



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

“EXPRESIÓN DE TRASPORTADORES DE SODIO EN EXOSOMAS URINARIOS
DE PACIENTES CIRRÓTICOS SIN ASCITIS”

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LA ESPECIALIDAD DE MEDICINA INTERNA

PRESENTA

DR. PABLO ENRIQUE GALINDO VALLEJO

TUTORES DE TESIS

DR. GERARDO GAMBA AYALA

DR. EDUARDO CARRILLO MARAVILLA

CDMX

MÉXICO

JULIO 2016





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

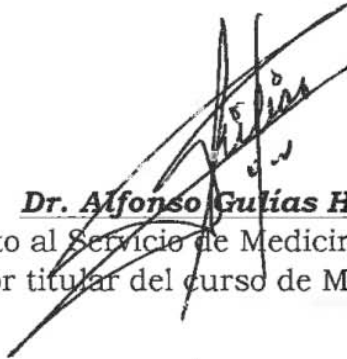
“EXPRESIÓN DE TRANSPORTADORES DE SODIO EN EXOSOMAS URINARIOS
DE PACIENTES CIRRÓTICOS SIN ASCITIS”



Dr. Sergio Ponce de León Rosales
Director de Enseñanza del INCMNSZ.



INCMNSZ
INSTITUTO NACIONAL
DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"DR. SALVADOR ZUBIRÁN"
DIRECCIÓN DE ENSEÑANZA
México, D.F.



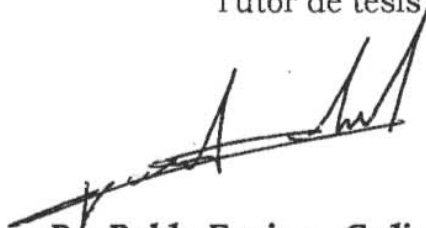
Dr. Alfonso Gullías Herrero
Profesor Adscrito al Servicio de Medicina interna del INCMNSZ
Profesor titular del curso de Medicina interna



Dr. Gerardo Gamba Ayala
Director de investigación del INCMNSZ
Tutor de tesis



Dr. Eduardo Carrillo Maravilla
Profesor Adscrito al Servicio de Medicina Interna del INCMNSZ
Tutor de tesis



Dr. Pablo Enrique Galindo Vallejo
Residente de cuarto año de Medicina Interna del INCMNSZ

ÍNDICE

1.	Resumen.....	4
2.	Marco teórico.....	5
3.	Planteamiento del problema.....	7
4.	Hipótesis.....	7
5.	Justificación.....	7
6.	Objetivos.....	8
7.	Pacientes y métodos.....	8
8.	Resultados.....	10
9.	Discusión.....	14
10.	Conclusiones.....	15
11.	Referencias.....	16

RESUMEN

Introducción: Una de las principales complicaciones de la cirrosis es la formación de ascitis [1]. La retención de sodio se considera la alteración renal más importante en los pacientes cirróticos [2]. Se ha demostrado que la retención renal de sodio se presenta en etapas tempranas, previo a la formación de ascitis. Las porciones del túbulo renal más estudiadas hasta el momento en relación a la retención de sodio son: la porción distal dependiente de aldosterona (ENaC y NCC), la porción proximal dependiente de angiotensina II y de manera más reciente la porción distal dependiente del asa de Henle (NKCC2) [4].

Objetivo: Determinar el principal mecanismo renal de retención de sodio en pacientes cirróticos sin ascitis.

Material y métodos: Estudio prospectivo, transversal, observacional. Se reclutó a 5 pacientes cirróticos sin ascitis o edema y 5 sujetos sanos pareados por edad y sexo. Todos los casos realizaron una dieta normocalórica y normosódica durante 7 días. Al final de la semana se tomó una muestra matutina de orina y suero a todos los casos y controles de la cual se obtuvo exosomas urinarios, osmolaridad urinaria, creatinina urinaria, electrolitos urinarios, osmolaridad sérica, creatinina sérica y electrolitos séricos.

Resultados: Fueron incluidos 5 pacientes con cirrosis y 5 sujetos sanos. La mediana de edad fue de 54(43-60) y 56 (41-58) para cirróticos y controles respectivamente. De cada grupo se reclutaron 2 mujeres y 3 hombres. La cuenta de plaquetas fue de 255 (57.85) y 67.2 (26.9) para el grupo control y cirrosis respectivamente con diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en creatinina, sodio, potasio, calcio y cloro sérico y urinario. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en FENa, GTTK, filtración glomerular y osmolaridad urinaria. El NCC fosforilado presentó un cambio de 393% con respecto a los controles, sin diferencia estadísticamente significativa ($p=0.25$). El NKCC2 presentó un cambio del 388% sin diferencias estadísticamente significativa ($p= 0.5$). A pesar de no documentar diferencia significativa entre los dos grupos con respecto a NCC Y NKCC2, existe una tendencia lógica hacia la alta en el grupo de los cirróticos.

