



# Bases moleculares de la retención hidrosalina en la cirrosis hepática experimental: aquaporinas y transportadores renales de sodio

P. Fernández-Llama

Laboratorio de Hormonología. Hospital Clínic i Provincial. Universidad de Barcelona. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS). Barcelona.

## INTRODUCCIÓN

La cirrosis hepática se asocia con un trastorno en la regulación del balance hidrosalino. En la fase inicial del estado de descompensación se produce una retención de sodio que puede seguirse en una fase más evolucionada de la enfermedad, de un exceso en la retención de agua libre que conduciría a la dilución del fluido extracelular y al desarrollo de hiponatremia<sup>1</sup>. Los mecanismos fisiopatológicos implicados en el trastorno del balance hidrosalino de la cirrosis no se conocen en profundidad. La reciente clonación de distintas proteínas que intervienen en el transporte renal de agua y sodio, como son las aquaporinas y los transportadores de sodio, ha permitido abordar el estudio de este problema desde una nueva perspectiva. El método utilizado ha sido el desarrollo de anticuerpos policlonales específicos contra cada una de estos transportadores y canales para, poder detectar su inmunoreactividad en el riñón ante diversas circunstancias<sup>2</sup>. La siguiente revisión comenta los resultados obtenidos del análisis de la cantidad renal de aquaporinas y transportadores de sodio en las diferentes fases de la retención hidrosalina en la cirrosis hepática experimental<sup>3-9</sup>. Asimismo, se hace una breve descripción de las aquaporinas y de los transportadores de sodio.

## AQUAPORINAS

Las aquaporinas son una familia de proteínas intrínsecas de membrana que facilitan el transporte osmótico de agua en la membrana plasmática de las células de distintos tejidos<sup>10</sup>. Hasta la fecha, se han identificado en los tejidos de mamíferos diez aquaporinas, que se han denominado consecutivamente aquaporina-0 a aquaporina-9.

## Estructura molecular de las aquaporinas

Se trata de una cadena polipeptídica sencilla con un peso molecular aproximado de 28 kDa. La cadena atraviesa la membrana seis veces, formando cinco asas y quedando los extremos amino y carboxilo en el interior de la célula. Se ha determinado la estructura tridimensional de la aquaporina-1 y se ha observado que se agrupa en homotetrámeros en la membrana plasmática y que cada subunidad monomérica forma un canal de agua<sup>11</sup>.

## Patrón de expresión y fisiología de las aquaporinas renales (fig. 1)

La aquaporina-1 se localiza en la membrana apical y basolateral de las células del túbulo proximal.

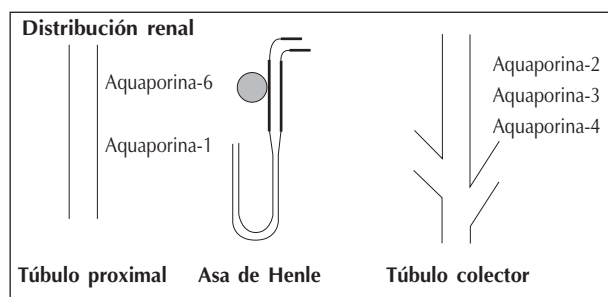


Fig. 1.—Representación esquemática de las principales aquaporinas localizadas a lo largo del túbulo renal. La aquaporina-1 se localiza en la membrana apical y basolateral de las células del túbulo proximal y de la porción descendente del asa de Henle. La aquaporina-2 en la membrana apical y en vesículas intracelulares de las células principales de los túbulos colectores. La aquaporina-3 y la aquaporina-4 en la membrana basolateral de las células principales del túbulo colector. La aquaporina-6, en membranas intracelulares de podocitos glomerulares, células del túbulo proximal y células intercaladas del túbulo colector.

Es en esta zona de la nefrona donde se reabsorbe la mayor parte del ultrafiltrado glomerular. La aquaporina-1 también se encuentra de la rama descendente del asa de Henle y en los vasa recta, su presencia a este nivel tiene importancia para el proceso de multiplicación a contracorriente<sup>12</sup>. La rama gruesa ascendente del asa de Henle es impermeable al agua, no habiéndose localizado en esta zona ningún canal de agua. En el túbulo colector se han descrito tres aquaporinas, la aquaporina-2, -3 y -4. Estos segmentos de la nefrona son claves para los procesos de concentración y dilución urinarios. La aquaporina-2 se localiza en la membrana apical y en vesículas intracelulares de las células principales de los túbulos colectores. Este es el canal de agua que está regulado por la vasopresina<sup>13</sup>. La aquaporina-3 y la aquaporina-4 se localizan en la membrana basolateral de las células principales de los túbulos colectores<sup>14</sup>. Recientemente se ha descrito la aquaporina-6, que se localiza exclusivamente en membranas intracelulares de podocitos glomerulares, de células del túbulo proximal y de células intercaladas del túbulo colector. La aquaporina-6 parece que puede jugar un papel en el mantenimiento del equilibrio ácido base<sup>15</sup>.

