

## Aquaporinas y metabolismo renal del agua. Papel en la fisiopatología de la retención acuosa en la cirrosis

P. Fernández-Llama

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

El movimiento de agua a través de la bicapa lipídica de las membranas celulares se produce de forma pasiva como respuesta al gradiente osmótico generado por el transporte activo de iones o solutos neutros. La observación de que la permeabilidad al agua de algunos tejidos era excesivamente alta para ser explicada sólo por la simple difusión a través de la membrana lipídica, fue fundamental para el desarrollo del concepto de un canal específico para el transporte de agua<sup>1</sup>. Actualmente se ha demostrado la existencia de una familia de canales proteicos específicos de agua que facilitan su movimiento transcelular, denominados 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. Hasta el momento se han identificado en los tejidos de mamíferos 10 aquaporinas, que se han denominado, de manera consecutiva, aquaporina-0 a aquaporina-9. Recientemente esta familia se ha subdividido, a su vez, en aquaporinas y aquagliceroporinas basándose en la homología de las secuencias, la comparación filogenética y las propiedades de permeabilidad. Las aquaporinas 0, 1, 2, 4, 5 y 8 son canales selectivos de agua y las aquaporinas 3, 7 y 9 son denominadas aquagliceroporinas porque son canales menos restrictivos que además de agua dejan pasar glicerol y otros solutos pequeños<sup>2</sup>.

### *Estructura molecular de las aquaporinas*

Están constituidas por una cadena polipeptídica sencilla con un peso molecular aproximado de 28 kDa. La cadena atraviesa la membrana seis veces, formando 5 asas y quedando los extremos amino y carboxilo en el interior de la célula. De las 5 asas, tres son extracelulares (denominadas A, C, y E) y dos son intracelulares (B y D) (fig. 1)<sup>1</sup>.

Correspondencia: Dra. P. Fernández-Llama.  
Laboratorio de Hormonología, escalera 9, piso 5.º. Hospital Clínic.  
Villarroel, 170. 08036 Barcelona.  
Correo electrónico: pfernand@clinic.ub.es

Recibido el 5-10-00; aceptado para su publicación el 11-10-00.

(*Gastroenterol Hepatol* 2001; 24:205-209)

Las asas B y E contienen la secuencia NPA (asparagina-prolina-alanina), que es característica de las proteínas intrínsecas de membrana (MIP, *major intrinsic protein*), de las cuales las aquaporinas son miembros. Las aquagliceroporinas contienen en el asa C la secuencia GLYY (glicina-leucina-tirosina-tirosina) y un residuo de aspartato en la segunda secuencia NPA<sup>3</sup>. Por otro lado, la cadena polipeptídica presenta secuencias susceptibles de glucosilación. 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>4</sup>. A pesar de la gran homología en la estructura primaria de las aquaporinas, no todas tienen la misma estructura tridimensional. Así, recientemente se ha observado que la aquaporina-4 presenta una estructura ortogonal<sup>5</sup>.

### *Patrón de expresión y papel fisiológico de las aquaporinas renales*

La aquaporina-1 abunda en la membrana apical y basolateral de los túbulos proximales renales, en la rama descendente del asa de Henle y en los vasos rectos. También se ha encontrado en menor cuantía en otros tejidos: membrana plasmática de los eritrocitos, distintos epitelios (plexos coroideo del cerebro, ciliar no pigmentado y lentes oculares, colangiocitos intrahepáticos, vesícula biliar, glándulas sudoríparas ecrinas) y en ciertos endotelios (corneal, capilares peribronquiales)<sup>2</sup>. El estudio de los ratones que tienen anulado el gen de la aquaporina-1 (*aquaporin-1-knockout mice*) ha puesto de manifiesto el importante papel de este canal de agua en el mantenimiento del balance hídrico. De esta forma, se ha demostrado mediante estudios de micropunción que estos ratones sin aquaporina-1 presentan una disminución muy importante de la permeabilidad transepitelial osmótica al agua del túbulo proximal<sup>6</sup>. A pesar de la disminución de la permeabilidad, se ha observado que la cantidad de fluido tubular que llega a la parte final del túbulo proximal o al túbulo distal es similar a la que se observa en los ratones control. Este proceso de compensación en la cantidad de fluido tubular se debe a una disminución del filtrado glomerular debido a una activación del *feedback* glomerulotubular. En con-