Conclusiones: No existe diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos con respecto a NCC Y NKCC2. Existe una tendencia franca y lógica hacia la alta de NCC y NKCC2 en pacientes cirróticos con respecto a los controles. No se demostró participación significativa de la hormona antidiurética. No se demostró participación significativa del sistema renina angiotensina aldosterona. Se requiere continuar con el estudio para aumentar la muestra y demostrar diferencias significativas

MARCO TEÓRICO

Antecedentes:

Mecanismos de retención de sodio en cirrosis

La cirrosis hepática es una condición crónica caracterizada por la sustitución de tejido hepático funcional por tejido fibroso; ésta es el resultado final de muchas enfermedades hepáticas. Una de sus principales complicaciones es la formación de ascitis [1]. La fisiopatología detrás de este fenómeno ha sido tema de amplia investigación y existen diferentes teorías propuestas para explicarlo. Las teorías propuestas más discutidas son la del “underfill”, “overfill” y la de vasodilatación periférica; siendo esta última la más aceptada hasta el momento [2,3]. Esta teoría toma como fenómeno inicial la hipertensión portal sinusoidal, la cual a su vez causa vasodilatación periférica, disminución de las resistencias periféricas y en etapas previas a la formación de ascitis activación de mecanismos compensadores basados en retención renal de sodio y agua. Estos mecanismos a su vez causan un estado hipervolémico con aumento del gasto cardiaco y en etapas avanzadas formación de ascitis y edema [2, 3].

La retención de sodio se considera la alteración renal más importante en los pacientes cirróticos [2]. Se ha demostrado en modelos animales y humanos que la retención renal de sodio se presenta en etapas tempranas, previo a la formación de ascitis. Además se ha demostrado que la retención renal de sodio es en el contexto de una filtración glomerular conservada lo que indica que las alteraciones de manejo de sodio en pacientes cirróticos predominan en los túbulos renales [4, 5,6].

Es motivo de estudio y controversia la porción y los mecanismos que llevan a la retención de sodio en el túbulo renal en pacientes cirróticos. Las porciones más estudiadas hasta el momento son la porción distal dependiente de aldosterona (ENaC y NCC), la porción proximal dependiente de angiotensina II y de manera más reciente la porción distal dependiente del asa de Henle (NKCC2) [4].

La porción distal dependiente de aldosterona (ENaC y NCC) se consideró el principal mecanismo de retención de sodio en cirróticos sin ascitis durante muchos años, sin embargo, recientemente ha sido tema de controversia. La hipótesis de que este mecanismo tiene un papel primario está basado en estudios con ratas cirróticas CCL4 y humanos cirróticos sin ascitis. En estos estudios demostraron que la retención urinaria de sodio tiene una relación directa con la secreción urinaria de aldosterona [7]. Por otro lado en modelos humanos y murinos de cirrosis sin ascitis se demostró que al administrar un antagonista de aldosterona (espironolactona) se previene de manera importante la retención de sodio y la formación de ascitis [7, 8, 9]. La principal crítica a este mecanismo es que es altamente influenciado por la posición corporal. Es decir que durante la posición erecta existe retención renal de sodio y aumento de la concentración de aldosterona en suero [10]. Mientras que lo contrario sucede en la posición supina, en donde existe aumento de la natriuresis acompañada de disminución de la concentración de aldosterona en suero [11]. Esto explica porque pacientes cirróticos sin ascitis en posición supina tienen niveles de aldosterona en suero normales o incluso bajos [11]. Por otro lado se ha visto que la retención de sodio durante la

posición erecta está en relación con el SRAA, pero en particular con la actividad intra renal de la angiotensina II. Esto se demostró en cirróticos sin ascitis en posición erecta que recibieron dosis bajas de losartán. En estos pacientes se documentó aumento de la natriuresis y por lo tanto disminución de la retención renal de sodio. En estos experimentos no se demostró activación del SRAA sistémico, por lo que la respuesta a losartán se atribuyó al efecto de la actividad intra renal de la angiotensina II [12,13]. Esta evidencia ha dejado fuera a la porción distal dependiente de aldosterona como el principal mecanismo de retención de sodio en cirróticos sin ascitis. Mientras que la porción proximal dependiente de angiotensina II explica de manera más convincente el efecto de la posición y retención de sodio en pacientes cirróticos sin ascitis [4].