### Regulación de la aquaporina-2 por la vasopresina

La vasopresina regula la aquaporina-2 de dos maneras: 1) un mecanismo de regulación a corto plazo asociado con una redistribución intracelular de la aquaporina desde las vesículas intracelulares a la membrana plasmática apical y 2) una regulación a largo plazo asociado con un aumento en la cantidad total de aquaporina-2 en la célula<sup>13</sup>. La vasopresina se une al receptor V<sub>2</sub> de la membrana basal de las células principales de los túbulos colectores (fig. 3) aumentando la producción de adenosin monofosfato cíclico (AMPC) y, poniendo en marcha los dos mecanismos anteriormente citados.

### Expresión renal de las aquaporinas en distintos modelos de cirrosis hepática experimental

La cirrosis hepática se caracteriza por la aparición de retención hidrosalina a lo largo del desarrollo de la enfermedad pudiendo, en una fase más evolucionada, aparecer una retención predominantemente de agua. El descubrimiento de la existencia de canales de agua que median el transporte osmótico de la misma y, el reconocimiento de que alguna de esas aquaporinas está regulada por la vasopresina, hizo que las investigaciones iniciales se centraran en el estudio de la aquaporina-2. Los primeros trabajos

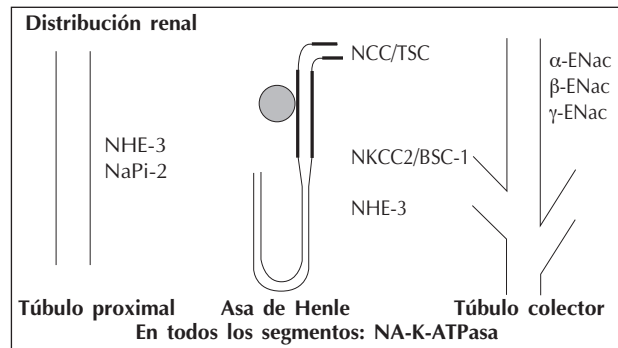


Fig. 2. Representación esquemática de los principales transportadores de sodio localizados a lo largo del túbulo renal. En la membrana apical destacan: 1) en el túbulo proximal se localiza la isoforma 3 del intercambiador de Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> (NHE-3) y la isoforma 2 del cotransportador de Na<sup>+</sup>-Pi (NaPi2), 2) en la porción ascendente del asa de Henle el cotransportador de Na<sup>+</sup>-K-2Cl (NKCC2) y el NHE-3, 3) en el túbulo distal el cotransportador de Na<sup>+</sup>-Cl (NCC) y 4) en el túbulo colector el canal epitelial de sodio (ENaC). En la membrana basolateral el principal transportador de sodio en todos los segmentos del túbulo es la Na<sup>+</sup>-K-ATPasa.