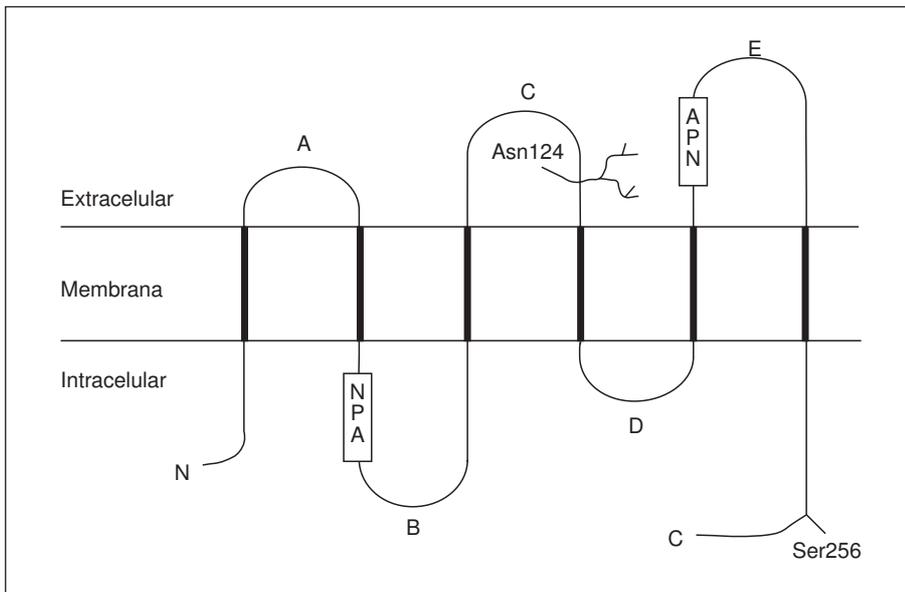
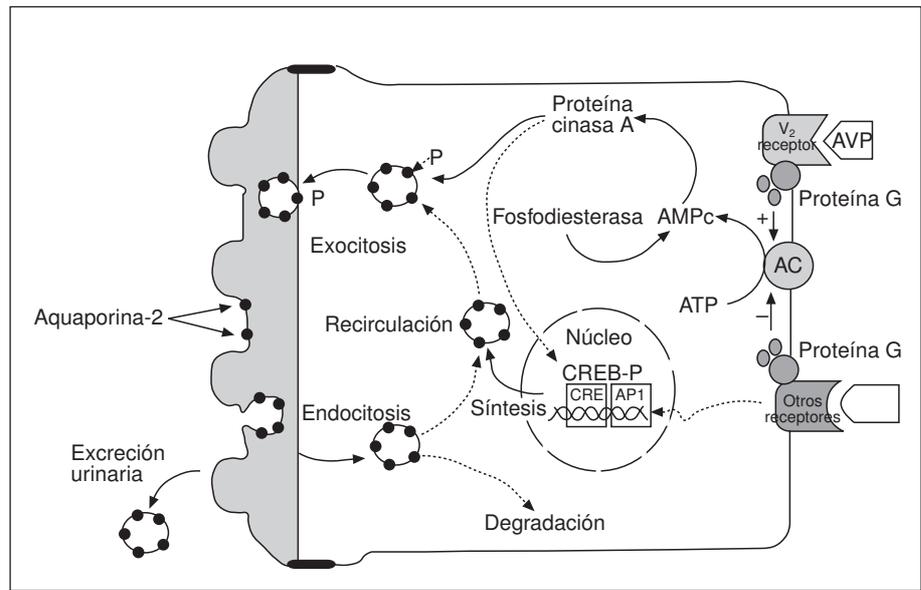