Se ha demostrado que existe un papel importante del asa de Henle en la retención de sodio en cirrosis sin ascitis, siendo la expresión de NKCC2 el factor más importante [4]. En un estudio con ratas CCL4 sin ascitis se documentó un aumento de la expresión de NKCC2 [14]. En otro modelo murino de cirrosis con ligadura de la vía biliar se demostró hipertrofia importante de la porción ascendente del asa de Henle [15]. También se demostró que la administración de furosemide a ratas cirróticas (CCL4) aumenta de manera significativa la natriuresis con respecto a los controles [16]. Por otro lado y de manera más reciente se ha estudiado el papel que tiene el sensor de calcio (CaRs) presente en el asa de Henle. Esto gracias a estudios que documentaron que una infusión de calcio en pacientes cirróticos sin ascitis disminuye la retención de sodio, al inhibir la expresión de NKCC2 a través de la activación del sensor de calcio en el asa de Henle [17]. En otro estudio con ratas cirróticas (CCL4), se documentó una disminución de expresión del CaRs y aumento del NKCC2, mientras que al administrar un calciomimético (l-arginina) a estas ratas se normalizó la capacidad de excreción de sodio [18]. Finalmente en un estudio más reciente con ratas cirróticas sin ascitis se documentó menor expresión de NKCC2 y más expresión de CaRs al administrar PTH subcutánea [19]. Esto ha llevado a la hipótesis de que el asa de Henle y en particular la expresión de NKCC2 en relación a la expresión del CaRs tiene un papel fundamental en el mecanismo de retención renal en pacientes cirróticos sin ascitis [4].

Exosomas urinarios:

En años recientes se ha reconocido que la orina es más compleja de lo que se reconocía previamente. Esto se demostró por primera vez, a través de estudios de proteómica. Estos estudios documentaron que existen cientos de proteínas en la orina, incluyendo proteínas de membrana tubular no identificadas en la orina previamente. [20,21]. Posteriormente se demostró que en el sobrenadante de muestras de orina centrifugadas de manera convencional permanecen formas sólidas, que pueden ser obtenidas a través de ultra centrifugación [22]. Uno de los componentes más importantes identificados en estas formas sólidas son los "exosomas". Los exosomas son vesículas de membrana celular (40-80 nm) producidas por endocitosis, las cuales se fusionan con cuerpos multivesiculares intracelulares, que a su vez se fusionan a la membrana celular para expulsar su contenido al espacio extracelular, en este caso hacia la orina. [23]. La identificación de estos componentes en orina ha abierto la posibilidad de estudiar la expresión y la actividad de las proteínas transportadoras de sodio presentes en la membrana apical del túbulo renal, sin necesidad de realizar una biopsia renal [23]

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La cirrosis hepática es una entidad crónica, acompañada de múltiples complicaciones que causan alta morbimortalidad. Entre estas complicaciones está la retención de sodio, con la posterior presentación de ascitis y edema periférico, lo que causa una disminución importante de la calidad de vida. Por lo que, el entendimiento preciso de los mecanismos fisiológicos de la retención de sodio, dará entrada a nuevas formas de prevención y tratamiento de la ascitis y edema en cirróticos.

Se ha demostrado claramente en modelos animales de cirrosis sin ascitis, la influencia que tiene la porción distal de la nefrona independiente de aldosterona, especialmente el asa de Henle y el transportador NKCC2 en la retención de sodio. Sin embargo no se ha demostrado en humanos de manera clara, debido a la complejidad que implica tomar muestras de tejidos humanos.

JUSTIFICACIÓN

El entendimiento de la fisiopatología en la retención de sodio en pacientes cirróticos sin ascitis, dará información nueva aun no documentada e impactará en el desarrollo de medidas dirigidas de prevención y tratamiento.

El estudio de exosomas en orina, abre la posibilidad de estudiar de manera objetiva la expresión de diferentes transportadores de la membrana apical sin necesidad de tomar una biopsia renal.

HIPÓTESIS

Primaria: La porción dependiente del asa de Henle principalmente la expresión de NKCC2, es el principal mecanismo de retención de sodio en pacientes cirróticos sin ascitis.

Secundaria: La expresión de transportadores de sodio del túbulo renal (NKCC2, NCC) es mayor en pacientes cirróticos sin ascitis que en controles sanos.

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Determinar el principal transportador de sodio involucrado en la retención de sodio en pacientes cirróticos sin ascitis.

Objetivos secundarios:

- Determinar la diferencia de expresión de NKCC2, NCC, y sus formas fosforiladas a través de la excreción de exosomas urinarios entre pacientes cirróticos sin ascitis y controles sanos.

