neurol.* 2001;171:227-34.
- Reissinger A, Ludwig M, Utsch B, Promse A, Baulmann J, Weisser B, et al. Novel NCCT gene mutations as a cause of Gitelman's syndrome and a systematic review of mutant and polymorphic NCCT alleles. *Kidney Blood Press Res.* 2002;25:354-62.
- Gamba G. Role of WNK kinases in regulating tubular salt and potassium transport and in the development of hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;288:F245-52.
- Masilamani S, Kim GH, Mitchell C, Wade JB, Knepper MA. Aldosterone-mediated regulation of ENaC alpha, beta, and gamma subunit proteins in rat kidney. *J Clin Invest.* 1999;104:R19-23.
- Snyder PM, Price MP, McDonald FJ, Adams CM, Volk KA, Zeiher BG, et al. Mechanism by which Liddle's syndrome mutations increase activity of a human epithelial Na<sup>+</sup> channel. *Cell.* 1995;83:969-78.
- Arai K, Zachman K, Shibasaki T, Chrousos GP. Polymorphisms of amiloride-sensitive sodium channel subunits in five sporadic cases of pseudohypoaldosteronism: do they have pathologic potential? *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:2434-7.
- Chang SS, Grunder S, Hanukoglu A, Rosler A, Mathew PM, Hanukoglu I, et al. Mutations in subunits of the epithelial sodium channel cause salt wasting with hyperkalaemic acidosis, pseudohypoaldosteronism type 1. *Nat Genet.* 1996;12:248-53.
- Deen PM, Verdijk MA, Knoers NV, Wieringa B, Monnens LA, Van Os CH, et al. Requirement of human renal water channel aquaporin-2 for vasopressin-dependent concentration of urine. *Science.* 1994;264:92-5.
- Fernández-Llama P. Fisiología molecular del mecanismo de concentración urinario, papel de las aquaporinas renales. *Nefrología.* 2000;20:486-94.
- Nielsen S, Frokiaer J, Marples D, Kwon TH, Agre P, Knepper MA. Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. *Physiol Rev.* 2002;82:205-44.
- Zelenina M, Christensen BM, Palmer J, Nairn AC, Nielsen S, Aperia A. Prostaglandin E(2) interaction with AVP: effects on AQP2 phosphorylation and distribution. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000;278:F388-94.
- Valenti G, Procino G, Tamma G, Carmosino M, Svelto M. Minireview: aquaporin 2 trafficking. *Endocrinology.* 2005;146:5063-70.
- Morello JP, Bichet DG. Nephrogenic diabetes insipidus. *Annu Rev Physiol.* 2001;63:607-30.
- Du Cheyron CD, Daubin C, Poggioli J, Ramakers M, Houillier P, Charbonneau P, et al. Urinary measurement of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 3 (NHE3) protein as new marker of tubule injury in critically ill patients with ARF. *Am J Kidney Dis.* 2003;42:497-506.
- Kanno K, Sasaki S, Hirata Y, Ishikawa S, Fushimi K, Nakanishi S, et al. Urinary excretion of aquaporin-2 in patients with diabetes insipidus. *N Engl J Med.* 1995;332:1540-5.
- Sisson D, Battle D. Aquaporin-2 as a biomarker of distal renal tubular function using lithium as an experimental model. *Ren Fail.* 1999;21:331-6.
- Deen PM, Van Aubel RA, Van Lieburg AF, Van Os CH. Urinary content of aquaporin 1 and 2 in nephrogenic diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol.* 1996;7:836-41.
- Norgaard JP, Djurhuus JC, Watanabe H, Stenberg A, Lettgen B. Experience and current status of research into the pathophysiology of nocturnal enuresis. *Br J Urol.* 1997;79:825-35.
- Radetti G, Paganini C, Rigon F, Gentili L, Gebert U, Ishikawa S. Urinary aquaporin-2 excretion in nocturnal enuresis. *Eur J Endocrinol.* 2001;145:435-8.
- Pedersen RS, Bentzen H, Bech JN, Nyvad O, Pedersen EB. Urinary aquaporin-2 in healthy humans and patients with liver cirrhosis and chronic heart failure during baseline conditions and after acute water load. *Kidney Int.* 2003;63:1417-25.
- Ivarsen P, Frokiaer J, Aagaard NK, Hansen EF, Bendtsen F, Nielsen S, et al. Increased urinary excretion of aquaporin 2 in patients with liver cirrhosis. *Gut.* 2003;52:1194-9.
- Esteva-Font C, Baccaro ME, Fernandez-Llama P, Sans L, Guevara M, Ars E, et al. Aquaporin-1 and aquaporin-2 urinary excretion in cirrhosis: Relationship with ascites and hepatorenal syndrome. *Hepatology.* 2006;44:1555-63.
- Schrier RW, Cadnapaphornchai MA, Umenishi F. Water-losing and water-retaining states: role of water channels and vasopressin receptor antagonists. *Heart Dis.* 2001;3:210-4.
- Funayama H, Nakamura T, Saito T, Yoshimura A, Saito M, Kawakami M, et al. Urinary excretion of aquaporin-2 water channel exaggerated dependent upon vasopressin in congestive heart failure. *Kidney Int.* 2004;66:1387-92.