Fig. 1. Estructura general de las aquaporinas. Los canales de agua están formados por una cadena polipeptídica sencilla con un peso molecular aproximado de 28 kDa. La cadena atraviesa la membrana seis veces, formando 5 asas y quedando los extremos N y C en el interior de la célula. De las 5 asas, tres son extracelulares (denominadas A, C, y E) y dos son intracelulares (B y D). Las asas B y E contienen la secuencia NPA (asparragina-prolina-alanina), que es característica de las proteínas intrínsecas de membrana (MIP, major intrinsic protein).

diciones normales, los ratones deficientes en aquaporina-1 están asintomáticos; sin embargo, no son capaces de concentrar la orina cuando se les somete a un test de deshidratación<sup>7</sup>. Este hallazgo confirma que la aquaporina-1 constituye la principal zona de paso para la reabsorción de agua en el túbulo proximal<sup>6</sup>. La aquaporina-2 se localiza en la membrana apical y en vesículas intracelulares de las células principales de los túbulos colectores. Este canal de agua está regulado por la vasopresina de dos maneras: *a*) 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 *b*) una regulación a largo plazo asociada con un aumento en la cantidad total de aquaporina-2 en la célula<sup>8</sup>. La vasopresina se une al receptor V2 de la membrana basal de las células principales de los túbulos colectores (fig. 2). Éste es un receptor proteico unido a la proteína G (*GTP-binding protein*). La unión con el receptor activa la adenilciclasa, que acelera la producción de adenosinmonofosfato cíclico (AMPC) a partir de adenosintrifosfato<sup>9</sup>. Posteriormente, el AMPC se une a la subunidad reguladora de la proteína cinasa A (PKA) produciendo la disociación de la subunidad reguladora de la subunidad catalítica. La subunidad catalítica de la PKA se activa al disociarse y fosforila diversas proteínas, entre ellas la aquaporina-2. La fosforilación de la aquaporina-2 produce una translocación de las vesículas intracitoplasmáticas, que contienen la aquaporina-2 fosforilada, a la membrana plasmática apical. El resultado final es un aumento de la permeabilidad al agua de los túbulos colectores<sup>10</sup>. Posteriormente, al disminuir las concentraciones de vasopresina se produce un mecanismo de endocitosis de los canales de agua de la membrana apical que conduce a una disminución de la permeabilidad del epitelio tubular. Por otro lado, la regulación de la transcripción del gen de la aquaporina-2 se realiza a través de un mecanismo dependiente de la AMPC. El extremo 5' del gen de la aquaporina-2 presenta una secuencia de respuesta al