PACIENTES Y MÉTODOS

Tipo de estudio (diseño general):

Estudio prospectivo, transversal, observacional, que determinará la diferencia de expresión de transportadores de sodio de la membrana apical en diferentes zonas de la nefrona, a través de la medición de exosomas urinarios en pacientes cirróticos sin ascitis de consulta externa del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y controles sanos voluntarios.

Criterios de inclusión:

Grupo cirrosis

- Diagnóstico de cirrosis hepática
- Aceptar participar en el estudio con firma del consentimiento informado.

Grupo control

- Paciente sano sin evidencia de cirrosis o algún otra condición hipervolémica (síndrome nefrótico, falla cardíaca)
- Voluntarios reclutados por los investigadores

Criterios de exclusión:

Grupo cirrosis

- Uso de diuréticos

- Uso de betabloqueadores
- Uso de antihipertensivos tipo IECA Y ARA II
- Evidencia de ascitis por ultrasonido
- Evidencia de edema periférico
- Historia de sangrado de tubo digestivo en los 3 meses previos
- Depuración de creatinina menor a 60 ml/min
- Otro estado hipervolémico asociado (falla cardiaca, síndrome nefrótico y falla renal)
- Consumo de cafeína o tabaco durante la toma de muestra.

Grupo control

- Los mismo mencionados para el grupo cirróticos

Criterios de eliminación

Grupo cirrosis

- Mal apego a la dieta
- Mal procesamiento de las muestras.
- Decisión del paciente de abandonar el estudio

Grupo control

- Los mismos mencionados para el grupo cirróticos
- Que al procesar los laboratorios mencionados se identifique alguna patología que lo excluya del estudio.

Metodología:

Se reclutó a 5 pacientes cirróticos sin ascitis o edema y 5 sujetos sanos pareados por edad y sexo. Todos los casos realizaron una dieta normocalórica y normosódica (1500 Calorías para mujeres y 2000 calorías para hombres y 2.5 gramos de sodio diarios) basada en equivalentes, durante 7 días. Se documentó el seguimiento adecuado de la dieta a través de una bitácora en la que se especificó alimentos consumidos durante toda la semana. Posteriormente cada sujeto control realizó exactamente la misma dieta que su caso correspondiente. Al final de la semana se tomó una muestra matutina de orina y suero a todos los casos y controles de la cual se obtuvo exosomas urinarios, osmolaridad urinaria, creatinina urinaria, electrolitos urinarios, osmolaridad sérica, creatinina sérica y electrolitos séricos.

Se definió como cirrosis de manera operacional de las siguientes tres maneras: biopsia compatible con cirrosis, F4 en fibroscan y por datos clínicos de hipertensión portal asociados con cambios crónicos por ultrasonido (bazo 13 mm o más, trombocitopenia < 100 000 y endoscopía con evidencia de varices esofágicas.

Para la extracción de exosomas urinarios se aplicó un inhibidor de proteasa a 30 ml de orina de cada muestra previo a su almacenamiento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente las muestras se sometieron a un proceso de centrifugación en 2 pasos. Primero se centrifugó a 17000 g durante 15 minutos con el objetivo de aislar en el precipitado membranas celulares y partículas de alta densidad. En el segundo paso el sobrenadante se sometió a ultracentrifugación a 200 000 g durante 120 minutos. El precipitado formado durante esta etapa se suspendió en una solución amortiguadora y se congeló a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

El precipitado obtenido por ultracentrifugación con exosomas urinarios se sometió a la técnica de Western-blot. Las proteínas se normalizaron utilizando creatinina urinaria y se cargaron en geles de acrilamida, posteriormente se realizó electroforesis de proteínas, transferencia de proteínas en membranas de nitrocelulosa, bloqueo de membranas con leche al 5% y exposición de las membranas durante 12 horas a anticuerpos primarios dirigidos a NCC, pNCC, NKCC2 y al estructural de exosomas TSG 101. Finalmente las membranas se expusieron al anticuerpo secundario y se revelaron para obtener imágenes de las proteínas de interés.

Todas las estimaciones estadísticas fueron realizadas utilizando el programa estadístico Prism versión 7 para MAC (Graphpad software Inc). Se estableció la normalidad de variables por medio de la prueba Shapiro-Wilk. Las variables con distribución normal fueron presentadas utilizando media y desviación estándar y las variables no distribuidas normalmente fueron presentadas en mediana y rango intercuartilar. Debido al tamaño de la muestra la comparación de variables continuas entre 2 grupos se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Para la comparación pareada de las variables continuas entre 2 grupos, se utilizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon. Se consideraron valores de $p < 0.05$ para significación estadística.