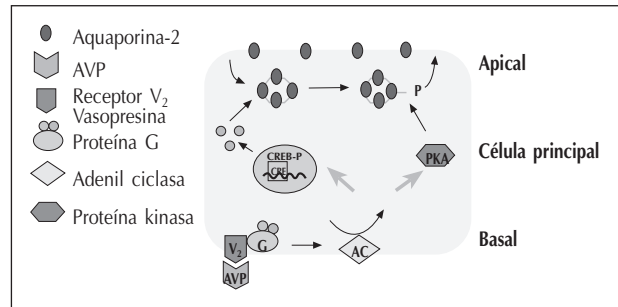


Fig. 3.—Representación esquemática de los principales eventos que resultan de la interacción de la vasopresina con el receptor V<sub>2</sub> de la célula principal del túbulo colector. La vasopresina (AVP) se une al receptor V<sub>2</sub> de la vasopresina localizado en la membrana basolateral y, a través de la proteína G tipo estimuladora, que activa la adenil ciclasa (AC), aumenta la cantidad de AMPc citosólico. El AMPc activa la proteína quinasa A (PKA), que al activarse fosforila diversas proteínas, entre ellas la aquaporina-2. Las vesículas que contienen aquaporina-2 fosforilada se fusionan con la membrana plasmática en un proceso de exocitosis. Este aumento de la aquaporina-2 en la membrana apical aumenta la permeabilidad al agua de la membrana. Posteriormente, al disminuir los niveles de vasopresina la aquaporina-2 de la superficie de la membrana es internalizada (endocitosis). Por otro lado, el AMPc también estimula la transcripción del gen de la aquaporina-2. El gen presenta una secuencia de respuesta al AMPc denominada «cAMP responsive element» (CRE). La unión de una proteína previamente fosforilada a esta zona del gen «CRE-binding protein» (CRB-P), favorece la transcripción del mismo y conduce a un aumento de su ARNm y finalmente de la proteína.

publicados describieron que la cirrosis hepática podría estar asociada con un aumento en la cantidad de aquaporina-2 en el riñón<sup>3,4</sup>. Asahina y cols. ob-

servaron un aumento tanto del RNAm como de la proteína de la aquaporina-2 después de la administración intraperitoneal repetida de  $\text{CCl}_4$  y aceite de oliva<sup>3</sup>. Fujita y cols. observaron también un aumento del RNAm de la aquaporina-2 después de la administración subcutánea de  $\text{CCl}_4$  y aceite de oliva<sup>4</sup>. Los trabajos publicados posteriormente no han confirmado estos resultados<sup>5-8</sup>. Así, un estudio que utiliza la inhalación crónica de  $\text{CCl}_4$  para inducir la enfermedad observa que la cantidad total de aquaporina-2 no estaba aumentada en el riñón de las ratas cirróticas con ascitis. Sin embargo, se demostró que existía una activación del tráfico de aquaporina-2 con una redistribución de la misma de las vesículas intracitoplasmáticas a la membrana plasmática apical<sup>7</sup>. En este trabajo las ratas son sometidas a un test de sobrecarga de agua que permite identificar aquellas que desarrollan un defecto en la capacidad de excretar agua. Un trabajo de Jonassen y cols. en ratas con cirrosis hepática inducida por  $\text{CCl}_4$  describe también que la expresión renal de aquaporina-2 no está aumentada<sup>8</sup>. Por otro lado, estudios realizados en el modelo de cirrosis inducido por la ligadura del conducto biliar tampoco han observado un aumento en la expresión renal de la aquaporina-2<sup>5,6</sup>. De hecho, se describe una disminución de la cantidad de aquaporina-2 en el riñón. Además en estas ratas cirróticas, y a diferencia del modelo de cirrosis inducido por la inhalación de  $\text{CCl}_4$ , no se observaron evidencias que sugieran la existencia de una estimulación del tráfico de aquaporina-2. La causa de las diferencias en los resultados entre los distintos modelos de cirrosis no está clara, pero podría ser debido a diferencias en la ingesta de sodio y agua en la dieta u a otras condiciones experimentales. Además, de que cada modelo de cirrosis experimental tiene sus propias características fisiopatológicas.

La mayoría de los trabajos comentados se han centrado en el estudio de la aquaporina-2 sin embargo, existen otros canales de agua que también juegan un importante papel en el transporte de agua a lo largo del túbulo. Así, en el modelo de cirrosis inducido por la inhalación de  $\text{CCl}_4$  se demuestra un aumento de la cantidad de aquaporina-3 y de aquaporina-1 en el riñón de las ratas cirróticas con ascitis y un defecto en la excreción de agua<sup>7</sup>. La vasopresina además de activar el tráfico de aquaporina-2 también regula la aquaporina-3<sup>14</sup>. Se ha postulado que el aumento de la aquaporina-3 puede, en parte, favorecer el trastorno en la excreción de agua que se observa en este modelo de cirrosis. Por otro lado, se ha interpretado que el aumento en la cantidad de aquaporina-1 del túbulo proximal optimizaría la absorción de fluidos a este nivel ya que

no sería necesario generar un gradiente osmótico muy elevado para la absorción de agua. Se especula que este menor gradiente osmótico podría minimizar la fuga retrógrada de  $\text{ClNa}$  por los espacios paracelulares ya que este epitelio tiene una permeabilidad paracelular de  $\text{ClNa}$  elevada.