AMPC denominada *cAMP responsive element* (CRE). Parece que la unión de una proteína previamente fosforilada a esta zona del gen (*CRE-binding protein*) favorece la transcripción del mismo y conduce a un aumento en su ARNm y finalmente de la proteína (fig. 2)<sup>9</sup>. Recientemente se ha observado en ratones transgénicos (DI +/+) que, de manera constitutiva, presentan un incremento en la actividad AMPC fosfodiesterasa y, por tanto, bajas concentraciones celulares de AMPC, una poliuria intensa y una marcada disminución en la expresión renal de aquaporina-2<sup>11</sup>. Se ha observado también que el contenido celular de esta aquaporina-2 aumenta en respuesta a la restricción hídrica en ratas normales o en respuesta a la infusión de vasopresina en las ratas Brattleboro (que carecen de vasopresina endógena circulante)<sup>10</sup>. La aquaporina-3 se expresa en la membrana basolateral de las células principales de los túbulos colectores<sup>12</sup>. A diferencia de los otros miembros de esta familia, la aquaporina-3 posee permeabilidad tanto al agua como el glicerol<sup>2</sup>. Además de su localización renal, la aquaporina-3 se ha encontrado expresada en el tracto gastrointestinal, en el pulmón, en el ojo y en el sistema nervioso<sup>2</sup>. La aquaporina-4 se localiza en la membrana basolateral de las células principales de los túbulos colectores<sup>13</sup>. Inicialmente se creyó que este canal de agua no desempeñaba un papel importante en el transporte transepitelial de agua en el túbulo colector. Sin embargo, se ha observado que los ratones con una anulación en el gen de la aquaporina-4 y que, por tanto, carecen de la proteína aquaporina-4, presentan un defecto en la capacidad de concentrar la orina cuando se les somete a una prueba de restricción hídrica<sup>14</sup>. La aquaporina-4 también se expresa en las células gliales y ependimales del cerebro y en menor cuantía en la retina, el epitelio de las vías aéreas, la membrana basolateral de las células parietales y el epitelio superficial del colon y músculo esquelético<sup>2</sup>. La aquaporina-6, a diferencia de las otras aquaporinas, se localiza exclusivamente en membranas intracelulares de

Fig. 2. Representación esquemática de los principales acontecimientos 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 y, a través de la proteína G tipo estimuladora, se activa la adenilciclasa (AC) y aumenta la cantidad de AMPc citosólico. Este proceso de activación está contrarrestado por la acción de otros receptores unidos a una proteína G tipo inhibidora y por la acción de la fosfodiesterasa. El aumento del AMPc conduce a una activación de la proteína cinasa A que fosforila la aquaporina-2. Las vesículas que contienen aquaporina-2 fosforilada se fusionan con la membrana plasmática en un proceso de exocitosis. La aquaporina-2 de la superficie de la membrana es después internalizada. Por otro lado, el AMPc también estimula la transcripción de la aquaporina-2.



podocitos glomerulares, células del túbulo proximal y células intercaladas del túbulo colector<sup>15</sup>. Esta distribución intracelular en diversos tipos de células del epitelio renal plantea su posible papel en otros procesos celulares diferentes del transporte transcelular de fluidos como, por ejemplo, en la regulación del equilibrio ácido-base<sup>15</sup>, lo que, a su vez, se encuentra apoyado por el hecho de la baja permeabilidad al agua de este canal de agua<sup>2</sup>.

### EXPRESIÓN RENAL DE LAS AQUAPORINAS EN DISTINTOS MODELOS DE CIRROSIS HEPÁTICA EXPERIMENTAL

Los estudios fisiológicos realizados en ratones modificados genéticamente y deficientes en distintas aquaporinas<sup>6,7,14</sup>, junto con los estudios en pacientes con mutaciones en el canal de agua aquaporina-2<sup>16</sup>, han puesto de manifiesto que la mayor parte del agua que se transporta a través del epitelio del túbulo renal está mediada por las aquaporinas. Actualmente se cree que la cantidad de canales de agua en la membrana plasmática de las células del epitelio renal es el principal determinante de la permeabilidad al agua del epitelio. El gran progreso de la biología molecular ha facilitado la clonación del ADN complementario de los principales transportadores renales de agua, obteniéndose así la estructura primaria de los mismos. Esto ha facilitado el análisis de la expresión de los transportadores en diferentes situaciones fisiológicas y fisiopatológicas. La estrategia que se ha seguido ha sido el desarrollo de anticuerpos policlonales contra los transportadores a partir de la secuencia conocida de la proteína y el uso de estos anticuerpos en técnicas de *immunoblot* e inmunohistoquímica para estudiar el patrón de adaptación de los transportadores a diferentes situaciones<sup>12,13</sup>.