RESULTADOS

Se analizaron las características clínicas de 5 pacientes con cirrosis y 5 sujetos sanos (tabla 1). La mediana de edad en pacientes cirróticos fue de 54 (43-60) y la de los controles fue de 56 (41-58). De cada grupo se reclutaron 2 mujeres y 3 hombres. La causa de cirrosis en el grupo correspondiente fue de 4 casos de virus de hepatitis C y 1 caso de hepatitis autoinmune. Dos pacientes del grupo de cirrosis padecían diabetes mellitus y uno hepatocarcinoma, mientras que un paciente control padecía hipotiroidismo. Se comparó la cuenta de plaquetas entre los dos grupos con una media de 255 (57.85) para el grupo control y una media de 67.2 (26.9) para el grupo de cirrosis, con diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Tabla 1 Características de los 2 grupos		
	Controles (n=5)	Cirrosis (n=5)
Edad	56 (41-58) τ	54 (43-60) τ
Sexo		
- Mujeres	2	2
- Hombres	3	3
Causas de cirrosis		
- Virus de hepatitis C	-	4
- Hepatitis autoinmune	-	1
Comorbilidades		
- Diabetes mellitus	-	2
- Hepatocarcinoma	-	1
- Hipotiroidismo	1	-
Plaquetas	255.4 (57.85)	67.2 (26.9) *

Los datos están representados en media y desviación estándar (DE)
 τ Los datos están representados en mediana y rango intercuartilar
 * $p < 0.05$

Se analizaron las características bioquímicas de los 5 pacientes con cirrosis y 5 sujetos sanos (tabla 2 y tabla 3). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en creatinina, sodio, potasio, calcio y cloro sérico. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre pacientes cirróticos y controles con respecto a sodio, potasio, cloro y calcio urinario. Se realizaron cálculos para fracción excretada de sodio, gradiente transtubular de potasio y filtración glomerular sin encontrar diferencia estadística. A pesar de no documentar diferencia significativa entre los dos grupos con respecto a sodio y cloro urinario, existe una tendencia lógica hacia la alta en el grupo control (Figura 1). Con la finalidad de valorar otros mecanismos fisiopatológicos, se compararon los valores de osmolaridad urinaria y se calculó el gradiente transtubular de potasio sin encontrar tendencia o diferencia significativa (figura 2)

Figura 1. Sodio urinario y cloro urinario

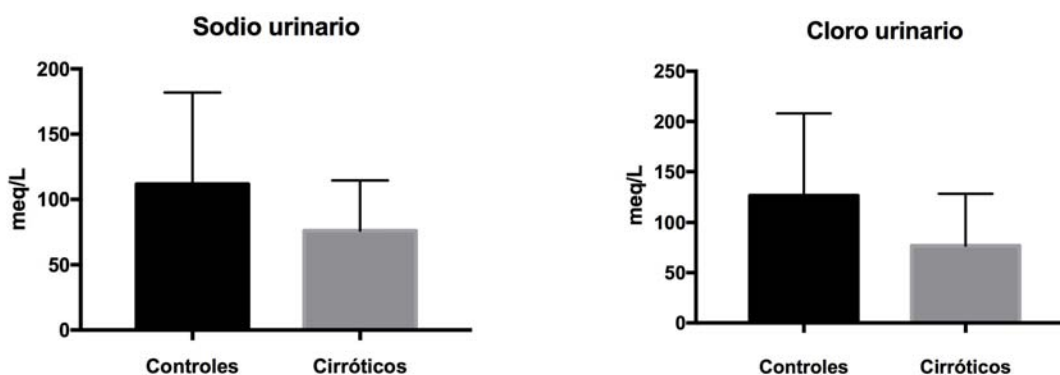


Tabla 2 Función renal y electrolitos séricos		
	Controles (n=5)	Cirrosis (n=5)
GFR	93 (5.33)	106.6 (17.6)
Creatinina mg/dl	0.87 (0.15)	0.68 (0.21)
Sodio mEq/L	138 (3.5)	137 (1.7)
Potasio mEq/L	4.43 (4.1-4.5) τ	4.15 (3.7-4.4) τ
Calcio mg/dl	9.52 (0.31)	9.28 (0.39)
Cloro mEq/L	102 (102-106) τ	106 (101-107) τ