## TRANSPORTADORES Y/O CANALES DE SODIO

Los transportadores o canales de sodio son un conjunto de proteínas de membrana que intervienen en el transporte de sodio a través de la membrana plasmática de las células de distintos tejidos<sup>16</sup>.

### Patrón de expresión y fisiología de los transportadores y/o canales renales de sodio (fig. 2)

El sodio excretado en la orina representa de un 1 a un 10% del sodio filtrado por el glomerulo, el resto del sodio es reabsorbido a lo largo de la nefrona. El túbulo renal está compuesto por diferentes segmentos cada uno de los cuales tiene distintos transportadores y/o canales de sodio. En el túbulo proximal se reabsorbe cerca de un 60-70% del sodio filtrado. Esta reabsorción tiene lugar principalmente a través del intercambiador de  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  (NHE-3, «*Na-H exchanger*») y del cotransportador de  $\text{Na}^+\text{-Pi}$  ( $\text{NaPi2}$ , «*Na<sup>+</sup>-Pi cotransporter*») de la membrana apical de las células del túbulo proximal. En el asa de Henle se reabsorbe entre un 25-30% del sodio filtrado. Este transporte tiene lugar mayoritariamente en la rama ascendente del asa de Henle a través del cotransportador de  $\text{Na-K-2Cl}$  (NKCC2, «*Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl cotransporter*») localizado en la membrana apical y en menor medida por el intercambiador de  $\text{Na}^+\text{-H}^+$ , NHE-3. En el túbulo distal se reabsorbe cerca de un 5% del sodio filtrado. Este transporte tiene lugar a través del cotransportador de  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  (NCC, «*Na<sup>+</sup>-Cl cotransporter*») también denominado cotransportador de sodio sensible a la tiacida. Finalmente, en el túbulo colector se reabsorbe entre un 5-10% del sodio filtrado a través del canal epitelial de sodio (ENaC, «*epithelial sodium channel*») o canal de sodio sensible al amiloride localizado en la membrana apical de las células principales. Este segmento de la nefrona es clave para conseguir una regulación precisa del balance de sodio. En todos los segmentos de la nefrona, el transporte de sodio en la membrana basolateral está mediado por la  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPasa o bomba de sodio. Este transportador es el responsable de generar y mantener dentro de la célula un gradiente electroquímico de sodio negativo.

El desarrollo de los ratones deficientes en los genes que codifican para muchos de estos transportadores de sodio ha puesto de manifiesto la importancia de los mismos para el mantenimiento de la homeostasis de sodio. Además, ha ayudado a mejorar nuestros conocimientos sobre los mecanismos compensadores renales que se ponen en marcha cuando existe una disfunción de los mismos. Así por ejemplo, se ha visto que un defecto en el transporte de sodio a nivel proximal se compensa de dos maneras. Una de forma primaria mediante la retroalimentación («*feedback*») tubuloglomerular que conduce a un aumento de la reabsorción proximal de sodio y la otra secundariamente mediante un ajuste del transporte de sal en el resto de la nefrona<sup>17</sup>. Otro ejemplo es lo que ocurre a nivel del asa de Henle. En este caso, a diferencia del túbulo proximal, un defecto en el transporte de sodio conduce a una pérdida importante de sal que no se ve compensada inicialmente por una disminución del filtrado glomerular. Esto es lo que manifiestan clínicamente los pacientes con el síndrome de Bartter secundario a una mutación en el cotransportador de Na-K-2Cl del asa de Henle<sup>18</sup>. A nivel del túbulo colector y, a pesar de que este segmento del túbulo no reabsorbe grandes cantidades de sodio, un defecto en el transporte de sodio produce importantes manifestaciones derivadas de la pérdida de sal<sup>19</sup>. Parece que los mecanismos de compensación renales en esta parte final del túbulo renal son insuficientes. En estos casos, se puede conseguir un balance adecuado de sodio ajustando la ingesta de sodio<sup>20</sup>. En el otro extremo de la balance se encontrarían aquellos casos derivados de un aumento del transporte de sodio a lo largo del túbulo renal que, por lo general, se caracteriza por el desarrollo de hipertensión arterial. Esto es lo que observa por ejemplo, en el síndrome de Liddle donde existe un aumento de la actividad del canal epitelial de sodio<sup>21</sup>.