La cirrosis hepática se asocia con un trastorno en la regulación del balance de agua. En la fase inicial del estado de

descompensación, la retención de agua por el riñón es isosmótica y parece que es secundaria a una estimulación excesiva de la reabsorción tubular de sal. Esta retención isosmótica de agua se cree que está asociada, al menos en parte, con un aumento de la reabsorción de fluido en el túbulo proximal, como parecen indicar los resultados obtenidos mediante estudios de micropunción en modelos animales<sup>17,18</sup> y en individuos cirróticos mediante la medición del aclaramiento de litio<sup>19,20</sup>. En una fase más evolucionada de la cirrosis hepática puede producirse, junto con la retención de sal, un exceso en la retención de agua libre, que conduciría a la dilución del fluido extracelular y la aparición de hponatremia. Presumiblemente, esta excesiva retención de agua libre implica una modulación del transporte renal de agua más allá del túbulo proximal. En un principio los estudios realizados en modelos de cirrosis hepática experimental se han centrado en el papel de la aquaporina-2 en el proceso de retención de agua que se asocia con esta enfermedad<sup>21-25</sup>. Algunos de estos trabajos han observado que la cirrosis hepática podría estar asociada con un aumento en la cantidad de aquaporina-2 en el riñón<sup>21,22</sup>, mientras que otros han observado un resultado muy diferente, es decir, una disminución en la cantidad de aquaporina-2 en el riñón<sup>23-26</sup>. Existen diversos modelos de animales de experimentación que desarrollan cirrosis hepática y que han sido ampliamente utilizados para el estudio de esta enfermedad. La forma de inducción de la cirrosis hepática varía de unos a otros, así como las características fisiopatológicas que desarrollan cada uno de ellos<sup>27</sup>. A continuación se comentan los resultados obtenidos en modelos de cirrosis hepática inducidos por la administración de CCl<sub>4</sub> y en el modelo de cirrosis hepática inducida por la ligadura del conducto biliar.

#### Modelos experimentales de cirrosis hepática inducidos por la administración de CCl<sub>4</sub> en ratas

En los primeros trabajos realizados con la administración de CCl<sub>4</sub> para inducir la cirrosis hepática se observó un

aumento moderado del ARNm<sup>21,22</sup> o de la proteína de la aquaporina-2 en el riñón de ratas cirróticas<sup>21</sup>. Así, Asahina et al<sup>21</sup> constataron un aumento tanto del ARNm como de la proteína de la aquaporina-2 después de la administración intraperitoneal repetida de CCl<sub>4</sub> y aceite de oliva. En este trabajo las ratas control recibieron únicamente suero salino intraperitoneal. Por otro lado, Fujita et al<sup>22</sup> observaron también un aumento del ARNm de la aquaporina-2 después de la administración subcutánea de CCl<sub>4</sub> y aceite de oliva. Estos autores observaron que el aumento de la aquaporina-2 quedaba bloqueado cuando a las ratas cirróticas se les administraba un antagonista del receptor de la vasopresina (OPC-31260). A diferencia de estos estudios, los trabajos publicados posteriormente no han observado un aumento en la expresión renal de aquaporina-2<sup>25,26</sup>. Un estudio que también utiliza el CCl<sub>4</sub> para inducir la enfermedad demuestra que no hay cambio en la cantidad de la proteína de la aquaporina-2<sup>25</sup> en el riñón de ratas con cirrosis hepática inducida por la inhalación crónica de CCl<sub>4</sub>. En estas ratas cirróticas se evidenciaba una retención hidrosalina manifestada en forma de ascitis además de un retraso en la excreción de agua después de someterlas a un test de sobrecarga de agua. En este trabajo se observó que, aunque la cantidad total de aquaporina-2 no estaba aumentada en el riñón de las ratas cirróticas, existía una redistribución de la aquaporina-2 de la fracción de membranas de baja densidad a la fracción de membranas de alta densidad, medida por una técnica de centrifugación diferencial. Esta redistribución intracelular de la aquaporina-2 ya se ha observado en otros estudios y se ha demostrado que indica la existencia de un tráfico de la aquaporina-2 de las vesículas intracelulares (fracción de membrana de baja densidad) a la membrana plasmática apical (fracción de membrana de alta densidad)<sup>28</sup>. Esta estimulación del tráfico de aquaporina-2 se cree que puede ser debida a un aumento de las concentraciones circulantes de vasopresina<sup>10</sup>. Recientemente, en un trabajo de Jonassen et al<sup>26</sup> también se observó, en ratas con cirrosis hepática inducida por CCl<sub>4</sub> que desarrollaron hiponatremia y ascitis, una falta de aumento de la expresión renal de aquaporina-2.