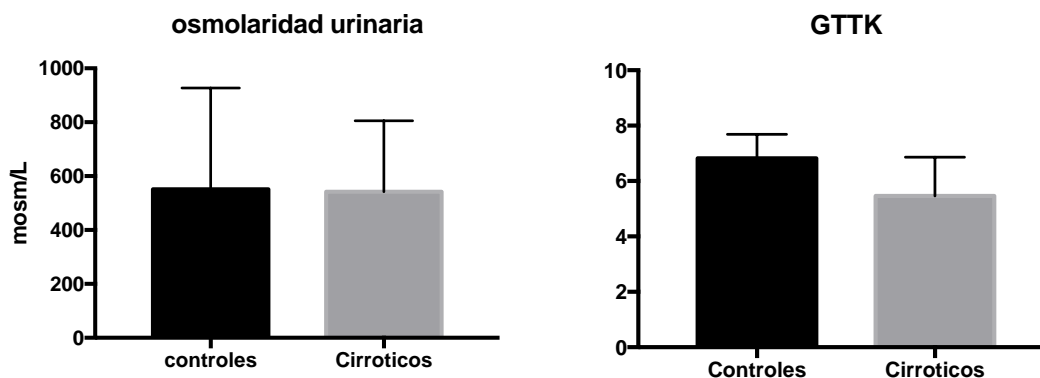
GFR, filtración glomerular, (CKD-EPI)
 Los datos están representados en media y desviación estándar (DE)
 τ Los datos están representados en mediana y rango intercuartilar
 * p < 0.05

Tabla 3 Electrolitos urinarios y gradientes		
	Controles (n=5)	Cirrosis (n=5)
Sodio mEq/l	117.2 (70.21)	76.1 (38.5)
Potasio mEq/l	50 (34.44)	34.7 (12.99)
Cloro mEq/l	126.2 (81.79)	77 (51.09)
Calcio mg/dl	11.8 (7.2)	15.9 (10.83)
GTTK	6.82 (0.86)	5.46 (1.4)
FeNa %	0.59 (0.37-0.89) τ	0.48 (0.28-0.5) τ

GTTK, gradiente transtubular de potasio
 FeNa, fracción excretada de sodio
 Los datos están representados en media y desviación estándar (DE)
 τ Los datos están representados en mediana y rango intercuartilar
 * p < 0.05

Figura 2. Osmolaridad urinaria y GTTK

□



Se analizaron las densitometrías para las placas obtenidas por Western blot de los transportadores de sodio NCC y NKCC2 para ambos grupos (figura 3). Se normalizaron para ambos transportadores los valores de densitometría con el marcador estructural de exosomas TSG 10. El valor de NCC fosforilado fue normalizado con el valor del NCC total, mientras que NKCC2 se muestra únicamente como el valor total. El NCC fosforilado presentó un cambio de 393% con respecto a los controles, sin encontrar una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.25$). El NKCC2 presentó un cambio del 388% con respecto a los controles, sin diferencias estadísticamente significativa ($p= 0.5$). A pesar de no documentar diferencia significativa entre los dos grupos con respecto a NCC Y NKCC2, existe una tendencia lógica hacia la alta en el grupo de los cirróticos (Figura 4).

Figura 3. NCC Y NKCC2

□

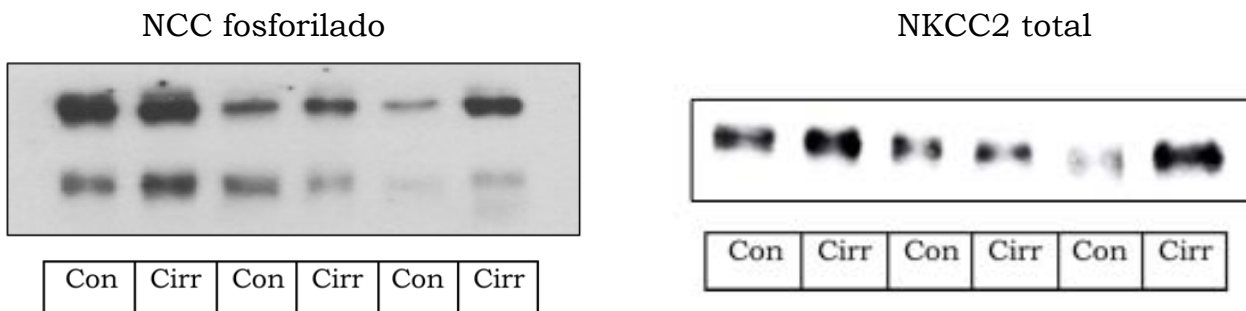
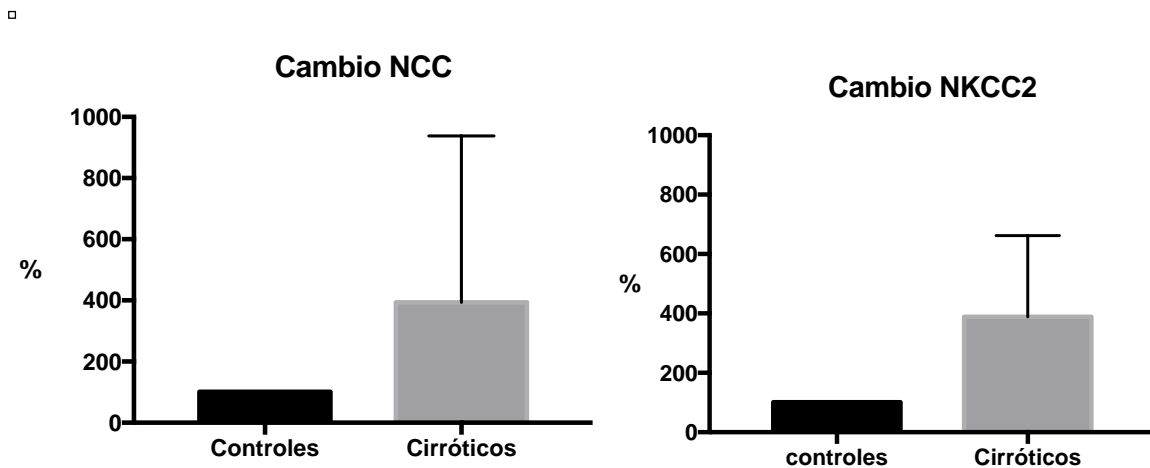