### Expresión renal de los transportadores de sodio en la cirrosis hepática experimental

A diferencia de las aquaporinas renales que han sido ampliamente estudiadas en los distintos modelos de cirrosis hepática, hasta el momento son escasos los trabajos que han utilizado el abordaje proteómico, anteriormente comentado, para estudiar el patrón de expresión de los transportadores renales de sodio en las diferentes fases de la retención hidrosalina en la cirrosis. Recientemente, se ha realizado un trabajo que utiliza este abordaje en el riñón de ratas con cirrosis hepática inducida por la inhalación crónica de CCl<sub>4</sub>. En este trabajo se confirma

que manteniendo una ingesta de sodio similar, las ratas cirróticas con ascitis presentan una disminución de la excreción renal de sodio acompañada de un aumento de la aldosterona en plasma. Desde el punto de vista molecular se observa un aumento de la cantidad del cotransportador de Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> (NCC) del túbulo distal y de la subunidad alfa del canal epitelial de sodio ( $\alpha$ -ENaC) en el riñón de las ratas cirróticas con ascitis<sup>9</sup>. Estos dos transportadores de sodio están regulados por la aldosterona y se ha demostrado que en situaciones en que la aldosterona está elevada aumenta la cantidad de estos transportadores de sodio en el riñón<sup>22,23</sup>. El aumento de la expresión renal de los transportadores de sodio distales pudiera teóricamente asociarse con un aumento de la reabsorción de sodio a este nivel. Esta hipótesis vendría avalada por el hecho de la buena respuesta que tienen los pacientes cirróticos con ascitis a la administración de diuréticos distales que bloquean, en cierta medida, estos transportadores<sup>25</sup>. En este trabajo sería muy interesante conocer que ocurre con la expresión del resto de transportadores de sodio de la nefrona y, especialmente que sucede con los transportadores de sodio cuando se administra tratamiento diurético.

En resumen, el estudio de la abundancia relativa de distintas proteínas transportadoras de sodio y agua en el riñón en situaciones de desbalance hidrosalino es una nueva forma de investigar este problema. Este tipo de enfoque nos puede ayudar a mejorar nuestros conocimientos sobre: 1) la fisiopatología del manejo renal del agua y del sodio, 2) los cambios primarios y secundarios en la cantidad de los transportadores en el riñón ante distintos estímulos y, 3) la actitud terapéutica más adecuada dependiendo de los transportadores o canales que están disfuncionantes. Finalmente, hay que señalar que el proceso de regulación proteica es complejo y que las proteínas pueden estar reguladas a diferentes niveles (fosforilación, degradación) y, no sólo por la cantidad relativa de las mismas.

### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado, en parte, con la ayuda de la Dirección General de Investigación Científica y Técnica (Plan Nacional I+D) (SAF 99/0016) y de la Fundació Marató TV3 (01-210).