Hoy día se sabe que, además de la aquaporina-2 o canal de agua regulado por la vasopresina, hay otros canales de agua que desempeñan un importante papel en el transporte de agua en el epitelio renal, como la aquaporina-1, el canal de agua del túbulo proximal, y la aquaporina-3, el canal de agua de la membrana basal de las células de los túbulos colectores. Del estudio de la expresión de estos canales de agua en este modelo de cirrosis inducida por la inhalación crónica CCl<sub>4</sub> se han obtenido resultados muy interesantes. Así, en este modelo de cirrosis se ha observado un aumento de la cantidad de aquaporina-3 en el riñón de las ratas cirróticas<sup>25</sup>. La aquaporina-3 es un canal de agua que también está regulado por la vasopresina<sup>12</sup>. Se ha especulado que este aumento en la aquaporina-3 en el riñón puede, en parte, favorecer el trastorno en la excreción de agua que se observa en este modelo de cirrosis hepática. Se ha descrito en ratas sometidas a la administración simultánea de vasopresina y agua un «fe-

nómeno de escape» en la acción anti-diurética de la vasopresina. Este término se utiliza para describir la situación donde la acción retenedora de agua de la vasopresina está afectada. En un inicio se observa en estas ratas un aumento en la expresión renal de aquaporina-2 seguida posteriormente, y coincidiendo con el aumento de la diuresis, de una disminución de la expresión renal de este canal de agua, a pesar de mantener unas concentraciones circulantes elevadas de vasopresina<sup>29</sup>. Este proceso, en el que la cantidad de la proteína de la aquaporina-2 escapa de la acción reguladora de la vasopresina, se acompaña de un aumento de la aquaporina-3. Se ha planteado, por tanto, que en este modelo de ratas cirróticas que presentan un aumento de las concentraciones de vasopresina en plasma<sup>29</sup> y una marcada expansión del volumen de fluido extracelular existe una activación del fenómeno de escape de la vasopresina que podría explicar la falta de aumento de la cantidad de la proteína aquaporina-2 y el aumento de la aquaporina-3 en el riñón de ratas con cirrosis, ascitis y un defecto en el manejo renal del agua.

En este modelo de cirrosis hepática inducido por la inhalación crónica CCl<sub>4</sub> se ha observado también la presencia de un aumento en la expresión renal de aquaporina-1 en las ratas cirróticas con un defecto en la excreción renal de agua<sup>25</sup>. Se ha interpretado que el aumento en la expresión de aquaporina-1 en el túbulo proximal optimizaría la absorción de fluidos en esta localización, ya que no sería necesario generar un gradiente osmótico muy elevado para la absorción de agua. Además, se cree que podría minimizar la fuga retrógrada de ClNa por los espacios paracelulares, ya que este epitelio tiene una permeabilidad paracelular de ClNa elevada. Estos resultados apoyarían la hipótesis de la existencia de un aumento de la absorción proximal de fluidos en las ratas cirróticas, como ya parecen apuntar los estudios de micropunción en ratas cirróticas y los estudios de aclaramiento de litio en pacientes<sup>17-20</sup>.