Figura 3. NCC Y NKCC2



DISCUSIÓN

En este estudio se describe un mecanismo fisiopatológico para la retención de sodio en pacientes cirróticos sin ascitis, es decir en una etapa temprana de la enfermedad. Este estudio fue un estudio piloto con una muestra pequeña, por lo que fue difícil encontrar diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo es clara la tendencia que tiene el grupo cirrótico sobre el grupo control con respecto a la presencia del transportador presente en el túbulo contornado distal NCC y el transportador presente en el asa de Henle NKCC2.

Esta misma tendencia se documentó en otros valores bioquímicos. La presencia de sodio y cloro urinario fue mayor en pacientes controles, lo que es congruente con el hallazgo de ambos transportadores .

Otras variables que pueden ser consideradas como mecanismos confusores para la retención de sodio y agua fueron comparadas sin encontrar diferencias o tendencias. La osmolaridad urinaria que es una medida indirecta de la actividad de la hormona antidiurética fue prácticamente igual para ambos grupos, lo cual podría sugerir que la participación de esta hormona es mínima o nula en esta etapa de la enfermedad. Por otro lado se calculó y comparó el gradiente transtubular de potasio como valor indirecto de la actividad mineralocorticoide y del sistema renina angiotensina aldosterona sin encontrar diferencia o tendencia, lo cual sugiere que la participación de este sistema en la retención de sodio es mínimo en esta etapa de la enfermedad.

El estudio tiene varias limitaciones: (i) El tamaño de la muestra es pequeño, lo que dificulta utilizar pruebas paramétricas para el análisis y encontrar diferencias significativas. (ii) En esta fase del estudio no fue posible medir la fosforilación de NKCC2 debido a complicaciones con el anticuerpo primario, tampoco fue posible medir otros marcadores propuestos en los objetivos como: concentración aldosterona, actividad plasmática de renina y PTH.

Es indispensable continuar con el estudio de manera completa con la muestra calculada de 30 pacientes por grupo para llegar a conclusiones válidas. Sin embargo este estudio piloto fue de gran ayuda para llegar a esta conclusión.

CONCLUSIONES

- No existe diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos con respecto a NCC Y NKCC2.
- Existe una tendencia franca y lógica hacia la alta de NCC y NKCC2 en pacientes cirróticos con respecto a los controles.
- No se demostró participación significativa de la hormona antidiurética
- No se demostró participación significativa del sistema renina angiotensina aldosterona
- Se requiere continuar con el estudio para aumentar la muestra y demostrar diferencias significativas.