### BIBLIOGRAFÍA

1. Claria J, Jiménez W: Renal dysfunction and ascites in Carbon-Tetrachloride-induced cirrhosis in rats. En: Ascites and

- renal dysfunction in liver disease. Pathogenesis Diagnosis and Treatment, edited by Arroyo V, Ginés P, Rodes J, Schrier RW, Malden, MA, Blackwell Science INC. pp. 379-396, 1999.
2. Knepper MA, Masilamani S: Targeted proteomics in the kidney using ensembles of antibodies. *Acta Physiol Scand* 173: 11-21, 2001.
  3. Asahina Y, Izumi N, Enomoto N, Sasaki S, Fushimi K, Marumo F, Sato C: Increased gene expression of water channel in cirrhotic rat kidneys. *Hepatology* 21: 169-173, 1995.
  4. Fujita N, Ishikawa SE, Sasaki S, Fujisawa G, Fushimi K, Marumo F, Saito T: Role of water channel AQP-CD in water retention in SIADH and cirrhotic rats. *Am J Physiol* 269: F926-F931, 1995.
  5. Jonassen TEN, Nielsen S, Christensen S, Petersen JS: Decreased vasopressin-mediated renal water reabsorption in rats with compensated liver cirrhosis. *Am J Physiol* 275: F216-F225, 1998.
  6. Fernández-Llama P, Turner R, DiBona G, Knepper MA: Renal Expression of aquaporins in liver cirrhosis induced by chronic bile duct ligation in rats. *J Am Soc Nephrol* 10: 1950-1957, 1999.
  7. Fernández-Llama P, Jiménez W, Bosch-Marce M, Arroyo V, Nielsen S, Knepper MA: Dysregulation of aquaporins and sodium-dependent cotransporters in the kidneys of rats with CCl<sub>4</sub>-induced cirrhosis with ascites. *Kidney Int* 58: 216-228, 2000.
  8. Jonassen TEN, Christensen S, Kwon T-H, Langhoff S, Nielsen S: Renal water handling in rats with descompensated liver cirrhosis. *Am J Physiol* 279: F1101-1109, 2000.
  9. Fernández-Llama P, Ageloff S, Ros J, Rodes J, Arroyo V, Jiménez W, Knepper MA: Upregulation of thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter (TSC/NCC) and alpha subunit of EnaC ( $\alpha$ -EnaC) in the kidneys of cirrhotic rats with ascites. *J Am Soc Nephrol* 12, 30A, 2001.
  10. Agre P, Homer W: Smith award lecture. Aquaporin water channels in kidney. *J Am Soc Nephrol* 11 (4): 764-77, 2000.
  11. Frigeri A, Gropper M, Umenishi F, Kawashima M, Brown D, Verkman AS: Localization of MIWC and GLIP water channel homologs in neuromuscular, epithelial and glandular tissues. *J Cell Sci* 108: 2993-3002, 1995.
  12. Ma TH, Yang BX, Gillespie A, Carlson EJ, Epstein CJ, Verkman AS: Severely impaired urinary concentrating ability in transgenic mice lacking aquaporin-1 water channels. *J Biol Chem* 273: 4296-4299, 1998.
  13. Knepper MA: Molecular physiology of urinary concentrating mechanism: regulation of aquaporin water channels by vasopressin. *Am J Physiol* 272: F3-F12, 1997.
  14. Terris J, Ecelbarger CA, Marples D, Knepper MA, Nielsen S: Distribution of aquaporin-4 water channel expression within rat kidney. *Am J Physiol* 269: F775-F785, 1995.
  15. Yasui M, Kwon TH, Knepper MA, Nielsen S, Agre P: Aquaporin-6: an intracellular vesicle water channel protein in renal epithelia. *Proc Natl Acad Sci* 96: 5808-5813, 1999.
  16. Berger UV, Marciani P, Peng JB, Hediger MA: The molecular basis of sodium transport. En: the kidney, edited by Brenner BM, sixth edition, WB Saunders Company, pp. 215-246, 2000.
  17. Schultheis P, Clarke LL, Meneton P, Miller ML, Soleimani M, Gawenis LR, Riddle TM, Duffy JJ, Doetschman T, Wang T, Giebisch G, Aronson PS, Lorenz JN, Shull GE: Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *Nature Genetics* 19: 282-285, 1998.
  18. Simon DB, Karet FE, Hamdan JM, DiPietro A, Sanjad SA, Lifton RP: Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutation in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nature Genet* 13: 183-188, 1996.
  19. Broks HL, Sorensen AM, Terris J, Schultheis PJ, Lorenz JN, Shull GE, Knepper MA: Profiling of renal tubule Na transporter abundances in NHE-3 and NCC null mice using targeted proteomics. *J Physiol* 530.3: 359-366, 2001.
  20. Changg SS, Grunder S, Hanukoglu A, Rosler A, Mathew PM, Hanukoglu I, Schild L, Lu Y, Shimkets RRA, Nelson, Williams C, Rossier BC, Lifton RP: Mutations in subunits of the epithelial sodium channel cause salt wasting with hyperkalaemic acidosis, pseudohypoaldosteronism type I. *Nature Genetics* 12: 248-250, 1996.
  21. Shimkets RA, Warnock DGGG, Bositis CM, Nelson-Williams C, Hansson JH, Schambelan M, Gill JR, Ulick S, Milora RV, Findling JWCMC, Rossier BC, Lifton RP: Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the  $\beta$  subunit of the epithelial sodium channel. *Cell* 79: 407-414, 1994.
  22. 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 USA* 95: 14552-14557, 1994.
  23. Masilamani S, Kim GH, Mitchell C, Wade JB, Knepper MA: Aldosterone-mediated regulation on EnaC  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  subunit protein in rat kidney. *J Clin Invest* 104: R19-R23, 1999.
  24. Pérez-Ayuso RM, Arroyo V, Planas R: Randomized comparative study of efficacy of furosemide versus spironolactone in nonazotemic cirrhosis with ascites. Relationship between the diuretic response and activity of the renin-aldosterone system. *Gastroenterology* 84: 961-968, 1983.