#### *Modelo experimental de cirrosis hepática inducida por la ligadura del conducto biliar en ratas*

Los 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>23,24</sup>. Jonassen et al<sup>23</sup> observaron en ratas cirróticas sin ascitis y concentraciones no elevadas de vasopresina circulante una disminución de la expresión de aquaporina-2 en la corteza y la médula renal externa. Por otro lado, en el estudio Fernández-Llama et al<sup>24</sup> en ratas cirróticas con ascitis e hiponatremia tampoco se demostró un aumento en la expresión renal de aquaporina-2<sup>24</sup>. De hecho, se apreció una disminución de la expresión de aquaporina-2 en la corteza, la médula externa y la médula interna de las ratas cirróticas. Además, en estas ratas cirróticas, y a diferencia del modelo de cirrosis inducido por la inhalación crónica de CCl<sub>4</sub>, no se observaron evidencias que sugirieran la existencia de una estimulación del tráfico de la aquaporina-2 dentro de las células principales del túbulo colector. Estos dos modelos experimentales también se diferencian en otros resultados. Así, la cantidad de aquapori-

na-3 se encontró disminuida en el modelo de la ligadura del conducto biliar y, sin embargo, estaba aumentada en el modelo de inhalación de  $\text{CCl}_4$ . Además, la cantidad de aquaporina-1 no se encontraba modificada en el modelo de la ligadura del conducto biliar y se halló aumentada en el modelo de inhalación de  $\text{CCl}_4$ . La causa de las diferencias en los resultados entre los distintos modelos de cirrosis no está clara, pero podría ser debida a diferencias en la ingestión de sodio y agua en la dieta o a otras condiciones experimentales. Por otro lado, es importante apuntar que, aunque los modelos experimentales ayudan a comprender la fisiopatología de distintos procesos patológicos, no necesariamente representan todas las características de las enfermedades humanas que mimetizan.

En resumen, estos resultados demuestran que en el modelo de cirrosis inducido por la ligadura del conducto biliar y en situación de expansión del volumen del espacio extracelular (manifestado por la presencia de ascitis e hiponatremia), la excesiva retención de agua se produce en ausencia de un aumento de la expresión renal de aquaporina-2. En el caso del modelo experimental de cirrosis inducida por el  $\text{CCl}_4$ , aunque los primeros trabajos observaron un aumento de la expresión renal de aquaporina-2 en presencia de hiponatremia estos resultados no se han podido confirmar en los estudios realizados posteriormente. Sin embargo, en ambos modelos experimentales de cirrosis hepática se ha observado la presencia de una disregulación en otros canales de agua del riñón que pueden desempeñar un papel importante en el trastorno del balance de agua que se observa en la cirrosis hepática.

#### AGRADECIMIENTO

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). Patricia Fernández-Llama tiene un Contrato de Incorporación del Ministerio de Educación y Cultura-SEUID (SAF 99/0016).