REFERENCIAS

1. Møller S, Henriksen J, Bendtsen F. Extrahepatic complications to cirrhosis and portal hypertension: Haemodynamic and homeostatic aspects. *World J Gastroenterol* 2014; 20(42): 15499-15517.
2. Such J, Lindor KD, Travis AC, Runyon BA. Pathogenesis of ascites in patients with cirrhosis. *UpToDate* 2014.
3. Leiva JG, Salgado JM, Estradas J, Torre A, Uribe M. Pathophysiology of ascites and dilutional hyponatremia: Contemporary use of aquaretic agents. *Annals of Hepatology* 2007;6:214-221
4. Bernardi M, Santi L. Renal sodium retention in pre-ascitic cirrhosis: The more we know about the puzzle, the more it becomes intricate. *Journal of Hepatology* 2010; 53: 790–792.
5. Wong F, Liu P, Blendis L. The Mechanism of Improved Sodium Homeostasis of Low-Dose Losartan in Preascitic Cirrhosis. *Hepatology*, 2002;35: 1449-1458
6. Bernardi M, Di marco C, Trevisani F, Fornalt L, Andreone F, Cursaro C, Baraldini M, Ligabue A, Tame MA, Gasbarrini G. Renal Sodium Retention During Upright Posture in Preascitic Cirrhosis. *Gastroenterology* 1993; 105: 188-193.
7. Jimenez W, Martinez – Pardo A, Arroyo V, Bruix J, Rimola A, Gaya J, et al. Temporal relationship between hyperaldosteronism, sodium retention and ascitis formation in rats with experimental cirrhosis. *Hepatology* 1985;5: 245-250
8. Sansoe G, Ferrari A, Baraldi E, Castellana CN, De Santis MC, Manenti F. Renal distal tubular handling of sodium in central fluid volumen homeostasis in preascitic cirrhosis. *Gut* 1999; 45:750-755
9. García-Pagan JC, Salmeron JM, Feu F, Luca A, Gines P, Pizcueta P, et al. Effects of low-sodium diet and spironolactone on portal pressure in patients with compensated cirrhosis. *Hepatology* 1994;19:1095-1099
10. Bernardi M, Di marco C, Trevisani F, Fornalt L, Andreone F, Cursaro C, Baraldini M, Ligabue A, Tame MA, Gasbarrini G. Renal Sodium Retention During Upright Posture in Preascitic Cirrhosis. *Gastroenterology* 1993; 105: 188-193

11. Sansoè G, Biava AM, Silvano S, Ferrari A, Rosina F, Smedile A, Touscoz A, Bonardi L, Rizzetto M. Renal tubular events following passage from the supine to the standing position in patients with compensated liver cirrhosis: loss of tubuloglomerular feedback. *Gut* 2002;51:736–741
12. Girgrah N, Liu P, Collier J, Blendis L, Wong F. Haemodynamic, renal sodium handling, and neurohormonal effects of acute administration of low dose losartan, an angiotensin II receptor antagonist, in preascitic cirrhosis. *Gut* 2000;46:114–120
13. Wong F, Liu P, Blendis L. The Mechanism of Improved Sodium Homeostasis of Low-Dose Losartan in Preascitic Cirrhosis. *Hepatology*, 2002;35: 1449-1458
14. Rojas L et al. Increased phosphorylation of the renal Na CL cotransporter in male kidney transplant recipient patients with hypertension: a prospective cohort. *Am J physiology Renal Physiol* 2015; 1-7
15. Jonassen TEN, Marcussen N, Haugan T, Skyum H, Christensen S, Andreasen F, et al. Functional and structural changes in the thick ascending limb of Henle's loop in rats with liver cirrhosis. *Am J Physiol* 1997; 273:R68–R572.
16. Jonassen TEN, Sørensen AM, Petersen JS, Andreasen F, Christensen S. Increased natriuretic efficiency of Furosemide in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Hepatology* 2000; 31:1224–1230.
17. Sansoè G, Wong F. Natriuretic and aquaretic effects of intravenously infused calcium in preascitic human cirrhosis: physiopathological and clinical implications. *Gut* 2007; 56:1117–1123.
18. Sansoè G, Aragno M, Tomasinelli CE, Valfrè di Bonzo L, Wong F, Parola M. Calcium-dependent diuretic system in preascitic liver cirrhosis. *Journal of Hepatology* 2010; 53: 856–862.
19. Sansoè G, Mastrocola R, Aragno M, Parola M. Dynamics Of Sodium Retention In Preascitic Cirrhotic Rats Assessed Through Parathyroid Hormone Injection. *Journal Of Physiology And Pharmacology* 2014; 65:649-657.
20. Spahr CS, Davis MT, McGinley MD et al. Towards defining the urinary proteome using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Proteomics* 2001;1:93-107.
21. Thongboonkerd V, Klein JB, Arthur JM. Proteomic identification of a large complement of rat urinary proteins. *Nephron Exp Nephrol* 2003;95:e69-e78.
22. Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. Identificación and proteomic profiling of exosomes in human urine. *ProcNatlAcadSci USA* 2004;101:13368-13373.

23. Jacquillet G, Ewout JH, Vilasi A, Unwin RJ. Urinary vesicles: in splendid isolation. *Nephrol Dial Transplant* 2013; 1-4.
24. Garcia JA, Reding A, Lopez JC. Cálculo del tamaño de la muestra en investigación en educación médica. *Investigación en educación médica* 2013 ; 2(8):217-224