#### BIBLIOGRAFÍA

- Agre P, Sasaki S, Chrispeels MJ. Aquaporins: a family of water channels proteins. *Am J Physiol* 1993; 265: F461.
- Borgnia M, Nielsen S, Engel A, Agre P. Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 425-458.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, Clustal W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 4673-4680.
- Cheng AC, Van Hoek AN, Yeager M, Verkman AS, Mitra AK. Three dimensional organization of a human water channel. *Nature* 1997; 387: 627-630.
- 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* 1995; 108: 2993-3002.
- Schmermann J, Chou CL, Ma T, Traynor T, Knepper MA, Verkman AS. Defective proximal tubular fluid reabsorption in transgenic aquaporin-1 null mice. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 9660-9674.
- 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* 1998; 273: 4296-4299.
- Knepper MA. Molecular physiology of urinary concentrating mechanism: regulation of aquaporin water channels by vasopressin. *Am J Physiol* 1997; 272: F3-F12.
- Matsumura Y, Uchida S, Rai T, Sasaki S, Marumo F. Transcriptional regulation of aquaporin-2 water channel gene by cAMP. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 861-867.
- 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* 1995; 92: 1013-1017.
- Frokiaer J, Marples D, Valtin H, Morris JF, Knepper MA, Nielsen S. Low aquaporin-2 expression in polyuric DI +/- severe mice with constitutively high cAMP-phosphodiesterase activity. *Am J Physiol* 1999; 276: F179-F190.
- Ecelbarger CA, Terris J, Frindt G, Echevarria M, Marples D, Nielsen S et al. Aquaporin-3 water channel localization and regulation in rat kidney. *Am J Physiol* 1995; 269: F663-F667.
- Terris J, Ecelbarger CA, Marples D, Knepper MA, Nielsen S. Distribution of aquaporin-4 water channel expression within rat kidney. *Am J Physiol* 1995; 269: F775-F785.
- Chou CL, Ma T, Yang B, Knepper MA, Verkman AS. Four fold reduction in water permeability in inner medullary collecting duct of aquaporin-4 knockout mice. *Am J Physiol* 1998; 274: C549-C554.
- 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* 1999; 96: 5808-5813.
- Deen PMT, Knoers NVAM. Vasopressin type 2 receptor and aquaporin-2 channel mutants in nephrogenic diabetes insipidus. *Am J Med Sci* 1998; 316: 300-309.
- López-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.
- Diez J, Simon MA, Antón F, Indart FJ, Prieto J. Tubular sodium handling in cirrhotic patients with ascites is analysed by renal lithium clearance method. *Eur J Clin Invest* 1990; 20: 266-271.
- Abraham WT, Lauwaars ME, Kim JK, Pena RL, Schrier RW. Reversal of atrial natriuretic peptide resistance by increasing distal tubular sodium delivery in patients with decompensated cirrhosis. *Hepatology* 1995; 22: 737-743.
- 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: 169-173.
- Fujita N, Ishikawa SE, Sasaki S, Fujisawa G, Fushimi K, Marumo F et al. Role of water channel AQP-CD in water retention in SIADH and cirrhotic rats. *Am J Physiol* 1995; 269: F926-F931.
- Jonassen TEN, Nielsen S, Christensen S, Petersen JS. Decreased vasopressin-mediated renal water reabsorption in rats with compensated liver cirrhosis. *Am J Physiol* 1998; 275: F216-F225.
- Fernández-Llama P, Turner R, Dibona G, Knepper M. Renal expression of aquaporins in liver cirrhosis induced by chronic bile duct ligation in rats. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 1950-1957.
- Fernández-Llama P, Jiménez W, Bosch-Marce M, Arroyo V, Nielsen S, Knepper M. Dysregulation of aquaporins and sodium-dependent cotransporters in the kidneys of rats with  $\text{CCl}_4$ -induced cirrhosis with ascites. *Kidney Int* 2000; 58: 216-228.
- Jonassen TEN, Christensen S, Kwon T-H, Langhoff S, Nielsen S. Renal water handling in rats with decompensated liver cirrhosis. *Am J Physiol* 2000; 279: F1101-F1109.
- Jiménez W, Claria J, Arroyo V. Experimental cirrhosis and pathogenesis of ascites formation in chronic liver disease. En: Holstege A, Schölmerich, Hahn EG, editores. *Portal hypertension*. Londres: Kluwer Academic Publishers, 1995; 15-32.
- Marples D, Knepper MA, Christensen EI, Nielsen S. Redistribution of aquaporin-2 water channels induced by vasopressin in rat kidney inner medullary collecting duct. *Am J Physiol* 1995; 269: C655-C664.
- Bosch-Marce M, Jiménez W, Angeli P, Leivas A, Claria J, Graziotto A et al. Aquaretic effect of the K-opioid agonist, RU51599 in cirrhotic rats with ascites and water retention. *Gastroenterology* 1995; 109: 217-223.